

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО МОЗ УКРАЇНИ

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО МОЗ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ШУЛЯК Наталія Степанівна

УДК 615.074:615.272.4:615.225.2:615.4]-092.4

ДИСЕРТАЦІЯ
РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК АНАЛІЗУ АТОРВАСТАТИНУ
ТА ЛІЗИНОПРИЛУ В ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ

226 «Фармація, промислова фармація»

22 «Охорона здоров'я»

Подається на здобуття ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Н. С. Шуляк

Науковий керівник: Логойда Лілія Святославівна, доктор фармацевтичних наук,
професор

Тернопіль – 2022

АНОТАЦІЯ

Шуляк Н.С. Розробка та валідація методик аналізу аторвастатину та лізиноприлу в лікарських засобах. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація» (22 «Охорона здоров'я»). – Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, 2022.

Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, 2023.

У дисертаційній роботі наведено експериментальне дослідження розробки спектрофотометричних і хроматографічних методик визначення аторвастатину та лізиноприлу в субстанціях та лікарських засобах.

Метою роботи була розробка експресних, простих у виконанні, доступних та валідованих спектрофотометричних і хроматографічних методик визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу в субстанціях та лікарських засобах.

Розроблено та валідовано УФ-спектрофотометричні методики визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу в моно-препаратах. Як впливає із спектральних кривих, УФ-спектри метанольного вилучення лізиноприлу та аторвастатину з бінарної суміші мають інтенсивно виражені смуги поглинання за довжини хвилі 212 нм, що унеможлиблює одночасне визначення аторвастатину та лізиноприлу із застосуванням методу УФ-спектрофотометрії.

Розроблено та валідовано спектрофотометричні методики кількісного визначення лізиноприлу у складі готових лікарських форм за нінгідриновою реакцією та реакцією з купруму (II) сульфатом. Лізиноприл взаємодіє з нінгідрином у нейтральному середовищі шляхом окисного дезамінування первинної аліфатичної аміногрупи залишку лізину, що міститься в молекулі лізиноприлу, з подальшою конденсацією відновленого нінгідрину з утворенням

забарвленого комплексу з λ_{max} за довжини хвилі 400 нм і 560 нм. Результати попередніх експериментів показали, що вищої чутливості можна було б досягти при λ_{max} за довжини хвилі 400 нм, що було обрано в наступних наших дослідженнях. Для вибору оптимальних умов реакції були проаналізовані різні параметри, такі як температура, час нагрівання, об'єм 0.2 % розчину нінгідрину. Встановлено, що оптимальною температурою нагрівання розчинів для отримання продукту реакції є (95 ± 2) °С. Час нагрівання 25 хв визнано оптимальним для утворення продукту реакції фіолетового кольору. Встановлено, що оптимальним об'ємом 0.2 % розчину нінгідрину є 1.1 мл. На наступному етапі експерименту, досліджено стабільність аналізованого розчину в часі. Встановлено, що досліджувані розчини є стабільними впродовж 45 хв. Молярний показник поглинання (ϵ) становив 2.24×10^3 , питома поглинання (a) – 6.02×10^{-1} , коефіцієнт Сендела (Ws) – 1.66×10^{-1} .

У нейтральному середовищі лізіноприл утворює з іонами Cu^{2+} синю комплексну сполуку з максимумом поглинання за довжини хвилі 730 нм. Стехіометричні співвідношення реагуючих компонентів «лізіноприл- купруму (II) сульфат» становлять 2:1, що підтверджено запропонованою схемою взаємодії лізіноприлу з купруму (II) сульфату. На наступному етапі експерименту, досліджено стабільність аналізованого розчину в часі. Встановлено, що випробовувані розчини є стабільними впродовж 45 хв. Молярний показник поглинання (ϵ) становив 0.13×10^3 , питома поглинання (a) – 3.08×10^{-3} , коефіцієнт Сендела (Ws) – 2.40×10^{-3} .

Нами апробовано різні сульфогталеїнові барвники з метою отримання неекстрактивного бінарного комплексу між аторвастатином кальцію та барвником на основі іонних асоціатів. При введенні аторвастатину кальцію до розчину бромтимолового синього (БТС) спостерігалось збільшення смуги поглинання однократно йонізованої форми барвника ($\lambda_{\text{max}} = 430$ нм) з одночасним зменшенням смуги поглинання двократно йонізованої форми барвника ($\lambda_{\text{max}} = 620$ нм). В органічних розчинниках положення цих форм дещо зміщене внаслідок сольватохромного ефекту. Нами розглянуто

можливість застосування методу диференціальної спектрофотометрії за реакцією з БТС із використанням максимуму поглинання продукту реакції за довжини хвилі 420 нм. Перед тим, як розпочати розробку спектрофотометричної методики визначення аторвастатину кальцію за реакцією з БТС, нами проведена оптимізація умов проведення з метою утворення кольорового комплексу іонного асоціату з максимальною стабільністю та чутливістю. Максимальне поглинання спостерігалось в розчині хлороформу та етилацетату з БТС, тоді як етанол, метанол та ацетонітрил були непридатними. Враховуючи принципи «зеленої хімії», ми не брали до уваги хлороформ як розчинник та обрали для подальших досліджень етилацетат. В процесі проведених експериментальних досліджень встановлено, що оптимальною концентрацією розчину БТС була концентрація 1.28×10^{-4} М. Встановлено, що випробовувані розчини стабільні впродовж 45 хв. Стехіометричні коефіцієнти реагуючих компонентів між аторвастатином кальцію та БТС визначали методом неперервних змін (метод Жоба) і методом насичення (метод молярних співвідношень). Встановлено, що стехіометричні співвідношення реагуючих компонентів «аторвастатин кальцію – БТС» становлять 1:1. Молярний показник поглинання (ϵ) становив 2.03×10^3 , питома поглинання (a) – 1.68×10^{-3} , коефіцієнт Сендела (W_s) – 0.09. При розрахуванні оцінки впливу екологічності аналітичної методики на навколишнє середовище з використання методу Analytical GREEnness (AGREE) отримано бал 0.76, оскільки в запропонованій методиці використовувався розчинник етилацетат. Тому ми продовжили дослідження з розробки більш екологічною методикою визначення аторвастатину в лікарських засобах. В процесі виконання експериментальної частини ми звернули увагу ще на один сульфоталеїновий барвник.

Нами розглянуто можливість застосування методу диференціальної спектрофотометрії за реакцією з бромфеноловим синім (БФС) із використанням максимуму поглинання продукту реакції за довжини хвилі 594 нм. Сульфоталеїнові барвники існують у розчині переважно у двох протонуваних

формах – монопротонованій, де протон відщеплюється від сульфогрупи, і в діаніонній формі, де другий протон відщеплюється від одного з фенольних гідроксилів. Для БФС ці форми поглинають у водному розчині при 437 нм (моноаніонна форма) і при 592 нм (діаніонна форма). У метанольному розчині переважає смуга моноаніонної форми БФС, а в присутності аторвастатину кислотно-лужний баланс барвника зміщується в бік двічі деіонізованої форми, оскільки з цією формою барвника аторвастатин утворює більш стійкі йонні асоціати. Максимальне поглинання спостерігалось в розчині метанолу та ацетонітрилу з БФС, тоді як етанол, хлороформ, ацетонітрил та етилацетат були непридатними. Тому для подальших досліджень нами обрано метанол. В процесі проведених експериментальних досліджень встановлено, що оптимальною концентрацією БФС була концентрація 4.12×10^{-4} М. Встановлено, що випробовувані розчини аторвастатину були стабільними впродовж 45 хв, що дало можливість працювати над подальшою розробкою аналітичної методики. Якщо стабільність йонних асоціатів низька, то додавання АФІ до барвника не повністю зміщує рівновагу і не весь доданий АФІ реагує. Стехіометричні коефіцієнти реагуючих компонентів між аторвастатином кальцію та БФС визначали методом неперервних змін (метод Жоба) і методом насичення (метод молярних співвідношень). Встановлено, що стехіометричні співвідношення реагуючих компонентів «аторвастатин кальцію – БФС» становлять 1:1. Молярний показник поглинання (ϵ) становив 1.71×10^4 , питома поглинання (a) – 1.42×10^{-2} , коефіцієнт Сендела (Ws) – 0.07.

Розроблені спектрофотометричні методики валідовано відповідно до вимог ДФУ та ІСН Q2 за наступними показниками: специфічність, лінійність, діапазон застосування, правильність, прецизійність та робастність.

Запропоновано хроматографічні умови та розроблено ВЕРХ-методику кількісного визначення аторвастатину кальцію та його домішок в таблетках. Метою цього дослідження була перевірка можливості застосування сучасної колонки 2.2 мкм на основі твердофазних частинок для розробки нової, оригінальної, простої, економічно доступної та експресної ВЕРХ-методици

одночасного визначення аторвастатину та його домішок з використанням менш токсичних та більш прозорих до УФ-променів компонентів в складі рухомої фази. Хроматографічні колонки Shim-Pack XR-ODS II (75 мм x 3 мм, 2.2 мкм) та Agilent Poroshell C₁₈ec (100 мм x 4.6 мм, 2.7 мкм) продемонстрували відмінні результати в розділенні аторвастатину та його домішок. Розроблена аналітична методика не тільки відповідає вимогам придатності системи, але й легко досягає необхідної чутливості для аналізу домішок, які наявні в низьких концентраціях аторвастатину в таблетках. Розроблена валідована методика визначення аторвастатину кальцію та його домішок в таблетках є екологічнішою за фармакопейну та всі інші раніше опубліковані методики визначення домішок аторвастатину кальцію, експресною для рутинних аналізів у лабораторіях контролю якості фармацевтичних компаній.

Враховуючи вище описані факти щодо неможливості кількісного одночасного визначення аторвастатину та лізіноприлу методом УФ-та видимої спектрофотометрії, обрано метод ВЕРХ для їх одночасного визначення. Відмінність фізико-хімічних властивостей між аторвастатином та лізіноприлом є основною перешкодою для їх одночасного визначення. Лізіноприл є гідрофільною молекулою (log P=-1.22, pKa 2.5, 4, 6.7 і 10.5), тоді як аторвастатин – гідрофобною (Log P 6.36, pKa 4.46). Ці факти виражаються надмірною різницею в їхніх утримуваннях і пікових симетриях на оборнено-фазових колонках. Пік лізіноприлу елююється близько до мертвого об'єму на отриманих хроматограмах, у той час як пік аторвастатину зберігається. Тому виникла потреба в розробці простих, економічних, експресних методик для одночасного аналізу цих двох АФІ.

Розроблено та валідовано хроматографічні методики визначення одночасного визначення аторвастатину кальцію та лізіноприлу в бінарній суміші та лікарських засобах з використанням хроматографічних колонок Purospher C₈ STAR, Zorbax C₈ Rx, LiChrosorb C₈, Waters Spherisorb ODS1. Запропоновано методологію щодо розробки ВЕРХ-методики одночасного кількісного визначення двох АФІ з значними відмінностями у фізико-хімічних

властивостях. Експериментальна робота щодо розробка ВЕРХ-методики мотивована використанням різних хаотропних аніонів як нового перспективного підходу для обмежень з використання іонно-парних реагентів. Використання хаотропних речовин виявилось незамінним для розробки еспресних кількісних методик, які можуть використовуватися в наукових цілях хіміками-аналітиками при здійсненні контролю якості лікарських засобів. Вказані результати підтверджують, що розроблена хроматографічна методика одночасного кількісного визначення гідрофільного лізіноприлу та гідрофобного аторвастатину в лікарських засобах є простою, експресною, точною та з дотриманням принципів «зеленої хімії».

Розроблені ВЕРХ-методики були валідовані відповідно до вимог ДФУ та ІСН Q2 за наступними показниками: специфічність, лінійність, діапазон застосування, правильність, прецизійність та робастність.

За допомогою аналітичної еко-шкали та методу AGREE встановлено, що всі запропоновані аналітичні методики визначення лізіноприлу та аторвастатину в субстанції і лікарських засобах є відмінними у відповідності до принципів «зеленої хімії».

Одним із важливих аспектів розробки лікарських засобів є вивчення біодоступності та біоеквівалентності. Беззаперечно актуальним залишається розробка аналітичних методик визначення АФІ в лікарських засобах для вивчення проникності через кишкову мембрану та тесту «Розчинення», у випадку проведення еквівалентності *in vitro*. Для аторвастатину та лізіноприлу – це складне завдання, оскільки АФІ мають різні фізико-хімічні властивості. Запропоновано аналітичну методику кількісного визначення лізіноприлу та аторвастатину для вивчення проникності через кишкову мембрану (тест Сасо-2). Випробувані субстанції лізіноприлу та аторвастатину в тест-системі Сасо-2 виявляють низьку проникність. Розроблена аналітична методика визначення лізіноприлу та аторвастатину для вивчення проникності через кишкову мембрану (тест Сасо-2) є простою та експресною.

Результати тесту «Розчинення» свідчать про якість лікарського засобу та про його біодоступність *in vitro*. Враховуючи той факт, що як альтернативні можуть застосовуватися спектрофотометричні методики, проведено трансфер розроблених нами аналітичних методик визначення лізиноприлу та аторвастатину. В результаті проведеного дослідження можна зробити висновок, що розроблені спектрофотометричні методики визначення лізиноприлу та аторвастатину у таблетках для застосування з метою проведення тесту «Розчинення» є коректними, експресними та доступними.

Новизна розробок підтверджена патентами України на корисну модель.

Ключові слова: аналіз, антигіпертензивні лікарські засоби, аторвастатин, біоеквівалентність, валідація, вискоєфективна рідинна хроматографія, домішки, лізиноприл, реагент, Сасо-2, спектрофотометрія, спектроскопія, фіксована комбінація.

ANNOTATION

Shulyak N.S. Development and Validation of Methods for the Analysis of Atorvastatin and Lisinopril in Medicinal Products. – Qualifying scientific work with manuscript rights.

Dissertation for obtaining the degree of Doctor of Philosophy in specialty 226 “Pharmacy, Industrial Pharmacy” (22 “Healthcare”). – I.Ya. Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Healthcare of Ukraine, 2022.

I.Ya. Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Healthcare of Ukraine, Ternopil, 2023.

The thesis presents an experimental study of the development of spectrophotometric and chromatographic methods for the determination of atorvastatin and lisinopril in substances and medicinal products.

The aim of work was the development of express, easy to perform, available and validated spectrophotometric and chromatographic methods for the determination of atorvastatin calcium and lisinopril in substances and medicinal products.

UV-spectrophotometric methods for the determination of atorvastatin calcium and lisinopril in mono-preparations have been developed and validated. As can be seen from the spectral curves, the UV spectra of the methanol extraction of lisinopril and atorvastatin from the binary mixture have intensely pronounced absorbance bands at a wavelength of 212 nm, which makes it impossible to simultaneously determine atorvastatin and lisinopril using the UV-spectrophotometric method.

Spectrophotometric methods for the quantitative determination of lisinopril in the composition of ready-made dosage forms by the ninhydrin reaction and the reaction with copper (II) sulfate have been developed and validated. Lisinopril interacts with ninhydrin in a neutral medium by oxidative deamination of the primary aliphatic amino group of the lysine residue contained in the lisinopril molecule, followed by condensation of reduced ninhydrin with the formation of a colored complex with λ max at wavelengths of 400 nm and 560 nm. The results of previous experiments showed that a higher sensitivity could be achieved at λ max at a wavelength of 400 nm, which was chosen in our subsequent studies. Various parameters, such as temperature, heating time, volume of 0.2 % ninhydrin solution have been analyzed to select optimal reaction conditions. It has been established that the optimal temperature of heating the solutions for obtaining the reaction product is (95 ± 2) °C. A heating time of 25 minutes has been found to be optimal for the formation of a purple reaction product. It has been established that the optimal volume of 0.2 % ninhydrin solution is 1.1 ml. At the next stage of the experiment, the stability of the analyzed solution over time has been investigated. It has been established that the investigated solutions are stable for 45 minutes. The molar absorption index (ϵ) has been 2.24×10^3 , the specific absorption (a) – 6.02×10^{-1} , and the Sendel coefficient (Ws) – 1.66×10^{-1} .

In a neutral medium lisinopril forms with ions of Cu^{2+} a blue complex compound with an absorbance maximum at a wavelength of 730 nm. The stoichiometric ratio of the reacting components “lisinopril-copper (II) sulfate” is 2:1, which is confirmed by the proposed interaction scheme of lisinopril with copper (II) sulfate. At the next stage of the experiment, the stability of the analyzed solution over

time has been investigated. It has been established that the tested solutions are stable for 45 minutes. The molar absorption index (ϵ) has been 0.13×10^3 , the specific absorption (a) – 3.08×10^{-3} , and the Sendel coefficient (W_s) – 2.40×10^{-3} .

We have tested various sulfophthalein dyes in order to obtain a non-extractable binary complex between atorvastatin calcium and a dye based on ion associates. When atorvastatin calcium has been added to the solution of bromothymol blue (BTB), an increase in the absorbance band of the singly ionized form of the dye ($\lambda_{\max} = 430$ nm) has been observed with a simultaneous decrease in the absorbance band of the doubly ionized form of the dye ($\lambda_{\max} = 620$ nm). In organic solvents, the position of these forms is slightly shifted due to the solvatochromic effect. We have considered the possibility of applying the method of differential spectrophotometry based on the reaction with BTB using the maximum absorbance of the reaction product at a wavelength of 420 nm. Before starting the development of a spectrophotometric method for the determination of atorvastatin calcium by reaction with BTB, we optimized the conditions for the formation of a colored complex of the ion associate with maximum stability and sensitivity. Maximum absorbance has been observed in chloroform and ethyl acetate solution with BTB, while ethanol, methanol and acetonitrile have been unusable. Considering the principles of «green chemistry», we have not considered chloroform as a solvent and chose ethyl acetate for further studies. In the course of experimental studies, it has been established that the optimal concentration of BTB solution has been 1.28×10^{-4} M. It has been established that the tested solutions are stable for 45 minutes. The stoichiometric coefficients of the reacting components between atorvastatin calcium and BTB have been determined by the method of continuous changes (Job's plot) and the saturation method (the method of molar ratios). It has been established that the stoichiometric ratios of the reacting components “atorvastatin calcium – BTB” are 1:1. The molar absorption index (ϵ) has been 2.03×10^3 , the specific absorption (a) – 1.68×10^{-3} , and the Sendel coefficient (W_s) – 0.09. When calculating the assessment of ecological impact of the analytical technique on the environment using the Analytical GREENness (AGREE) method, we obtained a score of 0.76, since the solvent ethyl acetate has been used in

the proposed method. Therefore, we continued research on the development of a more ecologically clean method of determining atorvastatin in medicinal products. In the process of performing the experimental part, we have paid attention to one more sulfophthalein dye.

We have considered the possibility of applying the method of differential spectrophotometry by reaction with bromophenol blue (BPB) using the maximum absorbance of the reaction product at a wavelength of 594 nm. Sulfophthalein dyes exist in solution mainly in two protonated forms – monoprotonated, where a proton is detached from the sulfo group, and in a dianionic form, where the second proton is detached from one of the phenolic hydroxyls. For BPB, these forms absorb in aqueous solution at 437 nm (monoanionic form) and at 592 nm (dianionic form). In the methanol solution, the band of the monoanionic form of BPB predominates, and in the presence of atorvastatin, the acid-base balance of the dye shifts towards the doubly deionized form, since atorvastatin forms more stable ionic associates with this form of the dye. Maximum absorbance has been observed in methanol and acetonitrile solution with BPB, while ethanol, chloroform, acetonitrile and ethyl acetate have been unusable. Therefore, we chose methanol for further research. In the course of experimental studies, it has been established that the optimal concentration of BPB has been a concentration of 4.12×10^{-4} M. It has been established that the tested atorvastatin solutions have been stable for 45 minutes, which gave us the opportunity to work on the further development of the analytical methodology. If the stability of the ionic associates is low, then the addition of API to the dye does not completely shift the equilibrium and not all of the added API reacts. The stoichiometric coefficients of the reacting components between atorvastatin calcium and BPB have been determined by the method of continuous changes (Job's plot) and the saturation method (the method of molar ratios). It has been established that the stoichiometric ratio of the reacting components "atorvastatin calcium – BPB" is 1:1. The molar absorption index (ϵ) has been 1.71×10^4 , the specific absorption (a) – 1.42×10^{-2} , and the Sendel coefficient (Ws) – 0.07.

The developed spectrophotometric methods have been validated in accordance with the requirements of SPhU and ICH Q2 according to the following indicators: specificity, linearity, range of application, accuracy, precision and robustness.

Chromatographic conditions have been proposed and HPLC method has been developed for the quantitative determination of atorvastatin calcium and its impurities in tablets. The purpose of this study has been to verify the possibility of using a modern 2.2 μm column based on solid-phase particles for the development of a new, original, simple, economically available and express HPLC method for the determination of atorvastatin and its impurities using less toxic and more transparent to UV rays components as part of the mobile phase. Chromatographic columns Shim-Pack XR-ODS II (75 mm x 3 mm, 2.2 μm) and Agilent Poroshell C₁₈ec (100 mm x 4.6 mm, 2.7 μm) have demonstrated excellent results in the separation of atorvastatin and its impurities. The developed analytical technique not only meets the system suitability requirements, but also easily achieves the required sensitivity for the analysis of impurities that are present in low concentrations of atorvastatin in tablets. The developed validated method for determining atorvastatin calcium and its impurities in tablets is more environmentally friendly than the pharmacopoeia and all other previously published methods for determining atorvastatin calcium impurities, express for routine analyzes in quality control laboratories of pharmaceutical companies.

Taking into account the facts described above regarding the impossibility of simultaneous quantitative determination of atorvastatin and lisinopril by the method of UV- and visible spectrophotometry, we have chosen the HPLC method for their simultaneous determination. The difference in physicochemical properties between atorvastatin and lisinopril is the main obstacle to their simultaneous determination. Lisinopril is a hydrophilic molecule ($\log P = -1.22$, pKa 2.5, 4, 6.7 and 10.5), while atorvastatin is hydrophobic (Log P 6.36, pKa 4.46). These facts are expressed by the excessive difference in their retention and peak symmetries on reversed-phase columns. The lisinopril peak has eluted very close to the dead volume in the resulting chromatograms, while the atorvastatin peak has been retained. Therefore, there has

been a need to develop simple, economic, express methods for the simultaneous analysis of these two APIs.

Chromatographic methods for the simultaneous determination of atorvastatin calcium and lisinopril in a binary mixture and medicinal products using Purospher C₈ STAR, Zorbax C₈ Rx, LiChrosorb C₈, Waters Spherisorb ODS1 chromatographic columns have been developed and validated. A methodology for the development of HPLC method for the simultaneous quantitative determination of two APIs with significant differences in physicochemical properties is proposed. Experimental work on the development of HPLC method has been motivated by the use of various chaotropic anions as a new promising approach to limitations in the use of ion-pair reagents. The use of chaotropic substances have turned out to be indispensable for the development of express quantitative methods that can be used for scientific purposes by analytical chemists in the implementation of quality control of medicinal products. These results confirm that the developed chromatographic technique for the simultaneous quantitative determination of hydrophilic lisinopril and hydrophobic atorvastatin in medicinal products is simple, rapid, accurate and in compliance with the principles of «green chemistry».

The developed HPLC methods have been validated in accordance with the requirements of SPhU and ICH Q2 according to the following indicators: specificity, linearity, range of application, accuracy, precision and robustness.

With the help of the analytical eco-scale and the AGREE method, it has been established that all proposed analytical methods for the determination of lisinopril and atorvastatin in substances and medicinal products are excellent in accordance with the principles of «green chemistry».

One of the important aspects of drug development is the study of bioavailability and bioequivalence. The development of analytical methods for the determination of APIs in medicinal products for the study of permeability through the intestinal membrane and the “Dissolution” test in the case of *in vitro* equivalence remains undeniably relevant. For atorvastatin and lisinopril, this is a difficult task, since APIs have different physicochemical properties. We have proposed an

analytical method for the quantitative determination of lisinopril and atorvastatin to study permeability through the intestinal membrane (Caco-2 test). The tested substances of lisinopril and atorvastatin in the Caco-2 test system show low permeability. The developed analytical method for determining lisinopril and atorvastatin for the study of permeability through the intestinal membrane (Caco-2 test) is simple and rapid.

The results of the “Dissolution” test indicate the quality of the medicinal product and its bioavailability *in vitro*. Taking into account the fact that spectrophotometric methods can be used as alternatives, we have transferred analytical methods for the determination of lisinopril and atorvastatin. As a result of the conducted research, it can be concluded that the developed spectrophotometric methods for the determination of lisinopril and atorvastatin in tablets for use in order to conduct the “Dissolution” test are correct, express and available.

Novelty of developments is confirmed by patents of Ukraine for a useful model.

Key words: analysis, antihypertensive drugs, atorvastatin, bioequivalence, validation, high-performance liquid chromatography, impurities, lisinopril, reagent, Caco-2, spectrophotometry, spectroscopy, fixed combination.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні результати дисертації:

1. Shulyak N, Piponski M, Kovalenko S, Stoimenova TB, Balkanov T, El-Subbagh HI, Drapak I, Omotosho JO, Logoyda L. Development of a Novel, Fast, Simple HPLC method for determination of atorvastatin and its impurities in tablets. *Scientia Pharmaceutica*. 2021;89(2):1-16. **(SCOPUS)** *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні статті).*

2. Shulyak N, Protsyk S, Kucher T, Kryskiw L, Poliak O, Zarivna N, Logoyda L. Development of the spectrophotometric method for the determination of

atorvastatin in tablets by using bromothymol blue. ScienceRise: Pharmaceutical Science. 2022;4(38):89-97. **(SCOPUS)** *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні статті).*

3. Shulyak N, Piponski M, Kovalenko S, Bakovska Stoimenova T, Drapak I, Piponska M, Rezk MR, Abbeyquaye AD, Oleshchuk O, Logoyda L. Chaotropic salts impact in HPLC approaches for simultaneous analysis of hydrophilic and lipophilic drugs. Journal of Separation Science. 2021;44(15):2908-16. **(SCOPUS)** *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні статті).*

4. Shulyak N, Budzivula K, Kucher T, Kryskiw L, Poliak O, Logoyda L. Spectrophotometric methods for the determination of lisinopril in medicines. Pharmacia. 2021;68(4):811-8. **(SCOPUS)** *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні статті).*

5. Shulyak N, Liushuk K, Semeniuk O, Yarema N, Uglyar T, Popovych D, Sverstiuk A, Ciciura R, Logoyda L. Study of the dissolution kinetics of drugs in solid dosage form with lisinopril and atorvastatin and intestinal permeability to assess their equivalence *in vitro*. Pharmacia. 2022;69(1):61-7. **(SCOPUS)** *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні статті).*

6. Shulyak N, Protsyk S, Kucher T, Kryskiw L, Poliak O, Mosula L, Logoyda L. Development of the Spectrophotometric Method for the Determination of Atorvastatin Calcium in Tablets by using Bromophenol Blue. Methods and objects of chemical analysis. 2022;17(3):111-7. **(SCOPUS)** *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні статті).*

7. Шуляк НС, Процик СА, Кучер ТВ, Криськів ЛС. Розробка спектрофотометричної методики визначення аторвастатину в таблетках. Медична та клінічна хімія. 2021;23(4):103-10. *(Особистий внесок –*

брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні статті).

8. Шуляк НС, Будзівула КВ, Криськів ЛС, Кучер ТВ. Розробка спектрофотометричної методики визначення лізиноприлу в таблетках. Львівський медичний часопис. 2022;28(1-2):104-17. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні статті).*

9. Шуляк НС, Логойда ЛС, винахідники; Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського, патентовласник. Спосіб хроматографічного визначення аторвастатину та лізиноприлу в лікарських засобах (Метод І). Патент України № 147999. 2021 черв. 24. *(Особистий внесок – брала участь в патентному пошуку, плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні заявки на патент).*

10. Шуляк НС, Логойда ЛС, винахідники; Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського, патентовласник. Спосіб хроматографічного визначення аторвастатину та лізиноприлу в лікарських засобах (Метод ІІ). Патент України № 148078. 2021 лип. 01. *(Особистий внесок – брала участь в патентному пошуку, плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні заявки на патент).*

11. Шуляк НС, Логойда ЛС, винахідники; Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського, патентовласник. Спосіб хроматографічного визначення аторвастатину та лізиноприлу в лікарських засобах (Метод ІІІ). Патент України № 147998. 2021 черв. 24. *(Особистий внесок – брала участь в патентному пошуку, плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні заявки на патент).*

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

12. Shulyak N, Kucher T, Kryskiw L, Poliak O, Logoyda L. Spectrophotometric methods for the determination of lisinopril in dosage forms. В:

Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присв. 100-річчю Національного фармацевтичного університету, Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи; 2021 верес. 10; Харків. Харків; 2021. с. 277-8. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні тез).*

13. Shulyak NS, Budzivula KV, Kryskiw LS, Kucher TV, Logoyda LS. Validation of new spectrophotometric method for determination of lisinopril with ninhydrin in tablets. В: Матеріали II міжнар. наук.-практ. дистанційної конф., присв. 80-річчю з дня народження професора В.В. Болотова, Сучасні аспекти створення лікарських засобів; 2022 лют. 1; Харків. Харків; 2021. с. 50. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні тез).*

14. Budzivula K, Shulyak N, Kryskiw L, Kucher T. Development and validation of new spectrophotometric procedure for determination of atorvastatin in tablets. В: Матеріали XXVI Міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених; 2022 квіт. 13-15; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2022. с. 138. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні тез).*

15. Shulyak N, Kovalenko S, Logoyda L. Development HPLC method for the quantification of atorvastatin and its impurities in tablets. В: Матеріали VIII наук.-практ. конф. з міжнар. участю Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів; 2020 верес. 23-24; Тернопіль. Тернопіль; 2020. с. 139-40. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні тез).*

16. Shulyak N, Joy Omotosho O, Donkor Abbeyquaye A, Piponski M, Logoyda L. Novel HPLC method for quantification of atorvastatin and its impurities in tablets on different chromatographic columns. In: 18th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry; 2021 Feb 25-27; Athens. Athens; 2021. с. 20. *(Особистий*

внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні тез, презентації постерної доповіді).

17. Shulyak N, Logoyda L. Comparative study for several HPLC approaches for the simultaneous analysis of hydrophilic and lipophilic drugs. В: Матеріали міжнар. наук.-практ. симп., присв. 100-річчю кафедри фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету, 100 років успіху та якості; 2021 жовт. 18; Харків. Харків; 2021. с. 77. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні тез).*

18. Peleshok K, Shulyak N, Adaeze EA, Donkor AA, Oluwatobiloba JO, Fatma AM, Obianuju FE, Agyemang FS. Analytical support of innovative pharmaceutical development of antihypertensive drugs. In: Матеріали III міжнародної науково-практичної конференції Scientific community: interdisciplinary research; 2021 March 16-18; Hamburg. Busse Verlag GmbH; 2021. р. 364-8. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні тез).*

19. Peleshok K, Shulyak N, Joy OO, Donkor AA, Abdelmalek MF, Obianuju EF, Adaeze AE, Agyemang SF. Validation of analytical methods for quantification of different antihypertensive active pharmaceutical ingredients in dosage forms. В: Матеріали XXV міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених; 2021 квіт. 12-14; Тернопіль. Тернопіль; 2021. с. 206-7. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні тез).*

20. Shulyak N, Budzivula K, Kucher T, Kryskiw L. Development and validation of new spectrophotometric procedure for determination of lisinopril in tablets. В: Матеріали VIII наук.-практ. конф. з міжнар. участю, «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів»; 2022 верес. 22-23; Тернопіль. Тернопіль; 2022. с. 96-7. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні тез).*

21. Shulyak N, Protsyk S, Kucher T, Kryskiw L, Poliak O, Logoyda L. Development of the spectrophotometric method for the determination of atorvastatin calcium in tablets by using bromophenol blue. In: 12th International Pharmacy Conference Contemporary Pharmacy: Issues Challenges and Expectations 2022 autumn; 2022 octob. 21; Kaunas. Kaunas; 2022. p. 49. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні тез).*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	26
ВСТУП	27
РОЗДІЛ 1 АНАЛІЗ ІСНУЮЧИХ ПІДХОДІВ ЩОДО РОЗРОБКИ ТА ВАЛІДАЦІЇ МЕТОДІВ АНАЛІЗУ АТОРВАСТАТИНУ ТА ЛІЗИНОПРИЛУ В СУБСТАНЦІЯХ ТА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	35
1.1 Загальна характеристика аторвастатину кальцію та лізиноприлу	35
1.2 Огляд методик контролю якості АФІ та лікарських засобів з аторвастатином кальцію	36
1.3 Огляд методик аналізу домішок аторвастатину кальцію	43
1.4 Огляд методик контролю якості АФІ та лікарських засобів з лізиноприлом	46
1.5 Огляд аналітичних методик одночасного визначення аторвастатину та лізиноприлу в лікарських засобах	54
Висновки до розділу 1	55
РОЗДІЛ 2 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ОБ’ЄКТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА МОДЕЛЮВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ	57
2.1 Фізико-хімічні властивості об’єктів дослідження	61
2.2 Характеристика методик дослідження	63
2.2.1 УФ-спектрофотометрична методика визначення лізиноприлу в лікарських засобах	63
2.2.2 Спектрофотометрична методика визначення лізиноприлу в субстанції та лікарських засобах за нінгідриновою реакцією	64

2.2.3	Спектрофотометрична методика визначення лізиноприлу в субстанції та лікарських засобах за реакцією з купруму (II) сульфатом	65
2.2.4	УФ-спектрофотометрична методика визначення аторвастатину кальцію в лікарських засобах	66
2.2.5	Спектрофотометрична методика визначення аторвастатину кальцію в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромтимоловим синім	67
2.2.6	Спектрофотометрична методика визначення аторвастатину кальцію в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромфеноловим синім	68
2.2.7	ВЕРХ-методика кількісного визначення аторвастатину кальцію та його домішок у субстанції та лікарських засобах	69
2.2.8	ВЕРХ-методика одночасного кількісного визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу в бінарній суміші та лікарських засобах	70
2.2.9	ВЕРХ-методики кількісного визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу для застосування в дослідженнях на моделях <i>in vitro</i> (тест Сасо-2)	72
2.2.10	Методики кількісного визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу для проведення тесту «Розчинення»	80
РОЗДІЛ 3	РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИХ МЕТОДИК ВИЗНАЧЕННЯ АТОРВАСТАТИНУ КАЛЬЦІЮ ТА ЛІЗИНОПРИЛУ В СУБСТАНЦІЯХ ТА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ	81

3.1 Розробка та валідація УФ-спектрофотометричної методики визначення лізиноприлу в лікарських засобах	81
3.1.1 Специфічність методики	82
3.1.2 Лінійність, діапазон застосування методики	83
3.1.3 Правильність та прецизійність методики	84
3.1.4 Прогноз повної невизначеності методики	86
3.1.5 Робасність методики	88
3.1.6 Розрахування оцінки впливу аналітичної методики на навколишнє середовище	88
3.2 Розробка та валідація спектрофотометричної методики визначення лізиноприлу в субстанції та лікарських засобах за нінгідриноювою реакцією	90
3.2.1 Специфічність методики	94
3.2.2 Лінійність, діапазон застосування методики	95
3.2.3 Правильність та прецизійність методики	95
3.2.4 Прогноз повної невизначеності методики	98
3.2.5 Робасність методики	101
3.2.6 Розрахування оцінки впливу аналітичної методики на навколишнє середовище	101
3.3 Розробка та валідація спектрофотометричної методики визначення лізиноприлу в субстанції та лікарських засобах за реакцією з купруму (II) сульфатом	103
3.3.1 Специфічність методики	106
3.3.2 Лінійність, діапазон застосування методики	107
3.3.3 Правильність та прецизійність методики	108
3.3.4 Прогноз повної невизначеності методики	110
3.3.5 Робасність методики	113

3.3.6 Розрахування оцінки впливу аналітичної методики на навколишнє середовище	113
3.4 Розробка та валідація УФ-спектрофотометричної методики визначення аторвастатину кальцію в лікарських засобах	115
3.4.1 Специфічність методики	116
3.4.2 Лінійність, діапазон застосування методики	117
3.4.3 Правильність та прецизійність методики	118
3.4.4 Прогноз повної невизначеності методики	120
3.4.5 Робасність методики	122
3.4.6 Розрахування оцінки впливу аналітичної методики на навколишнє середовище	123
3.5 Розробка та валідація спектрофотометричної методики визначення аторвастатину кальцію в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромтимоловим синім	126
3.5.1 Специфічність методики	132
3.5.2 Лінійність, діапазон застосування методики	133
3.5.3 Правильність та прецизійність методики	133
3.5.4 Прогноз повної невизначеності методики	136
3.5.5 Робасність методики	138
3.5.6 Розрахування оцінки впливу аналітичної методики на навколишнє середовище	139
3.6 Розробка та валідація спектрофотометричної методики визначення аторвастатину кальцію в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромфеноловим синім	141
3.6.1 Специфічність методики	146
3.6.2 Лінійність, діапазон застосування методики	147
3.6.3 Правильність та прецизійність методики	147

3.6.4	Прогноз повної невизначеності методики	150
3.6.5	Робасність методики	152
3.6.6	Розрахування оцінки впливу аналітичної методики на навколишнє середовище	153
	Висновки до розділу 3	156
РОЗДІЛ 4	РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ ХРОМАТОГРАФІЧНИХ МЕТОДИК ВИЗНАЧЕННЯ АТОРВАСТАТИНУ КАЛЬЦІЮ ТА ЛІЗИНОПРИЛУ В СУБСТАНЦІЯХ ТА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ	158
4.1	Розробка ВЕРХ-методики кількісного визначення аторвастатину кальцію та його домішок у субстанції та лікарських засобах	158
4.1.1	Валідація аналітичної методики	168
4.1.2	Розрахування оцінки впливу аналітичної методики на навколишнє середовище	171
4.2	Розробка та валідація ВЕРХ-методики одночасного кількісного визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу в бінарній суміші та лікарських засобах	173
4.2.1	Специфічність методики	181
4.2.2	Лінійність, діапазон застосування методики	183
4.2.3	Правильність та прецизійність методики	185
4.2.4	Прогноз повної невизначеності методики	188
4.2.5	Робасність методики	190
4.2.6	Розрахування оцінки впливу аналітичної методики на навколишнє середовище	191
	Висновки до розділу 4	193
РОЗДІЛ 5	РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АТОРВАСТАТИНУ КАЛЬЦІЮ ТА ЛІЗИНОПРИЛУ ДЛЯ ОЦІНКИ ЕКВІВАЛЕНТНОСТІ <i>IN VITRO</i>	195

5.1 Розробка методик визначення аторвастатину кальцію та лізіноприлу для вивчення проникності через кишкову мембрану	195
5.2 Розробка та валідація методик кількісного визначення аторвастатину кальцію та лізіноприлу для застосування в тесті «Розчинення»	199
Висновки до розділу 5	205
ВИСНОВКИ	206
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	209
ДОДАТКИ	230

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФІ	– активний фармацевтичний інгредієнт
БСК	– біофармацевтична система класифікації
ВЕРХ/МС/МС	– високоефективна рідинна хроматографія з подвійним мас-спектрометричним детектуванням
ВЕРХ/УФ	– високоефективна рідинна хроматографія з УФ детектуванням
ДМД	- діодно-матричне детектування
ДФУ	– Державна Фармакопея України
ЄФ	– Європейська Фармакопея
ЛЗ	– лікарський засіб
ЛФ	– лікарська форма
МВ	– межа виявлення
МКВ	– межа кількісного визначення
МКЯ	– методи контролю якості
ТШХ	– тонкошарова хроматографія
УФ	– ультрафіолетовий
ФСЗ	– фармакопейний стандартний зразок
ANOVA	– analysis of Variance (дисперсійний аналіз)
CV	– коефіцієнт варіації (coefficient of variation)
ICH	– Міжнародна конференція з гармонізації технічних вимог до реєстрації лікарських препаратів для людини (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)
RSD	– відносне стандартне відхилення (Relative Standard Deviation)
T	– критерій Стьюдента
x, y	– поточні координати в рівнянні лінійної залежності

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Артеріальна гіпертензія та ішемічна хвороба серця – найпоширеніші захворювання, які супроводжується високою смертністю серед осіб працездатного віку та їх інвалідністю від серцево-судинних і цереброваскулярних захворювань. Причиною артеріальної гіпертензії та ішемічної хвороби серця у більшості випадків є гіперхолестеринемія. Тому з метою лікування та профілактики в більшості схем фармакотерапії застосовують антиатеросклеротичні лікарські засоби (ЛЗ). Маючи високий клас рекомендацій та рівень доказовості, високу ефективність для первинної та вторинної профілактики ішемічної хвороби серця, статини широко використовуються у клінічній практиці. Тому інноваційна фармацевтична розробка різних антигіпертензивних засобів зі статинами та створення вітчизняних фіксованих комбінацій ЛЗ з різнонаправленою дією є актуальним завданням сучасної фармації, що підвищуватиме комплаєнс до фармакотерапії. Поєднання декількох АФІ в фіксованій комбінації вимагає чіткої методології щодо розробки аналітичного забезпечення, яка полягає у використанні простих, точних методів аналізу у лабораторіях з контролю якості, де час і вартість є критичними. Більше того, розроблені методики повинні бути менш токсичними і зберігати ефективність методу тощо. Шлях до вирішення даної проблеми полягає в уніфікованому підході до інноваційної розробки методик визначення аторвастатину та лізиноприлу в лікарських засобах. Існуючі аналітичні методики визначення аторвастатину та лізиноприлу в ЛЗ часто мають обмежене застосування через не завжди достатню селективність та складність, непридатність для рутинного аналізу в лабораторіях контролю якості, невідповідність принципам «зеленої хімії» [60, 61].

Доцільність виконання даного дослідження, в першу чергу, визначається принциповою відсутністю системних досліджень з аналітичного забезпечення фармацевтичної розробки лікарських форм (ЛФ) на основі аторвастатину та

лізиноприлу, тому дисертаційна робота дозволяє вирішити не тільки науково-теоретичне, але й значне прикладне завдання, що дозволить оптимізувати фармацевтичну розробку антигіпертензивних ЛЗ зі статинами і як наслідок, забезпечити належний лікувальний ефект ішемічної хвороби серця.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота виконана згідно з планами науково-дослідних робіт Тернопільського національного медичного університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України «Розробка оригінальних комбінацій антигіпертензивних засобів, їх аналіз та стандартизація» (держбюджетна, номер державної реєстрації 0120U104201), «Цілеспрямований пошук біологічно активних речовин в ряду 7,8-дизаміщених теофіліну; розробка та валідація методик контролю якості антигіпертензивних лікарських засобів зі статинами» (номер державної реєстрації 0121U100062).

Мета дослідження: розробка експресних, простих у виконанні, доступних та валідованих спектрофотометричних і хроматографічних методик визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу в субстанціях та ЛЗ.

Завдання дослідження:

- узагальнити інформацію щодо цілей, завдань, особливостей досліджень, ускладнень, які виникають під час розробки та валідації методик визначення аторвастатину кальцію, його домішок та лізиноприлу в ЛЗ;
- запропонувати УФ-спектрофотометричні методики визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу в ЛЗ;
- розробити та валідувати спектрофотометричні методики кількісного визначення лізиноприлу у складі готових ЛФ за нінгідриновою реакцією та реакцією з купруму (II) сульфатом, встановити показники чутливості реакції та оптимальні умови проведення кількісного визначення;
- розробити спектрофотометричні методики кількісного визначення аторвастатину кальцію у складі готових ЛФ на основі взаємодії з бромтимоловим синім (БТС) та бромфеноловим синім (БФС), експериментально обґрунтувати оптимальні умови утворення продуктів

- взаємодії аторвастатину кальцію з БТС/БФС, встановити коефіцієнти стехіометричних співвідношень «аторвастатину кальцію –БТС/БФС»;
- запропонувати хроматографічні умови та розробити експресну, «зелену» ВЕРХ-методику кількісного визначення аторвастатину кальцію та його домішок в ЛЗ;
 - продемонструвати методологію розробки ВЕРХ-методики одночасного кількісного визначення двох АФІ з значними відмінностями у фізико-хімічних властивостях;
 - розробити та валідувати хроматографічну методику одночасного визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу в бінарній суміші та ЛЗ з використанням хроматографічних колонок Purospher C₈ STAR, Zorbax C₈ Rx, LiChrosorb C₈, Waters Spherisorb ODS1;
 - запропонувати аналітичні методики кількісного визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу для оцінки еквівалентності *in vitro*.

Об'єкт дослідження – обґрунтування підходів до розробки оригінальних спектрофотометричних та хроматографічних методик визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу в однокомпонентних та комбінованих ЛЗ.

Предмет дослідження – АФІ та таблетки аторвастатину кальцію і лізиноприлу.

Методи дослідження: високоефективна рідинна хроматографія з УФ детектуванням (ВЕРХ/УФ), високоефективна рідинна хроматографія з подвійним мас-спектрометричним детектуванням (ВЕРХ/МС/МС), абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій (УФ) та видимій областях; методи моделювання аналізу та візуалізації багатомірних даних – методи валідації, регресійний та кореляційний аналіз, визначення профілів розчинення таблеток, а також вивчення проникності через кишкову мембрану (тест Сасо-2); методи визначення впливу аналітичної методики на навколишнє середовище (метод аналітичної еко-шкали та метод AGREE (Analytical GREENness) (програмне забезпечення розроблено Гданським технічним університетом, Польща)).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше продемонстровано узагальненні підходи до розробки оригінальних експресних аналітичних методик контролю якості АФІ та готових ЛФ аторвастатину кальцію та лізиноприлу, а також їх комбінації.

Запропоновано УФ-спектрофотометричні методики визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу в ЛЗ. Розроблено та валідовано спектрофотометричні методики визначення кількісного вмісту аторвастатину кальцію та лізиноприлу в субстанціях та ЛЗ. Встановлено можливість застосування БТС, БФС, нінгідрину, купруму (II) сульфату як реагентів при розробці спектрофотометричних методик визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу в субстанціях та ЛЗ. Проведено дослідження щодо вибору оптимальних умов – вибір органічного розчинника, концентрації реагента, температури та часу перебігу реакції.

Вперше запропоновано хроматографічні умови та розроблено експресну «зелену» ВЕРХ-методику кількісного визначення аторвастатину кальцію та його домішок в ЛЗ. Хроматографічні колонки Shim-Pack XR-ODS II (75 мм x 3 мм, 2.2 мкм) та Agilent Poroshell C₁₈ec (100 мм x 4.6 мм, 2.7 мкм) продемонстрували відмінні результати в розділенні аторвастатину та його домішок. Розроблена аналітична методика кількісного визначення аторвастатину кальцію та його домішок в таблетках є екологічнішою за фармакопейну та всі інші раніше опубліковані методики визначення домішок аторвастатину кальцію, експресною для рутинних аналізів у лабораторіях контролю якості фармацевтичних компаній.

Вперше продемонстровано методологію розробки ВЕРХ-методики одночасного кількісного визначення двох АФІ з значними відмінностями у фізико-хімічних властивостях. Експериментальна робота щодо розробки ВЕРХ-методики мотивована використанням різних хаотропних аніонів як нового перспективного підходу з використання іонно-парних реагентів. Вперше розроблено та валідовано хроматографічні методики одночасного визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу в субстанціях та ЛЗ з використанням

методу ВЕРХ (на хроматографічних колонках Purospher C₈ STAR, Zorbax C₈ Rx, LiChrosorb C₈, Waters Spherisorb ODS1).

Розроблено методики кількісного визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу для оцінки еквівалентності *in vitro* з застосуванням спектрофотометричних та хроматографічних методів. У процесі виконання експериментальної частини вперше розроблено та валідовано методики визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу для вивчення проникності через кишкову мембрану. Запропоновано аналітичні методики кількісного визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу для застосування у тесті «Розчинення».

На підставі запропонованих принципів та підходів розроблено методики хроматографічного визначення аторвастатину та лізиноприлу в лікарських засобах (Метод I) (патент України на корисну модель № 147999 від 24.06.2021), (Метод II) (патент України на корисну модель № 148078 від 01.07.2021), (Метод III) (патент України на корисну модель № 147998 від 24.06.2021).

Практичне значення одержаних результатів. Розроблені оригінальні спектрофотометричні та хроматографічні методики визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу в субстанціях та ЛЗ можуть використовуватися для швидкого рутинного аналізу аторвастатину та лізиноприлу на однорідність вмісту, дослідження профілю розчинення та аналізу ЛЗ. Запропоновані методики можуть бути використані як арбітражні методики та застосовуватися атестованими аналітичними лабораторіями. Хроматографічні методики кількісного визначення аторвастатину кальцію та його домішок в ЛЗ опрацьовано в умовах промислового виробництва публічного акціонерного товариства «Фармак», що засвідчено відповідним актом впровадження від 17.02.2022 р.

Запропонована методологія щодо розробки ВЕРХ-методики одночасного кількісного визначення двох АФІ (аторвастатину кальцію та лізиноприлу) з значними відмінностями у фізико-хімічних властивостях, яка передбачає використання хаотропних речовин, може використовуватися в наукових цілях

хіміками-хроматографістами для розробки хроматографічних методик АФІ з відмінностями у фізико-хімічних властивостях.

Розроблено та валідовано методики визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу для вивчення проникності через кишкову мембрану (тест Сасо-2), які в подальшому можуть бути використані науковцями для вивчення біодоступності та реєстрації ЛЗ за процедурою «біовейвер».

Розроблено методики кількісного визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу для застосування у тесті «Розчинення», які можуть бути використані в процесі фармацевтичної розробки та для вивчення біоеквівалентності ЛЗ *in vitro*.

Розроблені аналітичні методики впроваджено в науково-педагогічний процес кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (акт впровадження від 02.11.2022 р.), кафедри фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету (акт впровадження від 18.11.2022 р.), кафедри аналітичної хімії Запорізького державного медичного університету (акт впровадження від 01.11.2022 р.), кафедри медичної та фармацевтичної хімії Буковинського державного медичного університету (акт впровадження від 28.10.2022 р.), кафедри хімії ліків та лікарської токсикології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (акт впровадження від 14.11.2022 р.), в практику роботи Державної служби з лікарських засобів та контролю за наркотиками в Тернопільській області (акт впровадження від 27.10.2022 р.).

Особистий внесок здобувача. Безпосередньо автором проведено патентно-інформаційний пошук та аналіз сучасного стану досліджень за темою дисертаційної роботи. Дисертантом разом з науковим керівником визначено мету, завдання та методики експериментальних досліджень. Автором самостійно розроблено та валідовано спектрофотометричні методики визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу в субстанціях та ЛЗ. Встановлено оптимальні умови проведення спектрофотометричних методик визначення

аторвастатину кальцію та лізиноприлу в субстанціях та ЛЗ. Запропоновано хроматографічні умови та розроблено експресну «зелену» ВЕРХ-методику визначення домішок аторвастатину кальцію в ЛЗ. Розроблено та валідовано хроматографічні методики визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу в субстанціях та ЛЗ. Підбрано оптимальні хроматографічні умови щодо рухомих фаз та хроматографічних колонок, запропоновано концепцію з використання хаотропних речовин для розробки еспресних кількісних методик визначення аторвастатину та лізиноприлу в ЛЗ. Розроблено методики кількісного визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу для оцінки еквівалентності *in vitro*. Розроблено хроматографічну методику визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу для вивчення проникності через кишкову мембрану та запропоновано методики кількісного визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу для застосування у тесті «Розчинення». Особисто проведено експериментальні дослідження та статистичну обробку одержаних результатів, систематизовано отримані дані, сформульовано висновки роботи.

Особистий внесок дисертанта щодо публікацій у співавторстві зазначено в тексті дисертаційної роботи у списку опублікованих праць. Співавторами наукових праць є науковий керівник та науковці, спільно з якими проведені дослідження. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок. Усі наукові узагальнення, положення, результати, висновки та рекомендації, викладені у дисертації, виконані автором особисто.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи оприлюднено на VIII науково-практичній конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 23-24 вересня 2020 р.), 18th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry (Athens, 25-27 лютого 2021 р.), III міжнародній науково-практичній конференції «Scientific Community: Interdisciplinary Research» Busse Verlag GmbH. (Hamburg, 16-18 березня 2021 р.), XXV міжнародному медичному конгресі студентів та

молодих вчених (Тернопіль, 12-14 квітня 2021 р.), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи», присвяченій 100-річчю Національного фармацевтичного університету (Харків, 10 вересня 2021 р.), міжнародному науково-практичному симпозиумі «100 років успіху та якості», присвяченій 100-річчю кафедри фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету (Харків, 18 жовтня 2021 р.), I міжнародній науково-практичній дистанційній конференції «Сучасні аспекти створення лікарських засобів», присвяченій 80-річчю з дня народження професора В.В. Болотова (Харків, 1 лютого 2022 р.), міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених (Тернопіль, 13-15 квітня 2022 р.), VIII науково-практичній конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 22-23 вересня 2022 р.), міжнародній конференції «Contemporary Pharmacy: Issues Challenges and Expectations 2022 autumn» (Kaunas, 21 жовтня 2022 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 21 наукову працю, із них 8 статей (4 статті у зарубіжних фахових наукових виданнях, що індексуються наукометричною базою *Scopus*, 2 статті у виданнях України категорії А (1 – фахове, 1 – із суміжної галузі знань), 2 статті у фахових виданнях України), 10 публікацій в матеріалах вітчизняних і міжнародних конгресів та конференцій, 3 патенти України на корисну модель.

Обсяг та структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 245 сторінках, складається з анотації, вступу, п'яти розділів, висновків, списку використаних джерел, що містить 170 найменувань (30 кирилицею та 140 латиною), додатків. Робота ілюстрована 80 таблицями, 56 рисунками. Список використаних джерел і додатки викладено на 36 сторінках.

РОЗДІЛ 1
АНАЛІЗ ІСНУЮЧИХ ПІДХОДІВ ЩОДО РОЗРОБКИ ТА ВАЛІДАЦІЇ
МЕТОДІВ АНАЛІЗУ АТОРВАСТАТИНУ ТА ЛІЗИНОПРИЛУ
В СУБСТАНЦІЯХ ТА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ
(ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Загальна характеристика аторвастатину кальцію та лізиноприлу

Статини – це клас препаратів, що знижують рівень холестерину, які діють пригнічуючи фермент 3-гідрокси-3-метил-глутарил-коензим А-редуктазу і зазвичай використовується для профілактики або лікування серцево-судинних захворювань [1]. Аторвастатин був одним з першим із антиатеросклеротичних ЛЗ для зниження рівня холестерину ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ) приблизно 40 років тому.

Аторвастатин знижує концентрацію холестерину у плазмі крові та ліпопротеїну у сироватці крові шляхом інгібування ГМК-КоА-редуктази, а згодом – біосинтезу холестерину у печінці, а також збільшує кількість печінкових рецепторів ЛПНЩ на поверхні клітин, що призводить до посилення захоплення і катаболізму ЛПНЩ. Призначається для зменшення ризику виникнення інфаркту міокарда, стенокардії та інсульту [2, 3]. У хімічному відношенні аторвастатин кальцію є кальцію (3R,5R)-7-[2-(4-фторфеніл)-5-(1-метилетил)-3-феніл-4-(фенілкарбамоїл)-1*H*-пірол-1-іл]-3,5-дигідроксигептаноату тригідратом [4]. Рекомендованими є дози від 10 мг до 80 мг аторвастатину кальцію.

В Україні аторвастатин кальцію зареєстрований під такими торговими назвами: Аторвакор, Аторвастатин-Ратіофарм, Аторвастатин-Тева, Атокор, Ліпримар, Лівостор, Лімістин, Ліподемін, Модліп, Аторис, Астин, Аторвастатин-КРКА, Аторвастерол, Вазоклін-Дарниця, Есколін-Сановель, Етсет, Толевас-Торвакард кристал, Торзакс, Туліп та інші.

Лізиноприл – несольфгідрильний інгібітор ангіотензинперетворювального ферменту (ІАПФ). Призначається для лікування есенціальної гіпертензії,

серцевої недостатності, гострого інфаркту міокарда [5]. У хімічному відношенні лізиноприл є (2S)-1-[(2S)-6-аміно-2-[[[(1S)-1-карбоксі-3-фенілпропіл]-аміно]гексаноїл]піролідин-2-карбоксихильної кислоти дигідратом [4]. Лізиноприл існує у вигляді рівноважної суміші *цис* і *транс* ізомерів. Вважається, що за прояв біологічної активності відповідає *транс*-форма, однак у розчинах відбувається ізомеризація лізиноприлу, що утруднює розробку методик його визначення [6]. Рекомендованими є дози від 5 мг до 20 мг лізиноприлу.

В Україні лізиноприл зареєстрований під такими торговими назвами: Лізиноприл-Астрафарм, Лізиноприл-Алкалоїд, Лізиноприл-Тева, Ауралайза, Даприл, Диротон, Лізи-Сандоз, Лінотор, Ліприл, Лоприл-Босналек, Скоприл та інші.

Для лікування пацієнтів з серцево-судинною патологією клініцистами запропоновано декілька варіантів фіксованих комбінацій (ІАПФ + ацетилсаліцилова кислота + статин), (ІАПФ + β -адреноблокатор + ацетилсаліцилова кислота + статин) [7].

Вчені наукової групи GREACE Study Collaborative Group підтвердили ефективність комбінації статину та ІАПФ, яка зменшує серцево-судинні захворювання більше, ніж монотерапія статину, і значно більше, ніж монотерапія ІАПФ [8].

З вищезазначеного можна зробити висновок, що фіксована комбінація аторвастатину кальцію та лізиноприлу є вдалою для лікування пацієнтів з есенціальною гіпертензією та інфарктом міокарда.

1.2 Огляд методик контролю якості АФІ та лікарських засобів з аторвастатином кальцію

У ЄФ [4] є монографія на субстанцію аторвастатину кальцію. Ідентифікацію аторвастатину кальцію ЄФ регламентує здійснювати абсорбційною спектрофотометрією в інфрачервоній області, визначенням енантіомерної чистоти та за реакцією на виявлення катіону Ca^{2+} , кількісне визначення – рідинною

хроматографією. Для визначення енантіомерної чистоти регламентується методика ВЕРХ/УФ з використанням хіральної колонки 0.25 м x 4.6 мм та рухомої фази, що складається з трифлуороцтової кислоти Р, етанолу Р та гексану Р (0.1:6:94). Розчинник – суміш безводного етанолу Р та метанолу Р (50:50), швидкість рухомої фази – 1.0 мл/хв, довжина хвилі детектування – 244 нм.

Для кількісного визначення аторвастатину кальцію представлена методика ВЕРХ/УФ, що передбачає використання октацедилсилільної колонки 0.25 м x 4.6 мм, градієнтного елюювання та рухомої фази А – тетрагідрофуран Р, ацетонітрил Р, 3.9 г/л розчину амонію ацетату рН 5.0 (12:21:67), рухомої фази Б – тетрагідрофуран Р, 3.9 г/л розчину амонію ацетату рН 5.0, ацетонітрил Р (12:27:61). Розчинник – диметилформамід Р, швидкість рухомої фази – 1.5 мл/хв, довжина хвилі детектування – 244 нм. До недоліків запропонованої фармакопейної методики можна віднести тривалий час хроматографування (85-90 хв) та використання великого об'єму рухомої фази за одне хроматографування.

У науковій літературі описано значну кількість методик кількісного визначення аторвастатину кальцію у ЛЗ [9-27].

Відомі спектрофотометричні методики визначення аторвастатину кальцію за утворенням іон-парних комплексів із сульфтафалеїновими барвниками [9], *n*-диметиламінобензальдегідом [10], *n*-розаніліном гідрохлоридом [11] та з використанням сечовини як гідротропного солубілізуючого агента [12], сульфо-фосфо-ваніліну як реагента [13], йоду та утворенні трийодидного (I_3^-) комплексу [14]. Вказані методики мають ряд недоліків, це, зокрема, використання токсичних реагентів, довготривалість, нагрівання, необхідність екстракції, трудомісткість тощо.

Запорізькою науковою школою під керівництвом проф. Васюк С. О. розроблено спектрофотометричну методику визначення аторвастатину кальцію в таблетках за реакцією з бромкрезоловим пурпуром за довжини хвилі 399 нм в середовищі ацетону. Встановлено оптимальні умови проведення реакції, коефіцієнти стехіометричних співвідношень між аторвастатином кальцію і бромкрезоловим пурпуром. Проведено валідацію розробленої методики [9].

Єгипетськими вченими із Загазіг університету запропоновано спектрофотометричну методику визначення аторвастатину кальцію та розувастатину кальцію в ЛФ за реакцією з *n*-диметиламінобензальдегідом в кислому середовищі. Реакційна суміш демонструвала максимальне поглинання при λ_{\max} 540 і 570 нм для аторвастатину кальцію та розувастатин кальцію відповідно. Встановлено оптимальні умови кількісного визначення. Розроблена аналітична методика була лінійною в діапазоні концентрацій 20-160 мкг/мл для аторвастатину кальцію і 2-16 мкг/мл для розувастатину кальцію відповідно [10].

Alshabrawy A. et al. описано спектрофотометричну методику визначення аторвастатину кальцію в ЛФ за реакцією з *n*-розаніліном гідрохлоридом. Утворений продукт реакції червоного кольору легко екстрагується органічним розчинником і демонструє максимальне поглинання за довжини хвилі 547 нм. Валідацію аналітичної методики проводили в діапазоні концентрацій 1-8 мкг/мл. Межа кількісного визначення (МКВ) становила 0.93 мкг/мл, межа виявлення (МВ) – 0.31 мкг/мл. Запропонована методика успішно застосовувана для кількісного визначення аторвастатину в таблетках. Чутливість та недороговартісність аналізу дають можливість використовувати його в рутинному контролі якості таблеток аторвастатину [11].

Індійськими вченими розроблено спектрофотометричну методику визначення аторвастатину кальцію та аспіріну в капсулах з використанням сечовини як гідротропного солюбілізуючого агента. У запропонованій аналітичній методиці використано метод одночасного рівняння (метод-А) з використанням довжин хвиль 243 нм і 233 нм як максимумів поглинання для аторвастатину кальцію та аспіріну відповідно і метод коефіцієнта Q -поглинання (метод-В), який засновано на вимірюванні поглинання в точці ізопоглинання за довжин хвиль 239 нм і 243 нм (максимум поглинання аторвастатину). Розроблена аналітична методика була лінійною в діапазоні концентрацій 10-50 мкг/мл. Запропонована спектрофотометрична методика валідована та застосована для визначення аторвастатину кальцію та аспіріну в капсулах в рутинному аналізі при проведенні контролю якості ЛЗ [12].

Bernard S. та Mathew M. запропоновано спектрофотометричну методику визначення аторвастатину кальцію в таблетках з використанням сульфо-фосфovanіліну як реагента. Розроблена методика базувалася на взаємодії аторвастатину з сірчаною кислотою з утворенням іону карбонію, який реагував з фосфатним ефіром ваніліну з утворенням фіолетового комплексу з максимумом поглинання за довжини хвилі 414 нм. Проведено валідацію аналітичної методики. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 30-100 мкг/мл [13].

Науковцями з Університету Алеппо (Сирія) розроблено спектрофотометричну методику визначення аторвастатину кальцію в ЛФ, яка базувалася на окисненні аторвастатину кальцію йодом та утворенні трийодидного (I_3^-) комплексу з максимумом поглинання за довжин хвиль 291 нм і 360 нм. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 0.5586-11.173 мкг/мл. МВ та МКВ становила 0.056 і 0.17 мкг/мл відповідно [14].

Пряма УФ-спектрофотометрія, завдяки простоті й значній економічності, все ще залишається найчастіше використовуваним аналітичним методом у фармацевтичному аналізі. Naveed S. описано УФ-спектрофотометричну методику визначення аторвастатину кальцію в ЛЗ. Вимірювання оптичної густини проводили за довжини хвилі 244 нм. Розроблена аналітична методика може використовуватися при рутинному аналізі таблеток аторвастатину [15].

Вченими Hirave R. et al. запропоновано УФ-спектрофотометричну методику визначення аторвастатину кальцію та фенофібрату в таблетках. Валідацію аналітичної методики проводили в діапазоні концентрацій 1-10 мкг/мл для кальцію аторвастатину і 2-20 мкг/мл для фенофібрату. Розроблена методика є точною, економічно доступною та селективною для одночасного визначення аторвастатину кальцію та фенофібрату в таблетованій ЛФ [16].

Індійськими вченими розроблено УФ-спектрофотометричну методику визначення аторвастатину кальцію та амлодипіну бесилату в комбінованій таблетованій ЛФ за площею під кривою. Запропонований метод площі під кривою передбачав вимірювання площі на обраному аналітичному діапазоні

довжин хвиль та виконанні аналізу за допомогою «правила Крамера» та «матричного методу». Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 5-50 мкг/мл ($r^2 = 0.9998$) для аторвастатину кальцію і 5-50 мкг/мл ($r^2 = 0.9997$) для амлодипіну бесилату відповідно. Проведено валідацію розробленої аналітичної методики [17].

Jadhav N. R. et al. описано УФ-спектрофотометричну методику визначення аторвастатину кальцію та телмісартану в таблетках. Валідацію аналітичної методики проводили в діапазоні концентрацій 1-6 мкг/мл для аторвастатину кальцію і 4-24 мкг/мл для телмісартану. Розроблена аналітична методика може використовуватися при рутинному аналізі таблеток аторвастатину кальцію [18].

Методи рідинної хроматографії (РХ) (зокрема ВЕРХ) широко застосовуються в аналізі аторвастатину кальцію як в субстанції, так і в моно- та комбінованих ЛЗ [19-27].

Аргентинськими вченими розроблено ВЕРХ/УФ методику визначення аторвастатину кальцію в таблетках з використанням рухомої фази, що складалася з 0.1 % розчину оцтової кислоти та ацетонітрилу (45:55), рН 3.8 та хроматографічної колонки LiChroCART^R 250 мм×4 мм HPLC Cartridge LiChrospher^R 100 RP-18 (5 мкм). Детектування проводили за довжини хвилі 246 нм та швидкості рухомої фази 0.8 мл/хв. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 8.13-23.77 мкг/мл. Розроблена методика – валідована та може бути використана при рутинному контролі таблетованих форм аторвастатину кальцію [19].

Kumar K.K. et al. запропоновано методику обернено-фазової ультраефективної рідинної хроматографії (УЕРХ) для визначення вмісту аторвастатину кальцію в ЛЗ з використанням хроматографічної колонки C₁₈ та рухомої фази – буфера 0.02 М фосфорної кислоти та ацетонітрилу. Проведена валідація аналітичної методики. Розроблена методика може застосовуватися для визначення продуктів деградації [20].

Обернено-фазова ВЕРХ з УФ-спектрофотометричним детектуванням методика визначення аторвастатину кальцію та амлодипіну в ЛЗ описана

Chaudhari G. B et al. В розробленій ВЕРХ-методиці використовувалася хроматографічна колонка Lichrospher 100 C₁₈ (250 мм × 4.0 мм i.d., 5 мкм) та рухома фаза – суміш ацетонітрилу та 50 мМ буферного розчину калію дигідрогенфосфату рН 3.0 (60:40), швидкість рухомої фази – 1.0 мл/хв, довжина хвилі детектування – 254 нм. Аналітична методика була лінійною в діапазоні концентрацій 1-90 мкг/мл для аторвастатину кальцію та 1-80 мкг/мл для амлодипіну. МВ становила 0.4 мкг/мл та 0.6 мкг/мл відповідно, МКВ – 1.0 мкг/мл. Розроблена методика застосовувана для проведення тесту «Розчинення» *in vitro* комбінованих ЛЗ аторвастатину кальцію та амлодипіну, що представлені на фармацевтичному ринку [21].

Ще одна ВЕРХ-методика визначення аторвастатину кальцію та амлодипіну в таблетках розроблена єгипетськими вченими Hafez H.M. et al. з використанням хроматографічної колонки Phenomenex Kinetex C₁₈ 100A (250 мм × 4.6 мм i.d., 2.6 мкм) та рухомої фази, що складалася з калію дигідрогенфосфату (рН 5.5, 0.03 М) та ацетонітрилу (65:35), швидкості рухомої фази – 1.2 мл/хв, довжина хвилі детектування – 240 нм. Запропонована методика була лінійною в діапазоні концентрацій 5.18-15.54 мкг/мл для амлодипіну та 5.26-15.78 мкг/мл для аторвастатину кальцію відповідно. МВ становила 0.16 мкг/мл та 0.17 мкг/мл, МКВ – 0.48 мкг/мл для амлодипіну бесилату та 0.52 мкг/мл для аторвастатину кальцію відповідно. Автори проводили дослідження деградації амлодипіну та аторвастатину [22].

Patole M.S. et al. запропоновано методику обернено-фазової ВЕРХ для визначення аторвастатину кальцію, раміприлу та аспірину в ЛЗ з використанням хроматографічної колонки C₁₈ та рухомої фази – метанолу та ацетатного буфера рН 3.1 (70:30). Час утримування аторвастатину кальцію становив 8.38 хв, раміприлу – 5.62 хв, аспірину – 3.04 хв. Проведена валідація аналітичної методики [23].

Обернено-фазова ВЕРХ методика з УФ-спектрофотометричним детектуванням визначення аспірину, аторвастатину кальцію та клопідогрелю бісульфату в капсулах описана Londhe V.S et al. В розробленій методиці використовується

хроматографічна колонка Inertsil ODS (150 мм x 4.6 мм, 5 мкм) та рухома фаза – суміш ацетонітрилу та фосфатного буфера рН 3.0 (50:50), швидкість рухомої фази – 1.2 мл/хв, довжина хвилі детектування – 235 нм. Час утримування аспірину, аторвастатину кальцію та клопідогрелю бісульфату складав 1.89 хв, 6.6 хв та 19.8 хв відповідно. Калібрувальні графіки були лінійними ($r^2 > 0.998$) у діапазоні концентрацій 5-30 мкг/мл для аторвастатину кальцію та 30-105 мкг/мл для аспірину і клопідогрелю бісульфату. Методика була валідована за всіма валідаційними характеристиками. Запропоновану методику успішно застосовувано для кількісного аналізу капсул [24].

Індійськими вченими розроблено ВЕРХ/УФ методику визначення статинів (правастатину, аторвастатину, симвастатину) в ЛФ з використанням рухомої фази – суміші метанолу та 0.1. % розчину фосфорної кислоти, та хроматографічної колонки C_{18} (150 мм x 4.6 мм, 2.7 мкм), швидкості рухомої фази – 1.0 мл/хв, довжини хвилі детектування – 238 нм. Лінійність підтверджена в діапазоні концентрацій 0.12-0.24 мг/мл для правастатину та аторвастатину і 0.02-0.14 мг/мл для симвастатину. Запропонована методика була точною, специфічною та економічно доступною і придатною для визначення статинів в моно-препаратах, а також одночасного визначення в комбінованих ЛФ в лабораторіях контролю якості та науково-дослідних інститутах [25].

Sathiyasundar R. запропоновано методику обернено-фазової ВЕРХ для визначення аспірину, аторвастатину та клопідогрелю в ЛФ. Фактори – незалежні змінні (органічний модифікатор, рН рухомої фази та швидкість рухомої фази) були виділені з попереднього дослідження та як залежні три змінні відповідей, а саме коефіцієнт ємності tR_1 , роздільна здатність між аторвастатином та внутрішнім стандартом, час утримування tR_4 . Розроблена методика дозволила визначити оптимальні хроматографічні умови, а саме рухома фаза – суміш ацетонітрилу, метанолу, 0.1 % розчину триетиламіну (52:05:43), рН доводять до 3.0 за допомогою 10 % фосфорної кислоти, час хроматографування – 8 хв. З метою оптимізації розробки методики застосовано

функцію бажаності Деррінджера. Розроблена аналітична методика валідована згідно з рекомендаціями Міжнародної конференції з гармонізації (ICH) [26].

Індійськими вченими описано ВЕРХ/УФ методику визначення аторвастатину кальцію, метформіну гідрохлориду та глімепіриду в таблетованій ЛФ з використанням хроматографічної колонки Grace Smart Altima C₈ (250 мм x 4.6 мм, 5.0 мкм) та рухомої фази, що складалася з ацетонітрилу та фосфатного буферного розчину (60:40, рН 3.0), швидкості рухомої фази – 1.0 мл/хв, довжини хвилі детектування – 235 нм. Час утримування метформіну складав 2.57 хв, аторвастатину – 7.06 хв та глімепіриду – 9.39 хв. Розроблена методика валідована відповідно до вимог ІСН (Q2В). Калібрувальні криві були лінійними в діапазонах концентрацій від 10 до 150 мкг/мл, від 20 до 200 мкг/мл та від 10 до 150 мкг/мл для аторвастатину, метформіну та глімепіриду відповідно. Запропонована методика успішно застосована для визначення даних аналітів у таблетованій ЛФ. Продукти деградації, отримані в результаті стресових досліджень, не впливали на піки аналітів [27].

ВЕРХ/УФ методики визначення аторвастатину кальцію в ЛЗ, які описано в літературних джерелах, наведено в табл. 1.1.

1.3 Огляд методик аналізу домішок аторвастатину кальцію

Офіційною та найбільш часто використовуваною методикою визначення домішок аторвастатину є методика, яка представлена в ЄФ [4]. У монографії аторвастатину кальцію описано методику ВЕРХ для визначення домішок аторвастатину та АФІ аторвастатину за таких хроматографічних умов: октилсилільна колонка C₈ (L7) (250 мм x 4.6 мм, 5.0 мкм) (рекомендовано Zorbax C₈ Rx), комбінований ізократичний та лінійний градієнтний режим елюювання з рухомою фазою, що складається з ацетонітрилу, тетрагідрофурану та ацетатного буфера рН 5.0, зі швидкістю рухомої фази – 1.5 мл/хв, моніторингом УФ-сигналу за довжини хвилі 244 нм та загальним часом хроматографування 85-90 хв.

Таблиця 1.1 – ВЕРХ/УФ методики визначення аторвастатину кальцію в ЛЗ, які описано в літературних джерелах

№	Зразок	Хроматографічна колонка	Рухома фаза	Детектор	Хроматографічні умови	Посилання на джерело літератури
1	Таблетки	LiChroCART ^R 250 мм×4 мм HPLC Cartridge LiChrospher ^R 100 RP-18 (5 мкм)	0.1 % розчин оцтової кислоти та ацетонітрил (45:55), pH 3.8	УФ (246 нм)	Швидкість рухомої фази 0.8 мл/хв	[19]
2	ЛФ	C ₁₈	Буфер 0.02 М фосфорної кислоти та ацетонітрил	Не вказано	Не вказано	[20]
3	Комбінація з амлодипіном	Lichrospher 100 C ₁₈ (250 мм × 4.0 мм i.d., 5 мкм)	Ацетонітрил та 50 мМ буферний розчин калію дигідрогенфосфату pH 3.0 (60:40)	УФ (254 нм)	Швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв	[21]
4	Комбінація з амлодипіном	Phenomenex Kinetex C ₁₈ 100A (250 мм × 4.6 мм i.d., 2.6 мкм)	Калію дигідрогенфосфат (pH 5.5, 0.03 М) та ацетонітрил (65:35)	УФ (240 нм)	Швидкість рухомої фази 1.2 мл/хв	[22]
5	Комбінація з рамиприлом та аспірином	C ₁₈	Метанол та ацетатний буфер pH 3.1 (70:30)	Не вказано	Не вказано	[23]
6	Комбінація з аспірином та клопідогрелем	Inertsil ODS (150 мм х 4.6 мм, 5 мкм)	Ацетонітрил та фосфатний буфер pH 3.0 (50:50)	УФ (235 нм)	Швидкість рухомої фази 1.2 мл/хв	[24]
7	Комбінація з іншими статинами	C ₁₈ (150 мм х 4.6 мм, 2.7 мкм)	Метанол та 0.1. % розчин фосфорної кислоти	УФ (238 нм)	Швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв	[25]
8	Комбінація з аспірином та клопідогрелем	C ₁₈	Ацетонітрил, метанол, 0.1 % розчину триетиламіну (52:05:43), pH 3.0	Не вказано	Не вказано	[26]
9	Комбінація з метформіну гідрохлориду та глімепіриду	Grace Smart Altima C ₈ (250 мм х 4.6 мм, 5.0 мкм)	Ацетонітрил та фосфатний буферний розчин (60 : 40, pH 3.0)	УФ (235 нм)	Швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв	[27]

Незважаючи на фармакопейну методику, є також декілька опублікованих аналітичних методик ВЕРХ/УФ для визначення домішок аторвастатину [28-31].

Аналітична методика, опублікована Petkovska R. et al. [18], передбачала використання короткої хроматографічної колонки Zorbax Eclipse XDB C₁₈ Rapid Resolution HT (50 мм x 2.1 мм, 1.8 мкм), рухомої фази, що складалася з ацетонітрилу, тетрагідрофурану та фосфатного буфера рН 3.5. Використання запропонованої методики є обмеженим лише в системах УЕРХ з дуже низьким об'ємом дисперсії системи, оскільки встановлена сучасна колонка з частинками 1.8 мкм не може використовуватися стандартними ВЕРХ системами з нижчими характеристиками. Крім того, вказана хроматографічна колонка є складною для використання менш кваліфікованими хіміками-аналітиками. Також у запропонованій аналітичній методиці використовується тетрагідрофуран як частина рухомої фази, який є токсичним і нестабільним [28].

Аналітична методика, опублікована Vakkum P. et al. [29], передбачає використання градієнтного елюювання 0.1 % трифлуороцтової кислоти та ацетонітрилу і хроматографічної колонки Zorbax Bonus RP. Роздільна здатність була 2, хоча ЄФ вимагає мінімум 1.5. Проте високі значення роздільної здатності були досягнуті за допомогою піків домішок, наявних у низьких концентраціях, на їх МВ. При таких низьких концентраціях піки завжди вузькі і їх легше відокремити. Низьке значення рН 0.1% трифлуороцтової кислоти, що використовується як частина рухомої фази, також є критичним, зазвичай трохи менше 2, що виходить за межі рекомендованого діапазону рН 2-9 для використовуваної колонки Zorbax Bonus RP. Це зменшує термін експлуатації хроматографічної колонки та її використання.

Вченими Ertürk S. et al. запропоновано ВЕРХ методику визначення аторвастатину кальцію та його домішок з використанням хроматографічної колонки Luna C₁₈ та рухомої фази, що складалася з ацетонітрилу, амоній ацетату буферного розчину рН 4 та тетрагідрофурану, швидкості рухомої фази – 1.0 мл/хв, довжини хвилі детектування – 248 нм [30]. Як вже було зазначено

при аналізі хроматографічної методики [28], тетрагідрофуран як частина рухомої фази є токсичним і нестабільним.

Науковцями фармацевтичної компанії Replek (Північна Македонія) розроблено ВЕРХ методику визначення аторвастатину кальцію та його семи домішок. Хроматографування тривало від 25 до 40 хв із простим ступінчастим градієнтним елююванням. Основний акцент у запропонованій стратегії розробки методики зосереджений на рухомій фазі, що складалася з простої бінарної системи – фосфатного буфера та ацетонітрилу рН 4.1, без використання тетрагідрофурану, іонно-парних реагентів, трифлуороцтової кислоти та інших модифікаторів. Вченими протестовано хроматографічні колонки з різною ефективністю, розмірами та властивостями. Найкращі результати, що стосуються задовільної роздільної здатності піків, тривалості хроматографування були досягнуті з використанням колонок: YMC C₁₈ Triart (150 мм x 4.6 мм, 3 мкм) (YMC America, Inc.), потім з Nucleodur 100-3- C₁₈ec (250 мм x 4.6 мм, 3 мкм) (Macherey-Nagel GmbH & Co., Німеччина), Waters Symmetry C₁₈ (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм) (Waters, США) і Superspher C₁₈e (125 мм x 4.6 мм, 4 мкм) (Merck, Німеччина).

Усі запропоновані хроматографічні колонки досягають задовільних результатів щодо критичного розділення між домішкою аторвастатину В та аторвастатином (згідно з вимогами ЄФ), або в деяких випадках між домішкою аторвастатину В та домішкою аторвастатину С [31].

1.4 Огляд методик контролю якості АФІ та лікарських засобів з лізиноприлом

У ДФУ представлена монографія на таблетки лізиноприлу [32-39]. Для ідентифікації лізиноприлу в таблетках пропонується методика ТШХ (рухома фаза – оцтова кислота льодяна Р – бутанол Р – етилацетат Р – вода Р (25:25:25:25); виявлення – пластинку обприскують розчином 2 г/л нінгідрину Р в етанолі Р, нагрівають при температурі 105 °С впродовж 10 хв, переглядають при денном у світлі). Для кількісного визначення лізиноприлу в таблетках та визначення

супровідних домішок пропонується РХ. Хроматографічні умови: розчинник – суміш метанолу Р та води Р (1:4); нерухома фаза – силікагель для хроматографії октилсилільний Р (10 мкм), розмір – 0.20 м x 4.6 мм, температура – 40 ° С; рухома фаза – ацетонітрил Р – розчин 4.08 г/л калію дигідрофосфату безводного Р, рН якого попередньо доведено до 2.0 фосфорною кислотою Р, що містить 1.25 г/л натрію гексансульфонату Р (200:800); швидкість рухомої фази – 1.0 мл/хв; детектування – спектрофотометрично за довжини хвилі 215 нм.

У ЄФ [4] є монографія на субстанцію лізиноприлу. Для ідентифікації лізиноприлу у субстанції пропонується визначення питомого обертання та метод абсорбційної спектрофотометрії в інфрачервоній області, для кількісного визначення лізиноприлу в субстанції – алкаліметрія з потенціометричним фіксуванням кінцевої точки титрування. Для визначення супровідних домішок лізиноприлу ЄФ пропонує РХ. Хроматографічні умови: розчинник – рухома фаза А; нерухома фаза – силікагель для хроматографії октилсилільний Р (5 мкм), розмір – 0.25 м x 4.6 мм, температура: 50 ° С; рухома фаза А – ацетонітрил Р1 – розчин 3.12 г/л калію дигідрофосфату безводного Р, рН якого попередньо доведено до 3.8 фосфорною кислотою розведеною Р (3:97), рухома фаза Б – ацетонітрил Р1 – розчин 3.12 г/л калію дигідрофосфату безводного Р, рН якого попередньо доведено до 3.5 фосфорною кислотою розведеною Р (20.5:79.5); швидкість рухомої фази – 1.6 мл/хв; детектування – спектрофотометрично за довжини хвилі 210 нм.

У джерелах літератури представлені численні хроматографічні методики визначення лізиноприлу у субстанції та ЛФ, зокрема ВЕРХ [40-47], капілярний електрофорез [48, 49]. Описані також вольтамперометричні [50], полярографічні [51] та спектрофлуориметричні методики визначення лізиноприлу [52]. У фармацевтичному аналізі на сьогоднішній день для визначення лізиноприлу часто використовується спектрофотометрія в УФ-та видимій областях з використанням різних реагентів [53-60].

Індійськими вченими Chauhan V., Prajapati S. T., Patel C. N. запропонована ВЕРХ/УФ методика одночасного визначення лізиноприлу та

амлодипіну в ЛФ з використанням хроматографічної колонки Phenomenex C₁₈ (250 x 4.6 мм, 5 мкм) та рухомої фази – суміші 0.02 М фосфатного буферного розчину та метанолу (75:25, рН 7.0). Швидкість рухомої фази – 1.0 мл/хв, довжина хвилі детектування – 212 нм. Час утримування амлодипіну становив 4.11 хв, лізиноприлу – 7.29 хв. Аналітична методика була лінійною в діапазоні концентрацій 10-110 мкг/мл. Розроблена методика валідована та запропонована для визначення лізиноприлу та амлодипіну в ЛФ [40].

Bhaskara Raju V. та Lakshmana Rao A. розроблено хроматографічну методику визначення лізиноприлу в ЛФ. У запропонованій методиці використовується хроматографічна колонка Xterra C₈ (150 мм × 4.6 мм i.d., 3.5 мкм) та рухома фаза – суміш фосфатного буферного розчину та метанолу (35:65), швидкість рухомої фази – 0.8 мл/хв, довжина хвилі детектування – 215 нм. Аналітична методика показала відмінну лінійність в діапазоні концентрації 20-60 мкг/мл. Авторами продемонстровано, що методика є лінійною, правильною та прецизійною, що дає змогу використовувати її для рутинного контролю якості ЛФ лізиноприлу [41].

Науковцями фармацевтичної компанії Replek (Північна Македонія) запропоновано ВЕРХ/УФ методику визначення лізиноприлу в таблетках без використання іоннопарних реагентів, високих температур колонки та кислій рухомої фази. Беручи до уваги значення рК_a лізиноприлу, хроматографування оптимізовано за допомогою колонок Purospher C₁₈e STAR (125 мм × 4 мм i.d., 5 мкм), Lichrospher 100 C₁₈e (125 мм × 4 мм i.d., 5 мкм), Purospher C₁₈e STAR (150 мм × 4.6 мм i.d., 5 мкм), Discovery C₁₈ (100 мм × 4.6 мм i.d., 5 мкм), Nucleosil C₁₈ (250 мм × 4.6 мм i.d., 10 мкм), RP Select B (75 мм × 4 мм i.d., 5 мкм), Purospher C₈ (55 мм × 4 мм i.d., 5 мкм) та рухомої фази, що складалася з метанолу та амонійного (або калієвого) дигідрофосфатного буфера (рН 7.2) зі швидкістю рухомої фази 1.1 мл/хв, УФ-детектування за довжини хвилі 214 нм і температурою колонки 40 °С. Розроблена методика валідована та показала можливість застосування для визначення лізиноприлу в комбінованих ЛФ [42].

Болгарськими вченими описано ВЕРХ/УФ методику визначення лізиноприлу в ЛФ з використанням хроматографічної колонки LiChrospher RP-

$_{18}$ (250 мм × 4 мм i.d., 10 мкм) та рухої фази, що складалася з ацетонітрилу та фосфатного буфера (30:70, рН 2.0). Швидкість рухої фази – 1.0 мл/хв, довжина хвилі детектування – 215 нм. Час утримування лізиноприлу становив 6 хв. Запропонована методика може використовуватися для визначення лізиноприлу в таблетках при рутинному контролі якості [43].

Vikas Chander et al. запропоновано ВЕРХ/УФ методику визначення лізиноприлу в таблетованій ЛФ. В розробленій методиці використовується хроматографічна колонка Nucleosil (125 мм × 4 мм i.d., 5 мкм) та рухома фаза – суміш буферного розчину, ізопропанолу та триетиламіну (95:5:0.1). Швидкість рухої фази – 1.0 мл/хв, довжина хвилі детектування – 215 нм. Час утримування лізиноприлу становив 7 хв. Валідована аналітична придатна для кількісного визначення лізиноприлу в ЛФ [44].

Обернено-фазову ВЕРХ з УФ-спектрофотометричним детектуванням методику визначення лізиноприлу та гліклазиду в ЛФ описано науковцями з Університету Мармари (Туреччина). У запропонованій методиці використовувалася хроматографічна колонка Zorbax C₈ (250 мм × 4.6 мм i.d., 5 мкм) та рухома фаза – суміш метанолу та води (65:35, рН 3.0), швидкість рухої фази – 1.0 мл/хв, довжина хвилі детектування – 215 нм. Час утримування лізиноприлу становив 2.883 хв, гліклазиду – 7.456 хв. Розроблена методика була лінійною в діапазоні концентрацій 5-20 мкг/мл для лізиноприлу і 15-60 мкг/мл для гліклазиду. Запропонована аналітична методика успішно застосована для аналізу лізиноприлу та гліклазиду в ЛФ [45].

Nerella Sridhar Goud et al. розроблено хроматографічну методику визначення лізиноприлу в ЛФ з використанням хроматографічної колонки Hypersil BDS C₁₈ (250 мм × 4.6 мм i.d., 5 мкм) та рухої фази, що складалася з фосфатного буферного розчину рН 5.0 та ацетонітрилу (96:4), швидкості рухої фази – 2.0 мл/хв, довжини хвилі детектування – 210 нм. Час утримування лізиноприлу становив 3.68 хв. Аналітична методика була лінійною в діапазоні концентрацій 6.0-30.0 мкг/мл. Запропонована методика успішно застосована для аналізу лізиноприлу в ЛФ [46].

Досить цікавим був підхід індійських науковців до розробки ВЕРХ-методики визначення лізиноприлу та амлодипіну в ЛФ з використанням принципів Quality by Design («Якість шляхом розробки»). Дизайн Бокс-Бенкена використано для оптимізації рухомої фази, швидкості потоку та рН буферного розчину, в результаті чого встановлено оптимізовані умови хроматографування – хроматографічна колонка Kromasil C8 (250 мм × 4.6 мм i.d., 5 мкм), рухома фаза – суміш фосфатного буферного розчину та метанолу (25:75), рН буферного розчину – 6.5, швидкість рухомої фази – 1 мл/хв. Час утримування амлодипіну становив 2.33 хв, лізиноприлу – 3.59 хв. Лінійність спостерігалася в діапазоні концентрацій від 10 мкг до 50 мкг/мл. Запропонована методика успішно застосовувана для рутинного аналізу ЛФ лізиноприлу та амлодипіну [47].

ВЕРХ/УФ методики визначення лізиноприлу в ЛЗ, які описано в літературних джерелах, наведено в табл. 1.2.

Вченими Hillaert S. et al. запропоновано методику капілярного електрофорезу восьми ІАПФ, а саме еналаприлу, лізиноприлу, квінаприлу, фозиноприлу, периндоприлу, раміприлу, беназеприлу та цилазаприлу, за такими параметрами: буферний розчин, органічні модифікатори, поверхнево-активні речовини. Найважливішим параметром обрано рН буферного розчину. Додавання додецилсульфату натрію негативно вплинуло на симетрію піку, а селективність не покращувалася. Розділення восьми аналітів проводили за допомогою двох фосфатних буферів (кожен 100 мМ) при рН 7.0 і рН 6.25 відповідно. Ця комбінація була необхідною для селективної ідентифікації структурно супутніх речовин через їх подібні значення рКа. Роком пізніше цією самою групою науковців розроблено методику капілярного електрофорезу для одночасного визначення гідрохлоротіазиду та декількох ІАПФ: еналаприлу, лізиноприлу, квінаприлу, фозиноприлу, раміприлу та цилазаприлу. Розділення проводили на капілярі з кварцевого кремнезему (загальна довжина 52 см x 75 мкм I.D.) з використанням натрій-фосфатного буфера (рН 7.25; 100 мМ). Методика успішно застосована для кількісного визначення зазначених аналітів в ЛФ. Авторами проведена валідація розробленої аналітичної методики [49].

Таблиця 1.2 – ВЕРХ/УФ методики визначення лізиноприлу в ЛЗ, які описано в літературних джерелах

№	Зразок	Хроматографічна колонка	Рухома фаза	Детектор	Хроматографічні умови	Посилання на джерело літератури
1	Комбінація з амлодипіном	Phenomenex C ₁₈ (250 x 4.6 мм, 5 мкм)	0.02 М фосфатний буферний розчин та метанол (75:25, рН 7.0)	УФ (212 нм)	Швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв	[40]
2	ЛФ	Xterra C ₈ (150 мм × 4.6 мм i.d., 3.5 мкм)	Фосфатний буферний розчин та метанол (35:65)	УФ (215 нм)	Швидкість рухомої фази 0.8 мл/хв	[41]
3	ЛФ	Purospher C _{18e} STAR (125 мм × 4 мм i.d., 5 мкм), Lichrospher 100 C _{18e} (125 мм × 4 мм i.d., 5 мкм), Purospher C _{18e} STAR (150 мм × 4.6 мм i.d., 5 мкм), Discovery C ₁₈ (100 мм × 4.6 мм i.d., 5 мкм), Nucleosil C ₁₈ (250 мм × 4.6 мм i.d., 10 мкм), RP Select B (75 мм × 4 мм i.d., 5 мкм), Purospher C ₈ (55 мм × 4 мм i.d., 5 мкм)	Метанол та амонійний (або калієвий) дигідрофосфатний буфер (рН 7.2)	УФ (214 нм)	Швидкість рухомої фази 1.1 мл/хв	[42]
4	ЛФ	LiChrospher RP-18 (250 мм × 4 мм i.d., 10 мкм)	Ацетонітрил та фосфатний буфер (30:70, рН 2.0)	УФ (215 нм)	Швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв	[43]
5	Таблетки	Nucleosil (125 мм × 4 мм i.d., 5 мкм)	Буферний розчин, ізопропанол та триетиламін (95:5:0.1)	УФ (215 нм)	Швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв	[44]
6	Комбінація з гліклазидом	Zorbax C ₈ (250 мм × 4.6 мм i.d., 5 мкм)	Метанол та вода (65:35, рН 3.0)	УФ (215 нм)	Швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв	[45]
7	ЛФ	Hypersil BDS C ₁₈ (250 мм × 4.6 мм i.d., 5 мкм)	Фосфатний буферний розчин рН 5.0 та ацетонітрил (96:4)	УФ (210 нм)	Швидкість рухомої фази 2.0 мл/хв	[46]
8	Комбінація з амлодипіном	Kromasil C8 (250 мм × 4.6 мм i.d., 5 мкм)	Фосфатний буферний розчин та метанол (25:75)	УФ (215 нм)	Швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв	[47]

Вченими Sarma V.M. et al. описано чутливу та екологічно чисту методику екстракційно-спектрофотометричного визначення лізиноприлу в ЛФ. Методика базувалася на утворенні синього забарвленого координаційного комплексу між лізиноприлом і кобальту тіоціанатом при відповідному значенні рН. Комплекс у нейтральному середовищі екстрагували в шар поверхнево-активної речовини шляхом екстракції при точці помутніння з використанням неіонної поверхнево-активної речовини Triton X-114, потім шар поверхнево-активної речовини розчиняли у відповідному об'ємі етанолу і вміст лізиноприлу визначали спектрофотометрично за довжини хвилі 625 нм. Калібрувальна крива була лінійною ($R^2=0.99996$) у діапазоні концентрацій 1-6 мкг/мл. Запропонована аналітична методика успішно використана для визначення лізиноприлу в ЛФ [53].

Румунськими науковцями запропоновано чутливу, точну та експресну методику кількісного визначення лізиноприлу в ЛФ, що базувалася на взаємодії лізиноприлу з нінгідрином в присутності калію гідроксиду з утворенням фіолетового продукту реакції з максимумом поглинання за довжини хвилі 567 нм. Підпорядкування закону Бугера-Ламберта-Бера за реакцією з нінгідрином – 10 – 30 мкг/мл, а калібрувальна крива описувалася рівнянням регресії $A = 0.0312 C \text{ (мкг/мл)} - 0.2262$ (коефіцієнт кореляції $R^2 = 0.9981$). Авторами продемонстровано вплив температури, часу нагрівання та концентрації на утворення продукту реакції, на основі чого підібрано оптимальні умови методики кількісного визначення лізиноприлу. Проведена валідація аналітичної методики. Розроблена спектрофотометрична методика успішно застосована для кількісного визначення лізиноприлу в трьох ЛФ різних виробників [54].

Rahman N. et al. розроблено дві прості, швидкі та чутливі спектрофотометричні методики визначення лізиноприлу в ЛФ. Методики базувалися на реакції комплексоутворення лізиноприлу з 7,7,8,8-тетраціанохінодиметаном (TCNQ) та *n*-хлораніловою кислотою (рСА) в полярних середовищах з утворенням забарвлених аніонів TCNQ та рСА, які

визначали спектрофотометрично за довжин хвиль 743 нм і 525 нм. За оптимізованих експериментальних умов закон Бера виконувався в діапазоні концентрацій 2-26 мкг/мл та 25-300 мкг/мл. Обидві спектрофотометричні методики застосовані для визначення лізиноприлу в ЛФ [55].

El-Emam A. A. et al. описано дві чутливі, прості та специфічні методики (спектрофотометрія та обернено-фазова ВЕРХ із флуориметричним детектуванням) визначення лізиноприлу в ЛФ, а також у плазмі людини із застосуванням твердофазної екстракції. Обидві методики базувалися на дериватизації лізиноприлу 7-хлор-4-нітробензо-2-окса-1,3-діазолом (NBD-Cl) у боратному буфері з рН 9 з утворенням жовтого флуоресцентного продукту. Спектрофотометрична методика ґрунтувалася на вимірюванні утвореного жовтого кольору розчину за довжини хвилі 470 нм після оптимізації умов проведення реакції. Методика ВЕРХ базувалася на вимірюванні дериватизованого продукту за довжини хвилі 540 нм. Розділення дериватизованого ЛЗ, надлишку реагенту та внутрішнього стандарту (буметаніду) проводили на колонці з оберненою фазою ODS із використанням ізократичного елюювання метанолом та 0.02 М розчином натрію дигідрофосфату, рН 3.0 (55:45) і швидкості рухомої фази 1.0 мл/хв. Калібрувальні криві були лінійними в діапазонах концентрацій 2-20 або 0.02-3.2 мкг/мл лізиноприлу для спектрофотометричної та ВЕРХ методики відповідно. Запропоновані методики застосовані для визначення лізиноприлу у ЛФ, моно- або у комбінації з гідрохлоротіазидом [56].

Пакистанськими вченими запропоновано спектрофотометричну методику визначення лізиноприлу в ЛФ. Методика базувалася на реакції нінгідрину з первинним аміном (лізиноприлом) в присутності ДМФА. В результаті реакції утворювався зеленувато-блакитний кольоровий продукт реакції з максимумом поглинання за довжини хвилі 600 нм. За оптимізованих експериментальних умов закон Бера виконувався в діапазоні концентрацій 10-150 мкг/мл. Запропонована спектрофотометрична методика застосована для

визначення лізиноприлу в ЛФ, а результати аналізів були статистично порівняні з офіційною потенціометричною методикою [57].

Paraskevas G. et al. розроблено спектрофотометричну методику визначення лізиноприлу в моно-препаратах та в комбінації з гідрохлортіазидом, на основі реакції дериватизації з 1-флуор-2,4-динітробензолом (реагент Сенгера). Водні розчини лізиноприлу реагували з 1-флуор-2,4-динітробензолом (в ацетонітрилі) при рН 8.2 (боратний буфер) при 60 °С впродовж 45 хв. Після підкислення НСІ для знебарвлення 2,4-динітрофеноляту (продукту лужного гідролізу 1-флуор-2,4-динітробензолом) вимірювали абсорбцію лізиноприл-похідного за довжини хвилі 356.5 або 405.5 нм (лише за довжини хвилі 405.5 нм, якщо наявний гідрохлортіазид). Авторами проведена валідація аналітичної методики. Результати, отримані при аналізі ЛФ запропонованою методикою, корелювали з результатами, отриманими офіційною лізиноприл-похідне методикою. Розроблена спектрофотометрична методика може бути використана для швидкого рутинного аналізу лізиноприлу на однорідність вмісту, дослідження профілю розчинення та аналізу ЛЗ [58].

Preetham N. D. et al. описано УФ-спектрофотометричну методику визначення лізиноприлу в ЛФ з використанням максимуму поглинання за довжини хвилі 218 нм. Лінійність вивчена в діапазоні концентрацій 2–12 мкг/мл. Розроблена спектрофотометрична методика валідована та може використовуватися для рутинного аналізу лізиноприлу в ЛФ [59].

1.5 Огляд аналітичних методик одночасного визначення аторвастатину та лізиноприлу в лікарських засобах

В науковій літературі описано лише два методи одночасного визначення аторвастатину та лізиноприлу, а саме ВЕРХ [60] та міцелярний електрокінетичний капілярний метод [61]. У першій методиці [60] утримування лізиноприлу є незадовільним і він погано розділяється від мертвого об'єму, що має вирішальне значення для хроматографічного розділення сумішей АФІ у

ЛФ, а особливо в біологічних зразках. Пік лізиноприлу починається з мертвого об'єму, що ставить під загрозу його чистоту та правильність аналітичної методики. Використана хроматографічна колонка розміром 250 мм x 4.6 мм мала об'єм 4,15 мл, а час утримування лізиноприлу – 2 хв, отриманий за швидкості потоку 1 мл/хв, давав 48% її геометричного об'єму, що недостатньо для досягнення утримування, а згодом розділення аналіту від мертвого об'єму колонки зазначеного розміру, заповненої 5 мкм матрицею частинок. Він не задовольняє основну вимогу методу ВЕРХ — його селективність.

Іншим описаний в літературі методом [61] є міцелярний електрокінетичний капілярний метод, він є більш складним, непридатним для рутинного аналізу в лабораторіях контролю якості, потребує досвіду, ресурсів, таких як специфічне обладнання та колонка, тому він небажаний для виробників ЛЗ.

Висновки до розділу 1

1. Науковці групи GREACE Study Collaborative Group підтвердили ефективність комбінації статину та ІАПФ, яка зменшує серцево-судинні захворювання більше, ніж монотерапія статину, і значно більше, ніж монотерапія ІАПФ. Тому фіксована комбінація аторвастатину кальцію та лізиноприлу є вдалою для лікування пацієнтів з есенціальною гіпертензією та інфарктом міокарда.

2. Аналіз існуючих методів визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу в ЛЗ продемонстрував, що найбільш використовуваними методами є УФ-та видима спектрофотометрія і ВЕРХ. Проте, описані в літературі методи аналізу часто мають обмежене застосування через не завжди достатню чутливість, специфічність, залежність від рН, необхідність нагрівання, трудомісткість, довготривалість, застосування коштовних приладів та токсичних реагентів.

3. Аналіз представлених в літературі методик визначення домішок аторвастатину кальцію показав, що токсичні та часто нестабільні розчинники

використовуються як компоненти рухомої фази, пробопідготовка, загальний час хроматографування є довготривалими, а стандартні зразки домішок аторвастатину кальцію є дороговартісними.

4. Науковці при розробці аналітичних методик визначення аторвастатину кальцію, його домішок, лізиноприлу часто ігнорують принципи «зеленої хімії», що обмежує застосування розроблених аналітичних методик.

5. З урахуванням недоліків існуючих методів визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу у ЛЗ передбачається розробка і валідація нових методик аналізу аторвастатину кальцію та лізиноприлу в ЛЗ і оптимізація методики визначення домішок аторвастатину кальцію в таблетках.

6. Розробка методик кількісного визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу передбачала їх визначення в моно-препаратах та дуже рідко в ЛФ в комбінаціях з іншими АФІ. Розробка аналітичних методів одночасного кількісного визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу для потреб рутинного аналізу ЛЗ лабораторіями з контролю якості залишається невирішеним завданням.

РОЗДІЛ 2

ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ОБ'ЄКТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА МОДЕЛЮВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ

Для експериментального підтвердження теоретичних підходів, які пропонуються нами у роботі, на підставі аналітичних оглядів обрано аторвастатин та лізіноприл, що відображає чітке розуміння питання щодо фармацевтичного аналізу та стандартизації ЛЗ статинів та ІАПФ з використанням спектрофотометричних і хроматографічних методів; розроблено ряд оригінальних методик кількісного визначення аторвастатину кальцію та лізіноприлу в субстанціях та ЛЗ, методик кількісного визначення запропонованих аналітів для вивчення проникності через кишкову мембрану та для застосування в тесті «Розчинення», а також методик визначення домішок аторвастатину кальцію в таблетках, проведено процедуру їх валідацію. Дизайн експерименту наведено на рис. 2.1.

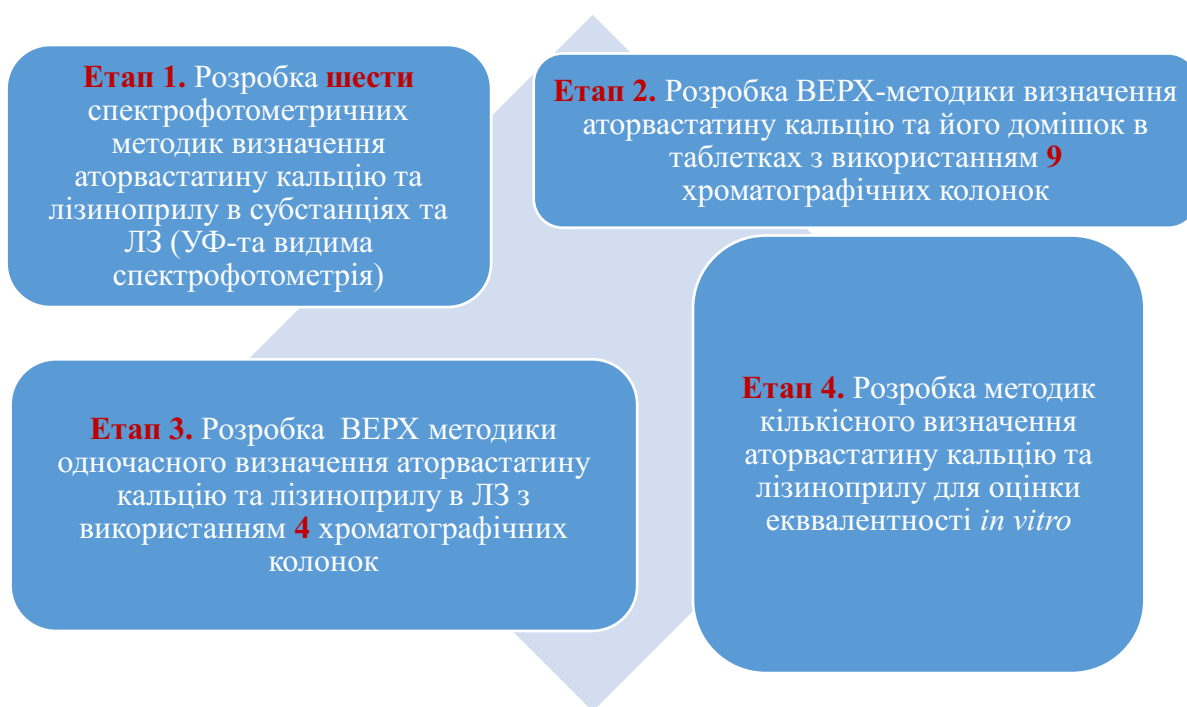


Рисунок 2.1 – Дизайн експерименту

Методологія розробки аналітичної (спектрофотометричної чи хроматографічної методики визначення лізиноприлу та/або аторвастатину) в ЛФ передбачала такі етапи:

1. Вивчення рекомендацій ДФУ та ЄФ, аналіз даних сучасної наукової літератури.
2. Вибір оптимальних умов проведення аналізу (для спектрофотометрії – вибір реагента, оптимального розчинника, температури, довжини хвилі, визначення стехіометричних коефіцієнтів), (для хроматографії – вибір оптимальної рухомої фази, хроматографічної колонки, температури колонки, швидкості подачі рухомої фази, способу детектування).
3. Власне розробка спектрофотометричної/хроматографічної методики визначення лізиноприлу та/або аторвастатину (можливість застосування розробленої методики до аналізу ЛФ).
4. Валідація розробленої аналітичної методики за такими валідаційними характеристиками як специфічність, лінійність, діапазон застосування, правильність та прецизійність, робасність.
5. Розрахування оцінки впливу аналітичної методики на навколишнє середовище (метод аналітичної еко-шкали та метод AGREE (Analytical GREEnness) (програмне забезпечення розроблено Гданським технічним університетом, Польща)).

Методи інструментального аналізу мають беззаперечні переваги в аналізі ЛЗ [62-71]. Проте, представлені існуючі аналітичні методики визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу в ЛЗ в розділах 1.2, 1.4 часто мають обмежене застосування через не завжди достатню чутливість, специфічність, залежність від рН, необхідність нагрівання, трудомісткість, довготривалість, застосування коштовних приладів та токсичних реагентів. Щодо аналітичних методик визначення домішок аторвастатину кальцію, описаних в розділі 1.3, то токсичні, часто нестабільні розчинники використовуються як компоненти рухомої фази, пробопідготовка та загальний час хроматографування є

довготривалими, а стандартні зразки домішок аторвастатину кальцію є дороговартісними.

На сьогоднішній день науковцями при розробці аналітичних методик повинні бути дотримані сучасні тенденції фармацевтичного аналізу та враховані принципи «зеленої хімії». Як випливає з представлених в розділах 1.2-1.4 методів аналізу, часто науковці при розробці аналітичних методик визначення аторвастатину кальцію, його домішок, лізиноприлу ігнорують принципи «зеленої хімії», що обмежує застосування розроблених аналітичних методик [72-82]. Більше того, у 2021 році високореєтинговий журнал «TrAC Trends in Analytical Chemistry» (видавництво Elsevier, Q1, H-index – 161, SJR 2020 – 2.28) опублікував спільну статтю польських та канадійських науковців щодо концепції «білої аналітичної хімії» як розширення принципів «зеленої хімії». Вченими запропоновано 12 принципів «білої аналітичної хімії» як альтернативу відомим 12 «зеленої аналітичної хімії» [83].

На рис. 2.2 представлено «Дерево рішень» щодо вибору методик аналізу аторвастатину кальцію та лізиноприлу. Як видно з рис. 2.2, методи УФ- та видимої спектрофотометрії і ВЕРХ використовуються з метою розробки методик аналізу аторвастатину кальцію, його домішок та лізиноприлу в моно- та комбінованих препаратах. Визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу в моно-препаратах є простим завданням, що дає можливість використання УФ- та видимої спектрофотометрії і ВЕРХ. Щодо розробки методик аналізу аторвастатину кальцію та лізиноприлу в комбінованих ЛЗ, то необхідним є аналіз фізико-хімічних властивостей усіх аналітів та прийняття висновку щодо можливості застосування методу спектрофотометрії. Якщо інші АФІ фіксованої комбінації будуть заважати визначенню аторвастатину кальцію/лізиноприлу, то перевагу надають ВЕРХ.

Щодо розробки методик аналізу домішок аторвастатину кальцію, то безапелюсним є використання методу ВЕРХ, враховуючи той факт, що ЄФ [4] регламентує визначення домішок А, В аторвастатину кальцію не більше 0.3 %,

домішок С, D аторвастатину кальцію не більше 0.15 %, неспецифічних домішок аторвастатину кальцію не більше 0.10 %.

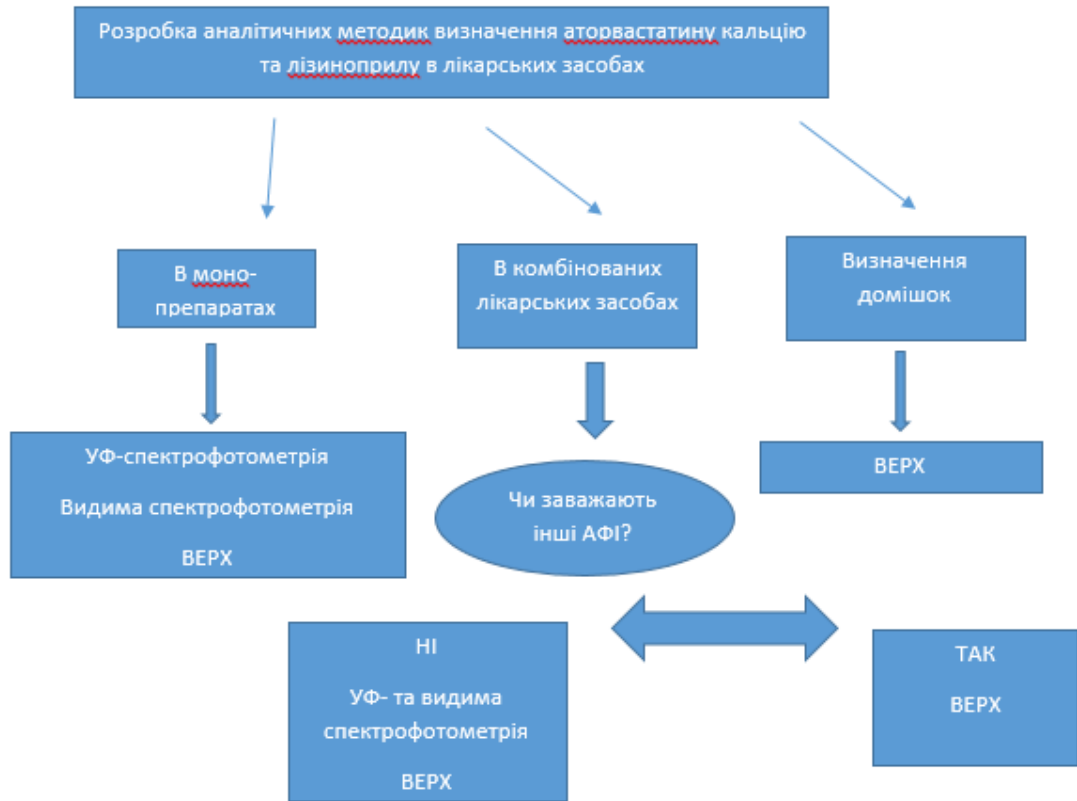


Рисунок 2.2 – «Дерево рішень» щодо вибору методик аналізу аторвастатину кальцію та лізиноприлу

Аналізуючи вищесказане можна зробити висновок, що найбільш виправданим методом аналізу домішок аторвастатину кальцію в таблетках є ВЕРХ, одночасного кількісного визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу в ЛФ – ВЕРХ/УФ, кількісного визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу в моно-препаратах – ВЕРХ/УФ та УФ- і видима спектрофотометрія.

У п. 2.1 цього розділу викладено фізико-хімічні властивості аторвастатину кальцію та лізиноприлу.

2.1 Фізико-хімічні властивості об'єктів дослідження

У хімічному відношенні аторвастатин кальцію є кальцію (3R,5R)-7-[2-(4-фторфеніл)-5-(1-метилетил)-3-феніл-4-(фенілкарбамоїл)-1H-пірол-1-іл]-3,5-дигідроксигептаноату тригідратом [4] (рис. 2.3).

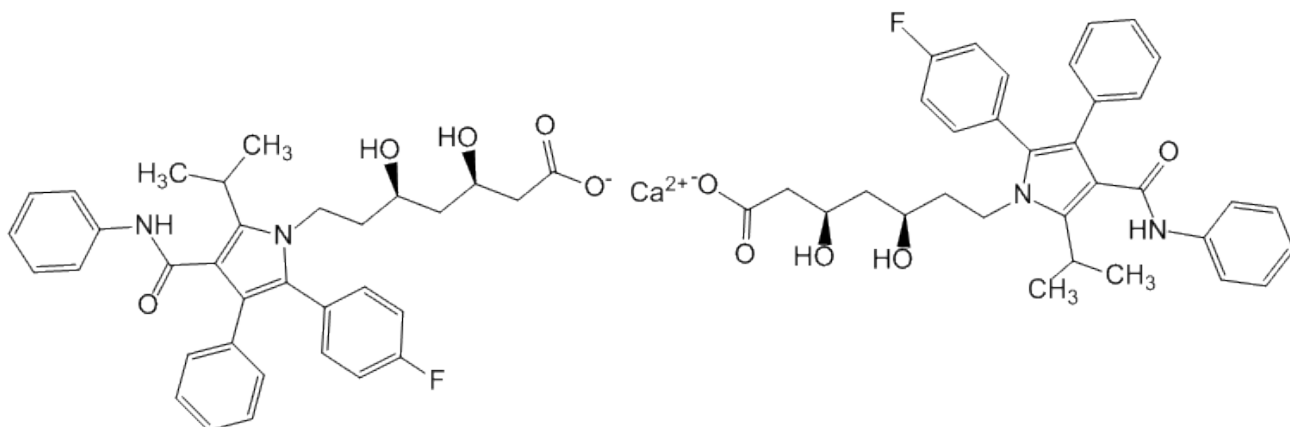
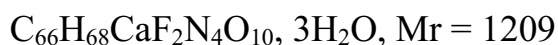


Рисунок 2.3 – Структурна формула аторвастатину кальцію



Фізико-хімічні властивості: білий чи майже білий порошок. Виявляє поліморфізм. Дуже мало розчинний у воді, мало розчинний у етанолі, практично нерозчинний в метиленхлориді. $\log P=6.36$, $pK_a=4.46$.

При виконанні дослідження використовували фармакопейний стандартний зразок (ФСЗ) аторвастатину кальцію тригідрат (“Sigma-Aldrich”, ≥ 98 %, HPLC), таблетки “Аторвастатин-Тева” 10 мг серії № 19939, 15683, 20284, Аторвакор 10 мг серія № 70920, Аторвакор 20 мг серія № 130921, Лівостор 20 мг серія ДО 0724, стандартні зразки домішки аторвастатину А, домішки аторвастатину В, домішки аторвастатину С, домішки аторвастатину D, домішки аторвастатину F, домішки аторвастатину G, домішки аторвастатину Н (“Sigma-Aldrich”, EDQM).

У хімічному відношенні лізиноприл є (2S)-1-[(2S)-6-аміно-2-[[[(1S)-1-карбокси-3-фенілпропіл]-аміно]гексаноїл]піролідин-2-карбоксильної кислоти дигідратом [4] (рис. 2.4).

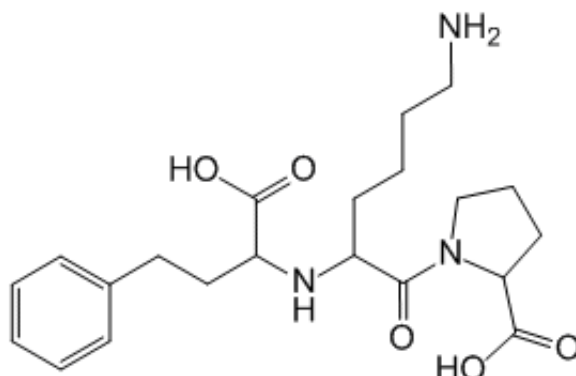
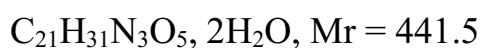


Рисунок 2.4 – Структурна формула лізиноприлу



Фізико-хімічні властивості: білий чи майже білий кристалічний порошок. Розчинний у воді, практично нерозчинний в етанолі та гептані. Log P=-1.22, рКа 2.5, 4, 6.7, 10.5.

При виконанні дослідження використовували фармакопейний стандартний зразок лізиноприлу дигідрат (“Sigma-Aldrich”, $\geq 98\%$, HPLC), таблетки Лізиноприл-Астрафарм 10 мг серії № 241119, 221119, 121220, 050620, 111220, 161220, 021021, Лізиноприл-Астрафарм 20 мг серії № 090919, 111119, 040620, Лізиноприл-Тева 10 мг серії № V16583A, V16673V, V10573C, W05773C, W08524A, W19438A.

Оскільки на фармацевтичному ринку відсутні будь-які комерційні комбінації фіксованих доз аторвастатину кальцію та лізиноприлу, застосування розроблених аналітичних методик одночасного кількісного визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу проводили на лабораторно виготовлених таблетках (містять 20 мг аторвастатину та 20 мг лізиноприлу на таблетку, целюлоза мікрокристалічна, натрію карбонат безводний, мальтоза, натрію кроскармелоза, кремнію діоксид колоїдний безводний, магнію стеарат як допоміжні речовини таблетки).

2.2 Характеристика методик дослідження

На основі аналізу наукових публікацій щодо методик кількісного визначення аторвастатину кальцію та лізіноприлу в субстанціях та ЛЗ, а також власних попередніх досліджень обрано методи УФ- та видимої спектрофотометрії і ВЕРХ.

Взяття наважок досліджуваних зразків, речовин проводили з точністю ± 0.2 мг. Для вимірювання об'ємів досліджуваних розчинів, зразків тощо використовували піпетки, циліндри та мірні колби 2 класу.

Для досліджень використовували розчинники класу ч.д.а (Chromasolv, Honeywell).

2.2.1 УФ-спектрофотометрична методика визначення лізіноприлу в лікарських засобах [2.2.25 ДФУ]

При виконанні даного дослідження застосовували таке обладнання: спектрофотометр «Shimadzu UV-1800» (Японія), ваги лабораторні електронні RAD WAG AS 200/C, ультразвукову баню Sonorex Digitec DT100H., мірний посуд класу А. Вимірювання абсорбції проводили у УФ-області спектра в прямокутних кварцових кюветах із товщиною шару 1 см на фоні компенсаційного розчину. Для обробки спектрів використовували програмний пакет Software UV-Probe 2.62. Статистичну обробку та визначення валідаційних характеристик проводили згідно з вимогами ДФУ.

Приготування випробовуваного розчину таблеток лізіноприлу: точну наважку порошку таблеток, еквівалентну 20 мг лізіноприлу, переносили до мірної колби об'ємом 200.0 мл, додавали 130 мл *метанолу Р*, розчиняли впродовж 5-10 хв при нагріванні на водяній бані при температурі 50 °С, охолоджували і доводили об'єм розчину *метанолом Р* до позначки, перемішували і фільтрували. Переносили 2.0 мл отриманого розчину до мірної

колби об'ємом 100.0 мл, доводили об'єм розчину *метанолом Р* до позначки та перемішували.

Приготування випробовуваного розчину субстанції лізиноприлу: 20 мг субстанції лізиноприлу переносили до мірної колби об'ємом 200.0 мл, додавали 130 мл *метанолу Р*, розчиняли і доводили об'єм розчину *метанолом Р* до позначки, перемішували і фільтрували. Переносили 2.0 мл отриманого розчину до мірної колби об'ємом 100.0 мл, доводили об'єм розчину *метанолом Р* до позначки та перемішували.

Приготування розчину порівняння лізиноприлу: 20 мг ФСЗ лізиноприлу переносили до мірної колби об'ємом 200.0 мл, додавали 130 мл *метанолу Р*, розчиняли і доводили об'єм розчину *метанолом Р* до позначки, перемішували. Переносили 2.0 мл отриманого розчину до мірної колби об'ємом 100.0 мл, доводили об'єм розчину *метанолом Р* до позначки та перемішували.

Компенсаційний розчин – *метанол Р*.

Вимірювали абсорбцію випробовуваного розчину та розчину порівняння на фоні компенсаційного розчину за аналітичної довжини хвилі 212 нм.

2.2.2 Спектрофотометрична методика визначення лізиноприлу в субстанції та лікарських засобах за нінгідриновою реакцією [2.2.25 ДФУ]

Приготування випробовуваного розчину субстанції лізиноприлу: 100 мг субстанції лізиноприлу переносили до мірної колби об'ємом 100.00 мл з 65.00 мл *води Р*. Суміш струшували впродовж 15 хв, доводили до об'єму 100.00 мл *водою Р* і фільтрували за допомогою нейлонової фільтруючої мембрани 0.2 мкм. У кожену пробірку відбирали 1.0 мл одержаного розчину, додавали 1.1 мл 0.2 % розчину нінгідрину *Р*. Суміш витримували на водяній бані при $(95 \pm 2) ^\circ\text{C}$ впродовж 25 хв, потім охолоджували до кімнатної температури і переносили до мірної колби на 25.00 мл, доводили *водою Р* до позначки та перемішують.

Приготування випробовуваного розчину таблеток лізиноприлу: точну наважку порошку розтертих таблеток, еквівалентну 100 мг лізиноприлу, переносили до мірної колби об'ємом 100.00 мл з 65.00 мл *води Р*. Суміш

струшували впродовж 15 хв, доводили до об'єму 100.00 мл водою *P* і фільтрували за допомогою нейлонової фільтруючої мембрани 0.2 мкм. Потім фільтрат піддавали подальшій пробопідготовці з використанням описаної вище процедури.

Приготування розчину порівняння лізиноприлу: 100 мг ФСЗ лізиноприлу переносили до мірної колби об'ємом 100.00 мл з 65.00 мл води *P*. Суміш струшували впродовж 15 хв, доводили до об'єму 100.00 мл водою *P*. Потім піддавали подальшій пробопідготовці з використанням описаної вище процедури.

Вимірюювали абсорбцію випробовуваного розчину та розчину порівняння на фоні компенсаційного розчину (без визначуваного аналіту) за аналітичної довжини хвилі 400 нм.

2.2.3 Спектрофотометрична методика визначення лізиноприлу в субстанції та лікарських засобах за реакцією з купруму (II) сульфатом [2.2.25 ДФУ]

Приготування випробовуваного розчину субстанції лізиноприлу: 0.37 г субстанції лізиноприлу переносили до мірної колби об'ємом 50.00 мл з 35.00 мл води *P*. Суміш струшували впродовж 15 хв, доводили до об'єму 50.00 водою *P* і фільтрували за допомогою нейлонової фільтруючої мембрани 0.2 мкм. 5.0 мл одержаного розчину переносили до мірної колби місткістю 25.00 мл, додавали 10.0 мл 1.0×10^{-3} М розчину купруму (II) сульфату *P*, струшували. Об'єм доводили до позначки шляхом додавання води *P*, ретельно перемішували.

Приготування випробовуваного розчину таблеток лізиноприлу: точну наважку порошку розтертих таблеток, еквівалентну 0.37 г лізиноприлу, переносили до мірної колби об'ємом 50.00 мл з 35.00 мл води *P*. Суміш струшували впродовж 15 хв, доводили до об'єму 50.00 водою *P* і фільтрували за допомогою нейлонової фільтруючої мембрани 0.2 мкм. Потім фільтрат піддавали подальшій пробопідготовці з використанням описаної вище процедури.

Приготування розчину порівняння лізиноприлу: 0.37 г ФСЗ лізиноприлу переносили до мірної колби об'ємом 50.00 мл з 35.00 мл *води Р*. Суміш струшували впродовж 15 хв, доводили до об'єму 50.00 *водою Р*. Потім піддавали подальшій пробопідготовці з використанням описаної вище процедури.

Вимірювали абсорбцію випробовуваного розчину та розчину порівняння на фоні компенсаційного розчину (без визначуваного аналіту) за аналітичної довжини хвилі 730 нм.

2.2.4 УФ-спектрофотометрична методика визначення аторвастатину кальцію в лікарських засобах [2.2.25 ДФУ]

Приготування випробовуваного розчину таблеток аторвастатину: точну наважку порошку розтертих таблеток, еквівалентну 20 мг аторвастатину кальцію, переносили до мірної колби об'ємом 200.00 мл, додавали 130 мл *метанолу Р*, нагрівали впродовж 5–10 хв на водяній бані при температурі 50 °С, охолоджували і доводили об'єм розчину до позначки *метанолом Р*, перемішували та фільтрували. До мірної колби об'ємом 50.00 мл переносили 1.0 мл отриманого розчину, доводили об'єм розчину до позначки *метанолом Р* і ретельно перемішували.

Приготування випробовуваного розчину субстанції аторвастатину: 20 мг субстанції аторвастатину кальцію переносили до мірної колби об'ємом 200.00 мл, додавали 130 мл *метанолу Р*, розчиняли і доводили об'єм розчину до позначки *метанолом Р*, перемішували та фільтрували. До мірної колби об'ємом 50.00 мл переносили 1.0 мл отриманого розчину, доводили об'єм розчину до позначки *метанолом Р* і ретельно перемішували.

Приготування розчину порівняння аторвастатину: 20.0 мг ФСЗ аторвастатину кальцію переносили до мірної колби об'ємом 200.00 мл, додавали 130 мл *метанолу Р*, розчиняли, доводили об'єм розчину до позначки *метанолом Р* та ретельно перемішували. До мірної колби об'ємом 50 мл переносили 1.0 мл отриманого розчину, доводили об'єм розчину до позначки *метанолом Р* і ретельно перемішували.

Компенсаційний розчин – метанол *P*.

Вимірювали абсорбцію випробовуваного розчину та розчину порівняння на фоні компенсаційного розчину за аналітичної довжини хвилі 247 нм.

2.2.5 Спектрофотометрична методика визначення аторвастатину кальцію в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромтимоловим синім [2.2.25 ДФУ]

Приготування випробовуваного розчину таблеток аторвастатину кальцію: точну наважку порошку розтертих таблеток, еквівалентну 77.40 мг аторвастатину кальцію, переносять до мірної колби на 500.00 мл, розчиняють в 350.00 мл *етилацетату P*, доводять *етилацетатом P* до позначки, витримують в ультразвуковій бані впродовж 2 хв. Після цього розчин фільтрують через паперовий фільтр («Синя стрічка»), відкидаючи перші порції фільтрату. З наступних порцій фільтрату беруть 5.0 мл розчину, переносять до мірної колби на 50.00 мл, додають 5.0 мл 1.28×10^{-4} М розчину бромтимолового синього (БТС) в *етилацетаті P*, доводять *етилацетатом P* до позначки та перемішують.

Приготування випробовуваного розчину субстанції аторвастатину кальцію: 77.40 мг субстанції аторвастатину кальцію, переносять до мірної колби місткістю 500.00 мл, розчиняють в 350.00 мл *етилацетату P*, доводять *етилацетатом P* до позначки, витримують в ультразвуковій бані впродовж 2 хв. 5.0 мл отриманого розчину, переносять у мірну колбу об'ємом 50.00 мл, додають 5.0 мл 1.28×10^{-4} М розчину БТС в *етилацетаті P*, доводять *етилацетатом P* до позначки та перемішують.

Приготування розчину порівняння аторвастатину кальцію: 77.40 мг ФСЗ аторвастатину кальцію вміщують до мірної колби місткістю 500.00 мл, розчиняють у *етилацетаті P* та доводять *етилацетатом* до позначки, перемішують. 5.0 мл розчину, переносять до мірної колби об'ємом 50.00 мл, додають 5.0 мл 1.28×10^{-4} М розчину БТС в *етилацетаті P*, доводять *етилацетатом P* до позначки та перемішують.

Вимірюють абсорбцію випробовуваного розчину та розчину порівняння на фоні компенсаційного розчину (без визначуваного аналіту) за аналітичної довжини хвилі 420 нм.

2.2.6 Спектрофотометрична методика визначення аторвастатину кальцію в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромфеноловим синім [2.2.25 ДФУ]

Приготування випробовуваного розчину таблеток аторвастатину кальцію: точну наважку порошку розтертих таблеток, еквівалентну 125.00 мг аторвастатину кальцію, переносять до мірної колби на 250.00 мл, розчиняють в 135.00 мл метанолу *P*, доводять метанолом *P* до позначки, витримують в ультразвуковій бані впродовж 2 хв. Після цього розчин фільтрують через паперовий фільтр («Синя стрічка»), відкидаючи перші порції фільтрату. З наступних порцій фільтрату беруть 3.00 мл розчину, переносять до мірної колби на 50.00 мл, додають 3.00 мл розчину 4.12×10^{-4} М розчину БФС в метанолі *P*, доводять метанолом *P* до позначки та перемішують.

Приготування випробовуваного розчину субстанції аторвастатину кальцію: 125.00 мг субстанції аторвастатину кальцію, переносять до мірної колби місткістю 250.00 мл, розчиняють в 135.00 мл метанолу *P*, доводять метанолом *P* до позначки, витримують в ультразвуковій бані впродовж 2 хв. 3.00 мл отриманого розчину, переносять у мірну колбу об'ємом 50.00 мл, додають 3.00 мл розчину 4.12×10^{-4} М розчину БФС в метанолі *P*, доводять метанолом *P* до позначки та перемішують.

Приготування розчину порівняння аторвастатину кальцію: 125.00 мг ФСЗ аторвастатину кальцію вміщують до мірної колби місткістю 250.00 мл, розчиняють у метанолі *P* та доводять метанолом до позначки, перемішують. 3.00 мл розчину, переносять до мірної колби об'ємом 50.00 мл, додають 3.00 мл 4.12×10^{-4} М розчину БФС в метанолі *P*, доводять метанолом *P* до позначки та перемішують.

Вимірюють абсорбцію досліджуваного розчину та розчину порівняння на фоні компенсаційного розчину (без визначуваного аналіту) за аналітичної довжини хвилі 594 нм.

2.2.7 ВЕРХ-методика кількісного визначення аторвастатину кальцію та його домішок у субстанції та лікарських засобах [2.2.29 ДФУ]

При виконанні даного дослідження застосовували таке обладнання: UPLC Shimadzu LC 2040с-і 3D, ваги лабораторні електронні RAD WAG AS 200/C, ультразвукова баня Sonorex Digitec DT100H., рН метр И-160МИ, мірний посуд класу А. Для обробки хроматограм використовували програмний пакет Lab Solutions version 5.97.

Хроматографічні колонки: Agilent Poroshell C₁₈ec (4.6 мм i.d. X 100 мм, 2.7 мкм; 4.6 мм i.d. X 150 мм, 2.7 мкм), Agilent Poroshell C₈ec (4.6 мм i.d. X 100 мм, 2.7 мкм; 4.6 мм i.d. X 150 мм, 2.7 мкм), Shimadzu Nex Leaf C₁₈ SH-SPP (4.6 мм i.d. X 150 мм, 2.7 мкм), Waters Cortecs C₁₈ (4.6 мм i.d. X 100 мм, 2.7 мкм), Waters Cortecs C₈ (4.6 мм i.d. X 100 мм, 2.7 мкм), Waters Symmetry C₁₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 3.5 мкм), Zorbax C₁₈ SB (4.6 мм i.d. X 150 мм, 3.5 мкм), Zorbax C₈ Rx (4.6 мм i.d. X 150 мм, 3.5 мкм), Shim-Pack XR-ODS II (3 мм i.d. X 75 мм, 2.2 мкм) (Merck Darmsttat, Німеччина, та Shimadzu Scientific Company, Японія).

Хроматографічні умови відповідно до монографії ЄФ: комбінований ізократичний та лінійний градієнтний режим елюювання, рухома фаза А – ацетонітрил, тетрагідрофуран та ацетатний буфер (3.9 г/л амонію ацетату у воді, доведений кислотою оцтовою льодяною до рН 5.0 ± 0.1) (21:12:67), рухома фаза Б – ацетонітрил, тетрагідрофуран та ацетатний буфер (3.9 г/л амонію ацетату у воді, доведений кислотою оцтовою льодяною до рН 5.0 ± 0.1) (61:12:27), швидкість потоку рухомої фази – 1.5 мл/хв, температура колонки – 35° С, моніторинг УФ-сигналу за довжини хвилі 244 нм.

Хроматографічні умови запропонованої методики: одноступінчасте градієнтне елюювання, рухома фаза – 0.05% розчин мурашиної кислоти, доведеної до рН 4.0 за допомогою амонію гідроксиду, та ацетонітрил.

Приготування випробовуваного розчину та розчину порівняння проводили, як описано в монографії АФІ аторвастатину кальцію відповідно до вимог ЄФ [4], розчиненням у *диметилформаміді Р*.

Наявність домішок аторвастатину F, G, H на хроматограмах підтверджено спектральними характеристиками отриманих піків.

2.2.8 ВЕРХ-методика одночасного кількісного визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу в бінарній суміші та лікарських засобах [2.2.29 ДФУ]

При виконанні даного дослідження застосовували таке обладнання: хроматограф «Varian», модель «Varian Pro Star PDA 330» (версія 6.81) (детектор «Varian LC 920 PDA» (версія 1.98)) та хроматограф «Dionex Ultimate 3000 UHPLC system» (Chromeleon версія 6.80), ваги лабораторні електронні RAD WAG AS 200/C, ультразвукова баня Sonorex Digitec DT100H., рН метр И-160МИ, мірний посуд класу А. Для обробки хроматограм використовували програмний пакет Lab Solutions version 5.97.

Хроматографічні колонки: Purospher C₈ STAR (4 мм i.d. X 55 мм, 5 мкм), Zorbax C₈ Rx (4.6 мм i.d. X 250 мм, 5 мкм), LiChrosorb C₈ (4 мм i.d. X 125 мм, 5 мкм), Waters Spherisorb ODS1 (4 мм i.d. X 250 мм, 5 мкм) (Merck Darmstadt, Німеччина та Agilent, США).

Хроматографічні умови запропонованої методики: рухома фаза, що складається з 60 % ацетонітрилу, 40 % буферного розчину (0.1 % КН₂РО₄, 0.25 % КРР₆ та 0.1 % НСІО₄), зі швидкістю потоку 1.0 мл/хв, температурою колонки 48 °С та УФ-детектування за довжини хвилі 215 нм. Об'єм проби, що вводився, – 10 мкл.

Приготування випробовуваного розчину таблеток лізиноприлу та аторвастатину: точну наважку порошку розтертих таблеток, еквівалентну

50 мг лізиноприлу та 50 мг аторвастатину, переносили до мірної колби об'ємом 500.0 мл і розчиняли в 350 мл розчинника, що складався з *метанолу Р* та 50 % розчину *кислоти хлорної Р* (50:50), витримували на УЗ-бані впродовж 2 хв. Розчин доводили розчинником до об'єму 500.0 мл. Фільтрували крізь мембранний фільтр з розміром пор 0.45 мкм, відкидаючи перші 5 мл фільтрату. Кінцеві концентрації обох аналітів – 0.1 мг/мл.

Приготування випробовуваного розчину субстанції аторвастатину: 50 мг субстанції аторвастатину переносили до мірної колби об'ємом 500.0 мл і розчиняли в 350 мл розчинника, що складався з *метанолу Р* та 50 % розчину *кислоти хлорної Р* (50:50), витримували на УЗ-бані впродовж 2 хв та струшували впродовж 15 хв. Розчин доводили розчинником до об'єму 500.0 мл. Фільтрували крізь мембранний фільтр з розміром пор 0.45 мкм, відкидаючи перші 5 мл фільтрату.

Приготування випробовуваного розчину субстанції лізиноприлу: 50 мг субстанції лізиноприлу переносили до мірної колби об'ємом 500.0 мл і розчиняли в 350 мл розчинника, що складався з *метанолу Р* та 50 % розчину *кислоти хлорної Р* (50:50), витримували на УЗ-бані впродовж 2 хв та струшували впродовж 15 хв. Розчин доводили розчинником до об'єму 500.0 мл. Фільтрували крізь мембранний фільтр з розміром пор 0.45 мкм, відкидаючи перші 5 мл фільтрату.

Приготування розчину порівняння лізиноприлу та аторвастатину: 50 мг ФСЗ лізиноприлу та 50 мг ФСЗ аторвастатину переносили до мірної колби об'ємом 500.0 мл і розчиняли в 350 мл розчинника, що складався з *метанолу Р* та 50 % розчину *кислоти хлорної Р* (50:50), витримували на УЗ-бані впродовж 2 хв та струшували впродовж 15 хв. Розчин доводили розчинником до об'єму 500.0 мл. Фільтрували крізь мембранний фільтр з розміром пор 0.45 мкм, відкидаючи перші 5 мл фільтрату. Кінцеві концентрації лізиноприлу та аторвастатину – 0.1 мг/мл.

2.2.9 ВЕРХ-методики кількісного визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу для застосування в дослідженнях на моделях *in vitro* (тест Caco-2)

Реагенти та витратні матеріали

DMEM з високим вмістом глюкози та L-глутаміном (HyClone, США)

Суміш незамінних амінокислот для середовища MEM (Gibco)

Ембріональна теляча сироватка (Sigma-Aldrich)

Бікарбонат натрію (Sigma-Aldrich, США)

Пеніцилін/Стрептоміцин (100x) (Sigma-Aldrich, США)

Пуроміцину дигідрохлорид $\geq 98\%$ (Santa Cruz, США)

Розчин Трипсин-EDTA (10x) (Sigma-Aldrich, США)

HEPES, особливо чистий (Helicon)

Фосфатно-сольовий розчин Дульбекко, без кальцію, без магнію (1x) (Gibco)

Збалансований сольовий розчин Хенкса (HBSS) без кальцію, без магнію, без фенолового червоного (1x) (Sigma)

ДМСО $\geq 99.7\%$ (Sigma-Aldrich, США)

Планшет з фільтр-мембраною (Multiwell Insert system, PET 1 μm) (Millicell, США)

24-лунковий планшет Multiwell™ (Millicell, США)

Центрифужні пробірки, 50 мл (Santa Cruz, США)

Піпетки серологічні культуральні 5 мл, 10 мл, 25 мл (Greiner Bio-One)

Одноразові наконечники для піпеток (Thermo Scientific, Fisherbrand, Eppendorf США)

1.4 мл мікропробірки (Thermo Scientific, США)

Кришечки для мікропробірок (Thermo Scientific, Ізраїль)

Пропранололу гідрохлорид $\geq 99\%$ (TLC), порошок (Sigma-Aldrich, США)

Атенолол, аналітичний стандарт, $\geq 98.5\%$ (HPLC) (Sigma-Aldrich, США)

Хінідин (Sigma-Aldrich, США)

Обладнання

CO₂ інкубатор для культивування клітин, модель CCL-170B-8 (ESCO, Сингапур)

Центрифуга Centra CL3R (Thermo Electron Corporation, США)

Баня водяна ISOTEMP 215 (Fisher Scientific, США)

Гемоцитометр, лічильна камера (Hausser Scientific, США)

Шейкер лабораторний (VWR Microplate Shaker, США)

Трансепітеліальний вольтметр Millicell-ERS system ohm meter (Millipore)

Багатоканальна піпетка 30-300 мкл (Eppendorf Research)

Піпетки 2-20 мкл (DLAB), 10-100 мкл, 100-1000 мкл (Oragonlab)

Система очистки води Millipore Milli-Q Gradient A10 (Millipore, Франція)

Система ВЕРХ Prominence UFLC XR (Shimadzu, Японія)

Тандемний мас-спектрометр API 3000 з TurboIonSpray Ion Source джерелом іонів (AB Sciex, Канада)

Мембранний генератор азоту VWR N2-04-L1466, чистота азоту 99% + (VWR, США)

Методика

Клітини лінії Caco-2 (ATCC ®, HTB-37TM) культивували у флаконах 75 см² для культури клітин на живильному середовищі DMEM, що містить 10 % ембріональної телячої сироватки, в CO₂-інкубаторі з постійною температурою 37 °C, 5% CO₂ і відносною вологістю 90 % згідно рекомендацій ATCC та Millipore. Перед початком експерименту клітини трипсинізували, ресуспендували у повному середовищі DMEM з глюкозою (4.5 мг/л), L-глутаміном (4 мМ), 10 % інактивованої ембріональної телячої сироватки, 1 % незамінних амінокислот і 730 нМ пуроміцину та висівали зі щільністю 5×10^5 клітин у флакон площею 75 см² [84-86]. Після 5 днів культивування клітини трипсинізували і ресуспендували в повному середовищі до кінцевої концентрації 425×10^3 клітин/мл. Аліквоти (400 мкл) клітинної суспензії додавали до кожної лунки планшету (Millicell-24 Multiwell Insert System) з фільтр-мембраною (1 мкм), 25 мл попередньо підігрітого повноцінного середовища вносили в планшет для подачі. Планшет з клітинами інкубували в CO₂-інкубаторі з постійною температурою 37 °C, 5 % CO₂ відносною вологістю

90 % впродовж 10 діб до початку тестування. Середовище поновлювали через день.

Перед початком тестування стан і цілісність епітеліального моношару контролювали шляхом вимірювання трансепітеліального електричного опору (TEER) кожної лунки за допомогою трансепітеліального вольтметра Millicell-ERS. Зрілий моношар клітин має питомий опір в межах 150-600 Ом \times см².

Перед початком тестування проникності 24-лункову вставку з клітинами виймали з планшета з живильним середовищем, промивали фосфатно-сольовим буферним розчином та поміщали в новий стерильний 24-лунковий планшет для аналізу транспорту.

Досліджувану сполуку та референтні сполуки розчиняли в ДМСО до 10 мМ, далі стокові розчини розводили в транспортному буфері (HBSS, MgSO₄ 0.81 мМ, CaCl₂ 1,26 мМ, 25 мМ HEPES, pH = 7.4) до 10 мкМ.

Для визначення швидкості транспортування сполук в апікально-базолатеральному (А-Б) напрямку, у верхню (апикальну) камеру додавали 300 мкл тестової речовини (10 мкМ) розчиненої в транспортному буфері, pH = 7.4. В нижню (базолатеральну) камеру кожної лунки додавали 1000 мкл транспортного буфера, pH = 7.4. Кінцева концентрація тестової та референтних речовин становила 10 мкМ.

Інкубацію проводили впродовж 90 хв при 37 °С та постійному струшуванні (100 об./хв). Після інкубації з донорної та акцепторної камери кожної лунки відбирали аліквоти (75 мкл) для аналізу. Зразки змішували з 2 об'ємними частками ацетонітрилу з подальшим осідженням білків методом центрифугуванням при 10000 об./хв впродовж 10 хвилин. Супернатанти аналізували за допомогою ВЕРХ системи з тандемним мас-спектрометром.

Хроматографію здійснювали в градієнтному режимі. Елюент А: ацетонітрил – Н₂О – мурашина кислота (5:95:0.1); елюент Б: ацетонітрил – мурашина кислота (100:0.1). Хроматографічна колонка з металевим

префільтром – Discovery® C₁₈ (довжина 50 мм, внутрішній діаметр 2.1 мм, розмір часток 5 мкм).

Налаштування хроматографічних параметрів для аторвастатину

Проби хроматографували в градієнтному режимі. Початковий вміст елюента Б 10 %, який лінійно збільшується до 100% за 1.0 хв і в 1.11 хв повертається до вихідних 10 %. Витрата елюента – 0.4 мл/хв; температура термостата колонки – 30 °С; час реєстрації – 2.5 хв; об'єм введеної проби – 2 мкл; температура термостата автосамплера – 15 °С. Перемикач потоку направляє потік елюента в мас-спектрометр з 0.6 хв до 2.4 хв.

Параметри електроспрей іонізатора та MRM-параметри аторвастатину представлено у табл. 2.1, 2.2.

Таблиця 2.1 – Параметри електроспрей іонізатора

Параметр	Значення
Polarity	Positive
Nebulizer Gas (NEB, Gas 1)	15
Curtain Gas (CUR)	8
Collision Gas (HCD)	5
IonSpray Voltage (IS)	5000
Temperature (TEM)	400
Turbo IonSpray Gas	8
Horizontal Position	5.0
Lateral Position	1.0

Таблиця 2.2 – MRM-параметри

Аналіт	Parent, m/z	Daughter, m/z	Time, ms	DP, V	EP, V	CE, V	CXP, V
Аторвастатин	559.234	440.300	120	96	370	11	29

Налаштування хроматографічних параметрів для лізиноприлу

Проби хроматографували в градієнтному режимі. Початковий вміст елюента Б 0 %, який лінійно збільшується до 100 % за 1.2 хв і в 1.31 хв

повертається до вихідних 0 %. Витрата елюента – 0.4 мл/хв; температура термостата колонки – 30 °С; час реєстрації – 2.8 хв; об'єм введеної проби – 2 мкл; температура термостата автосамплера – 15 °С. Перемикач потоку направляє потік елюента в мас-спектрометр з 0.6 хв до 2.8 хв.

Параметри електроспрей іонізатора та MRM-параметри лізиноприлу представлено у табл. 2.3, 2.4.

Таблиця 2.3 – Параметри електроспрей іонізатора

Параметр	Значення
Polarity	Positive
Nebulizer Gas (NEB, Gas 1)	15
Curtain Gas (CUR)	8
Collision Gas (CAD)	5
IonSpray Voltage (IS)	5000
Temperature (TEM)	400
Turbo IonSpray Gas	8
Horizontal Position	5.0
Lateral Position	1.0

Таблиця 2.4 – MRM-параметри

Аналіт	Parent, m/z	Daughter, m/z	Time, ms	DP, V	FP, V	EP, V	CE, V	CXP, V
Лізиноприл	406.145	84.2	120	91	330	11	43	4

Налаштування хроматографічних параметрів для атенололу

Початковий вміст елюента Б 0 %, який лінійно збільшується до 90 % за 1.1 хв і до 1.11 хв повертається до вихідних 0 %. Витрата елюента – 0.4 мл/хв; температура термостата колонки – 30 °С; час реєстрації – 2.3 хв; об'єм введеної проби – 3 мкл; температура термостата автосамплера – 15 °С. Перемикач потоку направляє потік елюента в мас-спектрометр з 0.9 хв до 1.7 хв.

Параметри електроспрей іонізатора та MRM-параметри атенололу представлено у табл. 2.5, 2.6.

Таблиця 2.5 – Параметри електроспрей іонізатора

Параметр	Значення
Polarity	Positive
Nebulizer Gas (NEB, Gas 1)	15
Curtain Gas (CUR)	8
Collision Gas (HCD)	5
IonSpray Voltage (IS)	5000
Temperature (TEM)	500
Turbo IonSpray Gas	8
Horizontal Position	5.0
Lateral Position	5.0

Таблиця 2.6 – MRM-параметри

Аналіт	Parent, m/z	Daughter, m/z	Time, ms	DP, V	EP, V	CE, V	CXP, V
Атенолол	267.026	145.1	120	56	11	37	12

Налаштування хроматографічних параметрів для пропранололу

Початковий вміст елюента Б 10 %, який лінійно збільшується до 100 % за 1.0 хв і до 1.01 хв повертається до вихідних 10 %. Витрата елюента – 0.4 мл/хв; температура термостата колонки – 30 °С; час реєстрації – 2.2 хв; об'єм введеної проби – 3 мкл; температура термостата автосамплера – 15 °С. Перемикач потоку направляє потік елюента в мас-спектрометр з 0.85 хв до 1.3 хв.

Параметри електроспрей іонізатора та MRM-параметри пропранололу представлено у табл. 2.7, 2.8.

Таблиця 2.7 – Параметри електроспрей іонізатора

Параметр	Значення
Polarity	Positive
Nebulizer Gas (NEB, Gas 1)	15
Curtain Gas (CUR)	7
Collision Gas (HCD)	5
IonSpray Voltage (IS)	5000
Temperature (TEM)	500
Turbo IonSpray Gas	8
Horizontal Position	5.0
Lateral Position	5.0

Таблиця 2.8 – MRM-параметри

Речовина	Parent, m/z	Daughter, m/z	Time, ms	DP, V	EP, V	CE, V	CXP, V
Пропранолол	260.1	183.4	100	56	11	27	16

Налаштування хроматографічних параметрів для хінідину

Початковий вміст елюента Б 0 %, який лінійно збільшується до 100 % за 1.0 хв і до 1.01 хв повертається до вихідних 0 %. Витрата елюента – 0.4 мл/хв; температура термостата колонки – 30 °С; час реєстрації – 2.4 хв; об'єм введеної проби – 3 мкл; температура термостата автосамплера – 15 °С. Перемикач потоку направляє потік елюента в мас-спектрометр з 0.85 хв до 1.5 хв.

Параметри електроспрей іонізатора та MRM-параметри хінідину представлено у табл. 2.9, 2.10.

Таблиця 2.9 – Параметри електроспрей іонізатора

Параметр	Значення
Polarity	Positive
Nebulizer Gas (NEB, Gas 1)	15
Curtain Gas (CUR)	8
Collision Gas (HCD)	5
IonSpray Voltage (IS)	5000
Temperature (TEM)	500
Turbo IonSpray Gas	8
Horizontal Position	5.0
Lateral Position	5.0

Таблиця 2.10 – MRM-параметри

Речовина	Parent, m/z	Daughter, m/z	Time, ms	DP, V	EP, V	CE, V	CXP, V
Хінідин	325.2	172.2	150	61	11	47	28

Коефіцієнт проникності (P_{app}) розраховували за формулою:

$$P_{app} = \frac{V_A}{Area \times Time} \times \frac{[drug]_{acc}}{[drug]_{initial,d}} \times 1000000 \quad (2.1)$$

де V_A — об'єм буфера в акцепторній камері (1.0 см³ в тесті А→Б; 0.3 см³ в тесті Б→А),

$Area$ — площа мембрани лунки (дорівнює ефективній площі росту клітин; за даними виробника — 0.7 см²),

$Time$ — час експозиції в секундах (5400 с),

$[drug]_{acc}$ — вміст тестової речовини в акцепторній камері,

$[drug]_d$ — вихідний вміст тестової речовини в донорній камері.

Коефіцієнт проникності виражається в 10⁻⁶ см/с.

Наприкінці експерименту були відібрані зразки для визначення зміни концентрації речовини в тест-системі та обчислення масового балансу (*recovery*) транспортного процесу. Цей параметр вказує на надійність розрахованого значення P_{app} . Якщо значення *recovery* дуже низьке, це може свідчити про погану розчинність речовини, її зв'язування з поверхнею планшету, метаболізм клітинами Caco-2 та/або акумуляцію речовини в моношарі клітин. Масовий баланс (*recovery*) розраховують за допомогою рівняння:

$$\% \text{ recovery} = \frac{C_{acc} \times V_{acc} + C_d \times V_d}{C_{initial,d} \times V_d} \times 100 \quad (2.2)$$

де V_{acc} — об'єм розчину в акцепторній камері (1.0 см³ в тесті А→Б; 0.3 см³ в тесті Б→А),

V_d — об'єм розчину в донорній камері (0.3 см³ в тесті А→Б; 1.0 см³ в тесті Б→А),

C_{acc} — вміст тестової речовини в камері- акцепторі,

C_d — вміст тестової речовини в камері-донорі,

$C_{initial,d}$ — вихідний вміст тестової речовини в донорній камері.

2.2.10 Методики кількісного визначення аторвастатину кальцію та лізіноприлу для проведення тесту «Розчинення»

Методики кількісного визначення аторвастатину кальцію та лізіноприлу в субстанціях та ЛЗ, які продемонстровані у підпунктах 2.2.1, 2.2.4 адаптовано до визначення аторвастатину кальцію та лізіноприлу для тесту «Розчинення» та проведено їх трансфер.

Вивчення тесту «Розчинення» проводили в стандартних фармакопейних середовищах з рН 1.2, 4.5 та 6.8 з використанням автоматичного приладу для тесту «Розчинення» з лопаттю (ДФУ 2.0). Точки контролю: 5, 15 хв.

РОЗДІЛ 3

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИХ МЕТОДИК ВИЗНАЧЕННЯ АТОРВАСТАТИНУ КАЛЬЦІЮ ТА ЛІЗИНОПРИЛУ В СУБСТАНЦІЯХ ТА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ

3.1 Розробка та валідація УФ-спектрофотометричної методики визначення лізиноприлу в лікарських засобах

Спектри поглинання метанольних розчинів ФСЗ лізиноприлу та метанольного вилучення з таблеток лізиноприлу володіють вираженим максимумом поглинання за довжини хвилі 212 нм (рис. 3.1). Це дозволило опрацювати спектрофотометричну методику визначення лізиноприлу шляхом прямого вимірювання поглинання випробовуваних розчинів в УФ-області спектра проти метанолу, що є значною перевагою запропонованої методики, оскільки не вимагає тривалої та трудомісткої пробопідготовки.

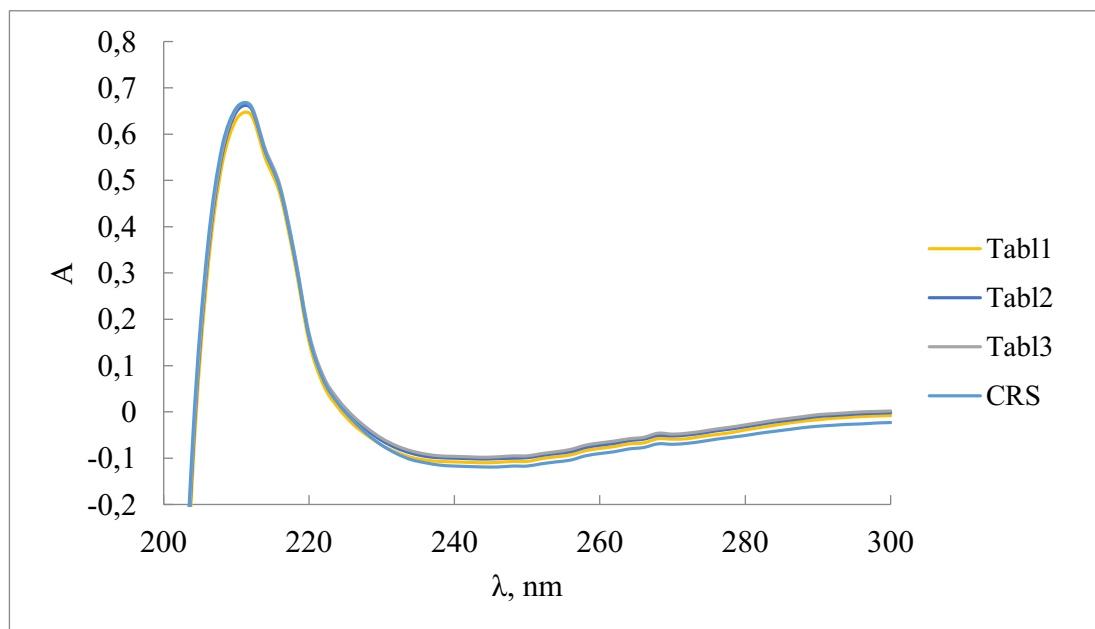


Рисунок 3.1 – Електронні спектри поглинання метанольного розчину ФСЗ лізиноприлу ($C = 30 \mu\text{кг/мл}$) (CRS) та метанольних вилучень з таблеток лізиноприлу: 1 – метанольне вилучення з таблеток Лізиноприл 10 мг, Астрафарм, серія 241119 (Tabl1), 2 – метанольне вилучення з таблеток Лізиноприл 10 мг, Астрафарм, серія 221119 (Tabl2), 3 – метанольне вилучення з таблеток Лізиноприл 10 мг, Астрафарм, серія 121220 (Tabl3)

Для визначення вмісту АФІ у ЛЗ встановлювали поглинання випробовуваного розчину за довжини хвилі $\lambda_{\max} = 212$ нм проти метанолу. Збіг максимумів поглинання спектрів випробовуваного розчину та розчину порівняння свідчить про відсутність впливу допоміжних речовин на кількісне визначення лізиноприлу в таблетках.

Розроблена аналітична методика валідована відповідно до вимог ДФУ [87] та ІСН Q2 [88] за наступними показниками: специфічність, лінійність, діапазон застосування, правильність, прецизійність та робастність [89, 90].

3.1.1 Специфічність методики

Для підтвердження специфічності УФ-спектрофотометричної методики визначення лізиноприлу в таблетках приготовлено розчин допоміжних речовин («плацебо»). Вплив домішок на результати кількісного визначення лізиноприлу не вивчався, оскільки при виконанні даної роботи використано ЛЗ промислового виробництва, що не містили неприпустимої кількості домішок, про що свідчили сертифікати якості виробників. Результати вивчення специфічності аналітичної методики представлено в табл. 3.1.

Таблиця 3.1 – Результати вивчення специфічності УФ-спектрофотометричної методики визначення лізиноприлу в таблетках

Абсорбція плацебо (А плацебо)	Абсорбція розчину домішок ЛФ (А домішок)	Абсорбція розчину порівняння (Ast)	Знайдене значення δ_{noise} , %	Критерій прийнятності
0.002	-	0.457	0.44	не більше 0.5 %

Аналіз результатів, представлених в табл. 3.1 вказує на те, що абсорбція допоміжних речовин за довжини хвилі 212 нм є незначною (знайдене значення $\delta_{\text{noise}} = 0.44$ %) і не перевищує критерій прийнятності.

3.1.2 Лінійність, діапазон застосування методики

Лінійність вивчали в усьому діапазоні застосування аналітичної методики згідно вимог ДФУ, використовуючи модельні розчини зразків. Для вивчення лінійності отримано електронні спектри поглинання зростаючих концентрацій метанольних розчинів лізиноприлу в УФ-області спектра. Із використанням методу найменших квадратів проведено статистичну обробку експериментальних результатів та отримано рівняння регресії.

Метрологічні характеристики рівняння регресійної залежності для кількісного визначення лізиноприлу наведено в табл. 3.2. Параметри лінійної залежності аналітичної методики (табл. 3.2) задовольняють вимогам ДФУ в усьому діапазоні застосування методики. Високе значення коефіцієнту кореляції $R^2 = 0.9995$ також задовольняє вимоги критерію прийнятності ($R^2 = 0.9992$) і підтверджує лінійність аналітичної методики.

Таблиця 3.2 – Метрологічні характеристики лінійної залежності

Величина	Значення	Критерій	Висновок (відповідає або не відповідає)
$b \pm (S_b)$	26.7910±(0.9745)	–	
$a \pm (S_a)$	0.4398±(0.0190)	$ a \leq \Delta a = t(2.57) \cdot S_a = 0.0488$	Відповідає
R^2	0.9995	> 0.9971	Відповідає
МВ (мкг/мл)	2.34	–	
МКВ (мкг/мл)	7.09	–	
Підпорядкування закону Бера в діапазоні концентрацій (мкг/мл)	20.00-100.00	–	

3.1.3 Правильність та прецизійність методики

Правильність та прецизійність аналітичної методики перевіряли шляхом приготування модельних розчинів з точно відомою концентрацією препарату з вмістом 70-130 % від номінального. Отримані результати проведених розрахунків наведено в табл. 3.3.

Таблиця 3.3 – Результати аналізу модельних сумішей і їх статистична обробка для кількісного визначення

Модельні розчини	Вміст лізиноприлу, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100, \%$
	Введено, $X_i = (C_i / C_{rs}) \cdot 100 \%$	Знайдено, $Y_i = (A_i / A_{rs}) \cdot 100 \%$	
M ₁	70.01	70.09	100.11
M ₂	80.06	80.02	99.95
M ₃	89.95	90.02	100.08
M ₄	95.05	95.01	99.96
M ₅	100.11	100.03	99.92
M ₆	104.91	105.02	100.10
M ₇	110.04	110.18	100.13
M ₈	120.15	120.04	99.91
M ₉	130.22	130.12	99.93
Середнє значення, $Z, \%$			100.01
Стандартне відхилення, $S_z, \%$			0.01
Відносний довірчий інтервал, $\Delta z = t(95\%, 8) \cdot S_z = 2.3060 S_z, \%$			0.02
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta_{As} = 1.6 \%$			виконується (0.02 < 1.60)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 , \%$			0.01
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta \%$			виконується (0.01 < 0.51)
Загальний висновок про методику			Коректна

Із табл. 3.3 видно, УФ-спектрофотометрична методика визначення лізиноприлу характеризується достатньою прецизійністю (збіжністю), так як знайдене значення відносного довірчого інтервалу величини Δz (0.02) менше критичного значення для збіжності результатів (1.6 %).

Виконується критерій незначущості систематичної похибки методики – систематична похибка методики (0.01) є практично незначущою, тобто методика аналізу характеризується достатньою правильністю в усьому діапазоні концентрацій від 70 до 130 %.

Дослідження внутрішньолабораторної прецизійності проводили на 6 пробах однієї серії препарату, різними аналітиками, в різні дні (3 дні), з використанням різного мірного посуду, шляхом оцінки значення відносного довірчого інтервалу, яке має бути менше максимально припустимої невизначеності результатів аналізу: $\Delta z \leq 1.6$ (при $V = 5\%$) (табл. 3.4).

Таблиця 3.4 – Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності

№ розчину	Величина Z_i , %		
	1 дослід	2 дослід	3 дослід
1	100.15	100.24	100.18
2	100.01	100.09	100.05
3	99.97	100.01	99.99
4	100.07	100.04	100.12
5	100.15	100.08	100.07
6	99.94	99.98	100.02
Середнє Z (%)	100.05	100.07	100.07
RSD_x , %	0.09	0.09	0.07
Відносне стандартне відхилення, RSD_z (%)	0.08		
Відносний довірчий інтервал, Δz	$0.07 \leq 1.6$		
Критичне значення збіжності результатів Δ_{As} , %	1.6		

Внутрішньолабораторна прецизійність результатів аналізу підтверджена тим, що величина відносного довірчого інтервалу для шести паралельних визначень однієї серії препарату задовольняє критерію прийнятності ($\leq 1.6\%$) (табл. 3.4).

3.1.4 Прогноз повної невизначеності методики

Вимоги щодо прогнозованої невизначеності пробопідготовки (Δ_{SP}) корегуються правильним підбором наважок та розведень, які використовуються в пробопідготовці (табл. 3.5). Для спектрофотометричного визначення невизначеність кінцевої аналітичної операції складає 0.70 %.

Таблиця 3.5 – Розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення ЛЗ

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
Розчин порівняння лізиноприлу		
1) взяття наважки ФСЗ лізиноприлу	m_0	$0.2 \text{ мг}/20 \text{ мг} \times 100 \% = 1.00$
2) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 200 мл	200	0.10
3) взяття аліквоти піпеткою 2 мл	2.0	0.57
4) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 100 мл	100	0.12
Випробовуваний розчин		
5) взяття наважки таблеток	m_1	$0.2 \text{ мг}/110 \text{ мг} \times 100 \% = 0.18$
6) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 200 мл	200	0.10
7) взяття аліквоти піпеткою 2 мл	2.0	0.57
8) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 100 мл	100	0.12

Розрахована невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) для визначення лізиноприлу в таблетках склала 1.32 %. Встановлено, що максимальний внесок у невизначеність пробопідготовки за операціями для кількісного визначення лізиноприлу в таблетках, вносить операція 1 – взяття наважки ФСЗ лізиноприлу. Повна невизначеність аналітичної методики (Δ_{As}) при аналізі препарату склала 1.49 %.

$$\Delta_{As} = 1.49 \% \leq \max \Delta_{As} = 1.6 \%$$

Опрацьована спектрофотометрична методика кількісного визначення лізиноприлу в інших лабораторіях також даватиме коректні результати, бо прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не перевищила критичних значень ($\max \Delta_{As}$).

Отримані результати вмісту лізиноприлу у таблетках з використанням запропонованої аналітичної методики приведено в табл. 3.6.

Таблиця 3.6 – Результати кількісного визначення лізиноприлу в лікарських засобах

Лікарський засіб	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
1	2	3
Таблетки «Лізиноприл-Астрафарм», 10 мг, серія 241119	0.0101	$\bar{m} = 0.0102$ г $S = 2.16 \times 10^{-4}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 2.27 \times 10^{-4}$ RSD = 2.12 % $\varepsilon = 2.23$ %
	0.0105	
	0.0099	
	0.0102	
	0.0103	
	0.0100	
Таблетки «Лізиноприл-Астрафарм», 10 мг, серія 221119	0.0102	$\bar{m} = 0.0103$ г $S = 2.73 \times 10^{-4}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 2.87 \times 10^{-4}$ RSD = 2.66 % $\varepsilon = 2.79$ %
	0.0100	
	0.0105	
	0.0101	
	0.0107	
	0.0101	

Продовження таблиці 3.6

1	2	3
Таблетки «Лізиноприл-Астрафарм», 10 мг, серія 121220	0.0101 0.0099 0.0105 0.0102 0.0109 0.0105	$\bar{m} = 0.0104$ г $S = 3.56 \times 10^{-4}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 3.74 \times 10^{-4}$ RSD = 3.44 % $\varepsilon = 3.61$ %

3.1.5 Робасність методики

Робасність запропонованої методики оцінювали шляхом вивчення стабільності розчинів в часі. У зв'язку з тим, що ДФУ не встановлює час, впродовж якого слід проводити випробування, то нами обрано двогодичний часовий діапазон. Отримані дані вивчення стабільності розчинів в часі лізиноприлу представлено в табл. 3.7. Результати, наведені в табл. 3.7, свідчать про те, що розчини стабільні впродовж двох годин.

Таблиця 3.7 – Результати вивчення стабільності випробовуваних розчинів лізиноприлу (1) та розчинів ФСЗ лізиноприлу (2)

№	t, хв						А сер	RSD _t , %
	0	20	40	60	90	120		
1	0.854	0.854	0.854	0.853	0.852	0.852	0.853	0.12
2	0.703	0.703	0.703	0.703	0.701	0.701	0.702	0.15

3.1.6 Розрахування оцінки впливу аналітичної методики на навколишнє середовище

При опрацюванні спектрофотометричної методики кількісного визначення лізиноприлу в таблетках враховано принципи «зеленої хімії». Оцінку «зеленості» аналітичної методики проводили за допомогою аналітичної еко-шкали та методу AGREE. Бал аналітичної еко-шкали становив 92 (табл. 3.8).

Таблиця 3.8 – Аналітична еко-шкала для оцінки «зеленості» розробленої методики

Параметри	Пенальті бали
Розчинник: метанол	3
Споживання енергії	0
Професійні шкідливості	0
Відходи	5
Загальна кількість пенальті балів	8
Бал аналітичної еко-шкали	92
Висновок	Відмінний «зелений» аналіз

Результати вивчення «зеленості» аналітичної методики з використання методу AGREE наведено на рис. 3.2.

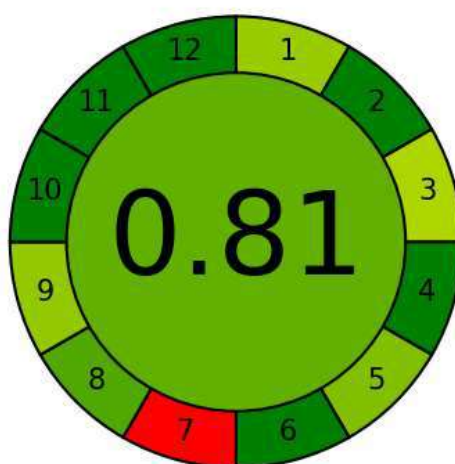


Рисунок 3.2 – Піктограма «зеленості» аналітичної методики з використання методу AGREE

Як видно з рис. 3.2, червоним кольором виділено операцію 7, що свідчить про аналітичні відходи, яких необхідно уникати чи зменшувати під час розробки аналітичної методики шляхом зменшення кількості аналіту та об'єму розчинника. У даному випадку точну наважку порошку таблеток, еквівалентну

20 мг лізиноприлу, можна зменшити до 5 мг лізиноприлу та перенести до мірної колби об'ємом 50.0 мл, а не 200.0 мл. Проте така пробопідготовка буде негативно впливати на невизначеність пробопідготовки для кількісного визначення лізиноприлу в таблетках і отримане значення Δ_{As} буде перевищувати 1.6 %, що є критичним в даному випадку. Тому прийнято рішення не застосовувати такий підхід в пробопідготовці, оскільки бал з використання методу AGREE становив 0.81.

Отримані результати у табл. 3.8 та рис. 3.2 свідчать про те, що розроблена УФ-спектрофотометрична методика визначення лізиноприлу в таблетках є відмінною у відповідності з принципами «зеленої хімії».

3.2 Розробка та валідація спектрофотометричної методики визначення лізиноприлу в субстанції та лікарських засобах за нінгідриновою реакцією

Нінгідрин відомий як реагент для виявлення амінокислот і амінів впродовж багатьох років, тому висунуто ряд теорій для пояснення механізму його реакції [91-94]. Припущено, що реакції нінгідрину з амінами, амінокислотами та імінокислотами перебігають за одним і тим же механізмом з утворенням дикетогідриндиліден-дикетогідриндаміну. Зазначена сполука далі реагуватиме з аміногрупою, утворюючи продукт, який має максимум поглинання за довжини хвилі 400 нм і 560 нм. Лізиноприл взаємодіє з нінгідрином у нейтральному середовищі шляхом окисного дезамінування первинної аліфатичної аміногрупи залишку лізину, що міститься в молекулі лізиноприлу, з подальшою конденсацією відновленого нінгідрину з утворенням забарвленого комплексу з λ_{max} за довжини хвилі 400 нм і 560 нм.

В науковій літературі описано розробку спектрофотометричної методики кількісного визначення лізиноприлу в ЛФ, що базувалася на взаємодії лізиноприлу з нінгідрином в присутності калію гідроксиду з утворенням фіолетового кольору продукту реакції з максимумом поглинання за довжини хвилі 567 нм [54] та спектрофотометричної методики визначення лізиноприлу в

ЛФ, що базувалася на взаємодії лізиноприлу з нінгідрином в присутності ДМФА з утворенням продукту реакції з максимумом поглинання за довжини хвилі 600 нм [57]. В описаній другій методиці [57] використовувався ДМФА, якого потрібно уникати, якщо є завдання розробити аналітичну методику з дотримання принципів «зеленої хімії». Результати наших попередніх досліджень показали, що вищої чутливості реакції можна досягти, використовуючи λ max 400 нм, що обрано в наших наступних дослідженнях [95-97] (рис. 3.3). Збіг максимумів поглинання спектрів випробовуваного розчину та розчину порівняння свідчить про відсутність впливу допоміжних речовин на кількісне визначення лізиноприлу в таблетках. Схема взаємодії лізиноприлу з нінгідрином представлена на рис. 3.4.

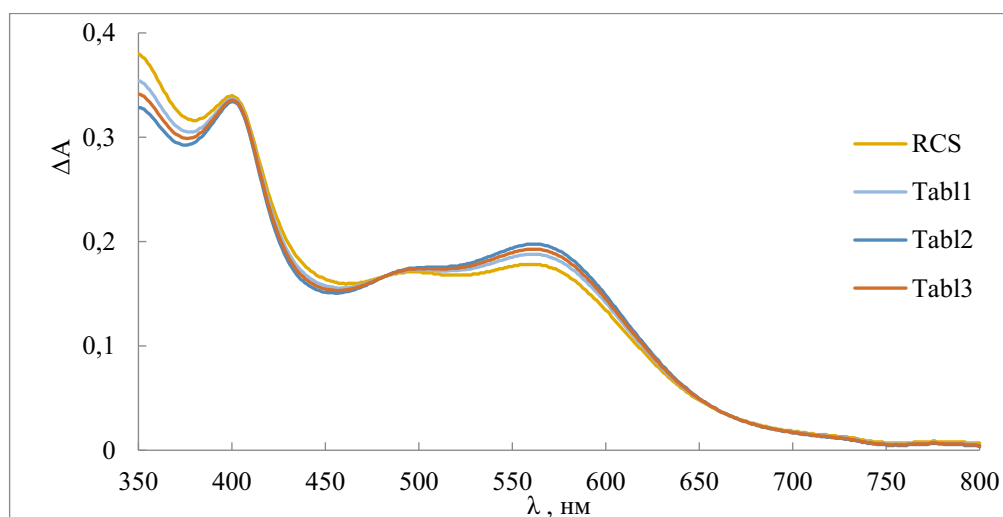


Рисунок 3.3 – Спектри поглинання продукту реакції лізиноприлу з нінгідрином (ФСЗ (RCS) та таблеток Лізиноприл 20 мг, Астрафарм, серії 090919 (Tabl1), 111119 (Tabl2), 040620 (Tabl3))

Для вибору оптимальних умов проведення реакції проаналізовано різні параметри, такі як температура, час нагрівання, об'єм 0.2 % розчину нінгідрину. Встановлено, що оптимальною температурою нагрівання розчинів для отримання продукту реакції є 95 ± 2 °C. Оптимальний час реакції визначали шляхом нагрівання реакційної суміші на водяній бані при (95 ± 2) °C. Час

нагрівання 25 хв визначено оптимальним для утворення продукту реакції фіолетового кольору (рис. 3.5).

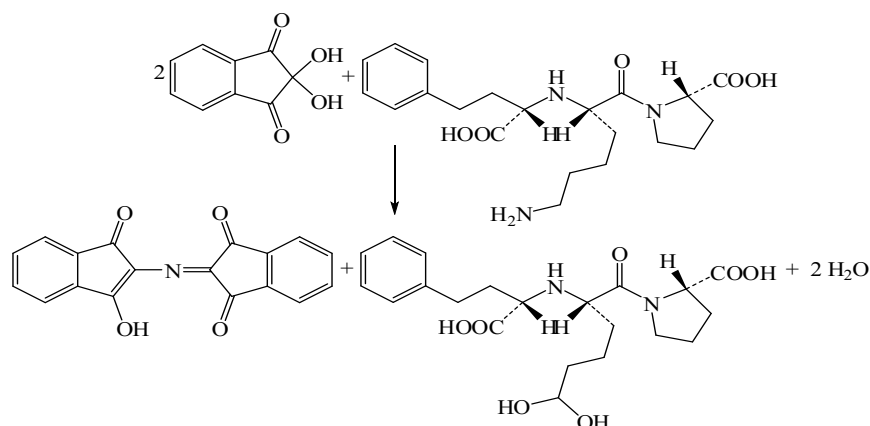


Рисунок 3.4 – Схема взаємодії лізіноприлу з нінгідрином [54]

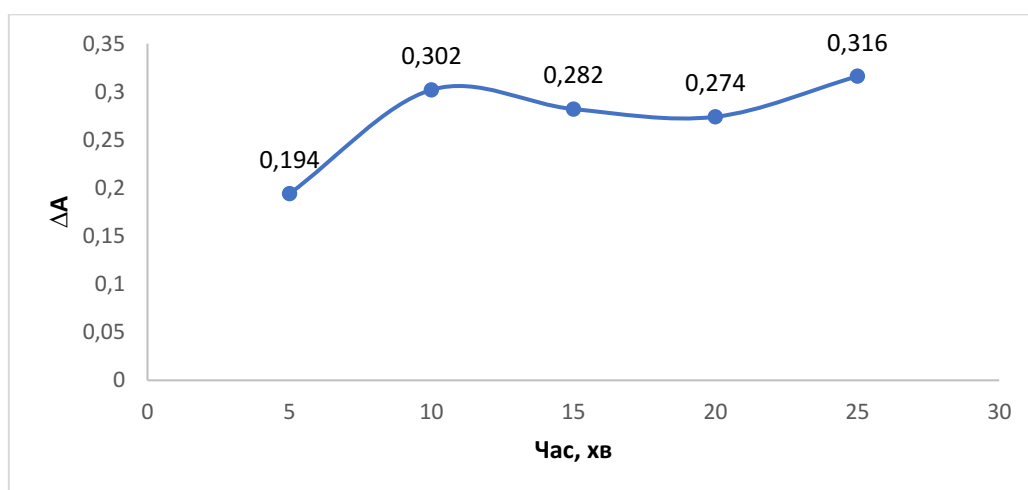


Рисунок 3.5 – Графік залежності абсорбції утвореного продукту реакції лізіноприлу з нінгідрином від часу нагрівання

З метою дослідження впливу концентрації нінгідрину на утворення кольору продукту реакції, зміну поглинання, викликане зміною концентрації нінгідрину на фіксовану концентрацію лізіноприлу (40 мкг/мл), вимірювали поглинання щодо холостого реагенту. Встановлено, що оптимальним об'ємом 0.2 % розчину нінгідрину є 1.1 мл. Графік залежності абсорбції утвореного продукту реакції лізіноприлу з нінгідрином від об'єму 0.2 % розчину нінгідрину представлено на рис. 3.6.

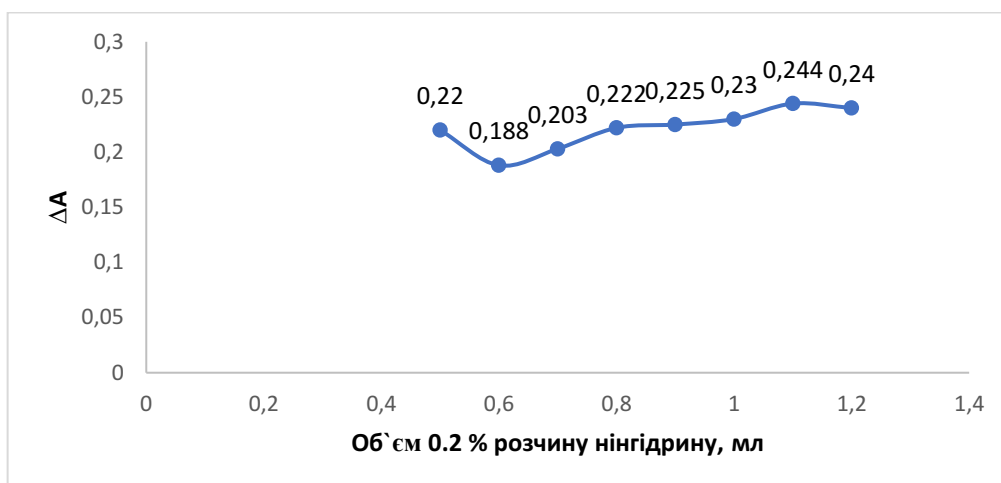


Рисунок 3.6 – Графік залежності абсорбції утвореного продукту реакції лізиноприлу з нінгідрином від об'єму 0.2 % розчину нінгідрину

На наступному етапі експерименту, досліджено стабільність аналізованого розчину в часі. Графік залежності абсорбції утвореного продукту реакції лізиноприлу з нінгідрином від часу наведено на рис. 3.7. Встановлено, що випробовувані розчини є стабільними впродовж 45 хв.

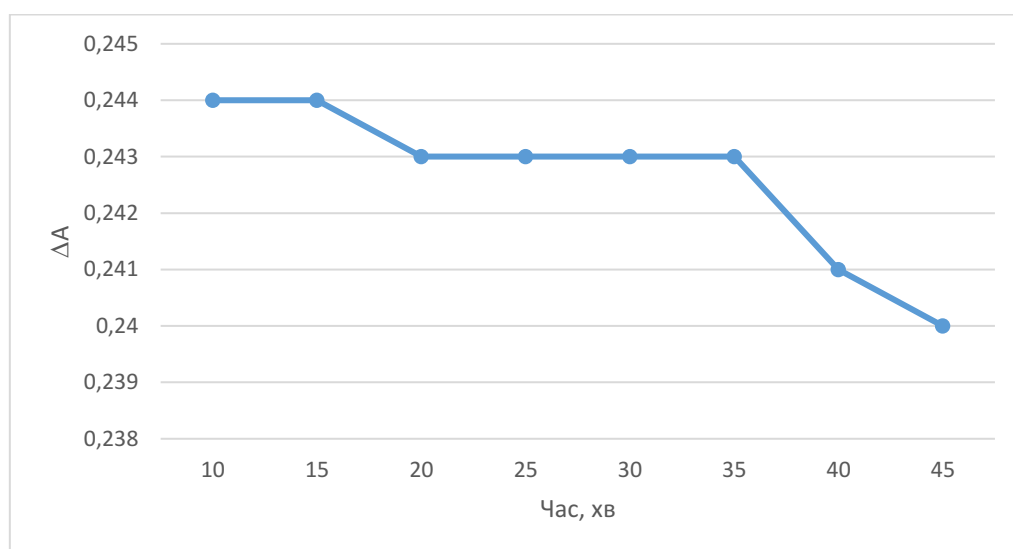


Рисунок 3.7 – Графік залежності абсорбції утвореного продукту реакції лізиноприлу з нінгідрином від часу

Для встановлення аналітичних показників чутливості реакції лізиноприлу з нінгідрином розраховано показники чутливості реакції. Молярний показник

поглинання (ϵ) становив 2.24×10^3 , питоме поглинання (a) – 6.02×10^{-1} , коефіцієнт Сендела (W_s) – 1.66×10^{-1} .

Розроблена аналітична методика валідована відповідно до вимог ДФУ [87] та ІСН Q2 [88] за наступними показниками: специфічність, лінійність, діапазон застосування, правильність, прецизійність та робасність [96].

3.2.1 Специфічність методики

Для підтвердження специфічності спектрофотометричної методики визначення лізиноприлу в таблетках за нінгідриною реакцією приготовлено розчин допоміжних речовин («плацебо»). Вплив домішок на результати кількісного визначення лізиноприлу не вивчався, оскільки при виконанні даної роботи використано ЛЗ промислового виробництва, що не містили неприпустимої кількості домішок, про що свідчили сертифікати якості виробників. Результати вивчення специфічності аналітичної методики представлено в табл. 3.9.

Таблиця 3.9 – Результати вивчення специфічності спектрофотометричної методики визначення лізиноприлу в таблетках за нінгідриною реакцією

Абсорбція плацебо (А плацебо)	Абсорбція розчину домішок ЛФ (А домішок)	Абсорбція розчину порівняння (Ast)	Знайдене значення δ_{noise} , %	Критерій прийнятності
0.001	-	0.245	0.41	не більше 0.5 %

Згідно з результатами, наведеними у табл. 3.9, впливає, що абсорбція допоміжних речовин є незначною (знайдене значення δ_{noise} – 0.41 %) і не перевищує критерій прийнятності.

3.2.2 Лінійність, діапазон застосування методики

Вивчення лінійності проводили на всьому діапазоні застосування методики з використанням модельних розчинів зразків відповідно до вимог ДФУ. Отримані результати оброблено за допомогою методу найменших квадратів. Результати розрахунків рівняння лінійної регресії продемонстровано в табл. 3.10. Параметри лінійності (табл. 3.10) відповідають вимогам ДФУ на всьому діапазоні застосування аналітичної методики.

Таблиця 3.10 – Метрологічні характеристики лінійної залежності

Величина	Значення	Критерій	Висновок (відповідає або не відповідає)
$b \pm (S_b)$	7.4929±(0.1205)	–	
$a \pm (S_a)$	0.0545±(0.0157)	$ a \leq \Delta a = t(2.57) \cdot S_a = 0.0373$	Відповідає
R^2	0.9917	> 0.9902	Відповідає
МВ (мкг/мл)	6.91	–	
МКВ (мкг/мл)	20.95	–	
Підпорядкування закону Бера в діапа- зоні концентрацій (мкг/мл)	40-60	–	

3.2.3 Правильність та прецизійність методики

Для перевірки правильності та прецизійності методики готували модельні розчини з точно відомим вмістом АФІ, які охоплювали діапазон застосування методики (з концентраціями 70-130 % від номінальної). Результати проведених розрахунків наведено в табл. 3.11.

Таблиця 3.11 – Результати аналізу модельних сумішей і їх статистична обробка для кількісного визначення

Модельні розчини	Вміст лізиноприлу, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100 \%$
	Введено, $X_i = (C_i / C_{rs}) \cdot 100 \%$	Знайдено, $Y_i = (A_i / A_{rs}) \cdot 100 \%$	
M ₁	70.02	70.05	100.04
M ₂	79.95	80.04	100.11
M ₃	89.98	90.05	100.08
M ₄	95.01	95.08	100.07
M ₅	100.09	99.97	99.88
M ₆	104.91	105.05	100.13
M ₇	110.32	110.72	100.36
M ₈	120.01	120.17	100.13
M ₉	129.95	130.05	100.08
Середнє значення, Z , %			100.10
Стандартне відхилення, S_z , %			0.16
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 8) \cdot S_z = 2.3060 S_z$, %			0.37
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta A_s = 1.6 \%$			виконується (0.37 < 1.6)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 $, %			0.1
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta \%$			виконується (0.1 < 0.51)
Загальний висновок про методику			Коректна

Із табл. 3.11 випливає, що спектрофотометрична методика визначення лізиноприлу за нінгідриною реакцією характеризується достатньою прецизійністю (збіжністю), так як знайдене значення відносного довірчого

інтервалу величини Δz (0.37) менше критичного значення для збіжності результатів (1.6 %).

Виконується критерій незначущості систематичної похибки методики – систематична похибка методики (0.1) є практично незначущою, тобто методика аналізу характеризується достатньою правильністю в усьому діапазоні концентрацій від 70 до 130 %.

Дослідження внутрішньолабораторної прецизійності проводили на 6 пробах однієї серії препарату, різними аналітиками, в різні дні (3 дні), з використанням різного мірного посуду, шляхом оцінки значення відносного довірчого інтервалу, яке має бути менше максимально припустимої невизначеності результатів аналізу: $\Delta z \leq 1.6$ (при $V = 5\%$) (табл. 3.12).

Таблиця 3.12 – Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності

№ розчину	Величина Z_i , %		
	1 дослід	2 дослід	3 дослід
1	99.93	99.98	100.01
2	99.99	100.04	100.18
3	100.14	100.09	100.06
4	100.02	100.08	100.04
5	100.16	100.12	100.09
6	100.07	99.95	100.03
Середнє Z (%)	100.05	100.04	100.07
RSD_x , %	0.09	0.07	0.06
Відносне стандартне відхилення, RSD_z (%)	0.07		
Відносний довірчий інтервал, Δz	$0.06 \leq 1.6$		
Критичне значення збіжності результатів Δ_{As} , %	1.6		

Внутрішньолабораторна прецизійність результатів аналізу підтверджена тим, що величина відносного довірчого інтервалу для шести паралельних визначень однієї серії препарату задовольняє критерію прийнятності ($\leq 1.6\%$) (див. табл. 3.12).

3.2.4 Прогноз повної невизначеності методики

Для підтвердження коректності аналітичної методики проводять прогнозування повної невизначеності методики. Невизначеність кінцевої аналітичної операції для спектрофотометричного аналізу становить 0.70 %. Розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення таблеток «Лізіноприл-Астрафарм» 0.02 г наведено у табл. 3.13.

Таблиця 3.13 – Розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення таблеток «Лізіноприл-Астрафарм» 0.02 г

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
1	2	3
Розчин порівняння		
1) взяття наважки ФСЗ лізіноприлу	m_0	$0.2 \text{ мг}/100 \text{ мг} \times 100 \% = 0.2$
2) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 100.00 мл	100	0.12
3) взяття аліквоти піпеткою 1.00 мл	1.0	0.74
4) взяття розчину нінгідрину піпеткою 2.00 мл	1.1	0.57
5) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.00 мл	25	0.23

Продовження таблиці 3.13

1	2	3
Випробовуваний розчин		
6) взяття наважки таблеток	m_1	$0.2 \text{ мг}/216 \text{ мг} \times 100 \% =$ 0.09
7) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.00 мл	100	0.12
8) взяття аліквоти піпеткою 1.00 мл	1.0	0.74
9) взяття розчину нінгідрину піпеткою 2.00 мл	1.1	0.57
10) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.00 мл	25	0.23
Компенсаційний розчин		
11) взяття наважки нінгідрину	-	$0.2 \text{ мг}/200 \text{ мг} \times 100 \% =$ 0.01
12) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 100.00 мл		0.12
13) взяття розчину нінгідрину піпеткою 2.00 мл	-	0.57
14) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.00 мл	-	0.23

Згідно із табл. 3.13, невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) становить 1.52 %. Розподіл невизначеності пробопідготовки за операціями для кількісного визначення таблеток «Лізиноприл-Астрафарм» 0.02 г показує, що найбільшу невизначеність в пробопідготовку вносять операції 3, 8 – взяття аліквоти піпеткою 1.00 мл.

Повна невизначеність аналітичної методики (Δ_{As}) становить 1.67 %.

$$\Delta_{As} = 1.67 \% \leq \max \Delta_{As} = 1.6 \%$$

У відповідності до вимог ДФУ, у випадку, коли не виконується наведене вище співвідношення, то використовують критерій незначущості цієї систематичної похибки в порівнянні з максимально припустимою невизначеністю аналізу. При розрахунку повної невизначеності аналізу необхідно використовувати максимально допустимі величини S_{sp} . У відповідності до характеристики спектрофотометра «Shimadzu UV-1800», Японія, величина S_{sp} не перевищує 0.20 %: $\Delta_{FAO} = 2 \cdot 0.2 = 0.40$, тоді, Δ_{As} складає 1.57 %.

$$\Delta_{As} = 1.57 \% \leq \max \Delta_{As} = 1.6 \%$$

Таким чином, аналітична методика є коректною та може відтворюватися в інших лабораторіях з необхідною точністю.

Результати кількісного визначення лізиноприлу у складі ЛЗ представлено у табл. 3.14.

Отримані значення метрологічних характеристик у табл. 3.14 свідчать про те, що результати кількісного визначення лізиноприлу у складі трьох ЛЗ є точними та вірогідними.

Таблиця 3.14 – Результати кількісного визначення лізиноприлу в ЛЗ

Лікарський засіб	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
1	2	3
Таблетки «Лізиноприл-Астрафарм» 0.02 г серія 090919	0.0208 0.0204 0.0199 0.0201 0.0203 0.0199	$\bar{m} = 0.0202$ г $S = 3.44 \times 10^{-4}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 3.62 \times 10^{-4}$ RDS = 1.7 % $\varepsilon = 1.79$ %

Продовження таблиці 3.14

1	2	3
Таблетки «Лізиноприл-Астрафарм» 0.02 г серія 111119	0.0198	$\bar{m} = 0.0202$ г
	0.0199	$S = 5.00 \times 10^{-4}$
	0.0209	$t = 2.57$
	0.0207	$\Delta x = 5.24 \times 10^{-4}$
	0.0201	RDS = 2.48 %
	0.0197	$\varepsilon = 2.60$ %
Таблетки «Лізиноприл-Астрафарм» 0.02 г серія 040620	0.0211	$\bar{m} = 0.0206$ г
	0.0205	$S = 3.92 \times 10^{-4}$
	0.0209	$t = 2.57$
	0.0202	$\Delta x = 4.11 \times 10^{-4}$
	0.0201	RDS = 1.90 %
	0.0207	$\varepsilon = 2.00$ %

3.2.5 Робасність методики

Вивчення робасності проведено на етапі розробки спектрофотометричної методики визначення лізиноприлу за нінгідриною реакцією під час встановлення оптимальних умов проведення перебігу реакцій та визначення факторів, які можуть впливати на величину абсорбції (стабільність розчинів у часі, коливання кількості доданого реагенту). Встановлено, що аналізовані розчини стабільні впродовж 45 хв (за умови щільного закриття кювети під час вимірювання оптичної густини) (рис. 3.7), а коливання кількості доданого реагенту (0.2 % розчину нінгідрину) в межах $\pm 10\%$ істотно не впливає на значення оптичної густини (рис. 3.6).

3.2.6 Розрахування оцінки впливу аналітичної методики на навколишнє середовище

Принципи «зеленої хімії» враховано при розробці спектрофотометричної методики визначення лізиноприлу в субстанціях та ЛЗ за нінгідриною

реакцією. У табл. 3.15 представлено результати оцінки «зеленості» спектрофотометричної методики визначення лізіноприлу в субстанціях та ЛЗ за нінгідриноювою реакцією. Бал аналітичної еко-шкали становив 94 (табл. 3.15). Результати вивчення «зеленості» аналітичної методики з використання методу AGREE наведено на рис. 3.8.

Таблиця 3.15 – Аналітична еко-шкала для оцінки «зеленості» розробленої методики

Параметри	Пенальті бали
Реактиви	
Вода	0
Нінгідрин	1
Споживання енергії	0
Професійні шкідливості	0
Відходи	5
Загальна кількість пенальті балів	6
Бал аналітичної еко-шкали	94
Висновок	Відмінний «зелений» аналіз

Як видно з рис. 3.8, червоним кольором виділено операцію 7, що свідчить про аналітичні відходи, яких необхідно уникати чи зменшувати під час розробки аналітичної методики шляхом зменшення кількості аналіту та об'єму розчинника. У даному випадку точну наважку порошку таблеток, еквівалентну 100 мг лізіноприлу, можна зменшити до 50 мг чи 25 мг лізіноприлу та перенести до мірної колби об'ємом 50.0 мл чи 25.0 мл, а не 100.0 мл. Така пробопідготовка буде негативно впливати на невизначеність пробопідготовки для кількісного визначення лізіноприлу в таблетках, що є критичним в даному випадку. Тому прийнято рішення не застосовувати такий підхід, оскільки бал з використання методу AGREE становив 0.80.

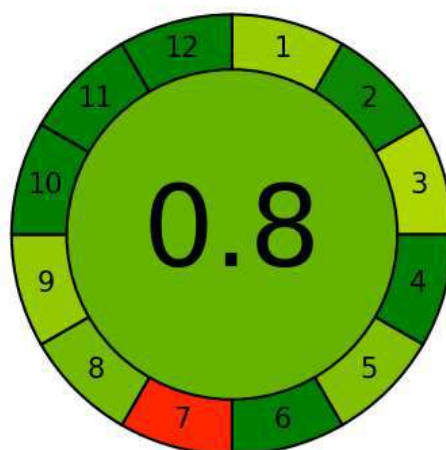


Рисунок 3.8 – Піктограма «зеленості» аналітичної методики з використання методу AGREE

Пробопідготовка розчинів була простою та використовувалися водні розчини лізіноприлу і нінгідрину, що дало можливість досягнути «зеленого» аналізу. Результати, представлені у табл. 3.15 та рис. 3.8, демонструють відмінну екологічність розробленої спектрофотометричної методики визначення лізіноприлу в субстанції та ЛЗ за нінгідриноювою реакцією.

3.3 Розробка та валідація спектрофотометричної методики визначення лізіноприлу в субстанції та лікарських засобах за реакцією з купруму (II) сульфатом

У нейтральному середовищі лізіноприл утворює з іонами Cu^{2+} синю комплексну сполуку. На рис. 3.9 показано спектр поглинання цієї сполуки з максимумом поглинання за довжини хвилі 730 нм. Збіг максимумів поглинання спектрів випробовуваного розчину та розчину порівняння свідчить про відсутність впливу допоміжних речовин на кількісне визначення лізіноприлу в таблетках. На рис. 3.10 представлено запропоновану схему взаємодії лізіноприлу з купруму (II) сульфатом.

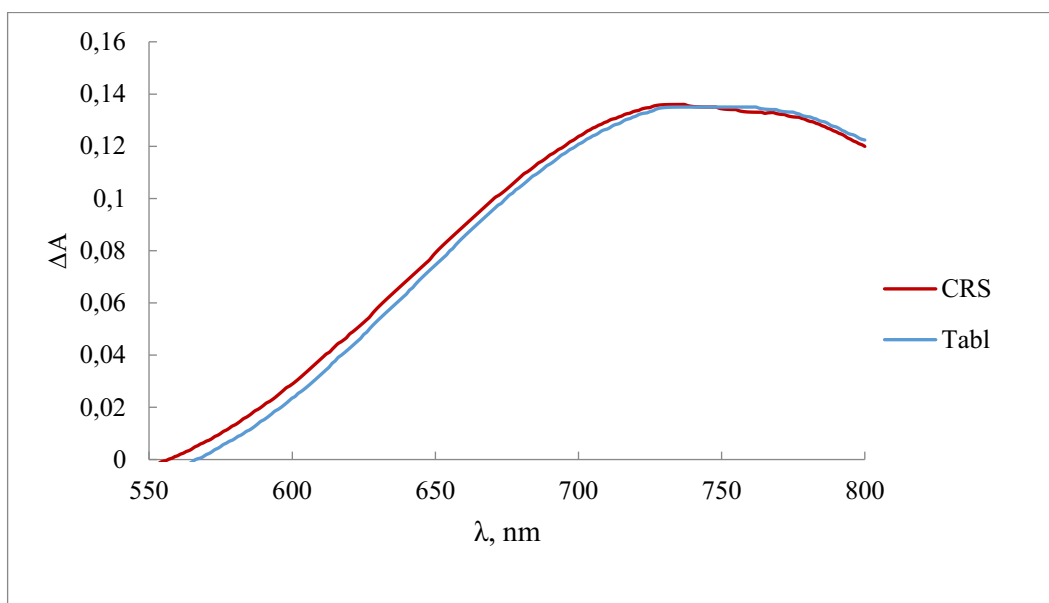


Рисунок 3.9 – Спектри поглинання продукту реакції лізиноприлу з купруму (II) сульфатом (ФСЗ лізиноприлу (CRS) та таблетки Лізиноприл 20 мг, Астрафарм, серії 090919 (Tabl))

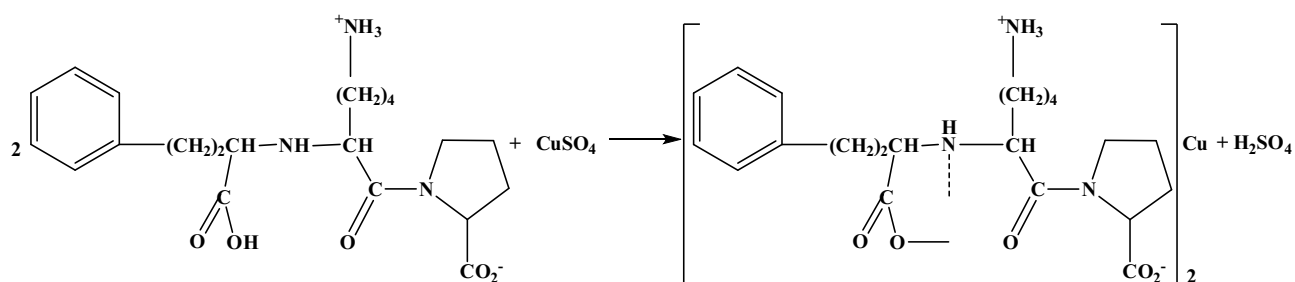


Рисунок 3.10 – Запропонована схема взаємодії лізиноприлу з купруму (II) сульфатом

Оптимальна концентрація розчину купруму (II) сульфату (1.0×10^{-3} М) встановлена експериментальним шляхом. Для встановлення стехіометричних коефіцієнтів реагуючих компонентів між лізиноприлом та купруму (II) сульфатом приготовлено розчини купруму (II) сульфату та лізиноприлу однакової молярної концентрації (1.0×10^{-3} М). Спектри поглинання продукту реакції лізиноприлу з купруму (II) сульфатом у співвідношенні 1-1, 1-2, 2-1 представлено на рис. 3.11. Відповідно до результатів, отриманих на рис. 3.11, стехіометричні співвідношення реагуючих компонентів «лізиноприл- купруму

(II) сульфат» становлять 2:1, що узгоджується з запропонованою схемою взаємодії лізиноприлу з купруму (II) сульфатом [95, 96] (див. рис. 3.10).

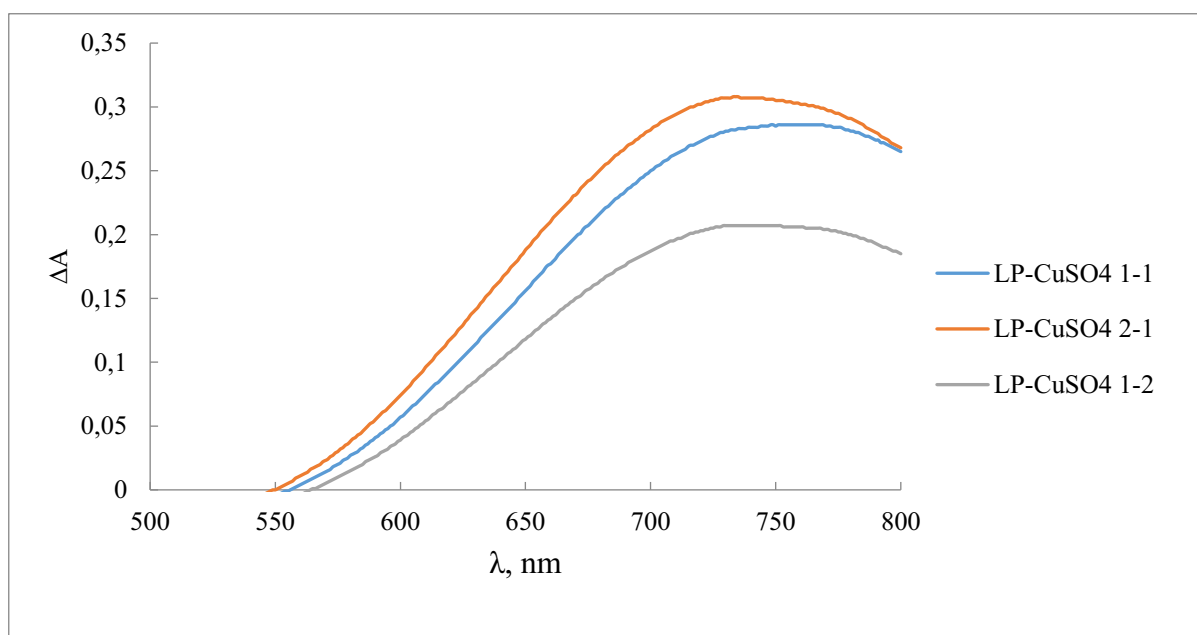


Рисунок 3.11 – Спектри поглинання продукту реакції лізиноприлу з купруму (II) сульфату (співвідношення реагуючих компонентів 2:1- оранжевий, 1:1 – синій, 1:2 – сірий)

На наступному етапі експерименту, досліджено стабільність аналізованого розчину в часі. Графік залежності абсорбції утвореного продукту реакції лізиноприлу з купруму (II) сульфатом від часу наведено на рис. 3.12. Встановлено, що випробовувані розчини є стабільними впродовж 45 хв.

Для встановлення аналітичних показників чутливості реакції лізиноприлу з купруму (II) сульфатом розраховано показники чутливості реакції. Молярний показник поглинання (ϵ) становив 0.13×10^3 , питома поглинання (a) – 3.08×10^{-3} , коефіцієнт Сендела (Ws) – 2.40×10^{-3} .

Розроблена аналітична методика валідована відповідно до вимог ДФУ [87] та ІСН Q2 [88] за наступними показниками: специфічність, лінійність, діапазон застосування, правильність, прецизійність та робастність.

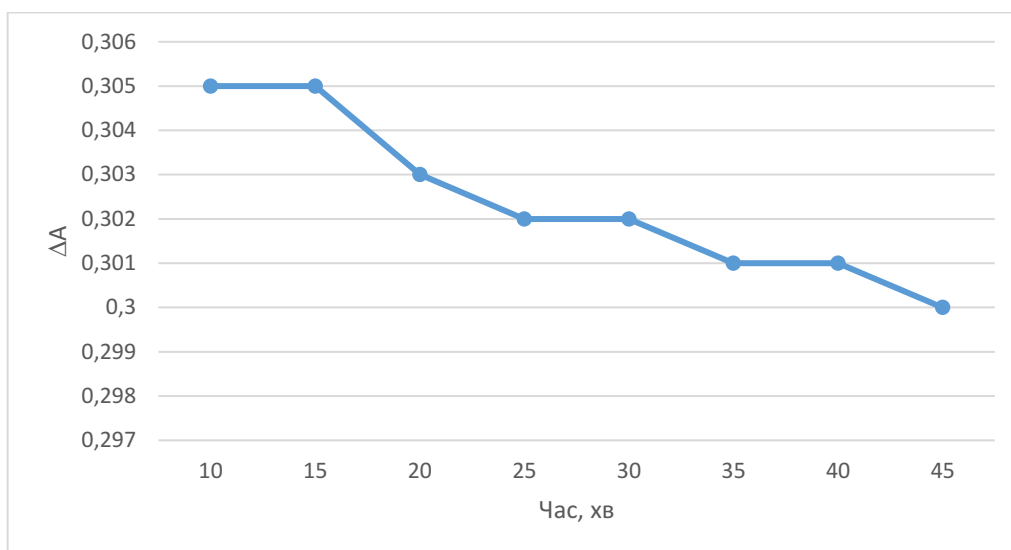


Рисунок 3.12 – Графік залежності абсорбції утвореного продукту реакції лізиноприлу з купруму (II) сульфатом від часу

3.3.1 Специфічність методики

Для підтвердження специфічності спектрофотометричної методики визначення лізиноприлу в таблетках за реакцією з купруму (II) сульфатом приготовлено розчин допоміжних речовин («плацебо»). Вплив домішок на результати кількісного визначення лізиноприлу не вивчався, оскільки при виконанні даної роботи використано ЛЗ промислового виробництва, що не містили неприпустимої кількості домішок, про що свідчили сертифікати якості виробників. Результати вивчення специфічності аналітичної методики представлено в табл. 3.16.

Таблиця 3.16 – Результати вивчення специфічності спектрофотометричної методики визначення лізиноприлу в таблетках за реакцією з купруму (II) сульфатом

Абсорбція плацебо (A плацебо)	Абсорбція розчину домішок ЛФ (A домішок)	Абсорбція розчину порівняння (Ast)	Знайдене значення δ_{noise} , %	Критерій прийнятності
0.001	-	0.307	0.33	не більше 0.5 %

З даних, представлених в табл. 3.16, випливає, що абсорбція допоміжних речовин є незначною (знайдене значення $\delta_{\text{noise}} = 0.33 \%$) і не перевищує критерій прийнятності.

3.3.2 Лінійність, діапазон застосування методики

Вивчення лінійності проводили на всьому діапазоні застосування методики з використанням модельних розчинів зразків відповідно до вимог ДФУ. Отримані результати оброблено за допомогою методу найменших квадратів. Метрологічні характеристики лінійної залежності представлено в табл. 3.17. Параметри лінійності (табл. 3.17) відповідають вимогам ДФУ на всьому діапазоні застосування аналітичної методики.

Таблиця 3.17 – Метрологічні характеристики лінійної залежності

Величина	Значення	Критерій	Висновок (відповідає або не відповідає)
$b \pm (S_b)$	$0.0443 \pm (0.0064)$	–	
$a \pm (S_a)$	$0.0832 \pm (0.0015)$	$ a \leq \Delta a = t(2.57) \cdot S_a = 0.0039$	Відповідає
R^2	0.9990	> 0.9982	Відповідає
МВ (мг/мл)	0.11	–	
МКВ (мг/мл)	0.34	–	
Підпорядкування закону Бера в діапазоні концентрацій (мг/мл)	0.59–2.07	–	

3.3.3 Правильність та прецизійність методики

Для перевірки правильності та прецизійності методики готували модельні розчини з точно відомим вмістом АФІ, які охоплювали діапазон застосування методики (з концентраціями 70-130 % від номінальної). Результати проведених розрахунків наведено в табл. 3.18.

Таблиця 3.18 – Результати аналізу модельних сумішей і їх статистична обробка для кількісного визначення

Модельні розчини	Вміст лізиноприлу, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100, \%$
	Введено, $X_i = (C_i/C_{rs}) \cdot 100 \%$	Знайдено, $Y_i = (A_i/A_{rs}) \cdot 100 \%$	
M ₁	69.95	70.04	100.13
M ₂	80.12	80.01	99.86
M ₃	89.95	90.07	100.13
M ₄	95.05	95.09	100.04
M ₅	100.01	100.07	100.06
M ₆	105.07	105.01	99.94
M ₇	110.12	110.45	100.30
M ₈	119.94	120.21	100.26
M ₉	129.91	130.02	100.08
Середнє значення, Z, %			100.09
Стандартне відхилення, S _z , %			0.15
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 8) \cdot S_z = 2.3060 S_z, \%$			0.35
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta_{As} = 1.6 \%$			виконується (0.35 < 1.6)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 , \%$			0.09
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta \%$			виконується (0.09 < 0.51)
Загальний висновок про методику			Коректна

Із табл. 3.18 випливає, що спектрофотометрична методика визначення лізиноприлу за реакцією з купруму (II) сульфатом характеризується достатньою

прецизійністю (збіжністю), так як знайдене значення відносного довірчого інтервалу величини Δz (0.35) менше критичного значення для збіжності результатів (1.6 %).

Виконується критерій незначущості систематичної похибки методики – систематична похибка методики (0.09) є практично незначущою, тобто методика аналізу характеризується достатньою правильністю в усьому діапазоні концентрацій від 70 до 130 %.

Дослідження внутрішньолабораторної прецизійності проводили на 6 пробах однієї серії препарату, різними аналітиками, в різні дні (3 дні), з використанням різного мірного посуду, шляхом оцінки значення відносного довірчого інтервалу, яке має бути менше максимально припустимої невизначеності результатів аналізу: $\Delta z \leq 1.6$ (при $V = 5\%$) (табл. 3.19).

Таблиця 3.19 – Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності

№ розчину	Величина Z_i , %		
	1 дослід	2 дослід	3 дослід
1	100.19	100.02	100.05
2	99.92	100.07	100.02
3	100.21	100.05	100.23
4	99.89	100.04	100.01
5	99.94	100.22	100.02
6	100.05	99.91	100.09
Середнє Z (%)	100.03	100.05	100.07
RSD_x , %	0.14	0.10	0.08
Відносне стандартне відхилення, RSD_z (%)	0.11		
Відносний довірчий інтервал, Δz	$0.10 \leq 1.6$		
Критичне значення збіжності результатів Δ_{As} , %	1.6		

Внутрішньолабораторна прецизійність результатів аналізу підтверджена тим, що величина відносного довірчого інтервалу для шести паралельних визначень однієї серії препарату задовольняє критерію прийнятності ($\leq 1.6\%$) (див. табл. 3.19).

3.3.4 Прогноз повної невизначеності методики

Для підтвердження коректності аналітичної методики проводять прогнозування повної невизначеності методики. Невизначеність кінцевої аналітичної операції для спектрофотометричного аналізу становить 0.70 %. Розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення таблеток «Лізіноприл-Астрафарм» 0.02 г наведено у табл. 3.20.

Таблиця 3.20 – Розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення таблеток «Лізіноприл-Астрафарм» 0.02 г

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
1	2	3
Розчин порівняння		
1) взяття наважки ФСЗ лізіноприлу	m_0	$0.2 \text{ мг}/370 \text{ мг} \times 100 \% = 0.05$
2) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 50.00 мл	50	0.17
3) взяття аліквоти піпеткою 5.00 мл	5	0.37
4) взяття розчину купруму (II) сульфату піпеткою 10.00 мл	10	0.25
5) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.00 мл	25	0.23

Продовження таблиці 3.20

1	2	3
Випробовуваний розчин		
6) взяття наважки таблеток	m_1	$0.2 \text{ мг}/580 \text{ мг} \times 100 \% =$ 0.03
7) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 50.00 мл	50	0.17
8) взяття аліквоти піпеткою 5.00 мл	5	0.37
9) взяття розчину купруму (II) сульфату піпеткою 10.00 мл	10	0.25
10) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.00 мл	25	0.23
Компенсаційний розчин		
11) взяття наважки купруму (II) сульфату	-	$0.2 \text{ мг}/249 \text{ мг} \times 100 \% =$ 0.08
12) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 50.00 мл	-	0.17
13) взяття аліквоти 10.00 мл розчину купруму (II) сульфату піпеткою 10.00 мл	-	0.25
14) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.00 мл	-	0.23

Згідно з табл. 3.20, невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) становить 0.85 %. Розподіл невизначеності пробопідготовки за операціями для кількісного визначення таблеток «Лізиноприл-Астрафарм» 0.02 г показує, що найбільшу невизначеність в пробопідготовку вносять операції 3, 8 – взяття аліквоти піпеткою 5.00 мл.

Повна невизначеність аналітичної методики (Δ_{As}) становить 1.10 %.

$$\Delta_{As} = 1.10 \% \leq \max \Delta_{As} = 1.6 \%$$

Прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не перевищувала критичного значення ($\max \Delta_{As}$). Таким чином, аналітична методика є коректною та може відтворюватися в інших лабораторіях з необхідною точністю.

Результати кількісного визначення лізиноприлу у складі ЛЗ представлено у табл. 3.21.

Таблиця 3.21 – Результати кількісного визначення лізиноприлу в ЛЗ

Лікарський засіб	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
Таблетки «Лізиноприл-Астрафарм» 0.02 г серія 090919	0.0197	$\bar{m} = 0.0201$ г $S = 3.74 \times 10^{-4}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 3.93 \times 10^{-4}$ RDS = 1.86 % $\varepsilon = 1.95$ %
	0.0205	
	0.0203	
	0.0204	
	0.0201	
	0.0196	
Таблетки «Лізиноприл-Астрафарм» 0.02 г серія 111119	0.0197	$\bar{m} = 0.0201$ г $S = 3.45 \times 10^{-4}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 3.62 \times 10^{-4}$ RDS = 1.72 % $\varepsilon = 1.81$ %
	0.0204	
	0.0205	
	0.0201	
	0.0197	
	0.0199	
Таблетки «Лізиноприл-Астрафарм» 0.02 г серія 040620	0.0201	$\bar{m} = 0.0203$ г $S = 4.72 \times 10^{-4}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 4.96 \times 10^{-4}$ RDS = 2.33 % $\varepsilon = 2.45$ %
	0.0209	
	0.0205	
	0.0195	
	0.0201	
	0.0204	

Аналіз даних, отриманих у табл. 3.21, вказує на те, що результати кількісного визначення лізиноприлу у ЛЗ є точними та вірогідними.

3.3.5 Робасність методики

Вивчення робасності проведено на етапі розробки спектрофотометричної методики визначення лізиноприлу за реакцією з купруму (II) сульфатом під час встановлення оптимальних умов проведення перебігу реакцій та визначення факторів, які можуть впливати на величину оптичної густини (стабільність розчинів у часі, кількість доданого реагенту). Встановлено, що аналізовані розчини стабільні впродовж 45 хв (за умови щільного закриття кювети під час вимірювання оптичної густини) (рис. 3.12), а коливання кількості доданого реагенту (1.0×10^{-3} М розчину купруму (II) сульфату) в межах $\pm 10\%$ істотно не впливає на значення оптичної густини (табл. 3.22).

Таблиця 3.22 – Вплив кількості доданого 1.0×10^{-3} М розчину купруму (II) сульфату на оптичну густину

Об'єм 1.0×10^{-3} М розчину купруму (II) сульфату, мл	% (1.0×10^{-3} М) розчину купруму (II) сульфату	ΔA
9.00	90	0.298
9.50	95	0.300
10.00	100	0.302
10.50	105	0.305
11.00	110	0.309

3.3.6 Розрахування оцінки впливу аналітичної методики на навколишнє середовище

Принципи «зеленої хімії» враховано при розробці спектрофотометричної методики визначення лізиноприлу в субстанціях та ЛЗ за реакцією з купруму (II) сульфатом. Бал аналітичної еко-шкали становив 94 (табл. 3.23). Результати

вивчення «зеленості» аналітичної методики з використання методу AGREE наведено на рис. 3.13.

Таблиця 3.23 – Аналітична еко-шкала для оцінки «зеленості» розробленої методики

Параметри	Пенальті бали
Реактиви	
Вода	0
Купрум (II) сульфат	1
Споживання енергії	0
Професійні шкідливості	0
Відходи	5
Загальна кількість пенальті балів	6
Бал аналітичної еко-шкали	94
Висновок	Відмінний «зелений» аналіз

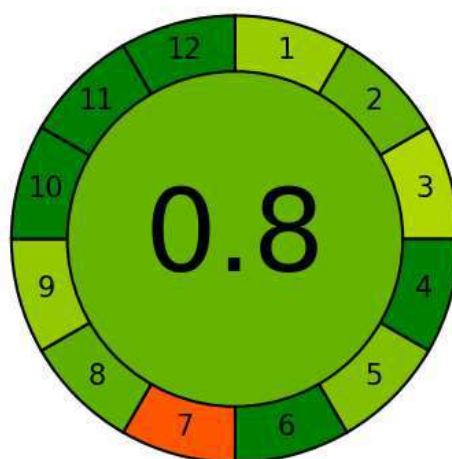


Рисунок 3.13 – Піктограма «зеленості» аналітичної методики з використання методу AGREE

Як видно з рис. 3.13, червоним кольором виділено операцію 7, що свідчить про аналітичні відходи, яких необхідно уникати чи зменшувати під час розробки аналітичної методики шляхом зменшення кількості аналіту та об'єму розчинника. У даному випадку точну наважку порошку таблеток, еквівалентну 370 мг лізиноприлу, можна зменшити до 185 мг лізиноприлу та перенести до мірної колби об'ємом 25.0 мл, а не 50.0 мл. Така пробопідготовка буде негативно впливати на невизначеність пробопідготовки для кількісного визначення лізиноприлу в таблетках, що є критичним в даному випадку. Тому прийнято рішення не застосовувати такий підхід, оскільки бал з використання методу AGREE становив 0.80.

Пробопідготовка розчинів була простою і використовувалися водні розчини лізиноприлу та купруму (II) сульфату, що дало можливість легко досягнути «зеленого» аналізу. Результати, представлені у табл. 3.23 та рис. 3.13, вказують на те, що розроблена спектрофотометрична методика визначення лізиноприлу в субстанції та лікарських засобах за реакцією з купруму (II) сульфату є відмінною у відповідності з принципами «зеленої хімії».

3.4 Розробка та валідація УФ-спектрофотометричної методики визначення аторвастатину кальцію в лікарських засобах

Запропонована методика базується на прямому вимірюванні поглинання випробовуваних розчинів в УФ-ділянці відносно компенсаційного розчину. УФ-спектри ФСЗ аторвастатину кальцію в метанолі й метанольного вилучення з таблеток аторвастатину мали інтенсивно виражені максимуми поглинання за довжин хвиль 212 та 247 нм (рис. 3.14) [98, 99]. Для встановлення вмісту аторвастатину кальцію вимірювали поглинання випробовуваного розчину за довжини хвилі 247 нм відносно компенсаційного розчину. Збіг максимумів поглинання спектрів випробовуваного розчину та розчину порівняння свідчить про відсутність впливу допоміжних речовин на кількісне визначення

аторвастатину в таблетках. Перевагами запропонованої методики є простота пробопідготовки та експресність.

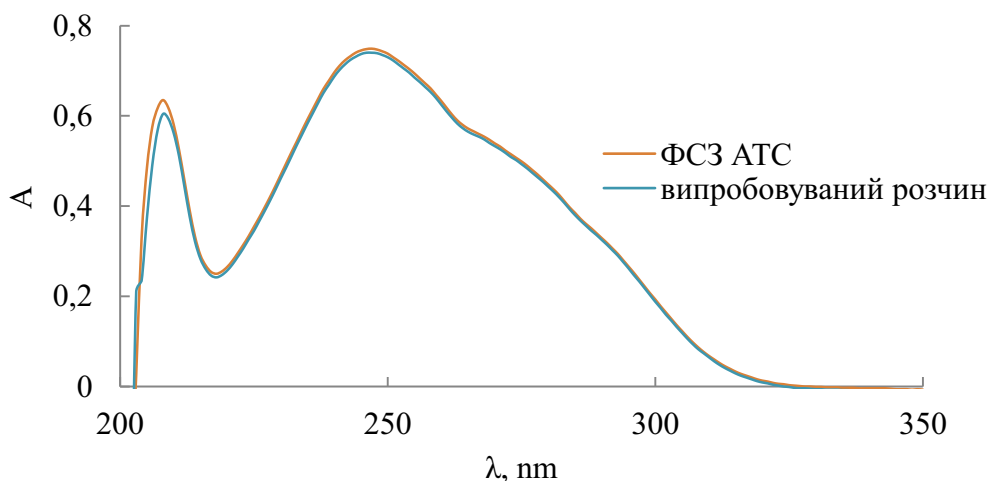


Рисунок 3.14 – Електронні спектри поглинання метанольного розчину ФСЗ аторвастатину ($C=20$ мкг/мл) та метанольного вилучення з таблеток Аторвастатину-Тева 10 мг, серія 15683

Валідацію аналітичної методики проводили за основними валідаційними характеристиками: специфічність, лінійність, прецизійність, правильність, робасність, діапазон застосування.

3.4.1 Специфічність методики

Для підтвердження специфічності УФ-спектрофотометричної методики визначення аторвастатину кальцію в таблетках приготовлено розчин допоміжних речовин («плацебо»). Вплив домішок на результати кількісного визначення аторвастатину кальцію не вивчався, оскільки при виконанні даної роботи було використано ЛЗ промислового виробництва, що не містили неприпустимої кількості домішок, про що свідчили сертифікати якості виробників. Результати вивчення специфічності аналітичної методики представлено в табл. 3.24.

Таблиця 3.24 – Результати вивчення специфічності УФ-спектрофотометричної методики визначення аторвастатину кальцію в таблетках

Абсорбція плацебо (А плацебо)	Абсорбція розчину домішок ЛФ (А домішок)	Абсорбція розчину порівняння (Ast)	Знайдене значення δ_{noise} , %	Критерій прийнятності
0.001	-	0.325	0.31	не більше 0.5 %

Відповідно до результатів, представлених в табл. 3.24 випливає, що абсорбція допоміжних речовин за довжини хвилі 247 нм є незначною (знайдене значення δ_{noise} – 0.31 %) і не перевищує критерій прийнятності.

3.4.2 Лінійність, діапазон застосування методики

Лінійність вивчали на всьому діапазоні застосування методики з використанням модельних розчинів зразків відповідно до вимог ДФУ. Отримані результати оброблено за допомогою методу найменших квадратів. Результати розрахунків рівнянь лінійної регресії наведено в табл. 3.25.

Таблиця 3.25 – Метрологічні характеристики лінійної залежності

Величина	Значення	Критерій	Висновок (відповідає або не відповідає)
$b \pm (S_b)$	$0.0438 \pm (0.0032)$	–	–
$a \pm (S_a)$	$0.128 \pm (0.0067)$	$ a \leq \Delta a = t(2.31) \cdot S_a = 0.0155$	Відповідає
R^2	0.9997	>0.9989	Відповідає
МВ (мкг/мл)	0.5	–	
МКВ (мкг/мл)	1.6	–	
Підпорядкування закону Бера в діапазоні концентрацій (мкг/мл)	8–40	–	

Параметри лінійної залежності аналітичної методики (табл. 3.25) задовольняють вимогам ДФУ в усьому діапазоні застосування методики. Високе значення коефіцієнту кореляції $R^2 = 0.9997$ також задовольняє вимоги критерію прийнятності ($R^2 = 0.9989$) і підтверджує лінійність аналітичної методики.

3.4.3 Правильність та прецизійність методики

Для перевірки правильності та прецизійності методики готували модельні розчини з точно відомим вмістом АФІ, які охоплювали діапазон застосування методики (з концентраціями 70-130 % від номінальної). Результати проведених розрахунків наведено в табл. 3.26. Із табл. 3.26 випливає, що УФ-спектрофотометрична методика визначення аторвастатину характеризується достатньою прецизійністю (збіжністю), так як знайдене значення відносного довірчого інтервалу величини Δz (0.36) менше критичного значення для збіжності результатів (1.6 %).

Таблиця 3.26 – Результати аналізу модельних сумішей і їх статистична обробка для кількісного визначення

Модельні розчини	Вміст аторвастатину, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100, \%$
	Введено, $X_i = (C_i / C_{rs}) 100 \%$	Знайдено, $Y_i = (A_i / A_{rs}) 100 \%$	
1	2	3	4
M ₁	69.97	69.82	99.79
M ₂	80.04	80.22	100.22
M ₃	89.93	89.97	100.04
M ₄	95.02	95.09	100.07
M ₅	100.05	99.95	99.90

Продовження таблиці 3.26

1	2	3	4
M ₆	104.99	104.91	99.92
M ₇	110.23	110.11	99.89
M ₈	120.03	119.95	99.93
M ₉	130.03	130.09	100.05
Середнє значення, Z, %			99.98
Стандартне відхилення, S _z , %			0.15
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 8) \cdot S_z = 2.3060 S_z, \%$			0.36
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta_{As} = 1.6 \%$			виконується (0.36 < 1.6)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 , \%$			0.02
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta \%$			виконується (0.02 < 0.51)
Загальний висновок про методику			Коректна

Виконується критерій незначущості систематичної похибки методики – систематична похибка методики (0.02) є практично незначущою, тобто методика аналізу характеризується достатньою правильністю в усьому діапазоні концентрацій від 70 до 130 %.

Дослідження внутрішньолабораторної прецизійності проводили на 6 пробах однієї серії препарату, різними аналітиками, в різні дні (3 дні), з використанням різного мірного посуду, шляхом оцінки значення відносного довірчого інтервалу, яке має бути менше максимально припустимої невизначеності результатів аналізу: $\Delta z \leq 1.6$ (при $V = 5 \%$) (табл. 3.27).

Внутрішньолабораторна прецизійність результатів аналізу підтверджена тим, що величина відносного довірчого інтервалу для шести паралельних

визначень однієї серії препарату задовольняє критерію прийнятності ($\leq 1.6\%$) (табл. 3.27).

Таблиця 3.27 – Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності

№ розчину	Величина Z_i , %		
	1 дослід	2 дослід	3 дослід
1	99.85	100.05	100.01
2	99.99	100.11	100.05
3	100.15	99.93	100.03
4	99.95	100.14	99.88
5	100.07	100.09	100.01
6	100.08	99.91	99.96
Середнє Z (%)	100.02	100.04	99.99
RSD_x , %	0.11	0.10	0.06
Відносне стандартне відхилення, RSD_z (%)	0.09		
Відносний довірчий інтервал, Δ_z	$0.08 \leq 1.6$		
Критичне значення збіжності результатів Δ_{As} , %	1.6		

3.4.4 Прогноз повної невизначеності методики

Для підтвердження коректності аналітичної методики проводять прогнозування повної невизначеності методики. Невизначеність кінцевої аналітичної операції для спектрофотометричного аналізу становить 0.70 %. Розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення ЛЗ наведено у табл. 3.28.

Згідно з даними табл. 3.28, невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) для визначення аторвастатину кальцію в ЛЗ становила 1.47 %.

Таблиця 3.28 – Розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення ЛЗ

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
Розчин порівняння аторвастатину		
1) взяття наважки ФСЗ аторвастатину	m_0	$0.2 \text{ мг}/20 \text{ мг} \times 100 \% = 1.00$
2) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 200.00 мл	200	0.10
3) взяття аліквоти піпеткою 1.00 мл	1.0	0.74
4) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 50.00 мл	50	0.17
Випробовуваний розчин		
5) взяття наважки порошку розтертих таблеток	m_1	$0.2 \text{ мг}/220 \text{ мг} \times 100 \% = 0.09$
6) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 200.00 мл	200	0.10
7) взяття аліквоти піпеткою 1.00 мл	1.0	0.74
8) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 50.00 мл	50	0.17

Розподіл невизначеності пробопідготовки за операціями для кількісного визначення аторвастатину кальцію в ЛЗ показує, що найбільшу невизначеність у пробопідготовку вносить операції 1 – взяття наважки. Повна невизначеність аналітичної методики (Δ_{As}) визначення аторвастатину кальцію становить 1.63 %:

$$\Delta_{As} = 1.63 \% \leq \max \Delta_{As} = 1.6 \%$$

Відповідно до вимог ДФУ, у випадку, коли не виконується наведене вище співвідношення, то використовують критерій незначущості цієї систематичної похибки в порівнянні з максимально припустимою невизначеністю аналізу. При розрахунку повної невизначеності аналізу необхідно використовувати максимально допустимі величини S_{sp} . У відповідності до характеристики спектрофотометра «Shimadzu UV-1800», Японія, величина S_{sp} не перевищує 0.20 %: $\Delta_{FAO} = 2 \cdot 0.2 = 0.40$, тоді, Δ_{As} складає 1.52 %.

$$\Delta_{As} = 1.52 \% \leq \max \Delta_{As} = 1.6 \%$$

Таким чином, аналітична методика є коректною та може відтворюватися в інших лабораторіях з необхідною точністю.

Результати визначення вмісту аторвастатину кальцію в ЛЗ наведено в табл. 3.29.

Таблиця 3.29 – Результати кількісного визначення аторвастатину в лікарських засобах ($n=6, p=0.95$)

Лікарський засіб	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
Таблетки «Аторвастатин Тева» 0.01 г, серія 15683	0.0103	$\bar{m} = 0.0103$ г $S = 3.21 \times 10^{-3}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 3.37 \times 10^{-3}$ RDS = 3.13 $\varepsilon = 3.29 \%$
	0.0102	
	0.0099	
	0.0105	
	0.0107	
	0.0099	

3.4.5 Робасність методики

Для вивчення робасності методики обрано такий параметр як стійкість аналізованих розчинів у часі (приготовлених за вищенаведеною методикою). В ДФУ не регламентується, через який проміжок часу необхідно проводити вимірювання після приготування розчину, тому нами обрано діапазон часу – 2

год. Отримані результати наведено в табл. 3.30. Розчини стабільні впродовж 120 хв (табл. 3.30).

Таблиця 3.30 – Результати вивчення стабільності випробовуваних розчинів аторвастатину (1) та розчинів ФСЗ аторвастатину (2)

№	t, хв						A сер	RSD _t , %
	0	20	40	60	90	120		
1	0.327	0.327	0.325	0.325	0.325	0.322	0.325	0.56
2	0.508	0.505	0.505	0.505	0.505	0.505	0.506	0.24

3.4.6 Розрахування оцінки впливу аналітичної методики на навколишнє середовище

При розробці УФ-спектрофотометричної методики визначення аторвастатину кальцію ЛЗ враховано принципи «зеленої хімії». У табл. 3.31 узагальнено результати оцінки «зеленості» аналітичної методики. Бал аналітичної еко-шкали становив 92 (табл. 3.31). Результати вивчення «зеленості» аналітичної методики з використання методу AGREE наведено на рис. 3.15.

Таблиця 3.31 – Аналітична еко-шкала для оцінки «зеленості» розробленої методики

Параметри	Пенальті бали
Розчинник: метанол	3
Споживання енергії	0
Професійні шкідливості	0
Відходи	5
Загальна кількість пенальті балів	8
Бал аналітичної еко-шкали	92
Висновок	Відмінний «зелений» аналіз

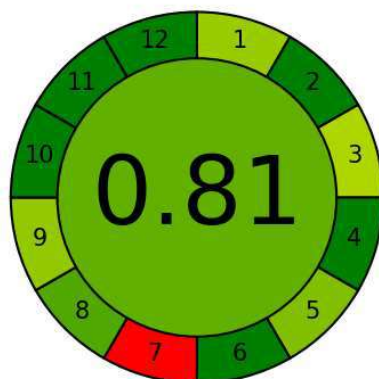


Рисунок 3.15 – Піктограма «зеленості» аналітичної методики з використання методу AGREE

Як видно з рис. 3.15, червоним кольором виділено операцію 7, що свідчить про аналітичні відходи, яких необхідно уникати чи зменшувати під час розробки аналітичної методики шляхом зменшення кількості аналіту та об'єму розчинника. У даному випадку точну наважку порошку таблеток, еквівалентну 20 мг аторвастатину, можна зменшити до 10 мг аторвастатину та перенести до мірної колби об'ємом 100.0 мл, а не 200.0 мл так, як і планувалося зробити в попередніх дослідженнях з розробки аналітичної методики, проте така пробопідготовка буде негативно впливати на невизначеність пробопідготовки для кількісного визначення аторвастатину кальцію в таблетках, що є критичним в даному випадку. Тому прийнято рішення не застосовувати такий підхід, оскільки бал з використання методу AGREE становив 0.81.

Пробопідготовка розчинів була простою і не вимагала використання реактивів, оскільки дана аналітична методика – це методика прямого спектрофотометричного визначення. Результати, представлені у табл. 3.31 та рис. 3.15, показують, що розроблена УФ-спектрофотометрична методика визначення аторвастатину кальцію в субстанції та ЛЗ є відмінною у відповідності до принципів «зеленої хімії».

З метою розробки спектрофотометричної методики одночасного кількісного визначення лізіноприлу та аторвастатину в бінарній суміші та

лабораторно виготовлених таблетках, які містили 20 мг лізіноприлу та 20 мг аторвастатину (фіксована комбінація), розглянута можливість застосування методу УФ-спектрофотометрії. Попередньо спектрофотометрували метанольні вилучення з таблеток лізіноприлу та аторвастатину. Електронні спектри поглинання метанольних розчинів аторвастатину та лізіноприлу представлено на рис. 3.16.

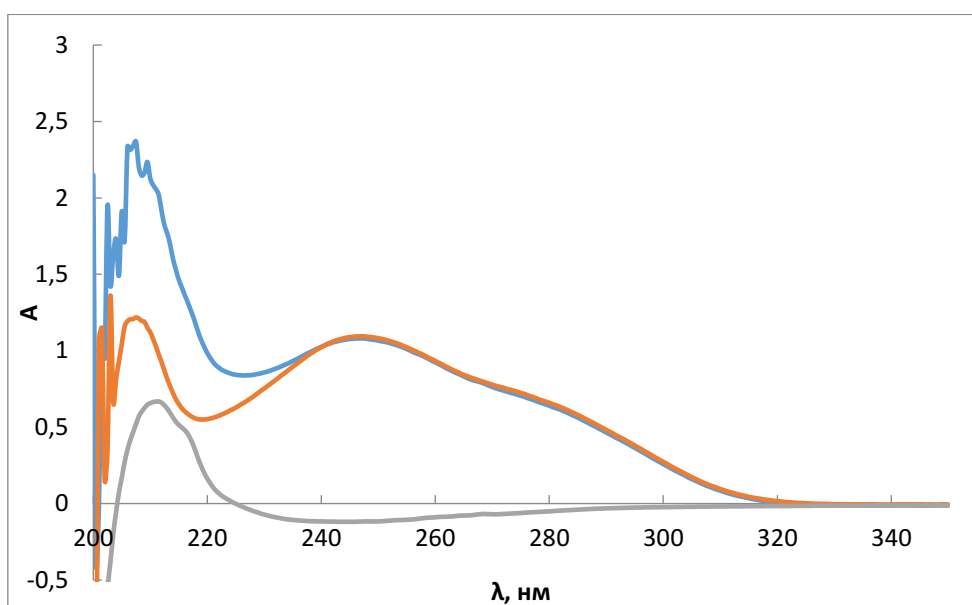


Рисунок 3.16 – Електронні спектри поглинання метанольних розчинів аторвастатину, лізіноприлу та вилучення з таблеток (сірий колір – метанольний розчин ФСЗ лізіноприлу, коричневий – метанольний розчин ФСЗ аторвастатину кальцію, синій – метанольний розчин вилучення з таблеток)

Як випливає із спектрів поглинання на рис. 3.16, УФ-спектри метанольного вилучення лізіноприлу та аторвастатину з таблеток мають інтенсивно виражені смуги поглинання за довжини хвилі 212 нм, що унеможливорює одночасне кількісне визначення аторвастатину та лізіноприлу із застосуванням методу УФ-спектрофотометрії і не може застосовуватися для аналізу комбінованої ЛФ на основі аторвастатину кальцію та лізіноприлу. Тому актуальною проблемою залишається розробка хроматографічної

методики одночасного кількісного визначення аторвастатину та лізиноприлу в таблетках, над якою продовжили працювати та яка описана у розділі 4.

3.5 Розробка та валідація спектрофотометричної методики визначення аторвастатину кальцію в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромтимоловим синім

У науковій літературі описано значну кількість спектрофотометричних методик кількісного визначення аторвастатину кальцію у ЛЗ [9-14]. Описано спектрофотометричні методики визначення аторвастатину кальцію за утворенням іон-парних комплексів із сульфаталеїновими барвниками [9], *n*-диметил-амінобензальдегідом [10], *n*-розаніліном гідрохлоридом [11] та з використанням сечовини як гідротропного солюбілізувального агента [12], сульфо-фосфваніліну як реагента [13], йоду та утворенні трийодидного (I_3^-) комплексу [14]. Як вже було описано у розділі 1, існуючі спектрофотометричні методики мають ряд недоліків, це, зокрема, використання токсичних реагентів, довготривалість, нагрівання, необхідність екстракції, трудомісткість тощо. В процесі вибору оптимального реагенту для розробки спектрофотометричної методики нами апробовано барвники (БТС, БФС, кристалічний фіолетовий, метиленовий синій) та альдегіди (бензальдегід, нітробензальдегід, саліциловий альдегід) в присутності кислоти сірчаної. З різних причин кристалічний фіолетовий, метиленовий синій та альдегіди як реагенти не бралися до уваги, оскільки вони давали негативний результат (утворювалися нестабільні комплекси, повнота утворення комплексу була недостатньою, калібрувальні криві були нелінійними тощо). Тому ми зупинили вибір на БТС та БФС та використали їх як реагенти для розробки спектрофотометричної методики. Утворення іонних асоціатів між речовинами, що мають основний характер та центри з надлишком електронної густини, є популярним підходом, що застосовується у фармацевтичному аналізі. Ці реакції є простими, експресними, відбуваються при кімнатній температурі, забарвлення сульфаталеїнових барвників і іонних асоціатів є

високоінтенсивними. Розробці та валідації спектрофотометричних методик визначення АФІ в субстанціях, модельних сумішах та ЛЗ з використанням сульфопталеїнових барвників присвячено ряд робіт вітчизняних та іноземних авторів [100-128]. В науковій літературі описана розробка тільки однієї спектрофотометричної методики визначення аторвастатину кальцію на основі реакції з БКП в середовищі ацетону [9]. У цитованій статті також використовувався сульфопталеїновий барвник та органічний розчинник. Молярний коефіцієнт поглинання був низьким, діапазон застосування аналітичної методики був неочікувано вузьким від 14 до 20 мг/л, а ацетон, який використовувався як розчинник, має ряд недоліків, оскільки дуже легко випаровується, є токсичним і тому методика не може відповідати принципам «зеленої» аналітичної хімії. Основною метою цього дослідження було отримати неекстраційні комплекси, оскільки вони мають ряд переваг при розробці аналітичних методик визначення АФІ в ЛЗ. При введенні аторвастатину кальцію до розчину БТС спостерігалось збільшення смуги поглинання однократно йонізованої форми барвника ($\lambda_{\max} = 430$ нм) з одночасним зменшенням смуги поглинання двократно йонізованої форми барвника ($\lambda_{\max} = 620$ нм). В органічних розчинниках положення цих форм дещо зміщене внаслідок сольватохромного ефекту [128]. Розглянуто можливість застосування методу диференціальної спектрофотометрії за реакцією з БТС з використанням максимуму поглинання продукту реакції за довжини хвилі 420 нм [129]. Спектри поглинання продукту реакції аторвастатину кальцію з БТС представлено на рис. 3.17. Спектри поглинання продукту реакції аторвастатину кальцію та БТС, отримані при аналізі ФСЗ та таблеток аторвастатину кальцію, наведено на рис. 3.18. Збіг максимумів поглинання спектрів випробовуваного розчину та розчину порівняння свідчить про відсутність впливу допоміжних речовин на кількісне визначення аторвастатину в таблетках.

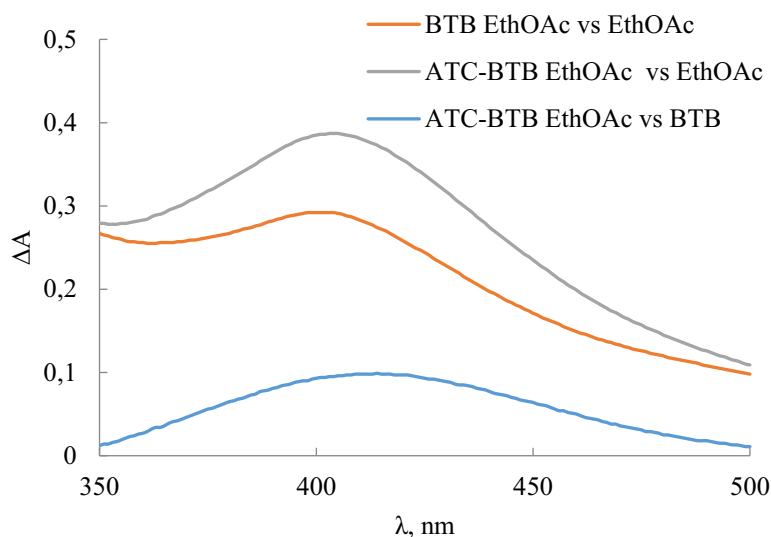


Рисунок 3.17 – Спектри поглинання продукту реакції аторвастатину кальцію з БТС проти етилацетату (сірий), проти БТС (синій) та БТС проти етилацетату (оранжевий)

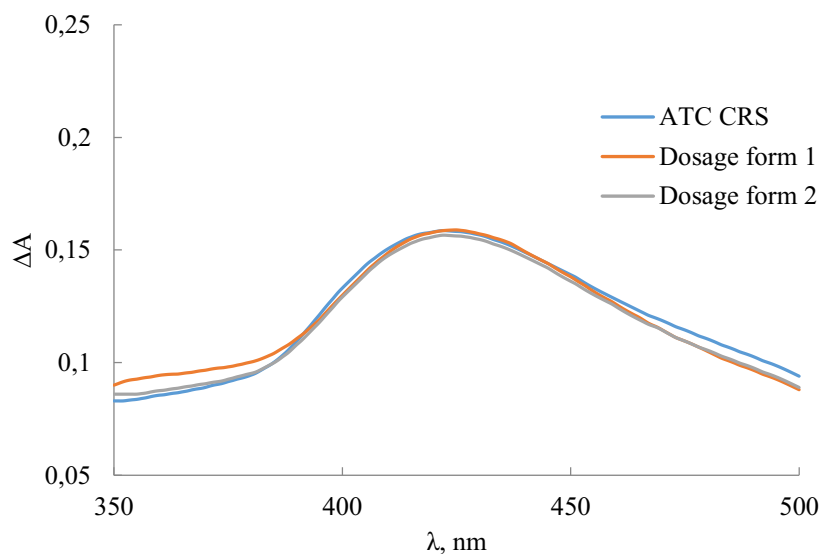


Рисунок 3.18 – Спектри поглинання продукту реакції аторвастатину кальцію та БТС, отримані при аналізі ФСЗ (CRS) та таблеток аторвастатину кальцію (1 – Аторвакор 20 мг серія № 130921, 2 – Лівостор 20 мг серія ДО 0724)

Перед тим, як розпочати розробку спектрофотометричної методики визначення аторвастатину кальцію за реакцією з БТС, здійснено оптимізацію умов проведення реакції з метою утворення кольорового комплексу іонного асоціату з максимальною стабільністю та чутливістю. Для того, щоб обрати

відповідний розчинник для приготування розчинів реагентів, які використовуються в дослідженні, реагент готували окремо в різних розчинниках, таких як метанол, хлороформ, ацетонітрил, етанол і етилацетат. Максимальне поглинання спостерігалося в розчині хлороформу та етилацетату з БТС, тоді як етанол, метанол та ацетонітрил були непридатними. Абсолютні значення абсорбції аторвастатину кальцію з БТС у різних розчинниках представлено на рис. 3.19. Враховуючи принципи «зеленої хімії», ми не брали до уваги хлороформ як розчинник та обрали для подальших досліджень етилацетат.

В процесі проведених експериментальних досліджень встановлено, що оптимальною концентрацією розчину БТС була концентрація 1.28×10^{-4} М. Наступним та важливим етапом для подальшої розробки спектрофотометричної методики є дослідження стабільності аналізованих розчинів в часі. Якщо розчини є нестабільними, то необхідним є застосування певних аналітичних прийомів для їх стабілізації (наприклад, корегування рН), що би вносило пенальті бали при розрахунку аналітичної еко-шкали та впливало на екологічність розробленої аналітичної методики. Для вивчення стабільності вимірювали абсорбцію отриманого розчину в оптимальних умовах впродовж 45 хв. Графік залежності абсорбції продукту реакції аторвастатину кальцію з БТС від часу наведено на рис. 3.20.

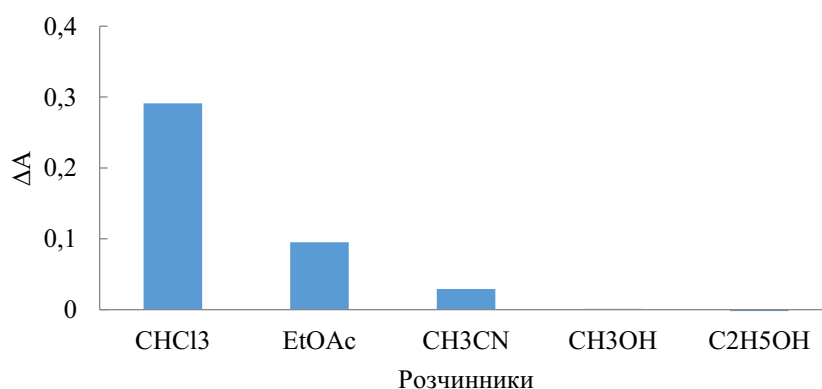


Рисунок 3.19 – Абсолютні значення абсорбції аторвастатину кальцію з БТС у різних розчинниках

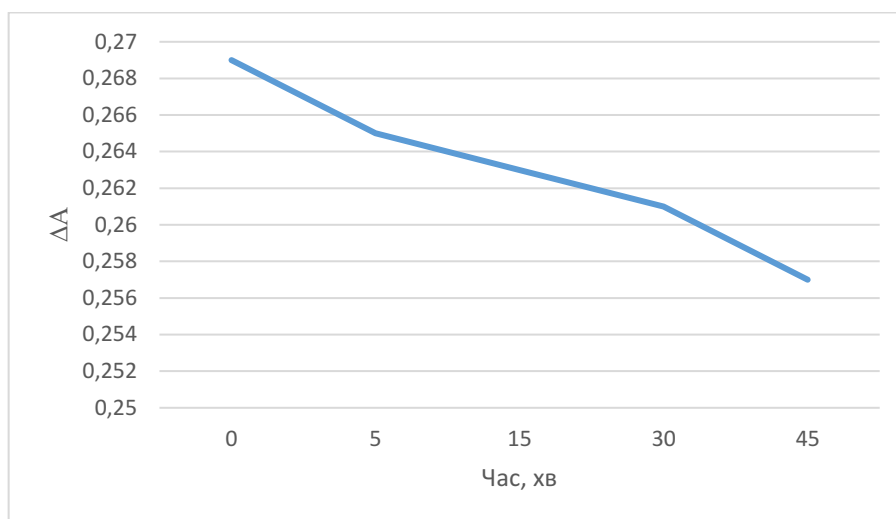


Рисунок 3.20 – Графік залежності абсорбції продукту реакції аторвастатину кальцію з БТС від часу

Встановлено, що випробовувані розчини стабільні впродовж 45 хв. Цей факт є однією з переваг майбутньої розробленої аналітичної методики, оскільки не вимагає корегування рН та додавання буферних розчинів, що б ускладнювало пробопідготовку.

Стехіометричні коефіцієнти реагуючих компонентів між аторвастатином кальцію та БТС визначали методом неперервних змін (метод Жоба) і метод насичення (метод молярних співвідношень). Метод неперервних змін заснований на визначенні співвідношення ізомолярних концентрацій реагентів, що відповідає максимальному виходу сполук, що утворюються в результаті реакції. Для цього готують розчини БТС і аторвастатину кальцію однакової молярної концентрації (1.28×10^{-4} М) і змішують їх у співвідношенні від 1/4 до 4/1, при цьому загальний об'єм розчину залишається незмінним. Графік залежності абсорбції від складу ізомолярного розчину за довжини хвилі 420 нм на рис. 3.21. Методом насичення визначається залежність поглинання від концентрації одного з компонентів реакційної суміші при постійній концентрації іншого компонента і навпаки. Точка перегину на кривій насичення дорівнює стехіометричному коефіцієнту компонента, концентрація якого змінювалася (рис. 3.22).

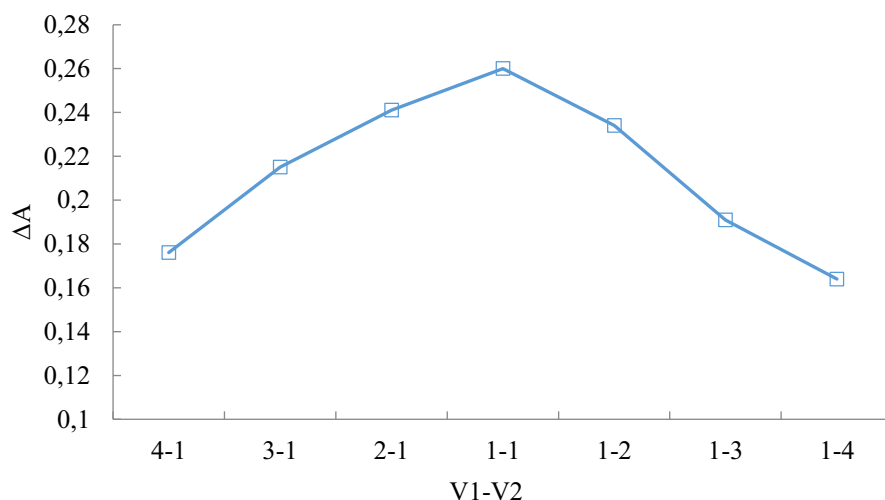


Рисунок 3.21 – Графік залежності абсорбції від складу ізомолярного розчину (V1 – об'єм 1.28×10^{-4} М розчину аторвастатину кальцію, V2 – об'єм 1.28×10^{-4} М розчину БТС) за довжини хвилі 420 нм

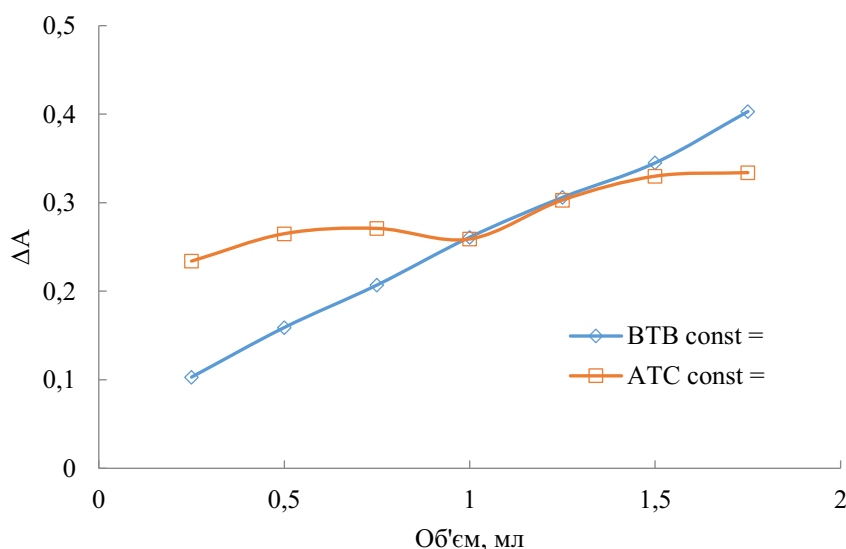


Рисунок 3.22 – Криві насичення: 1 – аторвастатину кальцію при постійній концентрації БТС (1.00 мл 1.28×10^{-4} М розчину); 2 – БТС при постійній концентрації аторвастатину кальцію (1.00 мл 1.28×10^{-4} М розчину)

Згідно з результатами, отриманими на рис. 3.21, 3.22, стехіометричні співвідношення реагуючих компонентів «аторвастатин кальцію – БТС» становлять 1:1.

З метою встановлення чутливості реакції аторвастатину кальцію з БТС розраховано показники чутливості реакції. Молярний показник поглинання (ϵ) становив 2.03×10^3 , питома поглинання (a) – 1.68×10^{-3} , коефіцієнт Сендела (Ws) – 0.09. Розраховані показники свідчать про високу чутливість реакції між аторвастатину кальцію та БТС.

Розроблена аналітична методика валідована відповідно до вимог ДФУ [87] та ІСН Q2 [88] за наступними показниками: специфічність, лінійність, діапазон застосування, правильність, прецизійність та робасність.

3.5.1 Специфічність методики

Для підтвердження специфічності спектрофотометричної методики визначення аторвастатину в таблетках за реакцією з БТС приготовлено розчин допоміжних речовин («плацебо»). Вплив домішок на результати кількісного визначення аторвастатину кальцію не вивчався, оскільки при виконанні даної роботи використано ЛЗ промислового виробництва, що не містили неприпустимої кількості домішок, про що свідчили сертифікати якості виробників. Результати вивчення специфічності аналітичної методики представлено в табл. 3.32.

Таблиця 3.32 – Результати вивчення специфічності спектрофотометричної методики визначення аторвастатину кальцію в таблетках за реакцією з БТС

Абсорбція плацебо (А плацебо)	Абсорбція розчину домішок ЛФ (А домішок)	Абсорбція розчину порівняння (Ast)	Знайдене значення $\delta noise$, %	Критерій прийнятності
0.001	-	0.267	0.37	не більше 0.5 %

Відповідно до результатів, отриманих в табл. 3.32 випливає, що абсорбція допоміжних речовин є незначною (знайдене значення $\delta noise$ – 0.37 %) і не перевищує критерій прийнятності.

3.5.2 Лінійність, діапазон застосування методики

Визначення лінійності проводили на всьому діапазоні застосування методики з використанням модельних розчинів. Отримані результати статистично оброблені методом найменших квадратів відповідно до вимог ДФУ. Результати розрахунків рівняння лінійної регресії наведено у табл. 3.33.

Параметри лінійності (табл. 3.33) відповідають вимогам ДФУ на всьому діапазоні застосування аналітичної методики.

3.5.3 Правильність та прецизійність методики

Для перевірки правильності та прецизійності методики готували модельні розчини з точно відомим вмістом АФІ, які охоплювали діапазон застосування методики (з концентраціями 70-130 % від номінальної). Результати проведених розрахунків наведено в табл. 3.34.

Таблиця 3.33 – Метрологічні характеристики лінійної залежності

Величина	Значення	Критерій	Висновок (відповідає або не відповідає)
$b \pm (S_b)$	0.0017±(0.036)	–	
$a \pm (S_a)$	0.0496±(0.0025)	$ a \leq \Delta a = t(2.77) \cdot S_a = 0.0069$	Відповідає
R^2	0.9993	> 0.9984	Відповідає
МВ (мкг/мл)	4.85	–	
МКВ (мкг/мл)	14.71	–	
Підпорядкування закону Бера в діапазоні концентрацій (мкг/мл)	15.48–154.80	–	

Таблиця 3.34 – Результати аналізу модельних сумішей і їх статистична обробка для кількісного визначення

Модельні розчини	Вміст аторвастатину, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100 \%$
	Введено, $X_i = (C_i / C_{rs}) \cdot 100 \%$	Знайдено, $Y_i = (A_i / A_{rs}) \cdot 100 \%$	
M ₁	69.98	70.05	100.10
M ₂	80.03	79.95	99.90
M ₃	90.05	90.02	99.97
M ₄	95.04	94.99	99.95
M ₅	100.07	100.01	99.94
M ₆	105.00	105.05	100.05
M ₇	110.08	110.35	100.25
M ₈	120.25	120.14	99.91
M ₉	130.11	130.44	100.25
Середнє значення, Z , %			100.04
Стандартне відхилення, S_z , %			0.13
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 8) \cdot S_z = 2.3060 S_z$, %			0.30
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta A_s = 1.6 \%$			Виконується (0.30 < 1.6)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 $, %			0.04
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta \%$			виконується (0.04 < 0.51)
Загальний висновок про методику			Коректна

Із табл. 3.34 випливає, що спектрофотометрична методика визначення аторвастатину за реакцією з БТС характеризується достатньою прецизійністю (збіжністю), так як знайдене значення відносного довірчого інтервалу величини

Δz (0.30) менше критичного значення для збіжності результатів (1.6 %). Виконується критерій незначущості систематичної похибки методики – систематична похибка методики (0.04) є практично незначущою, тобто методика аналізу характеризується достатньою правильністю в усьому діапазоні концентрацій від 70 до 130 %.

Дослідження внутрішньолабораторної прецизійності проводили на 6 пробах однієї серії препарату, різними аналітиками, в різні дні (3 дні), з використанням різного мірного посуду, шляхом оцінки значення відносного довірчого інтервалу, яке має бути менше максимально припустимої невизначеності результатів аналізу: $\Delta z \leq 1.6$ (при $V = 5\%$) (табл. 3.35).

Таблиця 3.35 – Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності

№ розчину	Величина Z_i , %		
	1 дослід	2 дослід	3 дослід
1	99.91	100.11	100.01
2	99.98	100.02	100.09
3	100.11	100.21	100.17
4	99.83	99.94	100.04
5	99.96	99.91	99.95
6	99.99	100.05	100.02
Середнє Z (%)	99.96	100.04	100.05
RSD_x , %	0.09	0.11	0.08
Відносне стандартне відхилення, RSD_Z (%)	0.08		
Відносний довірчий інтервал, Δ_Z	$0.08 \leq 1.6$		
Критичне значення збіжності результатів Δ_{As} , %	1.6		

Внутрішньолабораторна прецизійність результатів аналізу підтверджена тим, що величина відносного довірчого інтервалу для шести паралельних визначень однієї серії препарату задовольняє критерію прийнятності ($\leq 1.6 \%$) (див. табл. 3.35).

3.5.4 Прогноз повної невизначеності методики

Для підтвердження коректності аналітичної методики проводять прогнозування повної невизначеності методики. Розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення таблеток «Лівостор» 0.02 г наведено у табл. 3.36.

Згідно з табл. 3.36 невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) становить 1.06 %. Розподіл невизначеності пробопідготовки за операціями для кількісного визначення таблеток «Лівостор» 0.02 г показує, що найбільшу невизначеність в пробопідготовку вносять операції 3, 4, 8, 9, 13 – взяття аліквоти піпеткою 5.0 мл.

Повна невизначеність аналітичної методики (Δ_{As}) становить 1.27 %.

$$\Delta_{As} = 1.27 \% \leq \max \Delta_{As} = 1.6 \%$$

Прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не перевищувала критичного значення ($\max \Delta_{As}$), а отже запропонована спектрофотометрична методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях.

Результати кількісного визначення аторвастатину кальцію у складі ЛЗ представлено в табл. 3.37.

Аналіз даних табл. 3.37 вказує, що результати кількісного визначення аторвастатину кальцію двох ЛЗ різних виробників є вірогідними та точними.

Таблиця 3.36 – Розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення таблеток «Лівостор» 0.02 г

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
1	2	3
Розчин порівняння		
1) взяття наважки ФСЗ аторвастатину кальцію	m_0	$0.2 \text{ мг}/77.40 \text{ мг} \times 100 \% = 0.26$
2) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 500.00 мл	500	0.07
3) взяття аліквоти піпеткою 5.0 мл	5.0	0.37
4) взяття аліквоти розчину БТС піпеткою 5.0 мл	-	0.37
5) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 50.00 мл	50	0.17
Випробовуваний розчин		
6) взяття наважки таблеток	m_1	$0.2 \text{ мг}/309.60 \text{ мг} \times 100 \% = 0.06$
7) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 500.00 мл	500	0.07
8) взяття аліквоти піпеткою 5.0 мл	5.0	0.37
9) взяття аліквоти розчину БТС піпеткою 5.0 мл	-	0.37
10) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 50.00 мл	50	0.17
Компенсаційний розчин		
11) взяття наважки БТС	-	$0.2 \text{ мг}/41.4 \text{ мг} \times 100 \% = 0.48$
12) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 500.00 мл	-	0.07

Продовження 3.36

1	2	3
13) взяття аліквоти 5.00 мл розчину БТС піпеткою 5.00 мл	-	0.37
14) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 50.00 мл	-	0.17

Таблиця 3.37 – Результати кількісного визначення аторвастатину кальцію в ЛЗ ($n=6, p=0.95$)

Лікарський засіб	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
Таблетки «Аторвакор» 0.02 г	0.0201	$\bar{m} = 0.0202$ г $S = 2.97 \times 10^{-4}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 3.11 \times 10^{-4}$ RDS = 1.47 % $\varepsilon = 1.54$ %
	0.0206	
	0.0199	
	0.0202	
	0.0205	
	0.0199	
Таблетки «Лівостор» 0.02 г	0.0202	$\bar{m} = 0.0202$ г $S = 9.75 \times 10^{-5}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 2.51 \times 10^{-4}$ RDS = 1.18 % $\varepsilon = 1.24$ %
	0.0204	
	0.0201	
	0.0199	
	0.0205	
	0.0199	

3.5.5 Робасність методики

Вивчення робасності проведено ще на етапі розробки спектрофотометричної методики визначення аторвастатину кальцію за реакцією з БТС під час встановлення оптимальних умов проведення перебігу реакцій (стабільність розчинів у часі, кількість доданого реагенту).

Встановлено, що аналізовані розчини стабільні впродовж 45 хв (за умови щільного закриття кювети під час вимірювання оптичної густини) (див. рис. 3.20), а коливання кількості доданого реагенту (розчину БТС) в межах ± 10 % істотно не впливає на значення оптичної густини (табл. 3.38).

Таблиця 3.38 – Вплив кількості доданого розчину БТС на оптичну густину

Об'єм 1.28×10^{-4} М розчину БТС, мл	% БТС	ΔA
4.50	90.00	0.265
4.75	95.00	0.266
5.00	100.00	0.269
5.25	105.00	0.273
5.50	110.00	0.275

3.5.6 Розрахування оцінки впливу аналітичної методики на навколишнє середовище

Як вже зазначалося вище, метою нашого дослідження була розробка спектрофотометричної методики визначення аторвастатину кальцію в таблетках з урахуванням принципів «зеленої хімії». Бал аналітичної еко-шкали запропонованої методики становив 89 (табл. 3.39). Результати вивчення «зеленості» аналітичної методики з використання методу AGREE наведено на рис. 3.23.

Таблиця 3.39 – Аналітична еко-шкала для оцінки «зеленості» розробленої методики

Параметри	Пенальті бали
Реактиви	
Етилацетат	4
БТС	2
Споживання енергії	0
Професійні шкідливості	0
Відходи	5
Загальна кількість пенальті балів	11
Бал аналітичної еко-шкали	89
Висновок	Відмінний «зелений» аналіз



Рисунок 3.23 – Піктограма «зеленості» аналітичної методики з використання методу AGREE

Як видно з рис. 3.23, червоним кольором виділено операцію 7, що свідчить про аналітичні відходи, яких необхідно уникати чи зменшувати під час розробки аналітичної методики шляхом зменшення кількості аналіту та об'єму розчинника. При плануванні експерименту з метою отримання відповідної концентрації розчинів нами обрано масу наважки ФСЗ аторвастатину кальцію 7.74 мг та мірну колбу на 50.00 мл. Аліквота 1.00 мл перенесена в мірну колбу місткістю 10.00 мл. Проте при розрахунку невизначеності повна невизначеність результатів аналізу значно перевищувала критичне значення ($\max\Delta_{As}$). Тому нами було прийняти рішення збільшити масу наважки та об'єм розчину у 10 разів і аліквоту та об'єм вторинного розчину у 5 разів. Отримана повна невизначеність результатів аналізу не перевищувала критичного значення ($\max\Delta_{As}$), проте на піктограмі «зеленості» аналітичної методики з використання методу AGREE одержано відмічену у червоний колір операцію 7, що вказує на великі аналітичні відходи. На рис. 3.23 операція 10 відзначена жовтим кольором (через використання етилацетату як розчинника). В процесі експериментального вибору розчинника для спектрофотометричної методики визначення аторвастатину за реакцією з БТС, як уже зазначалося вище, встановлено, що оптимальними є хлороформ та етилацетат. Нами обрано

етилацетат. Якщо б було обрано хлороформ, то на піктограмі операція 10 відзначалася червоним кольором і це було би критично для «зеленості» розробленої методики.

Результати, представлені у табл. 3.39 та рис. 3.23, вказують на те, що розроблена спектрофотометрична методика визначення аторвастатину кальцію в субстанції та ЛЗ за реакцією з БТС є задовільною у відповідності до принципів «зеленої хімії».

3.6 Розробка та валідація спектрофотометричної методики визначення аторвастатину кальцію в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромфеноловим синім

У розділі 3.5 описано розробку спектрофотометричної методики визначення аторвастатину кальцію за реакцією з БТС. При розрахуванні оцінки впливу екологічності аналітичної методики на навколишнє середовище з використання методу AGREE отримано бал 0.76 (див. рис. 3.23). Тому продовжено дослідження з розробки більш екологічною методикою визначення аторвастатину в ЛЗ. В процесі виконання експериментальної частини ми звернули увагу ще на один сульфоталеїновий барвник. Розглянуто можливість застосування методу диференціальної спектрофотометрії за реакцією з БФС із використанням максимуму поглинання продукту реакції за довжини хвилі 594 нм [130, 131]. Як вже було сказано вище в розділі 3.5, сульфоталеїнові барвники існують у розчині переважно у двох протонуваних формах – монопротонуваних, де протон відщеплюється від сульфогрупи, і в діаніонній формі, де другий протон відщеплюється від одного з фенольних гідроксилів. Для БФС ці форми поглинають у водному розчині при 437 нм (моноаніонна форма) і при 592 нм (діаніонна форма). В органічних розчинниках положення цих форм дещо зміщене внаслідок сольватохромного ефекту. Реакції, пов'язані з утворенням комплексів йонних асоціатів, полягають в електростатичному притяганні протилежно заряджених іонів – утворення так

званих йонних пар або йонних асоціативних комплексів. Тому можуть утворюватися лише дві форми йонної асоціації: з одноразово йонізованою або з подвійно йонізованою формою барвника. Іноді, особливо у водних розчинах, до асоціації йонів додаються інші взаємодії, такі як гідрофобна взаємодія або утворення агрегатів. У деяких випадках не можна виключати утворення комплексів з переносом заряду. У метанольному розчині переважає смуга моноаніонної форми БФС, а за наявності аторвастатину кислотно-лужний баланс барвника зміщується в бік двічі деіонізованої форми, оскільки з цією формою барвника аторвастатин утворює більш стійкі йонні асоціати. Наявність такої рівноваги пояснює, чому калібрувальні криві в таких методах часто є нелінійними. Спектри поглинання продукту реакції аторвастатину кальцію з БФС представлено на рис. 3.24. Спектри поглинання продукту реакції аторвастатину кальцію та БФС, отримані при аналізі ФСЗ та таблеток аторвастатину кальцію, наведено на рис. 3.25. Збіг максимумів поглинання спектрів випробовуваного розчину та розчину порівняння свідчить про відсутність впливу допоміжних речовин на кількісне визначення аторвастатину в таблетках.

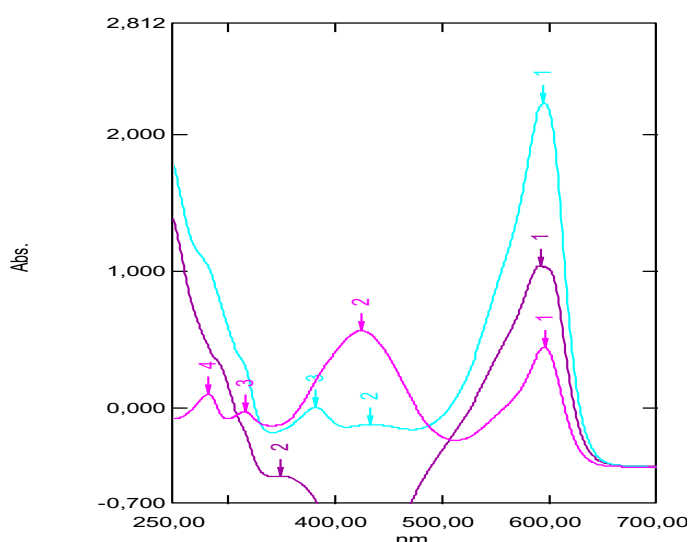


Рисунок 3.24 – Спектри поглинання продукту реакції аторвастатину кальцію з БФС проти метанолу (зелений), проти БФС (фіолетовий) та БФС проти метанолу (рожевий)

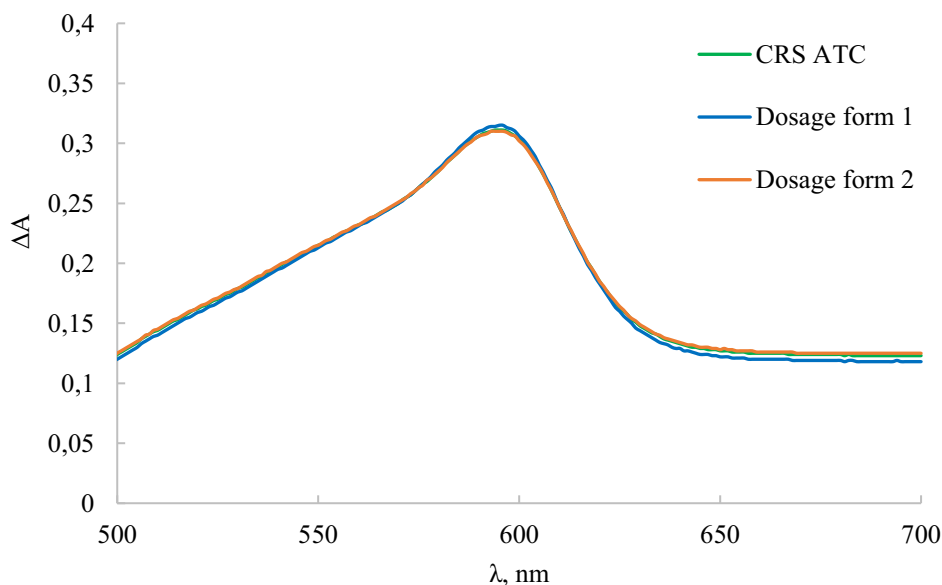


Рисунок 3.25 – Спектри поглинання продукту реакції аторвастатину кальцію та БФС, отримані при аналізі ФСЗ (CRS) та таблеток аторвастатину кальцію (1 – Аторвакор 20 мг серія № 130921 (Dosage form 1), 2 – Лівостор 20 мг серія ДО 0724 (Dosage form 2))

Нами здійснено вибір оптимальних умов проведення реакції з метою утворення кольорового комплексу йонного асоціату з максимальною стабільністю та чутливістю. Максимальне поглинання спостерігалось в розчині метанолу та ацетонітрилу з БФС, тоді як етанол, хлороформ, ацетонітрил та етилацетат були непридатними. Абсолютні значення абсорбції аторвастатину кальцію з БФС у різних розчинниках представлено на рис. 3.26. Тому для подальших досліджень обрано метанол.

У процесі проведених експериментальних досліджень встановлено, що найоптимальнішою концентрацією БФС була концентрація 4.12×10^{-4} М. Проведено вивчення стабільності аналізованих розчинів в часі. Для вивчення стабільності вимірювали абсорбцію отриманого розчину в оптимальних умовах впродовж 45 хв. Графік залежності абсорбції продукту реакції аторвастатину кальцію з БФС від часу наведено на рис. 3.27.

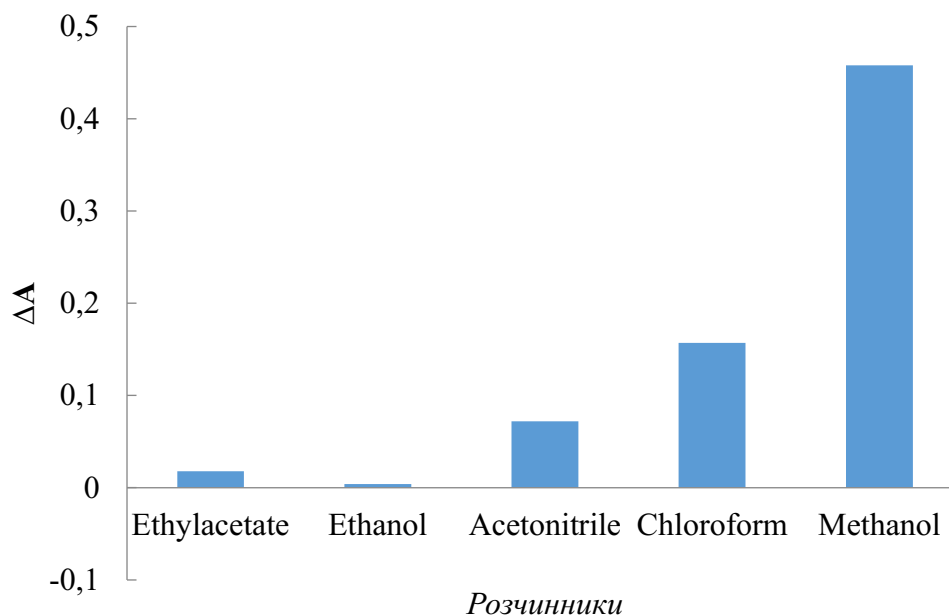


Рисунок 3.26 – Значення абсорбції аторвастатину кальцію з БФС у різних розчинниках

Встановлено, що випробовувані розчини аторвастатину були стабільними впродовж 45 хв, що дало нам можливість працювати над подальшою розробкою аналітичної методики. Якщо стабільність йонних асоціатів низька, то додавання АФІ до барвника не повністю зміщує рівновагу і не весь доданий АФІ реагує.

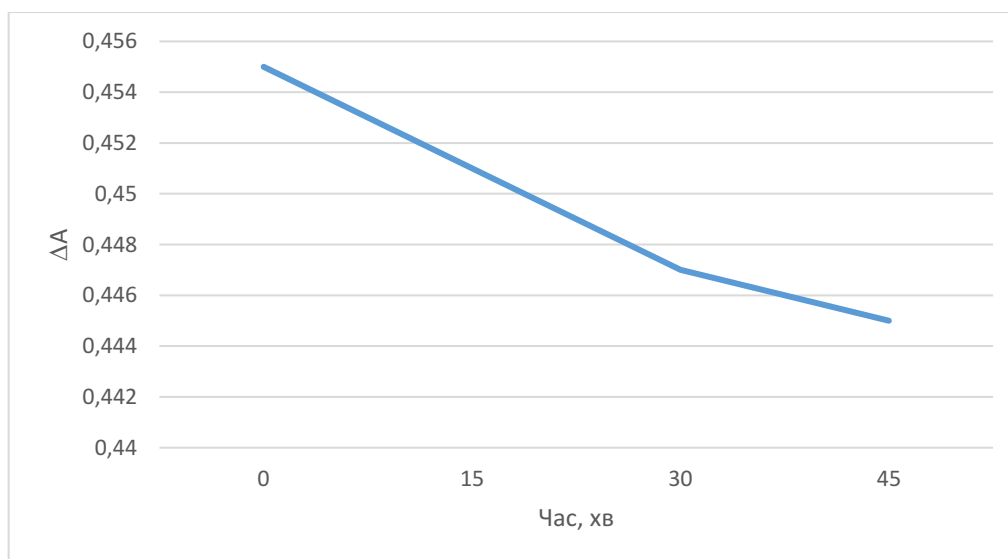


Рисунок 3.27 – Графік залежності абсорбції продукту реакції аторвастатину кальцію з БФС від часу

Стехіометричні коефіцієнти реагуючих компонентів між аторвастатином кальцію та БФС визначали методом неперервних змін (метод Жоба) і метод насичення (метод молярних співвідношень). Метод неперервних змін заснований на визначенні співвідношення ізомолярних концентрацій реагентів, що відповідає максимальному виходу сполук, що утворюються в результаті реакції. Для цього готують розчини БФС і аторвастатину кальцію однакової молярної концентрації (4.12×10^{-4} М) і змішують їх у співвідношенні від 1/4 до 4/1, при цьому загальний об'єм розчину залишається незмінним. Графік залежності абсорбції від складу ізомолярного розчину за довжини хвилі 595 нм на рис. 3.28. Методом насичення визначається залежність поглинання від концентрації одного з компонентів реакційної суміші при постійній концентрації іншого компонента і навпаки. Точка перегину на кривій насичення дорівнює стехіометричному коефіцієнту компонента, концентрація якого змінювалася (рис. 3.29).

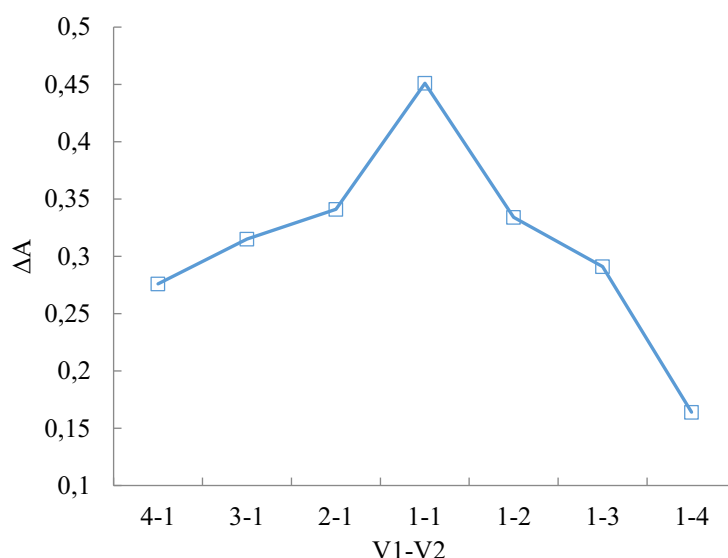


Рисунок 3.28 – Графік залежності абсорбції від складу ізомолярного розчину ($V1$ – об'єм 4.12×10^{-4} М розчину аторвастатину кальцію, $V2$ – об'єм 4.12×10^{-4} розчину БФС) за довжини хвилі 594 нм

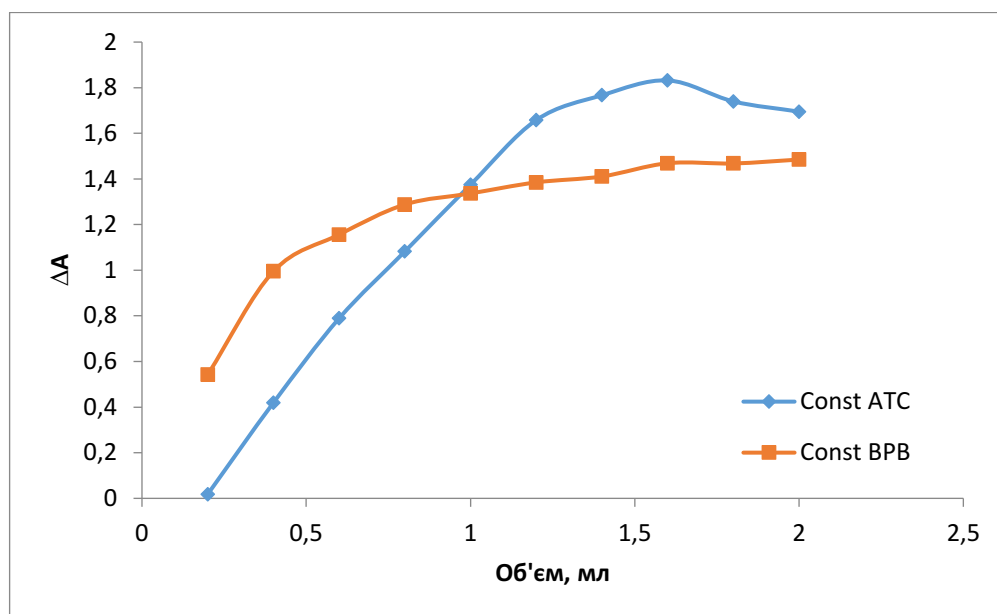


Рисунок 3.29 – Криві насичення: 1 – аторвастатину кальцію при постійній концентрації БФС (1.00 мл 4.12×10^{-4} М розчину); 2 – БФС при постійній концентрації аторвастатину кальцію (1.00 мл 4.12×10^{-4} М розчину)

Згідно з даними, отриманими на рис. 3.28, 3.29, стехіометричні співвідношення реагуючих компонентів «аторвастатин кальцію – БФС» становлять 1:1.

З метою встановлення чутливості реакції аторвастатину кальцію з БФС розраховано показники чутливості реакції. Молярний показник поглинання (ϵ) становив 1.71×10^4 , питома поглинання (a) – 1.42×10^{-2} , коефіцієнт Сендела (Ws) – 0.07. Розраховані показники чутливості реакцій свідчать про високу чутливість реакції між аторвастатину кальцію та БФС.

Розроблена аналітична методика валідована відповідно до вимог ДФУ [87] та ІСН Q2 [88] за наступними показниками: специфічність, лінійність, діапазон застосування, правильність, прецизійність та робастність.

3.6.1 Специфічність методики

Для підтвердження специфічності спектрофотометричної методики визначення аторвастатину в таблетках за реакцією з БФС приготовлено розчин допоміжних речовин («плацебо»). Вплив домішок на результати кількісного визначення

аторвастатину кальцію не вивчався, оскільки при виконанні даної роботи було використано ЛЗ промислового виробництва, що не містили неприпустимої кількості домішок, про що свідчили сертифікати якості виробників. Результати вивчення специфічності аналітичної методики представлено в табл. 3.40.

Таблиця 3.40 – Результати вивчення специфічності спектрофотометричної методики визначення аторвастатину кальцію в таблетках за реакцією з БФС

Абсорбція плацебо (А плацебо)	Абсорбція розчину домішок ЛФ (А домішок)	Абсорбція розчину порівняння (Ast)	Знайдене значення δ_{noise} , %	Критерій прийнятності
0.001	-	0.453	0.22	не більше 0.5 %

З даних, представлених в табл. 3.40 випливає, що абсорбція допоміжних речовин є незначною (знайдене значення δ_{noise} – 0.22 %) і не перевищує критерій прийнятності.

3.6.2 Лінійність, діапазон застосування методики

Визначення лінійності проводили на всьому діапазоні застосування методики з використанням модельних розчинів. Отримані результати статистично оброблені методом найменших квадратів відповідно до вимог ДФУ. Результати розрахунків рівняння лінійної регресії наведено у табл. 3.41.

Параметри лінійності (табл. 3.41) відповідають вимогам ДФУ на всьому діапазоні застосування аналітичної методики.

3.6.3 Правильність та прецизійність методики

Для перевірки правильності та прецизійності методики готували модельні розчини з точно відомим вмістом АФІ, які охоплювали діапазон застосування методики (з концентраціями 70-130 % від номінальної). Результати проведених розрахунків наведено в табл. 3.42.

Таблиця 3.41 – Метрологічні характеристики лінійної залежності

Величина	Значення	Критерій	Висновок (відповідає або не відповідає)
$b \pm (S_b)$	0.0487±(0.0034)	–	
$a \pm (S_a)$	0.1413±(0.0201)	$ a \leq \Delta a = t(2.57) \cdot S_a = 0.0517$	Відповідає
R^2	0.9990	> 0.9982	Відповідає
МВ (мкмоль/л)	1.36	–	
МКВ (мкмоль/л)	4.13	–	
Підпорядкування закону Бера в діпазоні концентрацій (мкмоль/л)	4.12-33	–	

Таблиця 3.42 – Результати аналізу модельних сумішей і їх статистична обробка для кількісного визначення

Модельні розчини	Вміст аторвастатину, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100, \%$
	Введено, $X_i = (C_i / C_{rs}) \cdot 100 \%$	Знайдено, $Y_i = (A_i / A_{rs}) \cdot 100 \%$	
1	2	3	4
M ₁	70.02	70.09	100.10
M ₂	80.01	79.93	99.90
M ₃	90.01	89.94	99.92
M ₄	95.05	95.12	100.07
M ₅	100.02	100.07	100.05
M ₆	105.10	105.02	99.92

Продовження таблиці 3.42

1	2	3	4
M ₇	110.12	110.05	99.94
M ₈	119.94	120.05	100.09
M ₉	130.00	129.93	99.95
Середнє значення, Z, %			99.99
Стандартне відхилення, S _z , %			0.09
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 8) \cdot S_z = 2.3060 S_z, \%$			0.21
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta_{As} = 1.6 \%$			Виконується (0.21 < 1.6)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 , \%$			0.01
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta \%$			Виконується (0.01 < 0.51)
Загальний висновок про методику			Коректна

Із табл. 3.42 випливає, що спектрофотометрична методика визначення аторвастатину за реакцією з БФС характеризується достатньою прецизійністю (збіжністю), так як знайдене значення відносного довірчого інтервалу величини Δz (0.21) менше критичного значення для збіжності результатів (1.6 %).

Виконується критерій незначущості систематичної похибки методики – систематична похибка методики (0.01) є практично незначущою, тобто методика аналізу характеризується достатньою правильністю в усьому діапазоні концентрацій від 70 до 130 %.

Дослідження внутрішньолабораторної прецизійності проводили на 6 пробах однієї серії препарату, різними аналітиками, в різні дні (3 дні), з використанням різного мірного посуду, шляхом оцінки значення відносного довірчого інтервалу, яке має бути менше максимально припустимої невизначеності результатів аналізу: $\Delta z \leq 1.6$ (при $V = 5 \%$) (табл. 3.43).

Таблиця 3.43 – Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності

№ розчину	Величина Z_i , %		
	1 дослід	2 дослід	3 дослід
1	100.32	100.04	100.05
2	100.24	100.01	100.07
3	100.09	99.95	100.13
4	100.08	99.92	100.00
5	100.05	99.99	99.92
6	100.17	100.08	99.94
Середнє Z (%)	100.16	100.00	100.02
RSD_x , %	0.11	0.06	0.08
Відносне стандартне відхилення, RSD_Z (%)	0.08		
Відносний довірчий інтервал, Δ_Z	0.07 ≤ 1.6		
Критичне значення збіжності результатів Δ_{As} , %	1.6		

Внутрішньолабораторна прецизійність результатів аналізу підтверджена тим, що величина відносного довірчого інтервалу для шести паралельних визначень однієї серії препарату задовольняє критерію прийнятності (≤ 1.6 %) (див. табл. 3.43).

3.6.4 Прогноз повної невизначеності методики

Для підтвердження коректності аналітичної методики проводять прогнозування повної невизначеності методики. Розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення таблеток «Аторвакор» 0.02 г наведено у табл. 3.44.

Таблиця 3.44 – Розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення таблеток «Аторвакор» 0.02 г

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
1	2	3
Розчин порівняння		
1) взяття наважки ФСЗ аторвастатину кальцію	m_0	$0.2 \text{ мг}/125.00 \text{ мг} \times 100 \% = 0.16$
2) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 250.00 мл	250	0.08
3) взяття аліквоти піпеткою 5.0 мл	3.0	0.37
4) взяття аліквоти розчину БФС піпеткою 5.0 мл	-	0.37
5) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 50.00 мл	50	0.17
Випробовуваний розчин		
6) взяття наважки таблеток	m_1	$0.2 \text{ мг}/181.25 \text{ мг} \times 100 \% = 0.11$
7) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 250.00 мл	250	0.08
8) взяття аліквоти піпеткою 5.0 мл	3.0	0.37
9) взяття аліквоти розчину БФС піпеткою 5.0 мл	-	0.37
10) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 50.00 мл	50	0.17
Компенсаційний розчин		
11) взяття наважки БФС	-	$0.2 \text{ мг}/71.25 \text{ мг} \times 100 \% = 0.28$
12) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 250.00 мл	-	0.08
13) взяття аліквоти розчину БФС піпеткою 5.00 мл	-	0.37

Продовження таблиці 3.44

1	2	3
14) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 50.00 мл	-	0.17

Згідно з табл. 3.44, невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) становить 0.95 %. Розподіл невизначеності пробопідготовки за операціями для кількісного визначення таблеток «Аторвакор» 0.02 г показує, що найбільшу невизначеність в пробопідготовку вносять операції 3, 4, 8, 9, 13 – взяття аліквоти піпеткою 5.0 мл.

Повна невизначеність аналітичної методики (Δ_{As}) становить 1.18 %.

$$\Delta_{As} = 1.18 \% \leq \max \Delta_{As} = 1.6 \%$$

Прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не перевищувала критичного значення ($\max \Delta_{As}$), а отже запропонована спектрофотометрична методика даватиме коректні результати в інших лабораторіях.

Результати кількісного визначення аторвастатину кальцію у складі ЛЗ представлено в табл. 3.45.

Аналіз даних табл. 3.45 вказує на те, що результати кількісного визначення аторвастатину кальцію двох ЛЗ різних виробників є вірогідними та точними.

3.6.5 Робасність методики

Вивчення робасності проведено на етапі розробки спектрофотометричної методики визначення аторвастатину кальцію за реакцією з БФС під час встановлення оптимальних умов проведення перебігу реакцій (стабільність розчинів у часі, кількість доданого реагенту).

Встановлено, що аналізовані розчини стабільні впродовж 45 хв (за умови щільного закриття кювети під час вимірювання оптичної густини) (рис. 3.27), а коливання кількості доданого реагенту (розчину БФС) в межах ± 10 % істотно не впливає на значення оптичної густини (табл. 3.46).

Таблиця 3.45 – Результати кількісного визначення аторвастатину кальцію в ЛЗ ($n=6, p=0.95$)

Лікарський засіб	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
Таблетки «Аторвакор» 0.02 г	0.0205	$\bar{m} = 0.0202$ г $S = 2.48 \times 10^{-4}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 2.61 \times 10^{-4}$ RDS = 1.23 % $\varepsilon = 1.29$ %
	0.0202	
	0.0198	
	0.0201	
	0.0204	
	0.0203	
Таблетки «Лівостор» 0.02 г	0.0199	$\bar{m} = 0.0200$ г $S = 2.61 \times 10^{-4}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 2.74 \times 10^{-4}$ RDS = 1.30 % $\varepsilon = 1.37$ %
	0.0200	
	0.0202	
	0.0198	
	0.0204	
	0.0197	

Таблиця 3.46 – Вплив кількості доданого розчину БФС на оптичну густину

Об'єм 4.12×10^{-4} М розчинуу БФС, мл	% БФС	ΔA
2.70	90	0.435
2.85	95	0.437
3.00	100	0.441
3.15	105	0.444
3.30	110	0.445

3.6.6 Розрахування оцінки впливу аналітичної методики на навколишнє середовище

Як вже було зазначено вище, продовжено дослідження з розробки більш екологічночистої методики визначення аторвастатину кальцію в таблетках.

Розроблена ще одна спектрофотометрична методика визначення авторвастатину кальцію в ЛЗ за реакцією з БФС дала змогу отримати бал аналітичної еко-шкали 90 (табл. 3.47). Результати вивчення «зеленості» аналітичної методики з використання методу AGREE наведено на рис. 3.30.

Таблиця 3.47 – Аналітична еко-шкала для оцінки «зеленості» розробленої методики

Параметри	Пенальті бали
Реактиви	
Метанол	3
БФС	2
Споживання енергії	0
Професійні шкідливості	0
Відходи	5
Загальна кількість пенальті балів	10
Бал аналітичної еко-шкали	90
Висновок	Відмінний «зелений» аналіз

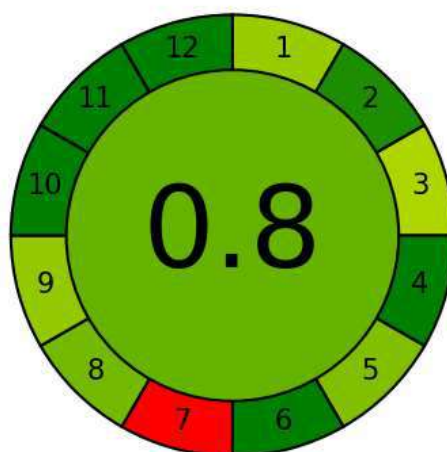


Рисунок 3.30 – Піктограма «зеленості» аналітичної методики з використання методу AGREE

Як видно з рис. 3.30, червоним кольором виділено операцію 7, що свідчить про аналітичні відходи, яких необхідно уникати чи зменшувати під час розробки аналітичної методики шляхом зменшення кількості аналіту та об'єму розчинника. При плануванні експерименту з метою отримання відповідної концентрації розчинів обрано масу наважки ФСЗ аторвастатину кальцію 25.00 мг та мірну колбу місткістю 50.00 мл. Аліквота 0.60 мл перенесена в мірну колбу місткістю 10.00 мл. Проте при розрахунках невизначеності пробопідготовки повна невизначеність результатів аналізу перевищувала критичне значення ($\max\Delta_{As}$). Тому прийнято рішення збільшити масу наважки та об'єм розчину у 5 разів і аліквоту та об'єм вторинного розчину у 5 разів. Отримана повна невизначеність результатів аналізу не перевищувала критичного значення ($\max\Delta_{As}$), проте на піктограмі «зеленості» аналітичної методики з використання методу AGREE одержано відмічену у червоний колір операція 7, що вказує на великі аналітичні відходи, що не є критичним для «зеленості» розробленої методики. В порівнянні з екологічнодоступністю спектрофотометричної методики визначення аторвастатину за реакцією з БТС (рис. 3.23), розроблена спектрофотометрична методика визначення аторвастатину за реакцією з БФС має ряд переваг. Згідно піктограми «зеленості» аналітичної методики з використання методу AGREE (рис. 3.30) бал становить 0.80 і операції 1 та 10 є «зеленими», тоді як бал з використання методу AGREE спектрофотометричної методики визначення аторвастатину за реакцією з БТС (див. рис. 3.23) становить 0.76, операції 1 та 10 є «жовтими».

Результати, представлені у табл. 3.47 та рис. 3.30, вказують на те, що розроблена спектрофотометрична методика визначення аторвастатину кальцію в субстанції та ЛЗ за реакцією з БФС є відмінною у відповідності до принципів «зеленої хімії» та більш екологічнішою за розроблену спектрофотометричну методику визначення аторвастатину за реакцією з БТС, де передбачалося використання етилацетату (розділ 3.5).

Висновки до розділу 3

1. Запропоновано УФ-спектрофотометричні методики визначення лізиноприлу та аторвастатину кальцію в моно-препаратах. Встановлено неможливість одночасного визначення лізиноприлу та аторвастатину кальцію із застосуванням методу УФ-спектрофотометрії, оскільки УФ-спектри метанольного вилучення лізиноприлу та аторвастатину з таблеток мають інтенсивно виражені смуги поглинання за довжини хвилі 212 нм.

2. Розроблено та валідовано спектрофотометричні методики кількісного визначення лізиноприлу у складі готових ЛФ за нінгідриноювою реакцією та реакцією з купруму (II) сульфатом, встановлено показники чутливості реакції, стехіометричні співвідношення реагуючих компонентів «лізиноприл-купруму (II) сульфат» (2:1) та концентрацію розчину купруму (II) сульфату (1.0×10^{-3} М), оптимальні умови проведення кількісного визначення за нінгідриноювою реакцією (час нагрівання 25 хв, температура (95 ± 2) °С, об'єм 0.2 % розчину нінгідрину 1.1 мл).

3. Запропоновано та валідовано спектрофотометричні методики кількісного визначення аторвастатину кальцію у складі готових ЛФ за реакцією з БТС та БФС, експериментально обґрунтовано оптимальні умови утворення продуктів взаємодії аторвастатину кальцію з БТС та БФС – вибір концентрації реагента (1.28×10^{-4} М розчину БТС, 4.12×10^{-4} М розчину БФС), органічного розчинника (БТС – етилацетат, БФС – метанол), встановлено коефіцієнти стехіометричних співвідношень «аторвастатину кальцію–БТС/БФС» (1:1) та показники чутливості реакції.

4. Проведено процедуру валідації розроблених аналітичних методик відповідно до вимог ДФУ та ІСН Q2 та підтверджено їх специфічність, лінійність, правильність, прецизійність та робасність. Усі валідаційні параметри були в межах критеріїв прийнятності.

5. За допомогою аналітичної еко-шкали та методу AGREE встановлено, що УФ-спектрофотометричні методики визначення лізиноприлу та аторвастатину кальцію були «зеленішими» за спектрофотометричні методики в

видимій області. Всі запропоновані спектрофотометричні методики кількісного визначення лізіноприлу та аторвастатину в субстанції та ЛЗ розроблено з дотримання принципів «зеленої хімії».

6. Розроблені спектрофотометричні методики визначення лізіноприлу та аторвастатину кальцію в субстанціях та ЛФ є простими, експресними, не вимагають застосування тривалої пробопідготовки, корегування рН, токсичних розчинників та дороговартісного обладнання і можуть бути використані як арбітражні методики та застосовуватися атестованими аналітичними лабораторіями.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в наукових працях автора [89, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 129, 130, 131].

РОЗДІЛ 4

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ ХРОМАТОГРАФІЧНИХ МЕТОДИК ВИЗНАЧЕННЯ АТОРВАСТАТИНУ КАЛЬЦІЮ ТА ЛІЗИНОПРИЛУ В СУБСТАНЦІЯХ ТА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ

4.1 Розробка ВЕРХ-методики кількісного визначення аторвастатину кальцію та його домішок у субстанції та лікарських засобах

Домішки можуть виникати в процесі синтезу АФІ, як побічні продукти, або бути продуктами деградації АФІ, які утворюються під впливом різних факторів навколишнього середовища впродовж терміну придатності АФІ та ЛФ, які їх містять. В монографії ЄФ для АФІ аторвастатину кальцію зазначено чотири основні домішки аторвастатину: домішка А, домішка В, домішка С і домішка D. Крім того, у цій монографії наявні ще три домішки аторвастатину: домішка F, домішка G та домішки H, але їх ідентифікація не є обов'язковою у відповідності з монографією ЄФ [4], оскільки вони обмежені загальним критерієм прийнятності для інших/неспецифічних домішок та/або монографією загальної ЄФ «Субстанції для фармацевтичного використання». Згідно з монографією ЄФ для аторвастатину кальцію як АФІ та для його домішок встановлені наступні допустимі межі вмісту: макс. 0.3 % для домішки А та домішки В; макс. 0.15 % для домішки С і домішки D; макс. 0.1 % для інших неспецифічних домішок. Обмеження щодо інших неспецифічних домішок для ЛФ, які містять аторвастатин, збільшено з 0.1 % до 0.2 % відповідно до рекомендацій ІСН. Таким чином, діапазон концентрацій, який був проаналізований під час проведення нашого дослідження, доведений як придатний для використання та відповідає цим вимогам.

Метою нашого дослідження була перевірка можливості застосування сучасної колонки 2.2 мкм на основі твердофазних частинок для розробки оригінальної, простої, економічно доступної та експресної ВЕРХ-методики

визначення аторвастатину та його домішок з використанням менш токсичних та більш прозорих до УФ-променів компонентів в складі рухомої фази.

Як вже зазначалося у розділі 1.3, офіційною та найбільш часто використовуваною методикою визначення домішок аторвастатину є методика, яка описана в ЄФ [4]. У монографії аторвастатину кальцію використано ВЕРХ-методику для визначення домішок аторвастатину та АФІ аторвастатину за таких хроматографічних умов: октилсилільна колонка C_8 (L7) (250 мм x 4.6 мм, 5.0 мкм) (рекомендованою є Zorbax C_8 Rx), комбінований ізократичний та лінійний градієнтний режим елюювання з рухомою фазою, що складалася з ацетонітрилу, тетрагідрофурану та ацетатного буфера рН 5.0, зі швидкістю потоку рухомої фази – 1.5 мл/хв, моніторингом УФ-сигналу за довжини хвилі 244 нм та загальним часом хроматографування 85-90 хв. Нами відтворено ВЕРХ-методику визначення аторвастатину кальцію та його домішок, яка представлена в монографії ЄФ. ВЕРХ-хроматограму, відтворену в регламентованих ЄФ умовах, наведено на рис. 4.1.

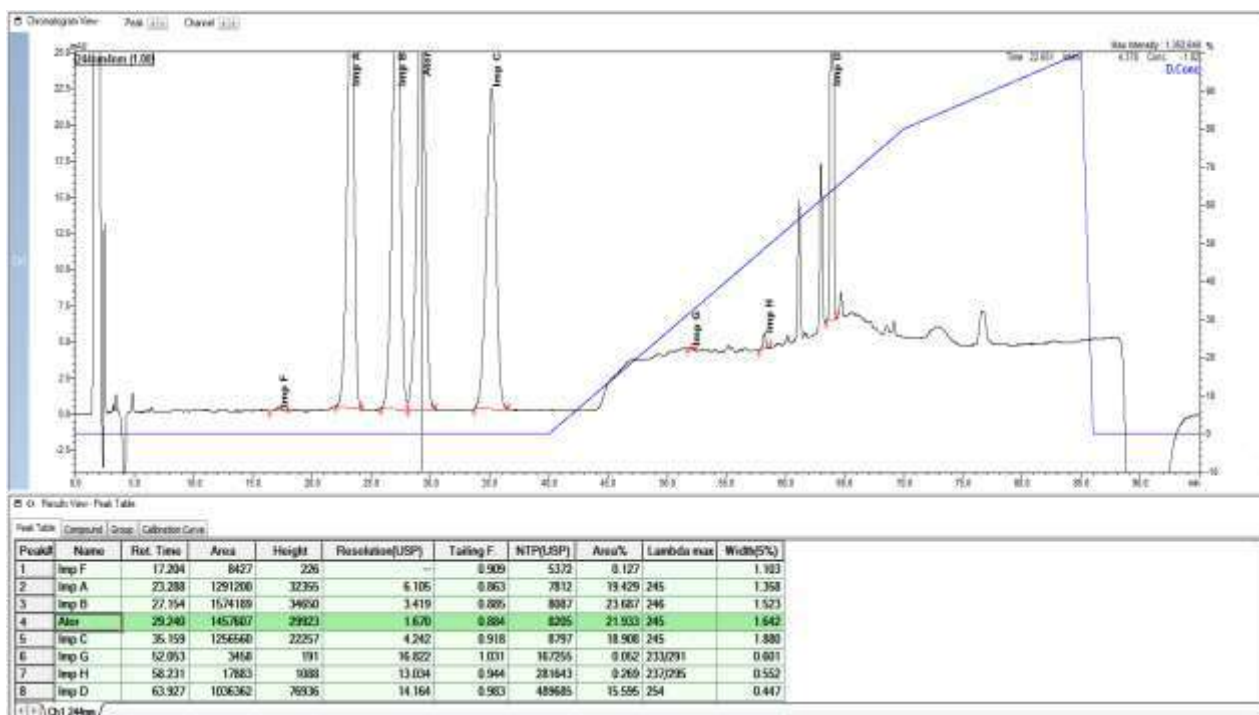


Рисунок 4.1 – ВЕРХ-хроматограма, відтворена за умов визначення аторвастатину кальцію та його домішок (ЄФ)

З метою оптимізації ВЕРХ-методики зосередилися на виборі селективної та простої рухомої фази і відповідної хроматографічної колонки для досягнення успішного, ефективного, експресного та відтворюваного розділення [132, 133]. Здійснено спроби для заміни ацетатного буферного розчину на іншу неорганічну частину рухомої фази, яка менше поглинає УФ, що дозволить отримати кращий спектральний аналіз. Намагалися також виключити токсичний, дорогий і нестабільний пероксидоутворюючий тетрагідрофуран у складі рухомої фази. 0.05 % розчин мурашинної кислоти, доведений до рН 4.0 за допомогою амонію гідроксиду, порівняно з ацетатним буферним розчином із граничним значенням поглинання за довжини хвилі 235-245 нм. Використання рухомої фази за межами діапазону рН 3.8-4.2 призводить до зниження роздільної здатності між домішкою аторвастатину В, аторвастатином та домішкою аторвастатину С, тому прийнято рішення обрати рН рухомої фази 4.0. Під час попередніх досліджень, проведених науковою групою македонських вчених фармацевтичної компанії Replek [30], встановлено, що фосфатний буферний розчин з концентрацією 10-15 мМ і рН 4.1 ± 0.1 давав відмінний результат із точки розділення, рівності базової лінії та швидшого врівноваження. УФ поглинання фосфатних буферів є низьким, зазвичай близько 200-205 нм навіть при високих концентраціях [134], що робить цей буфер більш придатним для аналізу пікової чистоти та спектру в нижчій області УФ, навіть нижче 220 нм, що не має вирішального значення для оцінки пікової чистоти. Форміатний буфер у порівнянні з фосфатним має переваги з точки зору приготування та кращої буферної ємності в межах 4-4.2. Нами використано 0.05 % розчин мурашиної кислоти (приготовленої з 98 % мурашиної кислоти), доведеної до рН 4.0 за допомогою амонію гідроксиду. Іншим цікавим фактом була ідентична послідовність елюювання піків, тобто порядок появи піків з описаним в монографії ЄФ, хоча були використані дві абсолютно різні рухомі фази: оригінальна методика ЄФ передбачає використання рухомої фази, що складається з ацетонітрилу, тетрагідрофурану та ацетатного буфера рН 5.0 градієнтним елююванням (рис. 4.1), тоді як

запропонована нами методика передбачає використання рухомої фази, що складається з 0.05 % розчину мурашиної кислоти, доведеної до рН 4.0 за допомогою амонію гідроксиду, та ацетонітрилу в режимі одноступінчастого градієнтного елюювання (рис. 4.2). З використанням запропонованих умов час хроматографування склав 15 хв, тоді як з використанням хроматографічних умов, описаних в монографії ЄФ, – 90 хв.

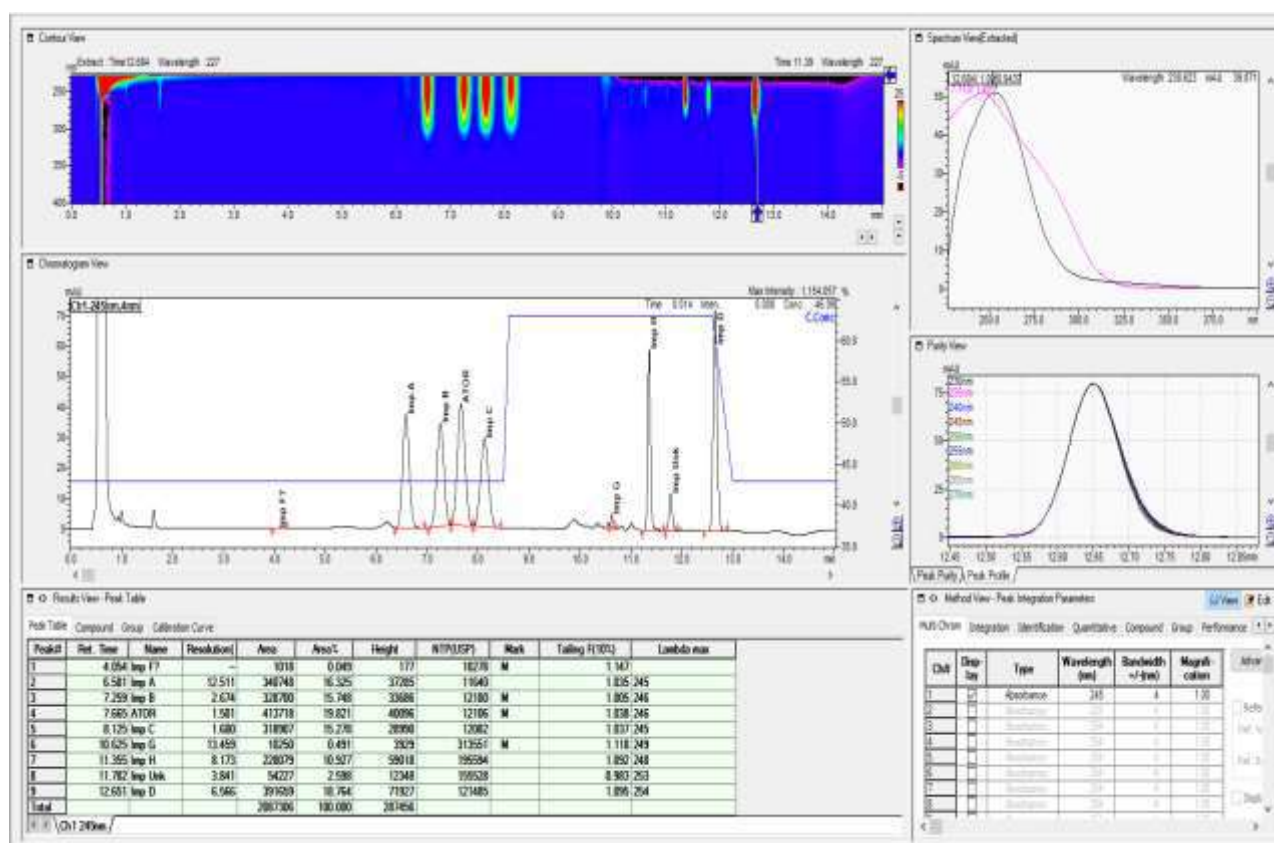


Рисунок 4.2 – Хроматограма, отримана за умов визначення аторвастатину кальцію та його домішок з використанням рухомої фази, що складалася з 0.05 % розчину мурашиної кислоти, доведеної до рН 4.0 за допомогою амонію гідроксиду, та ацетонітрилу в режимі одноступінчастого градієнтного елюювання (довжина хвилі детектування – 245 нм, Nexera-i 2040с-3D)

Порівняння відносних часів утримування зазначених домішок аторвастатину кальцію, отриманих з використанням двох методик, представлено в табл. 4.1. Ідентичність піків підтверджено спектральним

аналізом ДМД-УФ та додаванням зразків і стандартних речовин кожної зазначеної домішки окремо. Отримана хроматограма аторвастатину та його 7 домішок з їхніми специфічними спектрами УФ-поглинання представлена на рис. 4.3 з метою ідентифікації кожного. Запропонована методика успішно протестована системою ВЕРХ Shimadzu Nexera-i 2040c-3D та може працювати з більшістю систем ВЕРХ, випущених за останні 5 років. Хроматограму випробовуваного розчину, приготовленого з таблеток аторвастатину, представлено на рис. 4.4.

Таблиця 4.1 – Відносні часи утримування зазначених домішок аторвастатину кальцію, отримані за допомогою методики ЄФ (час утримування аторвастатину кальцію – близько 33 хв) та розробленої методики (час утримування аторвастатину кальцію – близько 7.5 хв)

Специфічні домішки аторвастатину	Відносний час утримування (методика ЄФ)	Відносний час утримування (розроблена методика)
Домішка А	0.8	0.86
Домішка В	0.9	0.95
Домішка С	1.2	1.06
Домішка D	2.1	1.65

Колонка Schim-pack XR II C₁₈ (75 мм х 3 мм, 2.2 мкм) досягла найкращого розділення з найвищими значеннями для критичної роздільної здатності за короткий час. Теоретично розраховано кількість теоретичних тарілок з використанням рівняння $N=L/2dp$ (близько 11835) для піку аторвастатину. Результати представлено в таблиці нижче хроматограми на рис. 4.4.

Домішки аторвастатину кальцію позначено на хроматограмі. Розчин порівняння (с) (ЄФ) витримували в холодильнику при 4 °С близько 9 місяців з

метою перевірки можливості методики розділяти додаткові утворені продукти деградації, незважаючи на зазначені домішки F, A, B, C, G, H і D.

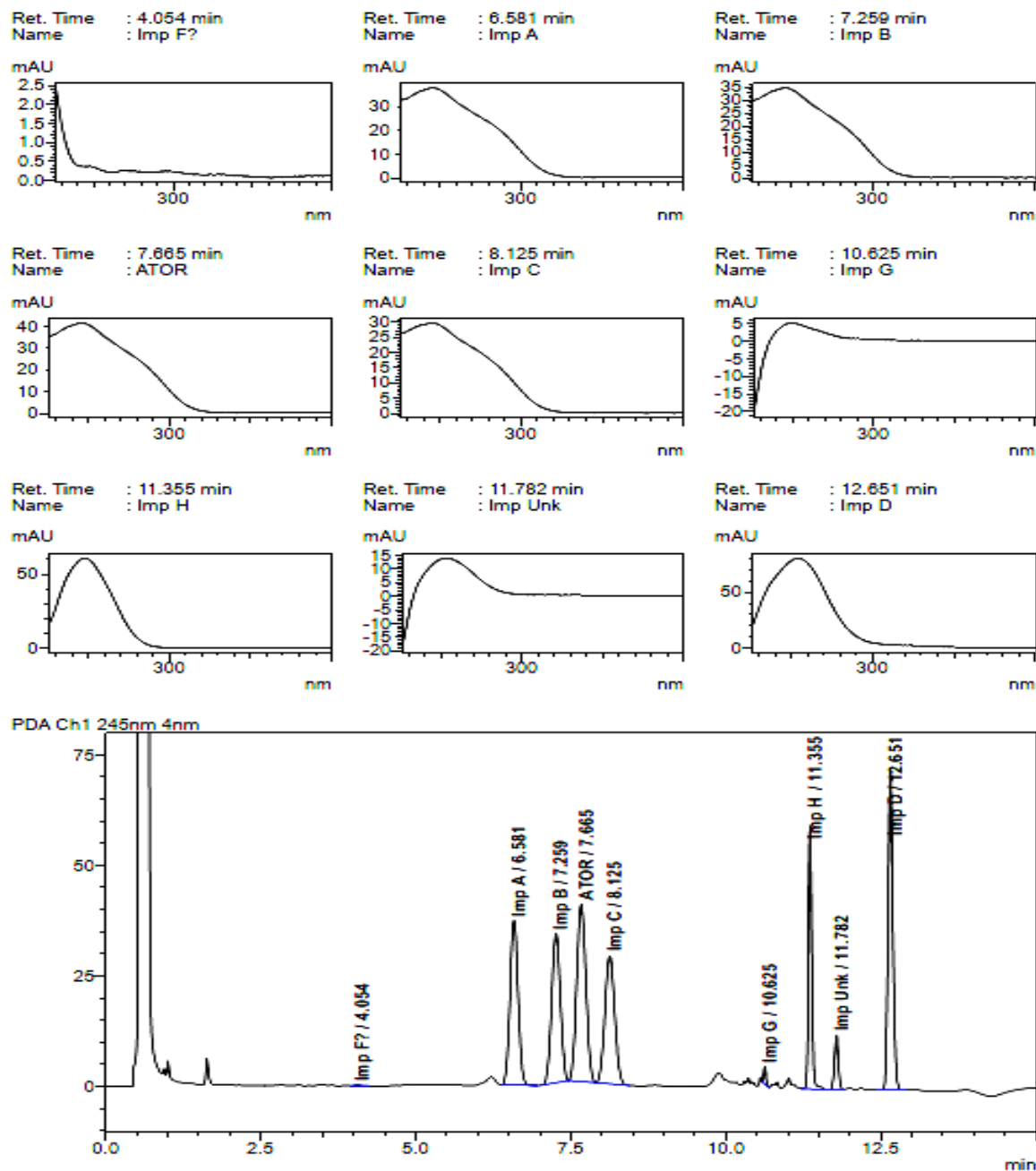


Рисунок 4.3 – Хроматограма аторвастатину кальцію та його домішок з спектрами УФ-поглинання

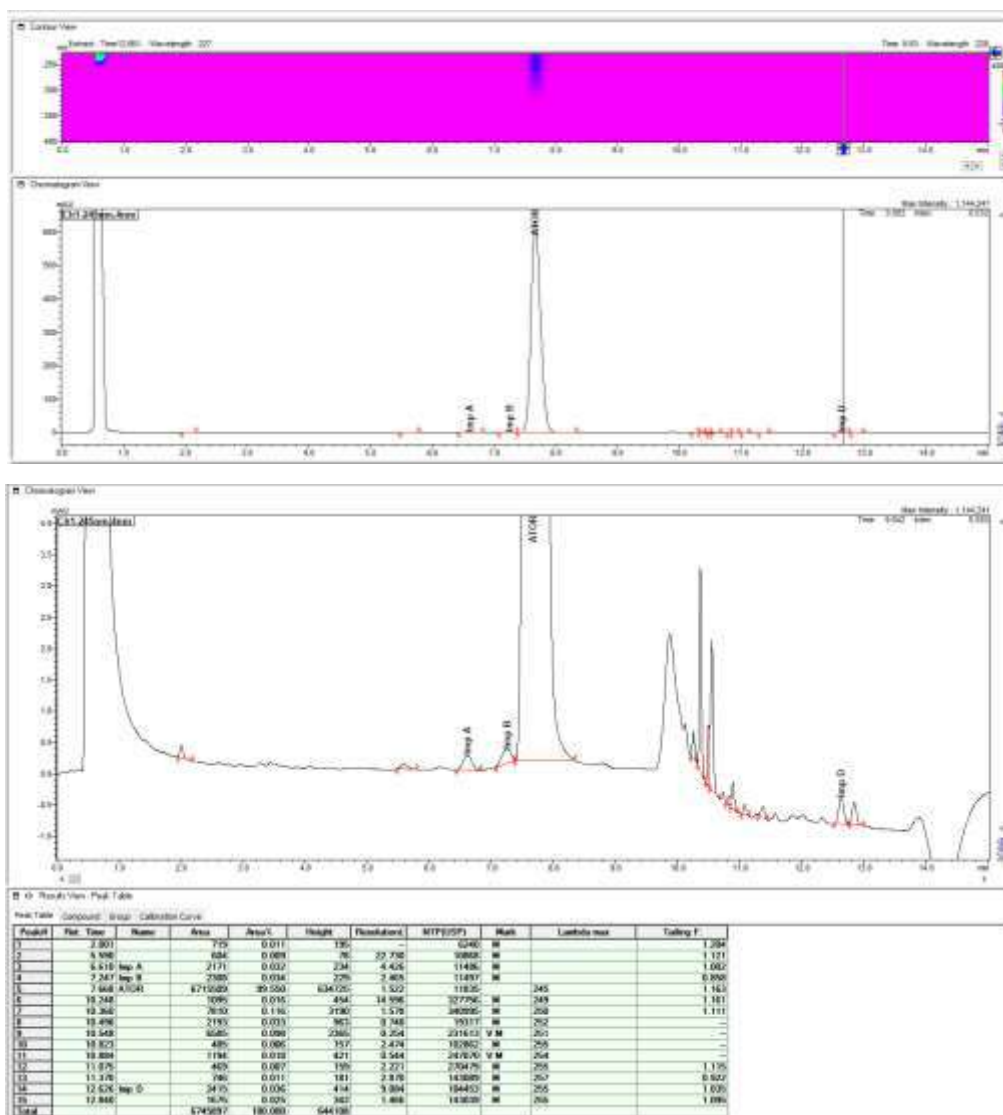


Рисунок 4.4 – Хроматограма розчину, приготовленого з таблеток аторвастатину з концентрацією близько 1 мг аторвастатину/мл

Ідентичність піків підтверджували порівнянням їх УФ-спектральних характеристик із УФ-спектральними характеристиками піків домішок з розчину аторвастатину (с) (приготованого відповідно до вимог монографії ЄФ). Інші виявлені, але не ідентифіковані піки на хроматограмі випробовуваного розчину, походять від інших невизначених домішок.

Хроматографічна колонка, рекомендована ЄФ для визначення домішок аторвастатину кальцію, Zorbax Rx C₈ (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм), також апробована за умов розробленої методики. Оптиміальний відсоток ацетонітрилу в ізократичній частині елюювання складав 44 %. Отримані коефіцієнти

роздільної здатності були задовільними, тобто всі мали значення мінімум 1.5 (відповідно до вимог ЄФ) [4] або 1.4 (USP) [135-137].

Через тривалий час утримування та високі коефіцієнти ємності колонки, вище 9, для перших 4 піків, які елюються в початковій ізократичній частині елюювання, зміна відсотка ацетонітрилу в цьому ізократичному режимі елюювання лише на 1 % призводить до значного збільшення часу утримування. Критична роздільна здатність зменшується в обох випадках, вищий і нижчий відсоток ацетонітрилу, ніж рекомендовані 43 %. Оптимальне розділення отримано шляхом поетапного збільшення відсотка ацетонітрилу в рухомій фазі через 1 хв до 4-го елюваного піку на хроматограмі з наступним поверненням до початкового відсотка через 2-5 хв (залежно від типу та розмірів колонки) після останнього піку домішки аторвастатину D. З наведених вище хроматограм видно, що критичним розділенням є: домішка аторвастатину В/аторвастатин, аторвастатин/домішка аторвастатину С, домішка аторвастатину А/домішка аторвастатину В. Це можна було очікувати через подібність в хімічній структурі перших чотирьох елююючих піків, аторвастатину та його 3 найближчих піків домішки А, домішки В та домішки С, що можна побачити з їх майже ідентичних спектральних характеристик, представлених на рис. 4.3.

За допомогою експериментальних випробувань оцінено оптимальний відсоток ацетонітрилу в рухомій фазі для кожної ВЕРХ колонки. Подальша зміна відсотка ацетонітрилу в рухомій фазі з метою покращення роздільної здатності між двома цільовими піками зменшує роздільну здатність між іншими сусідніми піками.

Аналітична методика, представлена в USP для визначення домішок аторвастатину кальцію, відрізняється від методики, описаної в монографії ЄФ, використанням колонки (L1) C₁₈ та рухомої фази, що складається з тетрагідрофурану, ацетонітрилу та комбінованого фосфатно-ацетатного буфера, з градієнтним режимом елюювання, зі змінною швидкістю потоку рухомої фази впродовж 65 хв для розділення 11 домішок.

Запропонована аналітична методика не тільки відповідає вимогам придатності системи, але й легко досягає необхідної чутливості для аналізу домішок, які наявні в низьких концентраціях аторвастатину в таблетках. Випробовуваний розчин готували відповідно до монографії ЄФ на АФІ аторвастатину кальцію з концентрацією аторвастатину 1 мг/мл у диметилформаміді. Розчин, що використовувався для кількісного визначення домішок аторвастатину в таблетках, готували у концентрації 0.002 мг аторвастатину/мл у диметилформаміді, що відповідає 0.2 % від концентрації аторвастатину у випробовуваному розчині. Для кількісного визначення АФІ аторвастатину готували розчин у концентрації 0.001 мг аторвастатину/мл або 1 мкг аторвастатину/мл, також у диметилформаміді, що відповідає 0.1 % від концентрації аторвастатину у випробовуваному розчині. Хроматограма 0.1 % розчину аторвастатину, одержана за умов кількісного визначення домішок у випробовуваному розчині, приготовленому з таблеток, представлена на рис. 4.5.

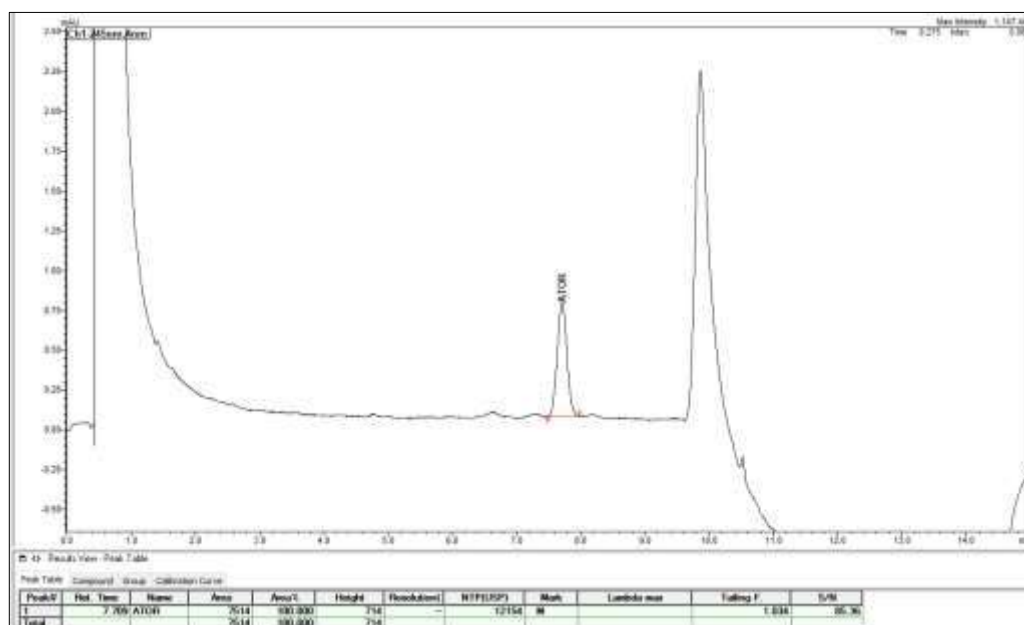


Рисунок 4.5 – Хроматограма розведеного випробовуваного розчину аторвастатину, що відповідає 0.1% його концентрації у випробовуваному розчині, приготовленому за критеріями аналізу аналітів, з параметрами придатності системи

Крім запропонованої хроматографічної колонки Shim-Pack XR-ODS II (75 мм x 3 мм, 2.2 мкм), ще одна хроматографічна колонка Agilent Poroshell C₁₈ec (100 мм x 4.6 мм, 2.7 мкм) продемонструвала відмінні результати в розділенні аторвастатину та його домішок, як випливає з рис. 4.6. Як видно з рис. 4.6, вказана колонка дає змогу отримати відмінне розділення піків, що забезпечує необхідні параметри придатності системи, роздільну здатність та пікову симетрію.

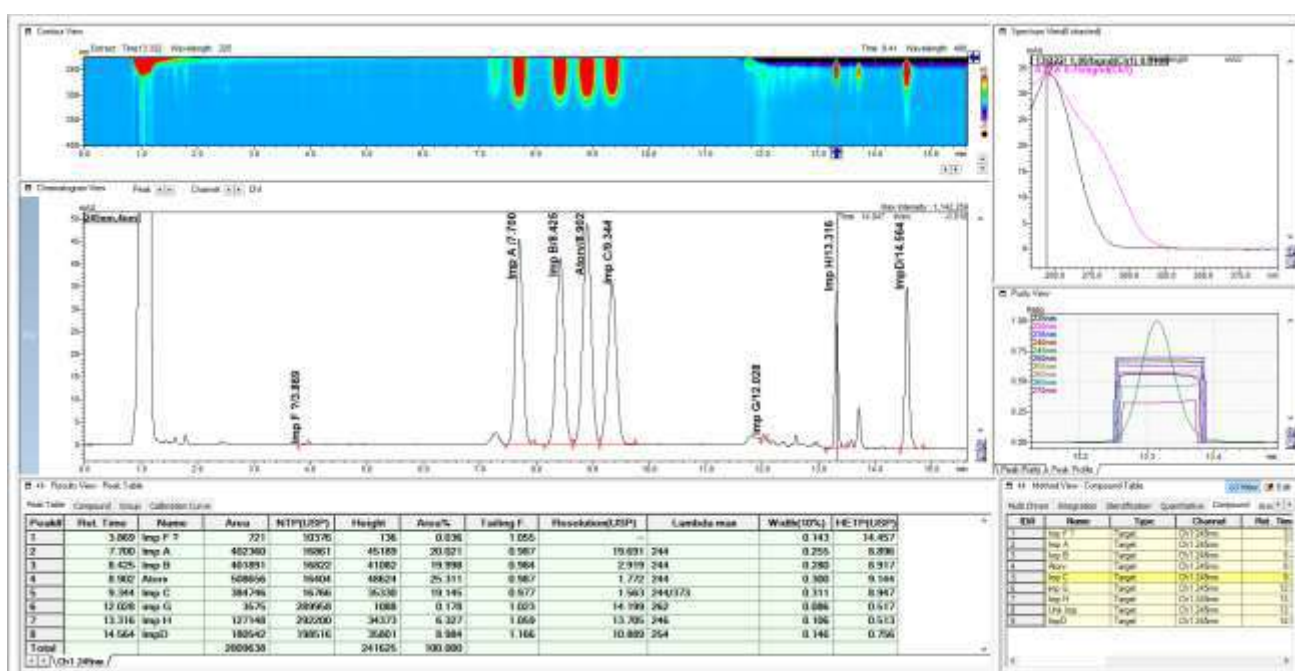


Рисунок 4.6 – Хроматограма, отримана за умов визначення аторвастатину кальцію та його домішок з використанням хроматографічної колонки Poroshell C₁₈ec (100 мм x 4.6 мм, 2.7 мкм), об'єм інжекції – 3 мкл

Хроматографічну колонку Agilent Poroshell C₁₈ec (100 мм x 4.6 мм, 2.7 мкм) можна розглядати як альтернативу запропонованій колонці Shim-Pack XR-ODS II, оскільки чутливість, яка забезпечує внутрішній діаметр 3 мм, є кращою порівняно з внутрішнім діаметром 4.6 мм. Час хроматографування збільшується приблизно на 20-25 % за рахунок більшої довжини колонки.

4.1.1 Валідація аналітичної методики

З хроматограми на рис. 4.5 можна зробити висновок, що аналітична методика придатна для визначення менших концентрацій домішок, оскільки основний пік аторвастатину в розчині 0.1 % з концентрацією 1 мкг аторвастатину/мл виявляє S/N близько 85. Це свідчить про те, що МКВ може бути щонайменше в 7 разів нижчою, а МВ щонайменше в 20 разів нижчою, використовуючи об'єм інжекції лише 2 мкл.

Часткову валідацію аналітичної методики проводили за наступними валідаційними параметрами: селективність, лінійність, МВ та МКВ, правильність, прецизійність.

З метою демонстрації селективності розробленої методики для кількісного визначення домішок використано хроматограми плацебо, розведеного випробовуваного розчину, що відповідає 0.2 % розчину порівняння (в) (ЄФ), що містить зазначені домішки аторвастатину F, A, B, C, G, H і D та випробовуваний розчин. Всі розчини приготовлено відповідно до монографії ЄФ АФІ аторвастатину кальцію. Встановлено, що піки зазначених домішок аторвастатину добре відділяються від піку аторвастатину, а піки плацебо не впливають на пік АФІ та його зазначені домішки (рис. 4.7).

Лінійність методики аналізу домішок аторвастатину продемонстровано на п'яти рівнях концентрації в діапазоні від 0.05 % до 0.3 % робочої концентрації аторвастатину у випробовуваному розчині (0.0005–0.003 мг аторвастатину/мл). Лінійність методики аналізу АФІ аторвастатину кальцію перевіряли на п'яти рівнях концентрації в діапазоні від 70 % до 130 % робочої концентрації аторвастатину у випробовуваному розчині (0.7–1.3 мг аторвастатину/мл).

Відмінна лінійність методики аналізу домішок аторвастатину підтверджується RSD отриманих факторів, що становили менше 3 %, а коефіцієнти кореляції були майже ідеальними (табл. 4.2).

МВ та МКВ розраховано на основі даних, отриманих під час випробування на лінійність у діапазоні низьких концентрацій від 0.1 % до 0.3 %

робочої концентрації аторвастатину у випробовуваному розчині, за такими формулами: $MB = 3,3\sigma/b$, $МКВ = 10\sigma/b$.

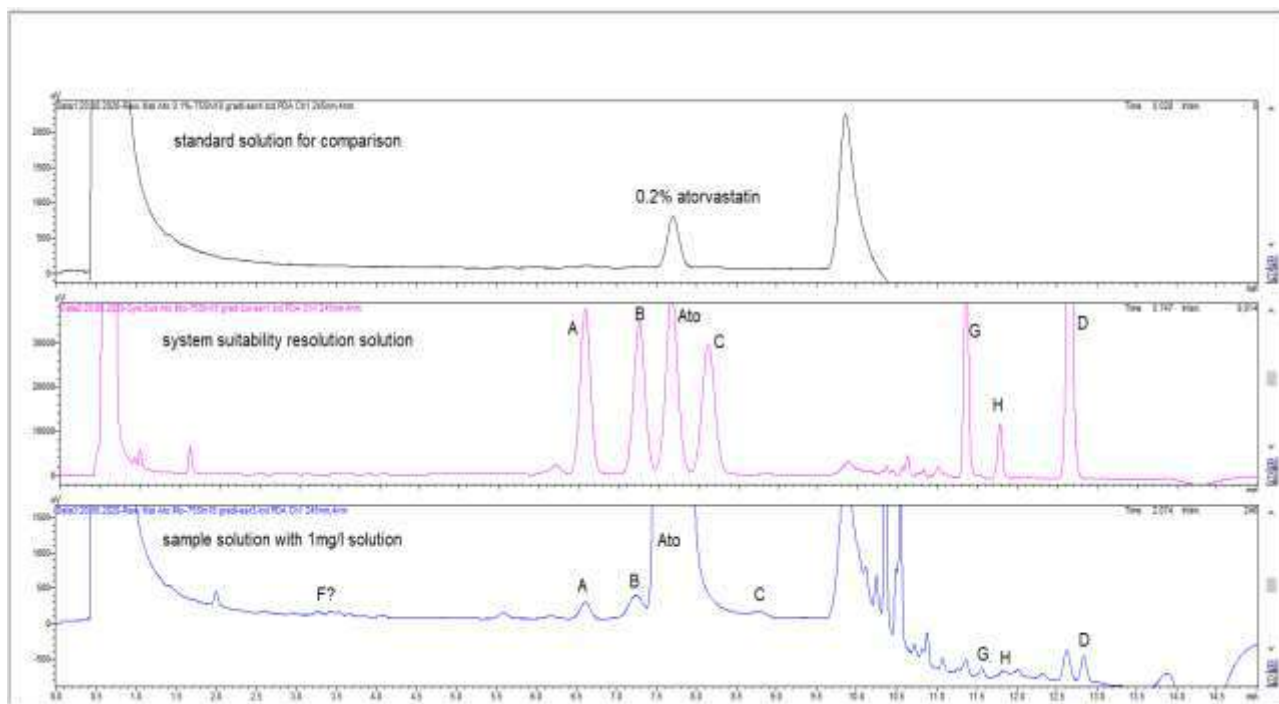


Рисунок 4.7 – Хроматограми, які описують стислий огляд селективності та чутливості методики: розчин зразка, приготований з таблеток аторвастатину (знизу), розчин для перевірки придатності системи (посередині) та розведений випробовуваний розчин, що містить 0.2 % аторвастатину (зверху)

Таблиця 4.2 – Результати вивчення лінійності методики

Параметри лінійності	Домішки	АФІ аторвастатину кальцію
Концентрація (% робочої концентрації випробовуваного розчину)	0.05 % – 0.3 %	70 % – 130 %
Рівняння регресії	$y = 3014.8108x - 70.2973$	$y = 2832.6906x - 19216.7744$
RSD, %	2.47	0.93
Коефіцієнт кореляції, R^2	0.9998	0.9993

МВ складала 0.05 мкг аторвастатину/мл, що відповідає 0.005 % його концентрації у випробовуваному розчині. Встановлено, що МКВ становила

0.14 мкг аторвастатину/мл, що відповідає 0.014 % його концентрації у випробовуваному розчині.

Вказані відмінності між результатами, отриманими у вивченні лінійності в діапазоні високих та низьких концентрацій, не є значущими, оскільки цілі їх використання відрізняються: лінійність у діапазоні високих концентрацій доводить, що методика придатна для кількісного визначення аторвастатину в субстанції та таблетках, тоді як доведена лінійність у діапазоні низьких концентрацій вказує на те, що методика придатна для кількісного визначення домішок аторвастатину (специфічних та неспецифічних), які наявні в субстанції та таблетках, що містять аторвастатин кальцію у низькій концентрації.

Правильність методики перевіряли на трьох рівнях концентрацій в діапазоні 0.1-0.3 % робочої концентрації аторвастатину у випробовуваному розчині для аналізу домішок та в діапазоні від 70 % до 130 % від робочої концентрації аторвастатину у випробовуваному розчині для аналізу АФІ аторвастатину. Дану аналітичну процедуру застосовували до синтетичних сумішей компонентів ЛЗ з відомою доданою кількістю АФІ, що відповідає цим рівням концентрації. RSD отриманих результатів були нижчим за 1 %, а коефіцієнти кореляції (R^2) – майже ідеальними ($\sim 1,0$), як показано в табл. 4.3.

Таблиця 4.3 – Результати вивчення правильності аналітичної методики

Концентрація домішок в робочому розчині, %	Знайдено (домішки), % ($n = 3$)	Концентрація АФІ в робочому розчині, %	Знайдено (АФІ), % ($n = 3$)
0.1	98.12	70	100.04
0.2	98.37	100	101.38
0.3	99.03	130	101.12
	RSD = 0.60		RSD = 0.61
	$R^2 = 0.9999$		$R^2 = 0.9999$

Прецизійність методики підтверджена, виконуючи шість повторних інжекцій розведеного випробовуваного розчину, що відповідає 0.2 % використовуваного для кількісного визначення домішок, і стандартного розчину з концентрацією ~ 1 мг аторвастатину/мл. Отримані значення RSD площ піків в обох випадках були нижчими за 1 % (0.73 % для аналізу домішок та 0.18 % для аналізу АФІ). ВЕРХ-методику можна також оптимізувати для вивчення однорідності вмісту та тесту «Розчинення» таблеток аторвастатину.

4.1.2 Розрахування оцінки впливу аналітичної методики на навколишнє середовище

Як вже було зазначено вище, одним з найважливіших завдань було розробити екологічнішу методику визначення аторвастатину кальцію та його домішок у порівнянні з методикою, яка описана в монографії ЄФ. У табл. 4.4 представлено результати порівняльної оцінки «зеленості» запропонованої ВЕРХ-методику визначення аторвастатину кальцію та його домішок в таблетках та аналітичної методики, представленої в монографії на аторвастатин кальцію ЄФ. Бал аналітичної еко-шкали запропонованої ВЕРХ-методику визначення аторвастатину кальцію та його домішок в таблетках становив 87 (відмінний «зелений» аналіз), тоді як ВЕРХ-методику, представленої в монографії на аторвастатин кальцію ЄФ, – 75 (відмінний «зелений» аналіз (межа із задовільним)) (табл. 4.4). Результати вивчення «зеленості» аналітичних методик з використання методу AGREE наведено на рис. 4.8.

Бал з використання методу AGREE запропонованої ВЕРХ-методику визначення аторвастатину кальцію та його домішок в таблетках становив 0.81, тоді як ВЕРХ-методику, представленої в монографії на аторвастатин кальцію ЄФ, – 0.77 (рис. 4.8). Як видно з рис. 4.8, червоним кольором в обох методиках виділено операцію 7, що свідчить про аналітичні відходи, яких необхідно уникати чи зменшувати під час розробки аналітичної методики шляхом зменшення кількості аналіту та об'єму розчинника. Така пробопідготовка буде негативно впливати на невизначеність пробопідготовки для кількісного

визначення домішок аторвастатину в таблетках, що є критичним в даному випадку. Тому прийнято рішення не застосовувати такий підхід. Враховуючи те, що в фармакопейній методиці використовується токсичний, пероксидуотворюючий тетрагідрофуран, то операції 10 та 12 відзначено жовтим кольором.

Таблиця 4.4 – Результати порівняльної оцінки «зеленості» запропонованої ВЕРХ-методики визначення аторвастатину кальцію та його домішок в таблетках та аналітичної методики, представленої в монографії на аторвастатин кальцію ЄФ

Параметри	Запропонована ВЕРХ-методика визначення аторвастатину кальцію та його домішок в таблетках	Аналітична методика визначення аторвастатину кальцію та його домішок в таблетках, представлена в монографії ЄФ
	Пенальті бали	
Реактиви		
диметилформамід	4	4
ацетонітрил	2	2
тетрагідрофуран	-	4
ацетатний буфер	-	2
форміатний буфер	2	-
Споживання енергії	0	0
Професійні шкідливості	0	3
Відходи	5	10
Загальна кількість пенальті балів	13	25
Бал аналітичної еко-шкали	87	75
Висновок	Відмінний «зелений» аналіз	Відмінний «зелений» аналіз (межа із задовільним)

Запропонована ВЕРХ-методика визначення аторвастатину кальцію та його домішок в таблетках

Аналітична методика визначення аторвастатину кальцію та його домішок в таблетках, представлена в монографії ЄФ

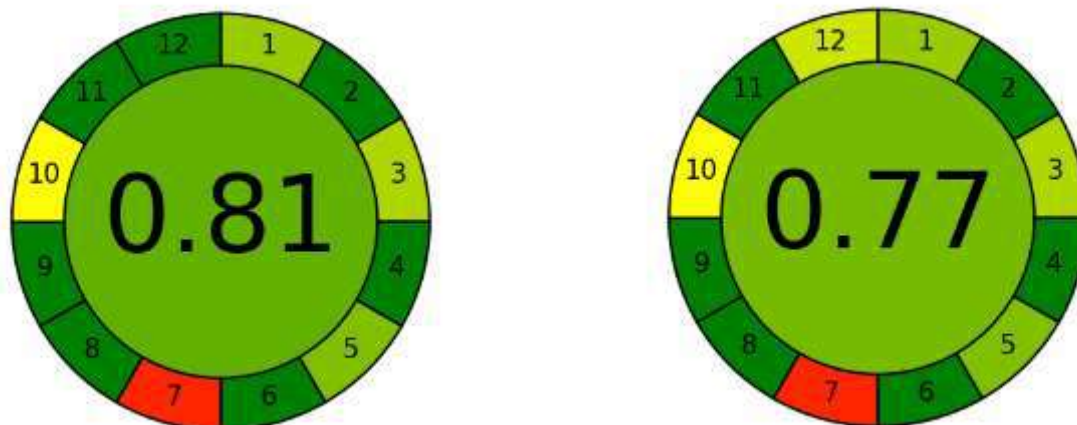


Рисунок 4.8 – Піктограма «зеленості» аналітичних методик з використання методу AGREE

Підсумовуючи, можна зробити висновок, що розроблена методика визначення аторвастатину кальцію та його домішок в таблетках є екологічнішою за фармакопейну та всі інші раніше опубліковані методики визначення домішок аторвастатину кальцію, експресною для рутинних аналізів у лабораторіях контролю якості фармацевтичних компаній. Дане дослідження дає значний внесок та напрямок для подальшого вдосконалення методик визначення аторвастатину кальцію та його домішок в таблетках.

4.2 Розробка та валідація ВЕРХ-методики одночасного кількісного визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу в бінарній суміші та лікарських засобах

Враховуючи описані факти в розділі 3 щодо неможливості одночасного кількісного визначення аторвастатину та лізиноприлу методом УФ-та видимої спектрофотометрії, розглянуто можливість застосування методу ВЕРХ для їх одночасного визначення. Відмінність фізико-хімічних властивостей між

аторвастатином та лізіноприлом є основною перешкодою для їх одночасного визначення. Лізіноприл є гідрофільною молекулою ($\log P = -1.22$, pK_a 2.5, 4, 6.7 і 10.5), тоді як аторвастатин – гідрофобною [138] ($\log P$ 6.36, pK_a 4.46). Ці факти виражаються надмірною різницею в їхніх утримуваннях і пікових симетриях на обернено-фазових колонках. Пік лізіноприлу елююється близько до мертвого об'єму. Такі висновки зроблені на основі вищезгаданих методів аналізу цих двох аналітів, описаних в розділах 1.2-1.5. Тому, виникла потреба в розробці простих, економічних, експресних методик для одночасного аналізу цих двох АФІ з значними відмінностями у фізико-хімічних властивостях. Обрано метод ВЕРХ, оскільки ВЕРХ вважається найбільш потужним і надійним методом у сфері контролю якості ЛЗ [139-141]. Мета нашого дослідження полягала в розробці експресної, екологічної, економічно доступної методики одночасного кількісного визначення аторвастатину кальцію та лізіноприлу в бінарній суміші та ЛЗ [142-146].

Перша концепція щодо розробки хроматографічної методики одночасного визначення аторвастатину та лізіноприлу в бінарній суміші і таблетках розпочалася з використання хроматографічної колонки Purospher C₈ STAR (4 мм i.d. X 55 мм, 5 мкм). Це попередня методика для перевірки вищеписаних фактів. Хроматографічні умови: рухома фаза – калію дигідрогенфосфат (25 мМ, рН 7.25) та метанол (40:60), швидкість потоку 1.0 мл/хв, температура колонки 48 °С, УФ-детектування за довжини хвилі 215 нм. Отримані хроматограми проілюстровано на рис. 4.9.

Як видно з хроматограм на рис. 4.9, форми піків лізіноприлу та аторвастатину задовільні, але між ними існує велика незадовільна роздільна здатність ($R_s = 13.26$), яка несприятливо збільшується для другого більш гідрофобного аналіту за рахунок зменшення відсотка органічного розчинника. Запропонована методика може бути корисною для експресного аналізу, якщо перший пік елюювався не близько до мертвого об'єму, що призводить до можливості спільного елюювання з піком іншого аналіту, який може з'явитися.

Коротка колонка високої ретенції з малими розмірами підтвердила наше припущення щодо надмірної роздільної здатності між піками.

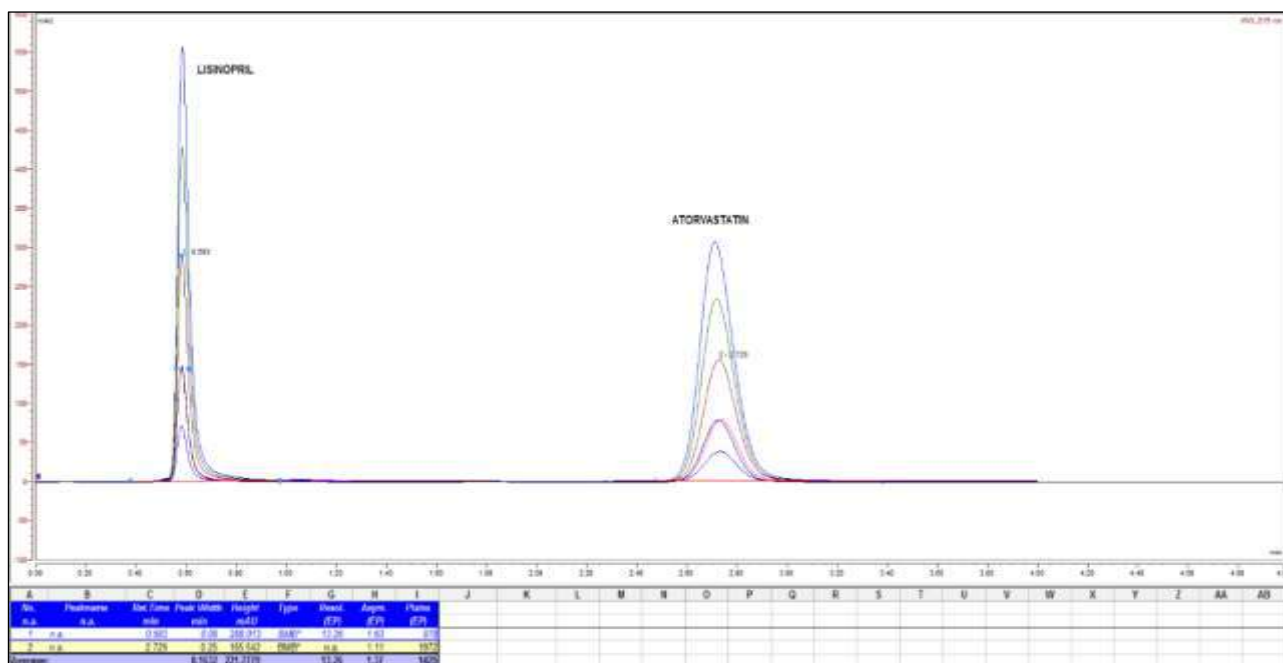


Рисунок 4.9 – Хроматограми, отримані з використанням хроматографічної колонки Purospher C₈ STAR (4 мм i.d. X 55 мм, 5 мкм) та системи Dionex Ultimate 3000 UHPLC за таких експериментальних умов: рухома фаза – суміш калію дигідрофосфату (25 мМ, рН 7.25) та метанолу (40:60), швидкості потоку 1.0 мл/хв, температури колонки 48 °С та УФ-детектування за довжини хвилі 215 нм

Друга концепція передбачала зовсім інший підхід з використанням довшої хроматографічної колонки Zorbax C₈ Rx (4.6 мм i.d. X 250 мм, 5 мкм) з високими характеристиками розділення (високе значення N більше 100 000/м). Отримано хроматограму з вузькими симетричними формами піків, але з подібним недоліком, що й у першій методиці, з елюванням лізиноприлу, дуже близьким до мертвого об'єму. Хроматографічні умови: рухома фаза – калію дигідрофосфат (5 мМ) та ацетонітрил (45:55) (верхня частина рис. 4.10), калію дигідрофосфат (5 мМ) та ацетонітрил (40:60) (нижня частина рис. 4.10), швидкість потоку 1.0 мл/хв, температура колонки 50 °С, УФ-

детектування за довжини хвилі 220 нм. Хроматограми відрізняються на 5 % органічним компонентом в рухомій фазі, що означає, що невеликі зміни полярності рухомої фази призводять до незадовільного збільшення утримування другого піку з незадовільним збільшенням роздільної здатності та часу хроматографування. Проте навіть при ранньому елююванні лізиноприлу розрахунки параметрів чистоти піку лізиноприлу передбачають задовільний пік чистоти, як продемонстровано на рис. 4.11, показуючи рівні значення чистоти обох піків із задовільною якістю з прямокутними формами пропорцій, за допомогою ДМД з представленими УФ-спектрами двох АФІ.

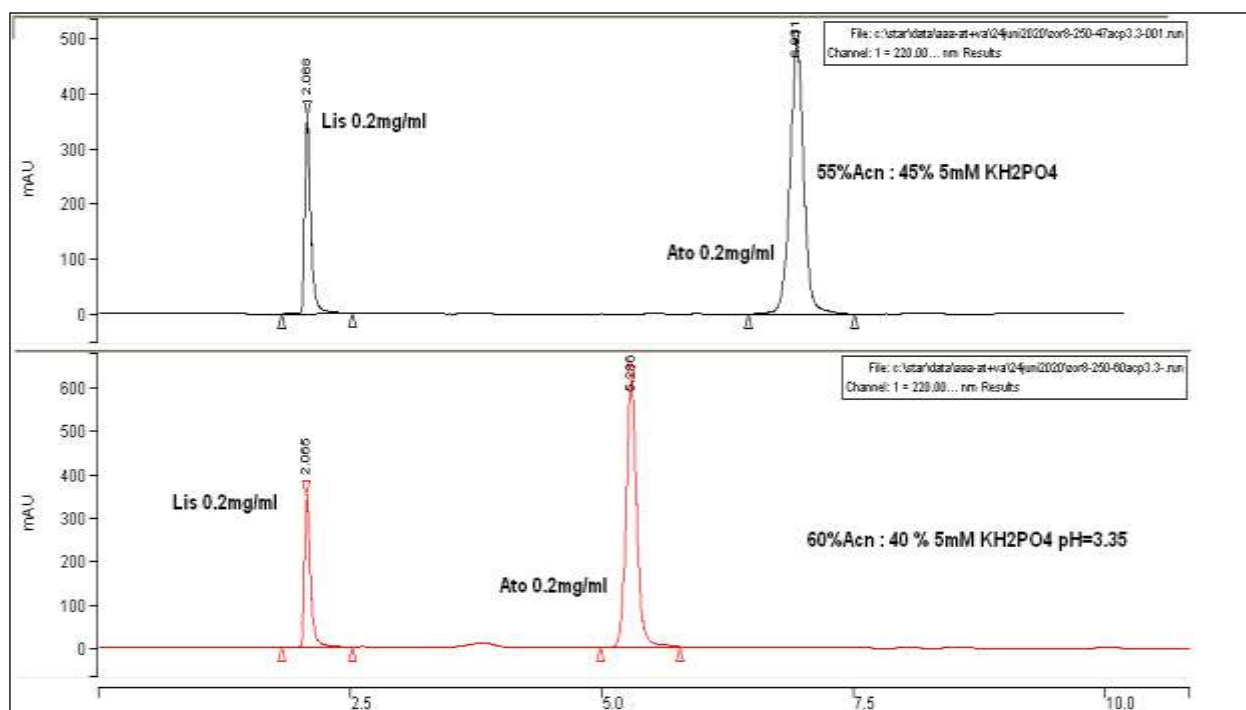


Рисунок 4.10 – Хроматограми, отримані з використанням хроматографічної колонки Zorbax C₈ Rx (4.6 мм i.d. X 250 мм, 5 мкм) на HPLC Varian Pro Star PDA 330 за таких експериментальних умов: рухома фаза – калію дигідрогенфосфату (5 мМ) та ацетонітрилу (45:55) (верхня частина рис.), калію дигідрогенфосфату (5 мМ) та ацетонітрилу (40:60) (нижня частина рис.), швидкості потоку 1.0 мл/хв, температури колонки 50 °С, УФ-детектування за довжини хвилі 220 нм

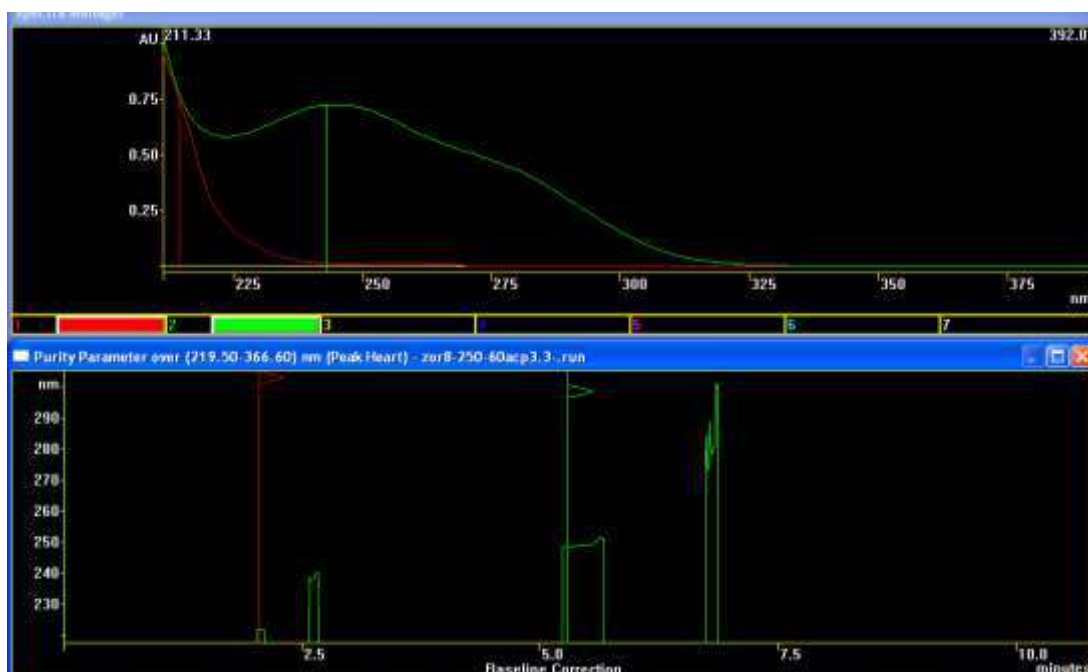


Рисунок 4.11 – УФ-спектральний аналіз хроматографічних піків, отриманих за допомогою хроматографічної колонки Zorbax C₈ Rx (4.6 мм i.d. X 250 мм, 5 мкм), з хроматограм, представлених на рис. 4.10, підтверджуючи їх ідентичність зі спектрами УФ-поглинання і розрахунками пікової чистоти (система VERX Varian, програмне забезпечення Pro Star PDA 330 і Polyview 2000)

Третя концепція передбачала використання хроматографічної колонки LiChrosorb C₈ (4 мм i.d. X 125 мм, 5 мкм), яка використовується у фармакопейних методиках кількісного визначення лізиноприлу в таблетках, та рухомої фази – суміші ацетонітрилу (25 %), фосфатного буферного розчину та іонпарним реагентом гексан-сульфонату. Відносно низький вміст органічного розчинника в рухомій фазі є важливим для елюювання аторвастатину з октилсилільної колонки C₈. Додавання іонпарного реагента додатково збільшить час утримування аторвастатину з великою неприйнятною роздільною здатністю. Описаний факт став причиною перевірки доцільності застосування хаотропних аніонів у рухомій фазі, що збільшує утримування в колонці N-вмісних молекул, особливо в кислому середовищі, та покращує симетрію піків [139]. Хаотропний аніон гексафлуорфосфату класифікується як

найсильніший у ряді хаотропних аніонів Гофмейстера [147]. Основна перевага хаотропних солей у порівнянні з іонпарними реагентами полягає в їх можливості ефективного вимивання з колонки, що є проблематичним при використанні іонпарних реагентів, які змінюють властивості колонки. Отримані хроматограми з використанням запропонованих хроматографічних умов представлено на рис. 4.12. Хроматографічні умови: рухома фаза – калію дигідрогенфосфат (10 мМ), ацетонітрил та калію гексафлуорфосфату(55:45:0.4), швидкість потоку – 1.0 мл/хв, температура колонки – 42 °С, УФ-детектування за довжини хвилі 215 нм.

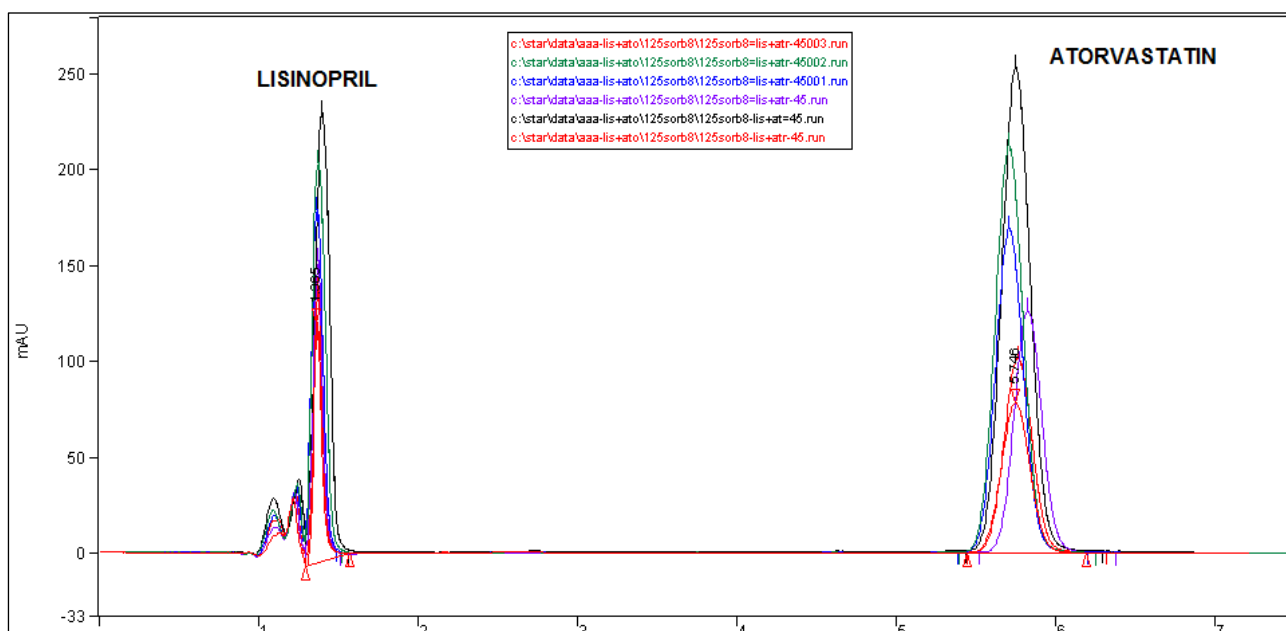


Рисунок 4.12 – Хроматограми перевірки лінійності, отримані з використанням хроматографічної колонці LiChrosorb C₈ (4 мм i.d. X 125 мм, 5 мкм) (HPLC Varian Pro Star PDA 330) та рухомої фази, що складалася з калію дигідрогенфосфату (10 мМ), ацетонітрилу і калію гексафлуорфосфату (55:45:0.4), швидкості потоку 1.0 мл/хв, температури колонки 42 °С та УФ-детектування за довжини хвилі 215 нм

Наявність хаотропної молекули покращує форму піку лізиноприлу, проте демонструє велику неприйнятну роздільну здатність, близькість першого елюючого піку лізиноприлу до аналітів, що елюються у мертвому об'ємі.

Враховуючи вищеописані факти, продовжено пошук з метою вибору оптимальнішої хроматографічної колонки.

Четверта концепція передбачала використання хроматографічної колонки Waters Spherisorb ODS1 (4 мм i.d. X 250 мм, 5 мкм) та двох найсильніших хаотропних аніонів, KPF_6 і $HClO_4$. Встановлено, що наявність 70 % ацетонітрилу в рухомій фазі викликає реверсію порядку елюювання піків, тобто спочатку елююється аторвастатин, а потім другий пік лізиноприл, чого не спостерігалося в жодній ВЕРХ/УФ методиці. Гідрофільна молекула елююється майже нерозчинною, лише за наявності двох найпотужніших хаотропних агентів у рухомій фазі. Використання низької концентрації хаотропної солі, калію дигідрогенфосфату (5 мМ), з додаванням 0.1 % $HClO_4$ та 0.25 % KPF_6 , при рН=2.05, швидкості потоку рухомої фази 1 мл/хв і температури колонки 42 °С, дає можливість отримати відмінну лінійність (рис. 4.13).

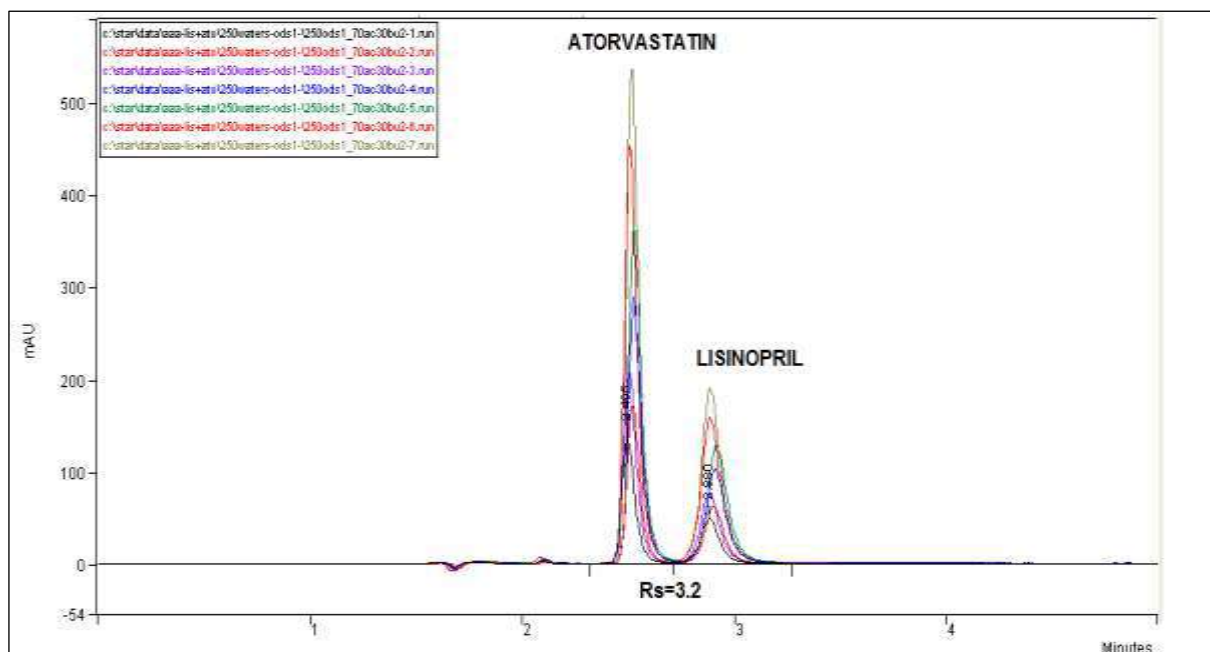


Рисунок 4.13 – Хроматограми, отримані з використанням хроматографічної колонки Waters Spherisorb ODS1 (4 мм i.d. X 250 мм, 5 мкм) (HPLC Varian Star PDA 330) за таких експериментальних умов: рухома фаза – суміш калію дигідрогенфосфату (5 мМ), ацетонітрилу, кислоти хлорної (72 %) і калію гексафлуорфосфату (30:70:0.1:0.25) з рН 2.12, швидкістю потоку – 1.0 мл/хв, температури колонки 42 °С та УФ-детектування за довжини хвилі 215 нм

Рухома фаза – калію дигідрогенфосфат (5 мМ), ацетонітрил, кислота хлорної (72 %) і калію гексафлуорфосфат (30:70:0.1:0.25). Хроматографічний аналіз проводили на HPLC Varian Pro Star PDA 330 з швидкістю потоку рухомої фази 1.0 мл/хв, температурою колонки 42 °С та УФ-детектування за довжини хвилі 215 нм. Спектральні підтвердження ідентичності піків зі спектрами УФ-поглинання та їх чистотою продемонстровано на рис. 4.14.

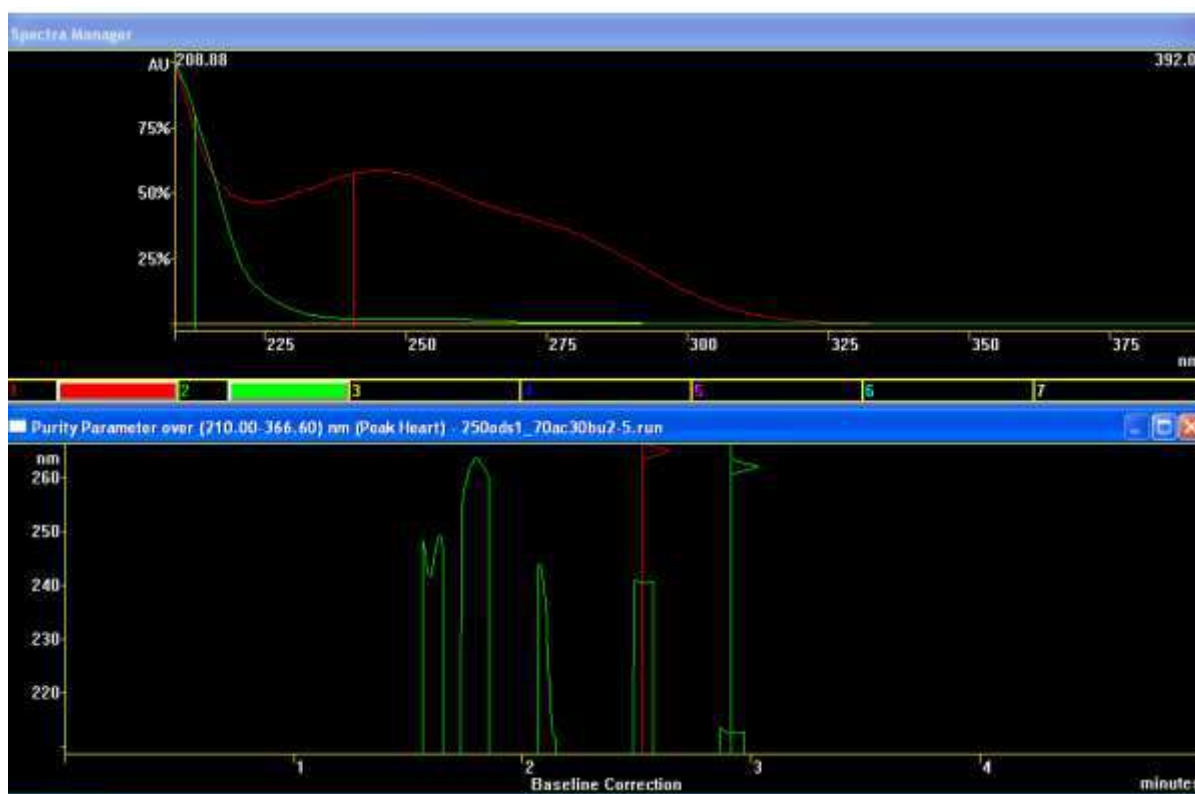


Рисунок 4.14 – Підтвердження ідентичності піків зі спектрами УФ-поглинання та їх чистоти (HPLC Varian Star PDA 330)

Профілі елюювання показали задовільне утримування та роздільну здатність приблизно $R_s=3$. Тотожність молекул підтверджена їх УФ-спектрами та піковою чистотою. Перевірка лінійності запропонованої методики показала відмінні результати, а коефіцієнти асиметрії становили 1.40 для першого елююваного піку аторвастатину та 1.32 для другого елююваного піку лізиноприлу. Вказані значення підтверджують висновки

та результати нашого дослідження щодо впливу хаотропних солей на N-вмісні молекули за рахунок збільшення їх утримуваності та покращення форми піків.

Останнім дослідженим та рекомендованим варіантом відповідної рухомої фази та хроматографічної колонки було використання тієї ж, що описано в четвертій концепції, колонки Waters Spherisorb ODS1 (4 мм i.d. X 250 мм, 5 мкм), характеристики якої були згадані вище. Шляхом зміни складу рухомої фази зі зниженням вмісту ацетонітрилу до 60 %, 40 % 0.1 % K_2HPO_4 , 0.25 % KPF_6 та 0.1 % HClO_4 , при $\text{pH} = 1.92$, температура колонки 48 °C, швидкість потоку рухомої фази 1.0 мл/хв і УФ-детектування за довжини хвилі 215 нм, отримано відмінну хроматограму із задовільними утримуваннями, формою піків, роздільною здатністю та часом хроматографування. Зазначені результати досягнуто шляхом експериментального дослідження, яке коротко узагальнено та представлено на хроматограмах рис. 4.15, 4.16. Як видно з рис. 4.15, повернення піку елюювання викликане зміною рухомої фази, а саме коригуванням відсоткового вмісту ацетонітрилу та буфера з хаотропними речовинами.

Валідацію аналітичної методики проводили за основними валідаційними характеристиками: специфічність, лінійність, прецизійність, правильність, робасність, діапазон застосування.

4.2.1 Специфічність методики

Специфічність запропонованої методики визначали за допомогою оцінки отриманих хроматограм холостого розчину, розчинів плацебо, випробовуваних розчинів та розчинів порівняння. Для порівняння додавали хроматограму розчинника, яка повинна бути майже ідентичною плацебо, що підтверджує специфічність розробленої методики (рис. 4.16).

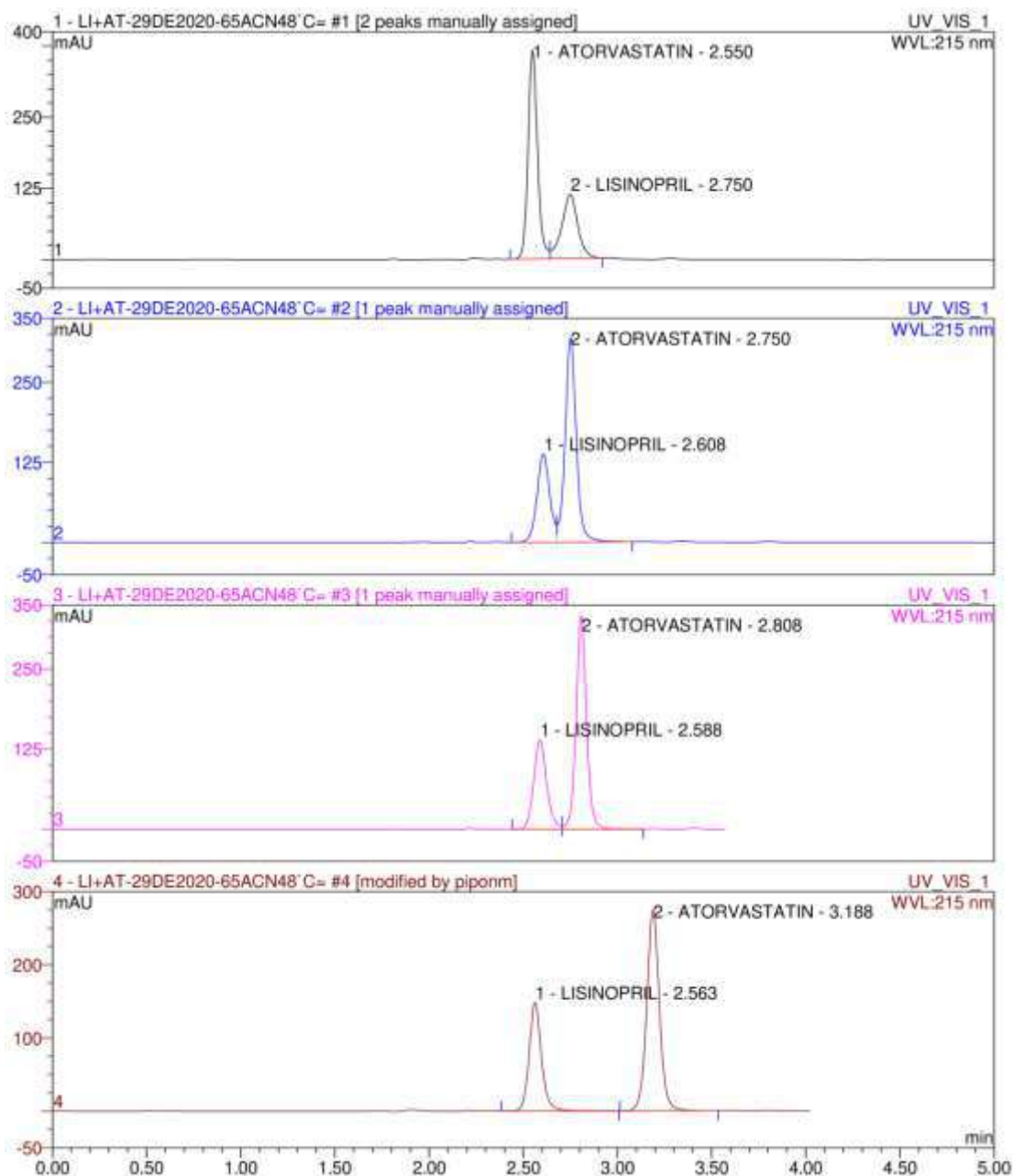


Рисунок 4.15 – Хроматограми, що ілюструють зміни елюювання обох аналітів, які регулюються варіаціями експериментальних змінних (система UPLC Dionex Ultimate 3000)б за наступних експериментальних умов: колонка Waters Spherisorb ODS1 (4 мм i.d. X 250 мм, 5 мкм), рухома фаза, що складається з ацетонітрилу (ACN) та буферного розчину (0.1 % KH_2PO_4 , 0.25 % KPF_6 та 0.1 % HClO_4) у різних співвідношеннях, представлених на рис., при швидкості потоку 1.0 мл/ хв, температури колонки 48 °C або 42 °C та УФ-детектування за довжини хвилі 215 нм (зверху вниз: 1.70 % ACN-42 °C; 2.67 % ACN-48 °C; 3.65 % ACN-48 °C; 4.60 % ACN-48 °C)

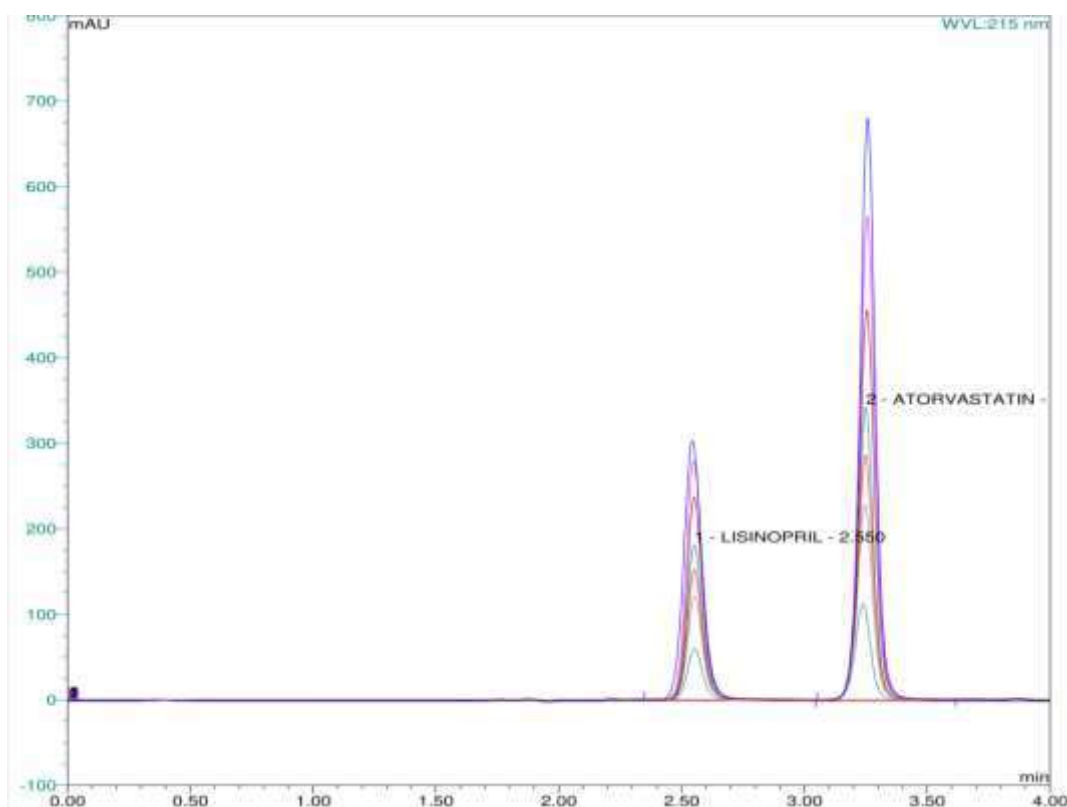


Рисунок 4.16 – Хроматограми, що ілюструють лінійність методики (система UPLC Dionex Ultimate 3000), хроматографічні умови: колонка Waters Spherisorb ODS1 (4 мм i.d. X 250 мм, 5 мкм), рухома фаза, що складається з 60 % ацетонітрилу, 40 % буферного розчину (0.1 % KH_2PO_4 , 0.25 % KPF_6 та 0.1 % HClO_4), зі швидкістю потоку 1.0 мл/хв, температурою колонки 48 °С та УФ-детектування за довжини хвилі 215 нм

4.2.2 Лінійність, діапазон застосування методики

Результати лінійності показали відмінний зв'язок між отриманими площами піків і використаними концентраціями досліджуваних препаратів, а також свідчили про високу чутливість розробленої ВЕРХ-методики. Доведено лінійність при різних рівнях концентрації в діапазоні робочих концентрацій аторвастатину (0.02–0.14 мг/мл) та лізіноприлу (0.02–0.14 мг/мл) (рис. 4.16). Метрологічні характеристики лінійної залежності представлено в табл. 4.5.

Параметри лінійності відповідають вимогам ДФУ на всьому діапазоні застосування аналітичної методики.

Таблиця 4.5 – Метрологічні характеристики лінійної залежності

Величина	Значення	Критерій	Висновок (відповідає або не відповідає)
Аторвастатин			
$b \pm (S_b)$	423.71 $\pm(23.5438)$	–	
$a \pm (S_a)$	0.2325 $\pm(0.0015)$	$ a \leq \Delta a = t(2.306) \cdot S_a = 0.0035$	Відповідає
R^2	0.9999	> 0.9977	Відповідає
МВ (мкг/мл)	0.012	–	
МКВ (мкг/мл)	0.035	–	
Діапазон застосування методики (мг/мл)	0.02–0.14	–	
Лізиноприл			
$b \pm (S_b)$	222.81 $\pm(11.6386)$	–	
$a \pm (S_a)$	0.1016 $\pm(0.0017)$	$ a \leq \Delta a = t(2.365) \cdot S_a = 0.0040$	Відповідає
R^2	0.9998	> 0.9972	Відповідає
МВ (мкг/мл)	0.025	–	
МКВ (мкг/мл)	0.076	–	
Діапазон застосування методики (мг/мл)	0.02–0.14	–	

4.2.3 Правильність та прецизійність методики

Для перевірки правильності та прецизійності методики готували модельні суміші з точно відомим вмістом АФІ, які охоплювали діапазон застосування методики (з концентраціями 70, 80, 90, 95, 100, 105, 110, 120, 130 % від номінальної). Результати проведених розрахунків наведено в табл. 4.6, 4.7.

Таблиця 4.6 – Результати аналізу модельних сумішей і їх статистична обробка для кількісного визначення аторвастатину методом ВЕРХ/УФ

Модельні розчини	Вміст аторвастатину, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100, \%$
	Введено, $X_i = (C_i / C_{rs}) 100 \%$	Знайдено, $Y_i = (A_i / A_{rs}) 100 \%$	
M ₁	70.02	69.89	99.81
M ₂	80.06	80.11	100.06
M ₃	89.98	89.83	99.83
M ₄	95.01	95.12	100.12
M ₅	99.93	100.07	100.14
M ₆	104.94	104.99	100.05
M ₇	110.04	110.15	100.10
M ₈	120.01	119.87	99.88
M ₉	130.02	130.08	100.05
Середнє значення, Z, %			100.01
Стандартне відхилення, S _z , %			0.13
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 8) \cdot S_z = 2.3060 S_z, \%$			0.30
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta_{As} = 1.6 \%$			виконується (0.30 < 1.6)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 , \%$			0.01
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta \%$			виконується (0.01 < 0.51)
Загальний висновок про методику			Коректна

Таблиця 4.7 – Результати аналізу модельних сумішей і їх статистична обробка для кількісного визначення лізиноприлу методом ВЕРХ/УФ

Модельні розчини	Вміст лізиноприлу, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100, \%$
	Введено, $X_i = (C_i / C_{rs}) 100 \%$	Знайдено, $Y_i = (A_i / A_{rs}) 100 \%$	
M ₁	69.91	69.98	100.22
M ₂	80.08	79.94	99.80
M ₃	89.95	89.88	99.92
M ₄	95.04	95.14	100.11
M ₅	100.08	99.99	99.91
M ₆	104.95	104.98	100.03
M ₇	110.02	110.15	100.15
M ₈	120.01	119.90	99.95
M ₉	129.95	130.07	100.09
Середнє значення, Z, %			100.02
Стандартне відхилення, S _z , %			0.16
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 8) \cdot S_z = 2.3060 S_z, \%$			0.37
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta_{As} = 1.6 \%$			виконується (0.37 < 1.6)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 , \%$			0.02
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta \%$			виконується (0.02 < 0.51)
Загальний висновок про методику			Коректна

Із табл. 4.6, 4.7. випливає, що ВЕРХ-методика одночасного кількісного визначення аторвастатину та лізиноприлу характеризується достатньою прецизійністю (збіжністю), так як знайдені значення відносного довірчого інтервалу величини Δz (0.30 та 0.37) менше критичного значення для збіжності результатів (1.6 %).

Виконується критерій незначущості систематичної похибки методики – систематичні похибки методики (0.01 та 0.02) є практично незначущими, тобто методика аналізу характеризується достатньою правильністю в усьому діапазоні концентрацій від 70 до 130 %.

Дослідження внутрішньолабораторної прецизійності проводили на 6 пробах однієї серії препарату, різними аналітиками, в різні дні (3 дні), з використанням різного мірного посуду, шляхом оцінки значення відносного довірчого інтервалу, яке має бути менше максимально припустимої невизначеності результатів аналізу: $\Delta z \leq 1.6$ (при $V = 5\%$) (табл. 4.8, 4.9).

Таблиця 4.8 – Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності (визначення аторвастатину)

№ розчину	Величина Z_i , %		
	1 дослід	2 дослід	3 дослід
1	100.03	100.01	100.09
2	99.91	100.07	100.02
3	100.05	100.09	100.18
4	100.03	99.95	100.05
5	100.09	99.87	100.16
6	99.89	100.06	99.85
Середнє Z (%)	100.00	100.01	100.06
RSD_x , %	0.08	0.08	0.12
Відносне стандартне відхилення, RSD_z (%)	0.09		
Відносний довірчий інтервал, Δz	$0.08 \leq 1.6$		
Критичне значення збіжності результатів Δ_{As} , %	1.6		

Таблиця 4.9 – Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності (визначення лізіноприлу)

№ розчину	Величина Z_i , %		
	1 дослід	2 дослід	3 дослід
1	99.95	100.09	99.93
2	99.99	100.05	100.09
3	100.05	100.14	100.12
4	100.09	100.18	99.89
5	100.02	99.83	100.21
6	99.85	100.09	99.98
Середнє Z (%)	99.99	100.06	100.04
RSD_x , %	0.08	0.12	0.12
Відносне стандартне відхилення, RSD_z (%)	0.11		
Відносний довірчий інтервал, Δ_z	$0.09 \leq 1.6$		
Критичне значення збіжності результатів Δ_{As} , %	1.6		

Внутрішньолабораторна прецизійність результатів аналізу підтверджена тим, що величини відносного довірчого інтервалу для шести паралельних визначень однієї серії препарату задовольняє критерію прийнятності (≤ 1.6 %) (див. табл. 4.8, 4.9).

4.2.4 Прогноз повної невизначеності методики

Для підтвердження коректності аналітичної методики проводять прогнозування повної невизначеності методики. Невизначеність кінцевої аналітичної операції складала 1.18 %. Розрахунок невизначеності пробопідготовки аторвастатину кальцію та лізіноприлу в таблетках наведено у табл. 4.10.

Таблиця 4.10 – Розрахунок невизначеності пробопідготовки аторвастатину кальцію та лізіноприлу в таблетках

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
Розчин порівняння аторвастатину		
1) взяття наважки ФСЗ аторвастатину кальцію	m_0	$0.2 \text{ мг}/50 \text{ мг} \times 100 \% = 0.40$
2) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 500.00 мл	500	0.07
Розчин порівняння лізіноприлу		
3) взяття наважки ФСЗ лізіноприлу	m_1	$0.2 \text{ мг}/50 \text{ мг} \times 100 \% = 0.40$
4) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 500.00 мл	500	0.07
Випробовуваний розчин		
5) взяття наважки таблеток	m_2	$0.2 \text{ мг}/192 \text{ мг} \times 100 \% = 0.10$
6) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 500.00 мл	200	0.07

Згідно з табл. 4.10, невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) аторвастатину кальцію та лізіноприлу в таблетках становить 0.59 %.

Розподіл невизначеності пробопідготовки за операціями для кількісного визначення таблеток аторвастатину та лізіноприлу показує, що найбільшу невизначеність в пробопідготовку вносить операції 1 та 3 – взяття наважки ФСЗ аторвастатину кальцію та лізіноприлу.

Повна невизначеність аналітичної методики (Δ_{As}) визначення аторвастатину кальцію та лізіноприлу в таблетках становить 1.32 % ($\Delta_{As} = 1.32 \% \leq \max \Delta_{As} = 1.6 \%$).

Отже, прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не перевищувала критичного значення ($\max\Delta_{As}$), що доводить, що розроблена ВЕРХ-методика одночасного визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу в таблетках даватиме коректні результати в інших лабораторіях.

4.2.5 Робастність методики

Робастність аналітичної методики оцінювали за невеликими змінами параметрів методу таких як швидкість потоку рухомої фази та температура колони. Результати вивчення робастності методики кількісного визначення представлено в табл. 4.11. Будь-які незначні зміни в досліджуваних умовах не впливали істотно на час утримування аторвастатину та лізиноприлу.

Таблиця 4.11 – Результати вивчення робастності ВЕРХ-методики визначення аторвастатину та лізиноприлу

Хроматографічні умови	Час утримування аторвастатину, хв	Час утримування лізиноприлу, хв	Резолюція
Швидкість потоку 0.8 мл/хв	4.06	3.19	5.42
Швидкість потоку 1.2 мл/хв	2.74	2.14	5.18
Температура колонки 45 °С	3.52	2.69	5.31
Температура колонки 51 °С	3.08	2.39	5.22
Стандартні умови	3.25	2.54	5.39

ВЕРХ-методика одночасного визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу в таблетках відповідає вимогам ДФУ за специфічністю, лінійністю, правильністю, прецизійністю та робастністю в діапазоні від 70 до

130 % від номінального вмісту аторвастатину кальцію та лізиноприлу і є коректною.

4.2.6 Розрахування оцінки впливу аналітичної методики на навколишнє середовище

Принципи «зеленої хімії» враховано при розробці хроматографічної методики одночасного визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу в ЛЗ. Бал аналітичної еко-шкали становив 83 (табл. 4.12). Результати вивчення «зеленості» аналітичної методики з використання методу AGREE наведено на рис. 4.17.

Таблиця 4.12 – Аналітична еко-шкала для оцінки «зеленості» розробленої хроматографічної методики визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу

Параметри	Пенальті бали
Ацетонітрил	2
HClO_4	4
KH_2PO_4	2
KPF_6	4
Споживання енергії	0
Професійні шкідливості	0
Відходи	5
Загальна кількість пенальті балів	17
Бал аналітичної еко-шкали	83
Висновок	Відмінний «зелений» аналіз

Як видно з рис. 4.17, червоним кольором виділено операцію 7, що свідчить про аналітичні відходи, яких необхідно уникати чи зменшувати під час розробки аналітичної методики шляхом зменшення кількості аналіту та об'єму розчинника. При плануванні експерименту з метою отримання відповідної

концентрації розчинів обрано масу наважки ФСЗ аторвастатину кальцію та лізиноприлу 10.00 мг та мірні колби місткістю 100.00 мл. Проте при розрахунках невизначеності пробопідготовки, отримали проблему, оскільки повна невизначеність результатів аналізу перевищувала критичне значення ($\max\Delta_{As}$). Тому нами було прийняти рішення збільшити масу наважки та об'єм розчину. Отримана повна невизначеність результатів аналізу не перевищувала критичного значення ($\max\Delta_{As}$), проте на піктограмі «зеленості» аналітичної методики з використання методу AGREE одержано відмічену у червоний колір операція 7, яка вказує на великі аналітичні відходи, що не є критичним для «зеленості» розробленої методики. Операція 10 відзначена жовтим кольором, оскільки рухома фаза містила 40 % буферного розчину (0.1 % KH_2PO_4 , 0.25 % KPF_6 та 0.1 % HClO_4). Результати, наведені у табл. 4.12 та рис. 4.17, доводять те, що розроблена ВЕРХ-методика одночасного кількісного визначення аторвастатину та лізиноприлу в таблетках є відмінною у відповідності до принципів «зеленої хімії».

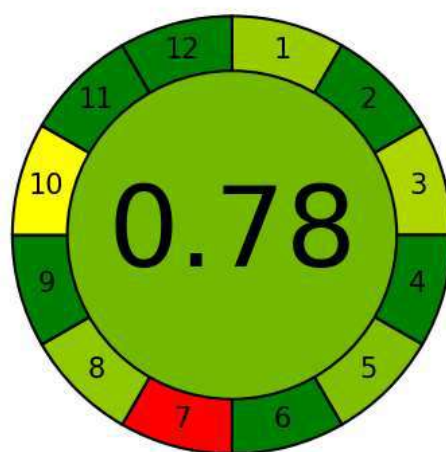


Рисунок 4.17 – Піктограма «зеленості» аналітичної методики з використання методу AGREE

Узагальнюючи все вищесказане, можна зробити висновок, що створена методологія щодо розробки ВЕРХ-методики одночасного кількісного визначення двох АФІ з значними відмінностями у фізико-хімічних властивостях мотивована використанням різних хаотропних аніонів як нового перспективного підходу для обмежень з використання іонно-парних реагентів. Отримані результати підтверджують, що розроблена хроматографічна методика одночасного кількісного визначення гідрофільного лізиноприлу та гідрофобного аторвастатину в ЛЗ є простою та експресною. З огляду на обмеженість інформації в джерелах літератури щодо розробки методики одночасного кількісного визначення цих двох АФІ, можемо зробити висновок, що запропонована робота дає змогу отримати детальні та успішні рішення для зазначеної мети. Використання хаотропних речовин виявилось незамінним для розробки еспресних кількісних методик АФІ, які можуть використовуватися в наукових цілях хіміками-аналітиками при здійсненні контролю якості ЛЗ.

Висновки до розділу 4

1. У роботі наведено експериментальне вирішення наукового завдання, що виявляється у розробці та валідації хроматографічних методик ідентифікації та кількісного одночасного визначення аторвастатину та лізиноприлу в субстанції та ЛЗ відповідно до вимог ДФУ.

2. З метою розробки ВЕРХ-методики визначення аторвастатину кальцію та його домішок в ЛЗ апробовано хроматографічні колонки Agilent Poroshell C₁₈ec, Agilent Poroshell C₈ec, Shimadzu Nex Leaf C₁₈ SH-SPP, Waters Cortecs C₁₈, Waters Cortecs C₈, Waters Symmetry C₁₈, Zorbax C₁₈ SB, Zorbax C₈ Rx, Shim-Pack XR-ODS II.

3. Запропоновано хроматографічні умови та розроблено ВЕРХ-методику кількісного визначення аторвастатину кальцію та його домішок в таблетках. Хроматографічні колонки Shim-Pack XR-ODS II (75 мм x 3 мм, 2.2 мкм) та Agilent Poroshell C₁₈ec (100 мм x 4.6 мм, 2.7 мкм) продемонстрували відмінні результати в розділенні аторвастатину та його домішок. Розроблена валідована

методика визначення аторвастатину кальцію та його домішок в таблетках є екологічнішою за фармакопейну та всі інші раніше опубліковані методики визначення домішок аторвастатину кальцію, експресною для рутинних аналізів у лабораторіях контролю якості фармацевтичних компаній. Дане дослідження дає значний внесок та напрямок для подальшого вдосконалення методик визначення аторвастатину кальцію та його домішок в таблетках.

4. Розроблено та валідовано ВЕРХ-методику одночасного кількісного визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу в бінарній суміші та таблетках з використанням хроматографічних колонок Purospher C₈ STAR, Zorbax C₈ Rx, LiChrosorb C₈, Waters Spherisorb ODS1.

5. Запропоновано методологію щодо розробки ВЕРХ-методики одночасного кількісного визначення двох АФІ з значними відмінностями у фізико-хімічних властивостях. Експериментальна робота щодо розробки ВЕРХ-методики мотивована використанням різних хаотропних аніонів як нового перспективного підходу для обмежень з використання іонно-парних реагентів. Вказані результати підтверджують, що розроблена хроматографічна методика одночасного кількісного визначення гідрофільного лізиноприлу та гідрофобного аторвастатину в ЛЗ є простою, експресною та точною. Використання хаотропних речовин виявилось незамінним для розробки експресних кількісних методик, які можуть використовуватися в наукових цілях хіміками-аналітиками при здійсненні контролю якості ЛЗ. Результати дослідження підтверджено патентами на корисну модель.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в наукових публікаціях автора [135, 136, 137, 142, 143, 144, 145, 146].

РОЗДІЛ 5

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АТОРВАСТАТИНУ КАЛЬЦІЮ ТА ЛІЗИНОПРИЛУ ДЛЯ ОЦІНКИ ЕКВІВАЛЕНТНОСТІ *IN VITRO*

5.1 Розробка методик визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу для вивчення проникності через кишкову мембрану

Одним із важливих аспектів розробки ЛЗ є вивчення біоеквівалентності. Беззаперечно актуальним залишається розробка аналітичних методик визначення АФІ в ЛЗ для вивчення проникності через кишкову мембрану та тесту «Розчинення», у випадку проведення еквівалентності *in vitro*. Для аторвастатину та лізиноприлу – це складне завдання, оскільки, як зазначалося у розділі 4, АФІ мають різні фізико-хімічні властивості.

Вивчення проникності через кишкову мембрану (тест Сасо-2) широко застосовується для визначення біодоступності та біоеквівалентності ЛЗ [148-164]. Нами запропоновано аналітичну методику кількісного визначення лізиноприлу та аторвастатину для вивчення проникності через кишкову мембрану (тест Сасо-2) [165].

Хроматографування проводили із використанням хроматографічної колонки Discovery® C18 (довжина 50 мм, внутрішній діаметр 2.1 мм, розмір часток 5 мкм) та градієнтного елюювання. Елюент А: *ацетонітрил – H₂O – мурашина кислота* (5: 95 : 0.1); елюент Б: *ацетонітрил – мурашина кислота* (100 : 0.1).

Типові хроматограми, одержані за умов кількісного визначення лізиноприлу та аторвастатину, наведено на рис. 5.1-5.5.

За даних хроматографічних умов пік лізиноприлу елюються близько 1.58 хв (рис. 5.1), аторвастатину – 1.98 хв (рис. 5.2). Загальний час хроматографування складав 2.5 хв, що дає змогу вважати розроблену аналітичну методику експресною.

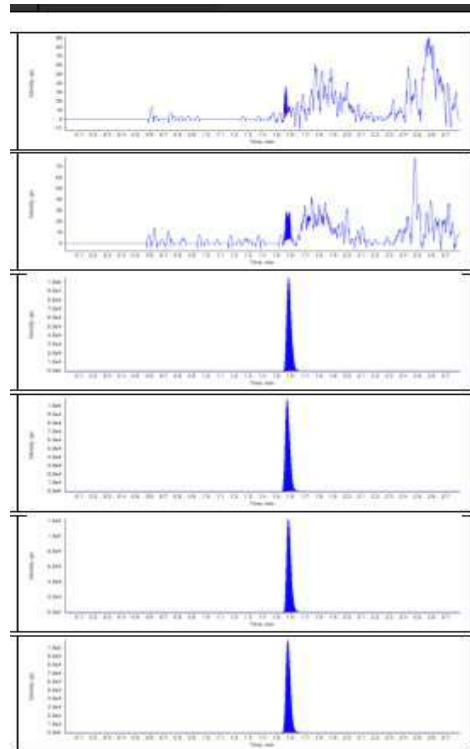


Рисунок 5.1 – Типові хроматограми лізиноприлу, одержані за умов кількісного визначення лізиноприлу та аторвастатину

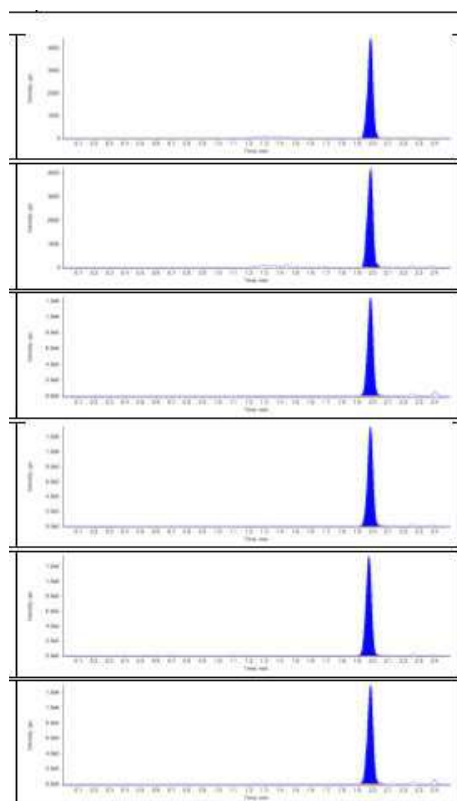


Рисунок 5.2 – Типові хроматограми аторвастатину, одержані за умов кількісного визначення лізиноприлу та аторвастатину

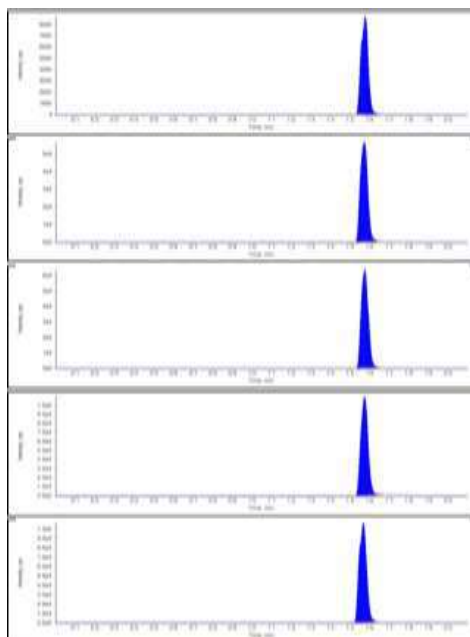


Рисунок 5.3 – Типові хроматограми пропранололу (еталонна речовина), одержані за умов кількісного визначення лізиноприлу та аторвастатину

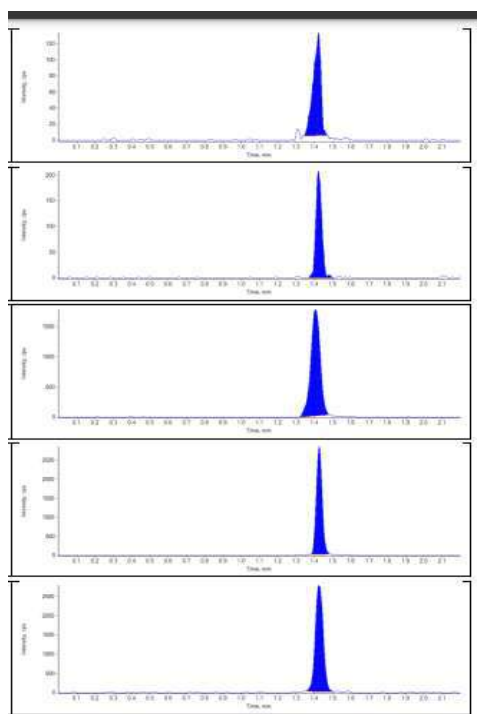


Рисунок 5.4 – Типові хроматограми хінідину (еталонна речовина), одержані за умов кількісного визначення лізиноприлу та аторвастатину

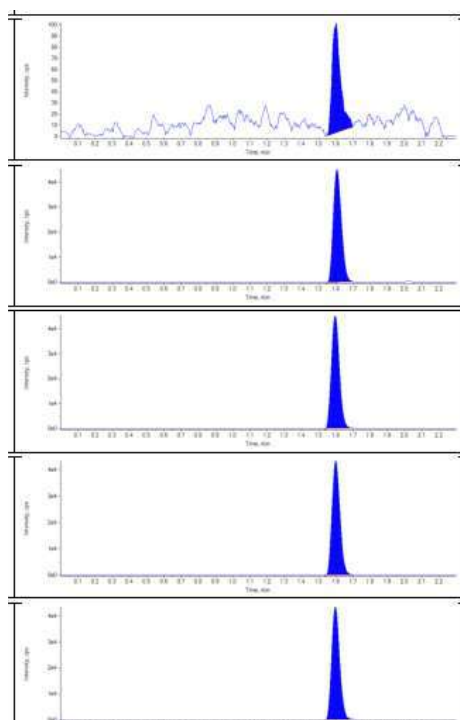


Рисунок 5.5 – Типові хроматограми атенололу (еталонна речовина), одержані за умов кількісного визначення лізиноприлу та аторвастатину

Дані про проникність (А-Б), а також коефіцієнт ефлюксу для випробовуваних та еталонних речовин наведено в табл. 5.1.

Таблиця 5.1 – Коефіцієнт проникності (P_{app}) лізиноприлу та аторвастатину через моношар клітин Caco-2 в апікально-базолатеральному напрямку

Аналіт	P_{app} (АБ), 10^{-6} см/с			
	1	2	М	m
Пропранолол	16.4	16.1	16.2	0.2
Атенолол	0.6	0.7	0.6	0.02
Хінідин	4.2	6.7	5.5	1.8
Лізиноприл	0.3	0.2	0.2	0.03
Аторвастатин	0.9	0.8	0.9	0.1

Примітка. М – середнє арифметичне значення коефіцієнта проникності; m – середнє квадратичне відхилення.

Значення масового балансу (recovery) транспортування випробовуваних та еталонних речовин через моношар клітин лінії Caco-2 представлено у табл. 5.2.

Таблиця 5.2 – Масовий баланс (recovery) транспортування випробовуваних та еталонних речовин через моношар клітин лінії Caco-2

Аналіт	% recovery			Відповідність критеріям прийнятності
	1	2	M	
Пропранолол	63	69	66	-
Атенолол	108	106	107	-
Хінідин	78	74	76	-
Лізиноприл	95	94	95	<± 15% Відповідає
Аторвастатин	92	94	93	<± 15% Відповідає

Значення масового балансу (recovery) транспортування випробовуваних та еталонних речовин через моношар клітин лінії Caco-2 (табл. 5.2) вказують на те, що результати експерименту є достовірними. Випробовані субстанції лізиноприлу та аторвастатину в тест-системі Caco-2 виявляють низьку проникність.

Розроблена аналітична методика визначення лізиноприлу та аторвастатину для вивчення проникності через кишкову мембрану (тест Caco-2) є простою та експресною.

5.2 Розробка та валідація методик кількісного визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу для застосування в тесті «Розчинення»

Тест «Розчинення» для твердих дозованих ЛФ є одним з основних фармако-технологічних випробувань на всіх етапах фармацевтичної розробки. Результати тесту «Розчинення» свідчать про якість ЛЗ та про його еквівалентність *in vitro* [166-168]. Враховуючи той факт, що як альтернативні

можуть застосовуватися спектрофотометричні методики, проведено трансфер аналітичних методик визначення лізіноприлу та аторвастатину, які описані у розд. 3.1, 3.4 [165, 169, 170].

Вивчення розчинення проводили в стандартних фармакопейних середовищах з рН 1.2, 4.5 та 6.8. Точки контролю: 5, 15 хв. ЛЗ вважаються дуже швидкорозчинними, коли не менше 85 % від діючої речовини розчиняється за 15 хв, швидкорозчинними – коли не менше 85 % від діючої речовини розчиняється за 30 хв.

Вивчення лінійності аналітичних методик проводили в широкому діапазоні концентрацій (50-130 % при трьох значеннях рН). Рівняння регресії та коефіцієнти кореляції представлено в табл. 5.3, 5.4.

Таблиця 5.3 – Результати вивчення валідаційного параметру «лінійність/калібрувальна модель» методики спектрофотометричного визначення лізіноприлу у таблетках за умов проведення тесту «Розчинення»

рН	Рівняння регресії	R ²	Відповідність критеріям прийнятності
1.2	$y=5.16x+0.24$	0.9994	Відповідає
4.5	$y = 3.71x +0.51$	0.9998	Відповідає
6.8	$y = 4.67 x + 0.42$	0.9985	Відповідає

Таблиця 5.4 – Результати вивчення валідаційного параметру «лінійність/калібрувальна модель» методики спектрофотометричного визначення аторвастатину у таблетках за умов проведення тесту «Розчинення»

рН	Рівняння регресії	R ²	Відповідність критеріям прийнятності
1.2	$y=11.84x+1.32$	0.9995	Відповідає
4.5	$y = 9.34x +0.53$	0.9989	Відповідає
6.8	$y = 8.64 x +0.96$	0.9997	Відповідає

Вимоги до параметрів лінійної залежності (див. табл. 5.3, 5.4) виконуються в усьому діапазоні застосування методики. Висновок щодо розроблених методик по валідаційному параметру «лінійність/калібрувальна модель» є коректними.

У табл. 5.5, 5.6 представлено результати аналізу модельних сумішей та їх статистична обробка для оцінки прецизійності, правильності та лінійності.

Таблиця 5.5 – Результати аналізу модельних сумішей і їх статистична обробка для кількісного визначення лізиноприлу при проведенні тесту «Розчинення»

Модельні розчини	Вміст лізиноприлу, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100, \%$
	Введено, $X_i = (C_i/C_{rs}) 100 \%$	Знайдено, $Y_i = (A_i/A_{rs}) 100 \%$	
M ₁	50.03	50.22	100.38
M ₂	60.12	60.14	100.03
M ₃	70.06	70.15	100.13
M ₄	79.98	79.86	99.85
M ₅	90.07	90.19	100.13
M ₆	100.11	99.92	99.81
M ₇	110.16	110.02	99.87
M ₈	120.24	119.99	99.79
M ₉	129.91	130.14	100.18
Середнє значення, $Z, \%$			100.02
Стандартне відхилення, $S_z, \%$			0.23
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 8) \cdot S_z = 2.3060 S_z, \%$			0.53
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta_{As} = 1.6 \%$			виконується (0.53 < 1.6)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 , \%$			0.02
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta \%$			виконується (0.02 < 0.51)
Загальний висновок про методику			Коректна

Таблиця 5.6 – Результати аналізу модельних сумішей і їх статистична обробка для кількісного визначення аторвастатину при проведенні тесту «Розчинення»

Модельні розчини	Вміст аторвастатину, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100, \%$
	Введено, $X_i = (C_i / C_{rs}) \cdot 100 \%$	Знайдено, $Y_i = (A_i / A_{rs}) \cdot 100 \%$	
M ₁	50.09	50.31	100.44
M ₂	60.05	60.19	100.23
M ₃	70.01	70.25	100.34
M ₄	80.14	79.95	99.76
M ₅	90.18	90.01	99.81
M ₆	100.15	99.82	99.67
M ₇	110.12	110.19	100.06
M ₈	120.19	119.96	99.81
M ₉	130.05	130.27	100.17
Середнє значення, Z, %			100.03
Стандартне відхилення, S _z , %			0.30
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 8) \cdot S_z = 2.3060 S_z, \%$			0.69
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta_{As} = 1.6 \%$			виконується (0.69 < 1.6)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 , \%$			0.03
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta \%$			виконується (0.03 < 0.51)
Загальний висновок про методику			Коректна

З даних табл. 5.5, 5.6 видно, що для визначення аторвастатину та лізиноприлу аналітичні методики характеризуються достатньою прецизійністю (збіжністю). Знайдене значення відносного довірчого інтервалу величини Δz (0.53 та 0.69) менше критичного значення для збіжності результатів (1.6 %). Виконується критерій невизначеності систематичної похибки методик, систе-

матична похибка методики (0.02 % та 0.03 %) є статистично і практично незначущою, тобто аналітичні методики характеризується достатньою правильністю в усьому діапазоні концентрацій від 50 до 130 %. Підтверджена лінійність, прецизійність (збіжність) і правильність визначення аторвастатину та лізиноприлу методом спектрофотометрії в діапазоні застосування від 50 до 130 %.

З метою перевірки робасності вивчено стабільність розчинів у часі. Отримані результати, представлені в табл. 5.7, 5.8, свідчать про те, що розчини стабільні впродовж двох годин.

У результаті проведеного експерименту отримано профілі вивільнення лізиноприлу з таблеток «Лізиноприл-Астрафарм» 0.01 г, «Лізиноприл-КРКА» 0.01 г, «Лізиноприл-Тева» 0.01 г, аторвастатину – «Аторвастатин-Тева» 0.01 г, Таблетки «Аторвакор Фармак» 0.01 г, Таблетки «Аторіс-КРКА» 0.01 г.

Таблиця 5.7 – Результати вивчення стабільності випробовуваних розчинів лізиноприлу (1) та розчинів ФСЗ лізиноприлу (2)

№	t, хв						A сер	RSD _t , %
	0	20	40	60	90	120		
1	0.745	0.742	0.739	0.738	0.735	0.732	0.739	0.63
2	0.738	0.737	0.735	0.732	0.727	0.726	0.733	0.69

Таблиця 5.8 – Результати вивчення стабільності випробовуваних розчинів аторвастатину (1) та розчинів ФСЗ аторвастатину (2)

№	t, хв						A сер	RSD _t , %
	0	20	40	60	90	120		
1	0.317	0.315	0.313	0.312	0.309	0.305	0.312	1.38
2	0.326	0.324	0.323	0.320	0.319	0.314	0.321	1.34

Результати тесту «Розчинення» лізиноприлу та аторвастатину в стандартних фармакопейних середовищах з рН 1.2, 4.5 та 6.8 з застосуванням спектрофотометричних методик представлено в табл. 5.9.

Таблиця 5.9 – Результати тесту «Розчинення» лізиноприлу та аторвастатину в стандартних фармакопейних середовищах з застосуванням спектрофотометричної методики

Лікарський засіб	Середовище	% вивільнення	
		5 хв	15 хв
Таблетки «Лізиноприл-Астрафарм» 0.01 г	pH 1.2	85.67	88.38
	pH 4.5	88.45	91.06
	pH 6.8	87.49	92.09
Таблетки «Лізиноприл-КРКА» 0.01 г	pH 1.2	85.56	87.87
	pH 4.5	87.38	89.18
	pH 6.8	87.94	93.48
Таблетки «Лізиноприл-Тева» 0.01 г	pH 1.2	85.56	86.38
	pH 4.5	87.85	90.05
	pH 6.8	86.82	92.04
Таблетки «Аторвастатин-Тева» 0.01 г	pH 1.2	85.34	95.26
	pH 4.5	85.76	94.94
	pH 6.8	86.39	96.82
Таблетки «Аторвакор Фармак» 0.01 г	pH 1.2	86.95	93.67
	pH 4.5	87.76	94.01
	pH 6.8	90.57	94.27
Таблетки «Аторіс-КРКА» 0.01 г	pH 1.2	85.76	91.69
	pH 4.5	89.19	93.45
	pH 6.8	87.63	92.31

У всіх трьох фармакопейних середовищах розчинення вивільнення аторвастатину та лізиноприлу з всіх ЛФ становило понад 85 % за 15 хв (див. табл. 5.9).

В результаті проведеного дослідження можна зробити висновок, що розроблені спектрофотометричні методики визначення лізиноприлу та

аторвастатину у таблетках для застосування з метою проведення тесту «Розчинення» є коректними, експресними та доступними навіть для лабораторій з обмеженим бюджетом.

Висновки до розділу 5

1. Запропоновано методики кількісного визначення аторвастатину та лізиноприлу для оцінки еквівалентності *in vitro*.

2. Розроблено аналітичну методику кількісного визначення аторвастатину та лізиноприлу для вивчення проникності через кишкову мембрану (тест Сасо-2). Випробувані субстанції лізиноприлу та аторвастатину в тест-системі Сасо-2 виявляють низьку проникність.

3. Розроблена аналітична методика визначення лізиноприлу та аторвастатину для вивчення проникності через кишкову мембрану (тест Сасо-2) є простою та експресною.

4. Проведено трансфер спектрофотометричних методик визначення лізиноприлу та аторвастатину для проведення тесту «Розчинення». Вивчено профілі розчинення таблеток лізиноприлу та аторвастатину. У всіх трьох фармакопейних середовищах розчинення вивільнення аторвастатину та лізиноприлу з всіх ЛФ становило понад 85 % за 15 хв.

5. Розроблені спектрофотометричні методики визначення лізиноприлу та аторвастатину у таблетках для застосування з метою проведення тесту «Розчинення» є коректними, експресними та доступними.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в наукових публікаціях автора [165, 169, 170].

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне та експериментальне вирішення актуального наукового завдання, що полягає в розробці експресних, простих у виконанні, доступних та валідованих спектрофотометричних і хроматографічних методик визначення аторвастатину кальцію та лізіноприлу в субстанціях та ЛЗ.

1. Проведено критичний аналіз оригінальних наукових публікацій, що дозволяє узагальнити інформацію щодо цілей, завдань, особливостей досліджень, ускладнень, які виникають під час розробки та валідації методик визначення аторвастатину кальцію, його домішок та лізіноприлу в ЛЗ. Розроблено «Дерево рішень» щодо вибору методик аналізу аторвастатину кальцію та лізіноприлу в ЛЗ. Запропонована стратегія дає можливість підібрати методи для розробки методик аналізу ЛЗ на основі аторвастатину та лізіноприлу.

2. Запропоновано та валідовано УФ-спектрофотометричні методики визначення лізіноприлу та аторвастатину кальцію в моно-препаратах. Встановлено неможливість одночасного кількісного визначення лізіноприлу та аторвастатину кальцію із застосуванням методу УФ-спектрофотометрії.

3. Розроблено та валідовано спектрофотометричні методики кількісного визначення лізіноприлу у складі готових ЛФ за нінгідриноювою реакцією та реакцією з купруму (II) сульфатом, встановлено показники чутливості реакції, стехіометричні співвідношення реагуючих компонентів «лізіноприл-купруму (II) сульфат» (2:1) та концентрацію розчину купруму (II) сульфату (1.0×10^{-3} М), оптимальні умови проведення кількісного визначення за нінгідриноювою реакцією (час нагрівання 25 хв, температура (95 ± 2) °С, об'єм 0.2 % розчину нінгідрину 1.1 мл).

4. Запропоновано та валідовано спектрофотометричні методики кількісного визначення аторвастатину кальцію у складі готових ЛФ за реакцією з БТС та БФС, експериментально обґрунтовано оптимальні умови утворення

продуктів взаємодії аторвастатину кальцію з БТС та БФС – вибір концентрації реагента (1.28×10^{-4} М розчину БТС, 4.12×10^{-4} М розчину БФС), органічного розчинника (БТС – етилацетат, БФС – метанол), встановлено коефіцієнти стехіометричних співвідношень «аторвастатину кальцію–БТС/БФС» (1:1) та показники чутливості реакції.

5. З метою розробки ВЕРХ-методики визначення аторвастатину кальцію та його домішок в ЛЗ апробовано хроматографічні колонки Agilent Poroshell C₁₈ec, Agilent Poroshell C₈ec, Shimadzu Nex Leaf C₁₈ SH-SPP, Waters Cortecs C₁₈, Waters Cortecs C₈, Waters Symmetry C₁₈, Zorbax C₁₈ SB, Zorbax C₈ Rx, Shim-Pack XR-ODS II. Хроматографічні колонки Shim-Pack XR-ODS II (75 мм x 3 мм, 2.2 мкм) та Agilent Poroshell C₁₈ec (100 мм x 4.6 мм, 2.7 мкм) продемонструвала відмінні результати в розділенні аторвастатину та його домішок. Розроблена аналітична методика визначення аторвастатину кальцію та його домішок в таблетках є екологічнішою за фармакопейну та всі інші раніше опубліковані методики визначення домішок аторвастатину кальцію, експресною для рутинних аналізів у лабораторіях контролю якості фармацевтичних компаній.

6. Розроблено та валідовано ВЕРХ-методику одночасного кількісного визначення аторвастатину кальцію та лізиноприлу в бінарній суміші та ЛЗ з використанням хроматографічних колонок Purospher C₈ STAR, Zorbax C₈ Rx, LiChrosorb C₈, Waters Spherisorb ODS1.

7. Запропоновано методологію щодо розробки ВЕРХ-методики одночасного кількісного визначення двох АФІ з значними відмінностями у фізико-хімічних властивостях. Експериментальна робота щодо розробка ВЕРХ-методики мотивована використанням різних хаотропних аніонів як нового перспективного підходу для обмежень з використання іонно-парних реагентів. Отримані результати підтверджують, що розроблена хроматографічна методика одночасного кількісного визначення гідрофільного лізиноприлу та гідрофобного аторвастатину в ЛЗ є простою, експресною та точною.

8. Запропоновано методики кількісного визначення аторвастатину та лізиноприлу для оцінки еквівалентності *in vitro*. Розроблено аналітичну

методику кількісного визначення аторвастатину та лізиноприлу для вивчення проникності через кишкову мембрану (тест Сасо-2). Випробувані субстанції лізиноприлу та аторвастатину в тест-системі Сасо-2 виявляють низьку проникність. Запропонована аналітична методика визначення лізиноприлу та аторвастатину для вивчення проникності через кишкову мембрану (тест Сасо-2) є простою та експресною. Проведено трансфер спектрофотометричних методик визначення лізиноприлу та аторвастатину для проведення тесту «Розчинення». Вивчено профілі розчинення таблеток лізиноприлу та аторвастатину. Розроблені спектрофотометричні методики визначення лізиноприлу та аторвастатину у таблетках для застосування з метою проведення тесту «Розчинення» є коректними, експресними та доступними.