

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
Пелешок Катерина Євгенівна

УДК 615.07:615.225.1

ДИСЕРТАЦІЯ
РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК АНАЛІЗУ ВАЛСАРТАНУ І
АТЕНОЛОЛУ В ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ

22 «Охорона здоров'я»

226 «Фармація, промислова фармація»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

_____ К. Є. Пелешок

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

Тернопіль – 2022

АНОТАЦІЯ

Пелешок К.Є. Розробка та валідація методик аналізу валсартану і атенололу в лікарських засобах – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація» (22 «Охорона здоров'я»). – Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, 2021.

Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, 2022.

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

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

Розроблено та валідовано спектрофотометричні методики визначення валсартану в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромфеноловим синім (БФС) та метиловим червоним (МЧ). Валсартан утворює іонно-парні комплекси вибірково з барвниками, про що свідчить утворення забарвленого комплексу з БФС при рН 5.5 з λ_{max} при 424 нм та МЧ при рН 4.3 з λ_{max} при 494 нм. Утворенні іонні асоціати є малорозчинними у воді, але в оптимізованих експериментальних умовах є розчинними і не потребують екстракції органічними розчинниками, що є значною перевагою розроблених аналітичних методик. Оптимізація умов проведення спектрофотометричного визначення необхідна для швидкого та кількісного утворення кольорових комплексів іонних асоціатів з максимальною стабільністю та чутливістю. Максимальне поглинання спостерігалось в розчині метанолу з БФС, тоді як етанол, пропанол, хлороформ, ацетонітрил та етилацетат були непридатними. Максимальне

поглинання спостерігалось в розчині етанолу з МЧ, тоді як метанол, пропанол, хлороформ, ацетонітрил та етилацетат були непридатними. Встановлено, що досліджувані розчини стабільні впродовж 45 хв. Для встановлення аналітичних показників чутливості реакції валсартану з БФС були розраховані показники чутливості реакції. У результаті проведених розрахунків аналітичних показників чутливості реакцій встановлено, що вищу чутливість має реакція валсартану з МЧ за реакцією валсартану з БФС, про що свідчить високе значення молярного коефіцієнта поглинання та низьке значення відкривального мінімуму. Стехіометричні співвідношення реагуючих компонентів «валсартан – БФС/МЧ» становлять 1:1.

Розроблені аналітичні методики були валідовані відповідно до вимог ДФУ та ІСН Q2 за наступними показниками: селективність, лінійність, діапазон застосування, правильність, прецизійність та робасність.

З метою розробки методики одночасного кількісного визначення валсартану та атенололу в бінарній суміші, яка містила 80 мг валсартану та 100 мг атенололу (фіксована комбінація), було розглянуто можливість застосування методу УФ-спектрофотометрії. Попередніми випробуваннями були вибрані належні умови пробопідготовки і кількісного визначення. Для розрахунку кількісного вмісту валсартану та атенололу вимірювали оптичну густину за довжин хвиль 249.5 нм (визначення валсартану) та 282 нм (визначення атенололу) відносно компенсаційного розчину. Валідацію аналітичної методики проводили за основними валідаційними характеристиками: специфічність, лінійність, прецизійність, правильність, робасність, діапазон застосування.

Запропоновані спектрофотометричні методики визначення валсартану та атенололу в субстанціях та лікарських формах є простими, точними, експресними, «зеленими», неекстраційними, не вимагають застосування тривалої пробопідготовки та дорогого обладнання. Усі розроблені методики можуть використовуватися в рутинному аналізі для визначення валсартану та атенололу в препаратах, що містять ці АФІ.

При розробці методик ідентифікації валсартану та атенололу в субстанціях та лікарських засобах було обрано метод хроматографії в тонкому шарі сорбенту (ТШХ). Найоптимальніші значення коефіцієнта утримування валсартану та атенололу для їх одночасного визначення спостерігаються при використанні рухомої фази – *n*-бутанол *P* – кислота оцтова льодяна *P* – вода *P* (40:10:20).

Атенолол та валсартан завдяки своїй хімічній структурі мають різну розчинність у воді та органічних розчинниках, $\text{Log } P = 0.16$ та $\text{Log } P = 1.499$ відповідно. Ця варіація ускладнює створення швидкого успішного та точного хроматографічного методу для їх одночасного визначення. Наступним етапом дослідження було проведення оптимізації та критична оцінка рухомої фази, швидкості потоку, довжини хвилі детектування та хроматографічної колони (Zorbax C₈, Discovery C₁₈, LiChrospher® 60 RP-select B) для розробки хроматографічної методики визначення валсартану та атенололу.

При розробці ВЕРХ/УФ методики одночасного визначення валсартану та атенололу в субстанціях та лікарських засобах була використана колонка Zorbax C₈, яка є класичною колонкою з оберненою фазою і має високу площу поверхні і стабільність фази. Підібрані умови ізократичного елюювання з бінарною рухомою фазою, що складалася з метанолу *P* та 25 мМ розчину калію дигідрогенфосфату рН 7.3 (55:45). Обрані експериментальні умови зменшували час хроматографування та кількість використовуваної рухомої фази, що знижувало вартість аналізу, та водночас забезпечувало необхідну специфічність, правильність та прецизійність результатів аналізу під час проведення контролю якості.

Валідацію методики кількісного визначення валсартану та атенололу в таблетках проводили за такими валідаційними характеристиками як специфічність, лінійність, правильність та прецизійність та робасність.

При розробці ВЕРХ/УФ методики одночасного визначення валсартану та атенололу в субстанціях та лікарських засобах нами була використана хроматографічна колонка Discovery C₁₈. Щоб знайти відповідні умови ВЕРХ

нами були попередньо апробовані ізократичні та градієнтні системи рухомої фази. Перш за все, суміш ацетонітрилу та 0.16 % розчину амонію ацетату випробовували в різних співвідношеннях, в результаті чого АФІ не були чітко розділені. Іонпарний реагент тетраметиламоній гідроксид був апробований і в даній методиці його не потрібно замінити на подібні до нього, такі як тетраметиламоній гідроксид сульфат, який не використовувався в даному експерименті. Збільшуючи концентрацію солі амонію ацетату більш ніж на 0.2 %, підштовхує пік атенололу ближче до мертвого об'єму, що є неприйнятним. Атенолол у багатокомпонентних сумішах елюється у мертвому об'ємі, тому необхідним є застосування сильнішої гідрофобної рухомої фази для одночасного визначення з валсартаном. При розробці ВЕРХ/УФ методики кількісного визначення валсартану та атенололу в субстанції та ЛЗ використовували умови ізократичного елюювання з рухомою фазою, що складалася з *ацетонітрилу P – 16 % розчину амонію ацетату P – 1.5 M розчину тетраметиламонію гідроксиду (20:80:0.2)* для досягнення оптимальної симетрії піка АФІ, та хроматографічну колонку Discovery C₁₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм). Як результат – хроматограми були отримані із задовільними факторами утримування та хорошою піковою симетрією обох піків аналіту.

Валідацію методик кількісного визначення валсартану та атенололу в таблетках проводили за такими валідаційними характеристиками як специфічність, лінійність, правильність та прецизійність, робасність.

У попередній двох хроматографічних методиках працювали на хроматографічних колонках Zorbax C₈ та Discovery C₁₈, які значно відрізняються від колонок LiChrospher® 60 RP-select B навантаженням вуглецю, активними поверхнями, кількістю теоретичних тарілок, залишками катіонів металів та розмірами колонок. При розробці цієї аналітичної методики показано повернення піку елюювання внаслідок зміни типу фосфатного буфера, або залежності типу катіону фосфатного буфера від профілю елюювання різних молекул. Це має велике значення при виборі методу для вивчення домішок,

продуктів розпаду або метаболітів при дослідженні різних аналітів, продуктів деградації та біоеквівалентності чи фармакокінетичних досліджень.

Для кількісного визначення вмісту валсартану та атенололу в субстанції, бінарній суміші та лікарських засобах було розроблено ВЕРХ/УФ методику з використанням хроматографічних колонок LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 125 мм, 5 мкм) та LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 250 мм, 5 мкм). З типової хроматограми видно, що піки відповідають вимогам симетрії, а їх інтенсивність достатня для інтегрування і проведення подальших розрахунків.

Відповідно до всіх результатів, представлених вище, було зроблено висновок, що перехід від тестування з попередньої колонки Zorbax C₈ до LiChrospher® 60 RP-select B дав велику кількість нових цікавих експериментальних результатів, фактів та переваг у підході до розробки методики одночасного визначення валсартану та атенололу. Після встановлення напрямку вибору оптимального складу рухомої фази, підготовки зразка та інших зазначених змінних, було застосовано та апробовано колонку LiChrospher® 60 RP-select B 250 мм, що дозволяє значно краще побачити симетричні піки майже незалежно від швидкості потоку, більшу роздільну здатність між піками (близько 4), вдвічі більше число теоретичних тарілок для піків (4100-4440), є важливим аспектом у випадках, коли необхідна краща роздільна здатність.

Валідацію методик кількісного визначення валсартану та атенололу в таблетках проводили за такими валідаційними характеристиками як специфічність, лінійність, правильність та прецизійність, робасність.

Як відомо, якість лікарського засобу закладається ще на етапі розробки лікарського засобу. На сьогоднішній день недостатньо проводити лише визначення якісного складу та кількісного вмісту АФІ у лікарських засобах. Необхідно також провести оцінку еквівалентності *in vitro* лікарських засобів. Для цього мають бути розроблені валідовані аналітичні методики кількісного визначення АФІ, що і було завершальним етапом нашого дослідження.

В результаті нами було розроблено аналітичну методику кількісного визначення валсартану для вивчення проникності через кишкову мембрану (тест Сасо-2). Валсартан в тест-системі Сасо-2 виявляє низьку проникність та зазнає активного транспортування. Зниження коефіцієнта ефлюксу у присутності верапамілу вказує на те, що ця речовина є субстратом P-gp транспортера. Розроблена аналітична методика визначення валсартану для вивчення проникності через кишкову мембрану (тест Сасо-2) є простою та експресною, що дозволяє зменшити час і витрати аналізу відповідно.

Також проведено трансфер аналітичних методик визначення валсартану та атенололу (спектрофотометрична та хроматографічна методики). Запропоновані спектрофотометрична та хроматографічна методики одночасного визначення валсартану та атенололу у таблетках для застосування її для вивчення розчинення є коректними, а результати аналізу, відповідно, корелюють між собою.

Таким чином, результати проведених досліджень розширюють горизонти фармацевтичного аналізу та стандартизації фіксованих антигіпертензивних комбінацій.

Новизна розробок підтверджена патентами України на корисну модель.

Ключові слова: антигіпертензивні лікарські засоби, атенолол, біоеквівалентність, валідація, валсартан, високоефективна рідинна хроматографія з УФ детекцією, спектрофотометрія, тонкошарова хроматографія, фармацевтичний аналіз, фіксована комбінація.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні результати дисертації:

1. Peleshok K. Ye., Logoyda L. S., Poliak O. B. Development and methodology for the estimation of atenolol and valsartan in pharmaceuticals. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2020. № 1. С. 30–33.

(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та оформленні статті).

2. Efficient Validated HPLC/UV method for determination of valsartan and atenolol in dosage form and *in vitro* dissolution studies / M. Piponski, K. Peleshok, L. Logoyda, L. Kravchuk, V. Piatnochka, U. Zakharchuk. *Biointerface research in applied chemistry*. 2020. Vol. 10, № 6. P. 6669–6675. (SCOPUS) (Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та оформленні статті).

3. Peleshok K. Quality control measurement and *in vitro* bioequivalence of valsartan and atenolol tablets marketed in Ukraine. *International Journal of Medicine and Medical Research*. 2020. № 2. P. 52–58.

4. Novel HPLC-UV method for simultaneous determination of valsartan and atenolol in fixed dosage form; Study of green profile assessment / K. Peleshok, M. Piponski, E. A. Ajie, O. Poliak, N. Zarivna, O. Deneffil, L. Logoyda. *Pharmacia*. 2021. Vol. 68, № 1. P. 43–51. (SCOPUS) (Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та оформленні статті).

5. New liquid chromatography assays for simultaneous quantification of antihypertensives atenolol and valsartan in their dosage forms / K. Peleshok, M. Piponski, S. Kovalenko, H. Ahmed, A. Abdel-Megied, O. F. Ezike, L. Logoyda. *Journal of Separation Science*. 2021. Vol. 44, № 2. P. 565–575. (SCOPUS) (Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та оформленні статті).

6. Development and validation of spectrophotometric method for simultaneous estimation of valsartan and atenolol in binary mixtures: application to tablets analysis / K. Peleshok, O. Poliak, L. Kryskiw, Agyemang F. Sarpong, N. Zarivna, D. Korobko, H. Zahrychuk, N. Horlachuk, A. Sverstiuk, L. Levytska, L. Logoyda. *Pharmakeftiki*. 2021. Vol. 33, № 1. P. 52–60. (SCOPUS) (Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та оформленні статті).

7. LC-MS/MS method development for the quantitative determination of valsartan from Caco-2 cell monolayers: application to permeability assay / K. Peleshok, O. Poliak, N. Zarivna, O. Oleshchuk, U. Mudryk, V. Hlushok, A. Sverstiuk, O. Svan, N. Terenda, A. Makhnitskyu, O. Yaremchuk, L. Logoyda. *Pharmakeftiki*. 2021. Vol. 33, № II. P. 107–115. (SCOPUS) *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та оформленні статті)*.

8. Пелешок К. Є., Логойда Л. С., Піпонські М. Спосіб ізократичного хроматографічного визначення валсартану та атенололу в лікарських засобах (Метод I) : патент № 146653 Україна, МПК G01N33/15. № u202005505 ; заявл. 25.08.2020 ; опубл. 10.03.2021, Бюл. № 10. *(Особистий внесок – брала участь в патентному пошуку, плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та оформленні заявки на патент)*.

9. Пелешок К. Є., Логойда Л. С., Піпонські М. Спосіб хроматографічного визначення валсартану та атенололу в лікарських засобах : патент № 145966 Україна, МПК G01N30/00, B01D15/08. № u202004075 ; заявл. 06.07.2020 ; опубл. 14.01.2021, Бюл. № 2. *(Особистий внесок – брала участь в патентному пошуку, плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та оформленні заявки на патент)*.

10. Пелешок К. Є., Логойда Л. С., Піпонські М. Спосіб ізократичного хроматографічного визначення валсартану та атенололу в лікарських засобах (Метод II) : патент № 145731 Україна, МПК G01N30/00. № u202005507 ; заявл. 25.08.2020 ; опубл. 29.12.2020, Бюл. № 24. *(Особистий внесок – брала участь в патентному пошуку, плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та оформленні заявки на патент)*.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

11. Peleshok K., Logoyda L. Application of thin layer chromatography in the analysis of atenolol and valsartan. *Хімічні Каразінські читання – 2020* : матеріали XII Всеукраїнської наук. конф. студентів та аспірантів, 21–23 квітня 2020 р.

Харків, 2020. С. 32. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та оформленні тез).*

12. Peleshok K., Piponski M., Logoyda L. Method development for simultaneous determination of valsartan and atenolol in newly formulated dosage form. *EFMC-ISM&EFMC-YMCS : Virtual Poster Session Powered by the EFMC Young Scientists Network*, 9 September. 2020. P. 189. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та оформленні тез).*

13. Development and validation of spectrophotometric method for simultaneous estimation of valsartan and atenolol in dosage forms / K. Peleshok, L. Kryskiw, S. Kovalenko, L. Logoyda. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів : матеріали VIII наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 23–24 вересня 2020 р. Тернопіль, 2020. С. 138–139. (Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та оформленні тез).*

14. HPLC method development for valsartan and atenolol in dosage forms on columns LiChrospher® 60 RP-select / K. Peleshok, M. Piponski, O. Florence, S. L. Kovalenko, L. Logoyda. *Contemporary pharmacy: issues, challenges and expectation. 2020 autumn : Abstracts of the international conference, 2020 October 23. Kaunas, 2020. С. 49. (Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та оформленні тез).*

15. HPLC method development for valsartan and atenolol in dosage forms on column Zorbax C8 / K. Peleshok, M. F. Abdelmalek, M. Piponski, L. Logoyda. *18th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry : Abstracts, 2021 February 25–27. Athens, 2021. P. 19. (Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та оформленні тез).*

16. Analytical methods development for the quantification of antihypertensive active pharmaceutical ingredients in dosage forms / K. Peleshok, N. Shulyak, A. E. Ajje, M. F. Abdelmalek, A. F. Sarpong. *Topical issues of new medicines development : матеріали XXVIII міжнародної наук.-практ. конф. молодих вчених*

та студентів, присв. 150-річчю з дня народження М. О. Валяшка, 18–19 березня 2021. Харків, 2021. С. 107–108. (*Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та оформленні тез*).

17. Validation of analytical methods for quantification of different antihypertensive active pharmaceutical ingredients in dosage forms / K. Peleshok, N. Shulyak, O. Omotosho, A. Abbeyquaye, M. F. Abdelmalek, F. Ezike, A. Ajie, F. Sarpong. *Матеріали XXV міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених*, 12–14 квітня 2021 р. Тернопіль, 2021. С. 206–207. (*Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та оформленні тез*).

18. Sarpong. Analytical support of innovative pharmaceutical development of antihypertensive drugs / K. Peleshok, N. Shulyak, A. E. Ajie, D. A. Abbeyquaye, O. J. Omotosho, M. F. Abdelmalek, O. F. Ezike, F. Agyemang. *Scientific community: interdisciplinary research : 3th International Scientific and Practical Conference*, 2021 March 16–18. Hamburg: Busse Verlag GmbH., 2021. P. 364–368. (*Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та оформленні тез*).

19. Peleshok K., Logoyda L. Method development for the quantitative determination of valsartan from caco-2 cell monolayers. *Current trends in pharmaceutical chemistry and standardization of medicines* : матеріали наук.-практ. конф. за міжнар. участю, 25–26 травня 2021 р. Тернопіль, 2021. С. 44. (*Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та оформленні тез*).

20. Development and validation of spectrophotometric methods for estimation of valsartan in dosage form / K. Peleshok, L. Kryskiw, T. Kucher, O. Poliak, L. Logoyda. *Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи* : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присв. 100-річчю Національного фармацевтичного університету, 10 вересня 2021 р. Харків, 2021. С. 275–276. (*Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та оформленні тез*).

21. Optimization of reaction variables for non-extractive spectrophotometric determination of valsartan via ion-pair complex formation with bromophenol blue / K. Peleshok, B. Bondar, L. Kryskiw, T. Kucher, O. Poliak, L. Logoyda. *100 РОКІВ УСПИХУ ТА ЯКОСТІ* : матеріали міжнародного наук.-практ. симп., присв. 100-річчю кафедри фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету, 18 жовтня 2021 р. Харків, 2021. С. 71–72. (*Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та оформленні тез*).

ANNOTATION

Peleshok K.Ye. Development and Validation of Methods for the Analysis of Valsartan and Atenolol in Drugs. – Qualifying scientific work on the rights of manuscript.

The dissertation on competition of a scientific degree of the Doctor of Philosophy, a specialty 226 «Pharmacy, Industrial Pharmacy» (22 «Health care») – Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University Ministry of Health of Ukraine, 2021.

Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University Ministry of Health of Ukraine, Ternopil, 2022.

In the dissertation has provided an experimental study of the development of spectrophotometric and chromatographic methods for the determination of valsartan and atenolol in substances and drugs.

The aim of work has been to develop express, easy to perform, available and validated spectrophotometric and chromatographic methods for the determination of valsartan and atenolol in substances and drugs.

Spectrophotometric methods for the determination of valsartan in substances and drugs by reaction with bromophenol blue (BPB) and methyl red (MR) have been developed and validated. Valsartan forms ion-pair complexes selectively with dyes, as evidenced by the formation of a colored complex with BPB at pH 5.5 with λ max

at 424 nm and MR at pH 4.3 with λ max at 494 nm. The formed ionic associates are sparingly soluble in water, but in optimized experimental conditions are soluble and do not require extraction with organic solvents, which is a significant advantage of the developed analytical methods. Optimization of spectrophotometric determination conditions is necessary for rapid and quantitative formation of color complexes of ionic associates with maximum stability and sensitivity. Maximum absorption has been observed in a solution of methanol with BPB, while ethanol, propanol, chloroform, acetonitrile and ethyl acetate have been unsuitable. Maximum absorption has been observed in a solution of ethanol with MC, while methanol, propanol, chloroform, acetonitrile and ethyl acetate have been unsuitable. It has been found that the investigated solutions are stable for 45 min. To establish the analytical rates of sensitivity of reaction of valsartan with BPB, the sensitivity of the reaction has been calculated. As a result of calculations of analytical indicators of sensitivity of reactions it is established that the reaction of valsartan with MR has higher sensitivity than reaction of valsartan with BPB, as evidenced by the high value of the molar absorption coefficient and the low value of the opening minimum. Stoichiometric ratios of reacting components of “valsartan – BPB/MR” are 1:1.

The developed analytical methods have been validated in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPhU) and ICH Q2 on the following indicators: selectivity, linearity, range of application, accuracy, precision and robustness.

In order to develop a method for the simultaneous quantification of valsartan and atenolol in a binary mixture containing 80 mg of valsartan and 100 mg of atenolol (fixed combination), the possibility of using the method of UV spectrophotometry has been considered. Preliminary tests have chosen the appropriate conditions for sample preparation and quantification. To calculate the quantitative content of valsartan and atenolol, the optical density has been measured at wavelengths of 249.5 nm (determination of valsartan) and 282 nm (determination of atenolol) relative to the compensation solution. Validation of the analytical method

has been performed according to the main validation characteristics: specificity, linearity, precision, correctness, robustness, range of application.

The proposed spectrophotometric methods for the determination of valsartan and atenolol in substances and drugs are simple, accurate, express, “green”, non-extractive, do not require the use of long sample preparation and expensive equipment. All developed techniques can be used in routine analysis to determine valsartan and atenolol in drugs containing these APIs.

The method of thin layer chromatography (TLC) has been chosen when developing methods for the identification of valsartan and atenolol in substances and drugs. The most optimal values of the retention rate of valsartan and atenolol for their simultaneous determination are observed when using the mobile phase – *n-butanol P* – *glacial acetic acid P* – *water P* (40:10:20).

Atenolol and valsartan due to their chemical structure have different solubilities in water and organic solvents, $\text{Log } P = 0.16$ and $\text{Log } P = 1.499$, respectively. This variation makes it difficult to create a fast successful and accurate chromatographic method for their simultaneous determination. The next step of study has been to optimize and critically evaluate the mobile phase, flow rate, detection wavelength, and chromatographic column (Zorbax C₈, Discovery C₁₈, LiChrospher® 60 RP-select B) to develop a chromatographic method for the determination of valsartan and atenolol.

Zorbax C₈ column, which is a classic reversed-phase column with a high surface area and phase stability, has been used in the development of HPLC/UV methods for the simultaneous determination of valsartan and atenolol in substances and drugs. Selected conditions of isocratic elution with a binary mobile phase consisting of *methanol P* and *25 mm potassium dihydrogen phosphate solution pH 7.3 (55:45)* have been selected. The selected experimental conditions have reduced the chromatography time and the amount of mobile phase used, which reduced the cost of the analysis, and at the same time provided the necessary specificity, accuracy and precision of the analysis results during quality control.

Validation of the method of quantitative production of valsartan and atenolol in tablets has been performed according to such validation characteristics as specificity, linearity, accuracy and precision and robustness.

We used the Discovery C₁₈ chromatographic column in the development of HPLC/UV methods for the simultaneous determination of valsartan and atenolol in substances and drugs. To find suitable HPLC conditions, we have previously tested isocratic and gradient mobile phase systems. First of all, a mixture of acetonitrile and 0.16 % ammonium acetate solution has been tested in different ratios, as a result of which the APIs have not been clearly separated. Ion pair reagent tetramethylammonium hydroxide has been tested and in this method it is not necessary to be replaced by similar ones, such as tetramethylammonium hydroxide sulfate, which has not been used in this experiment. Increasing the ammonium acetate salt concentration by more than 0.2 % pushes the atenolol peak closer to dead volume, which is unacceptable. Atenolol in multicomponent mixtures elutes in dead volume, so it is necessary to use a stronger hydrophobic mobile phase for simultaneous determination with valsartan. In the development of HPLC/UV methods for the quantitative determination of valsartan and atenolol in substances and drugs have been used conditions of isocratic elution with a mobile phase consisting of *acetonitrile P – 16% ammonium acetate solution P – 1.5 M tetramethylammonium hydroxide solution (20:80:0.2)* to achieve the optimal symmetry of the API peak, and the Discovery C₁₈ chromatographic column (4.6 mm i.d. X 150 mm, 5 µm). As a result – chromatograms have been obtained with satisfactory retention factors and good peak symmetry of both analyte peaks.

Validation of methods for quantitative determination of valsartan and atenolol in tablets has been performed according to such validation characteristics as specificity, linearity, accuracy and precision, robustness.

In the previous two chromatographic techniques, Zorbax C₈ and Discovery C₁₈ chromatographic columns have been used, which differ significantly from LiChrospher® 60 RP-select B columns by load of carbon, active surfaces, number of theoretical plates, metal cation residues and column sizes. In the development of this

analytical technique, the return of the elution peak due to a change in the type of phosphate buffer or the dependence of the type of phosphate buffer cation on the elution profile of different molecules is shown. This is important when choosing a method for studying impurities, degradation products or metabolites in the study of various analytes, degradation and bioequivalence products or pharmacokinetic studies.

To quantify the content of valsartan and atenolol in the substance, binary mixture and drug, HPLC/UV method has been developed using chromatographic columns LiChrospher® 60 RP-select B (4 mm i.d. X 125 mm, 5 µm) and LiChrospher® 60 RP-select B (4 mm i.d. X 250 mm, 5 µm). The typical chromatogram shows that the peaks meet the requirements of symmetry, and their intensity is sufficient for integration and further calculations.

In accordance with all the results presented above, it has been concluded that the transition from testing from the previous column Zorbax C₈ to LiChrospher® 60 RP-select B gave a lot of new interesting experimental results, facts and advantages in the approach to the development of methods for simultaneous determination of valsartan and atenolol. After establishing the direction of selection of the optimal composition of the mobile phase, sample preparation and other variables, LiChrospher® 60 RP-select B 250 mm column has been used and tested, which allows to see symmetrical peaks much better almost regardless of flow rate, higher resolution between peaks (about 4), twice the number of theoretical plates for peaks (4100-4440), is an important aspect in cases where better resolution is required.

Validation of methods for quantitative determination of valsartan and atenolol in tablets has been performed according to such validation characteristics as specificity, linearity, accuracy and precision, robustness.

It is known that the quality of drugs is laid at the stage of drug development. To date, it is not enough to determine only the qualitative composition and quantitative content of API in drugs. It is also necessary to assess the *in vitro* equivalence of drugs. To do this, validated analytical methods for quantifying API should be developed, which has been the final stage of our study.

As a result, we developed an analytical method for the quantitative determination of valsartan to study permeability across the intestinal membrane (Caco-2 test). Valsartan in the Caco-2 test system shows low permeability and undergoes active transportation. A decrease in the efflux ratio in the presence of verapamil indicates that this substance is a substrate of the P-gp transporter. The developed analytical method for determining valsartan to study the permeability through the intestinal membrane (Caco-2 test) is simple and express, which reduces the time and cost of analysis, respectively.

Transfer of analytical methods for determination of valsartan and atenolol (spectrophotometric and chromatographic methods) has been also performed. The proposed spectrophotometric and chromatographic methods for the simultaneous determination of valsartan and atenolol in tablets for use in the study of dissolution are correct, and the results of the analysis, respectively, correlate with each other.

Thus, the results of the research expand the horizons of pharmaceutical analysis and standardization of fixed antihypertensive combinations.

The novelty of developments is confirmed by the patents of Ukraine for the utility model.

Key words: antihypertensive drugs, atenolol, bioequivalence, validation, valsartan, HPLC/UV, spectrophotometry, TLC, pharmaceutical analysis, fixed combination.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	23
ВСТУП	24
РОЗДІЛ 1 АНАЛІЗ ІСНУЮЧИХ ПІДХОДІВ ЩОДО РОЗРОБКИ ТА ВАЛІДАЦІЇ МЕТОДІВ АНАЛІЗУ ВАЛСАРТАНУ ТА АТЕНОЛОЛУ В СУБСТАНЦІЯХ, ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ ТА БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	32
1.1 Загальна характеристика валсартану та атенололу	32
1.2 Огляд методик контролю якості АФІ та лікарських засобів з валсартаном	33
1.3 Огляд методик контролю якості АФІ та лікарських засобів з атенололом	44
1.4 «Дерево рішень» щодо вибору методик аналізу валсартану та атенололу	57
Висновки до розділу 1	59
РОЗДІЛ 2 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ОБ’ЄКТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА МОДЕЛЮВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ	61
2.1 Фізико-хімічні властивості об’єктів дослідження	62
2.2 Характеристика методик дослідження	63
2.2.1 Спектрофотометрична методика визначення валсартану в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромфеноловим синім	63
2.2.2 Спектрофотометрична методика визначення валсартану в субстанції та лікарських засобах за реакцією з метиловим червоним	65
2.2.3 Спектрофотометрична методика одночасного	

	визначення валсартану та атенололу в бінарній суміші та лікарських засобах	66
	2.2.4 ТПХ-методика визначення валсартану та атенололу в субстанції та лікарських засобах	68
	2.2.5 ВЕРХ-методика кількісного визначення валсартану та атенололу у субстанції та лікарських засобах на колонці Zorbax C ₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм)	69
	2.2.6 ВЕРХ-методика кількісного визначення валсартану та атенололу у субстанції та лікарських засобах на колонці Discovery C ₁₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм)	71
	2.2.7 ВЕРХ-методика кількісного визначення валсартану та атенололу у субстанції та лікарських засобах на колонках LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 125 мм, 5 мкм) та LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 250 мм, 5 мкм)	72
	2.2.8 ВЕРХ-методика кількісного визначення валсартану та атенололу для застосування в дослідженнях на моделях <i>in vitro</i> (тест Caco-2)	73
	2.2.9 ВЕРХ-методики кількісного визначення валсартану та атенололу для вивчення тесту «Розчинення»	78
РОЗДІЛ 3	РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИХ МЕТОДИК ВИЗНАЧЕННЯ ВАЛСАРТАНУ ТА АТЕНОЛОЛУ В СУБСТАНЦІЯХ ТА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ	79
	3.1 Розробка та валідація спектрофотометричної методики визначення валсартану в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромфеноловим синім	79
	3.1.1 Прогноз повної невизначеності методики	85
	3.1.2 Селективність методики	86

3.1.3 Лінійність, діапазон застосування методики	87
3.1.4 Правильність та прецизійність методики	88
3.1.5 Робасність методики	89
3.1.6 Оцінки озеленіння аналітичної методики	90
3.2 Розробка та валідація спектрофотометричної методики визначення валсартану в субстанції та лікарських засобах за реакцією з метиловим червоним	91
3.2.1 Прогноз повної невизначеності методики	96
3.2.2 Селективність методики	98
3.2.3 Лінійність, діапазон застосування методики	98
3.2.4 Правильність та прецизійність методики	100
3.2.5 Робасність методики	101
3.2.6 Оцінки озеленіння аналітичної методики	102
3.3 Розробка та валідація спектрофотометричної методики одночасного визначення валсартану та атенололу в бінарній суміші та лікарських засобах	103
3.3.1 Прогноз повної невизначеності методики	105
3.3.2 Специфічність методики	107
3.3.3 Лінійність, діапазон застосування методики	107
3.3.4 Правильність та прецизійність методики	110
3.3.5 Робасність методики	113
3.3.6 Оцінки озеленіння аналітичної методики	113
Висновки до розділу 3	114
РОЗДІЛ 4 РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ ХРОМАТОГРАФІЧНИХ МЕТОДИК ВИЗНАЧЕННЯ ВАЛСАРТАНУ ТА АТЕНОЛОЛУ В СУБСТАНЦІЯХ ТА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ	116
4.1 Розробка та валідація ТШХ-методики визначення	

валсартану та атенололу в субстанції та лікарських засобах	116
4.2 Розробка та валідація методики кількісного визначення валсартану та атенололу в субстанції та лікарських засобах методом ВЕРХ/УФ на колонці Zorbax C ₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм)	117
4.2.1 Прогноз повної невизначеності методики	119
4.2.2 Специфічність методики	121
4.2.3 Лінійність, діапазон застосування методики	121
4.2.4 Правильність та прецизійність методики	122
4.2.5 Робасність методики	125
4.2.6 Оцінки озеленіння аналітичної методики	127
4.3 Розробка та валідація методики кількісного визначення валсартану та атенололу в субстанції та лікарських засобах методом ВЕРХ/УФ на колонці Discovery C ₁₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм)	128
4.3.1 Прогноз повної невизначеності методики	130
4.3.2 Специфічність методики	132
4.3.3 Лінійність, діапазон застосування методики	133
4.3.4 Правильність та прецизійність методики	135
4.3.5 Робасність методики	138
4.3.6 Оцінки озеленіння аналітичної методики	139
4.4 Розробка та валідація методик кількісного визначення валсартану та атенололу в субстанції та лікарських засобах методом ВЕРХ/УФ на колонках LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 125 мм, 5 мкм) та LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 250 мм, 5 мкм)	140
4.4.1 Прогноз повної невизначеності методики	146
4.4.2 Специфічність методики	148

4.4.3 Лінійність, діапазон застосування методики	148
4.4.4 Правильність та прецизійність методики	153
4.4.5 Робастність методики	155
4.4.6 Оцінки озеленіння аналітичної методики	157
Висновки до розділу 4	158
РОЗДІЛ 5 УНІФІКОВАНА ПРОЦЕДУРА РОЗРОБКИ ТА ВАЛІДАЦІЇ МЕТОДИК КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ВАЛСАРТАНУ ТА АТЕНОЛОЛУ ДЛЯ ОЦІНКИ ЕКВІВАЛЕНТНОСТІ <i>IN VITRO</i> З ВИКОРИСТАННЯМ ХРОМАТОГРАФІЧНИХ ТА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИХ МЕТОДІВ	160
5.1 Обґрунтування процедури розробки методики визначення валсартану для вивчення проникності через кишкову мембрану	160
5.2 Уніфікована процедура розробки та валідації методик кількісного визначення валсартану та атенололу для застосування в тесті «Розчинення»	165
Висновки до розділу 5	171
ВИСНОВКИ	172
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	175
ДОДАТКИ	198

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФІ	– активний фармацевтичний інгредієнт
БСК	– біофармацевтична система класифікації
ВЕРХ/МС/МС	– високоефективна рідинна хроматографія з подвійною мас-спектрометричною детекцією
ВЕРХ/УФ	– високоефективна рідинна хроматографія з УФ детекцією
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

У XXI столітті розповсюдженість артеріальної гіпертензії (АГ) залишається провідною медико-соціальною проблемою. АГ – найбільш поширене неінфекційне захворювання, яке супроводжується високою смертністю серед осіб працездатного віку та їх інвалідністю від серцево-судинних і цереброваскулярних захворювань. Згідно відповідних протоколів для лікування АГ найчастіше застосовують антигіпертензивні препарати 5 основних класів – препарати першої лінії, які при застосуванні в еквівалентних дозах сприяють зниженню АГ та суттєво зменшують ризик серцево-судинних ускладнень. Доволі часто лікарі призначають два/три лікарських засоби (ЛЗ) одночасно, що створює певні незручності для пацієнтів і збільшує навантаження на їх печінку. Тому, інноваційна фармацевтична розробка різних антигіпертензивних засобів та створення вітчизняних фіксованих комбінацій ЛЗ з різнонаправленою дією є актуальним завданням сучасної фармації, що буде сприяти залученню більшого кола пацієнтів до лікування та профілактики серцево-судинних захворювань. Валсартан та атенолол є вдалою комбінацією для лікування пацієнтів з важкою есенціальною гіпертензією (Cifkova R., 1998). Вчені фармацевтичної компанії Novartis підтвердили безпеку застосування комбінації валсартану та атенололу (<https://clinicaltrials.gov>). До стандартизації лікарських форм (ЛФ) висувається системний та підтверджуючий підхід. Якість ЛФ закладається при фармацевтичній розробці, забезпечується в процесі виробництва, підтверджується методами контролю якості (МКЯ). Всі ці три складові повинні відповідати сучасним вимогам до ЛФ, їх виробництва і контролю. Методи контролю, що визначають рівень якості ЛФ, повинні відповідати рівню і потребам фармацевтичного виробництва тощо. Для таких цілей мають бути розроблені ефективні та надійні методики аналізу визначення активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) в субстанціях, модельних сумішах, ЛЗ.

Доцільність виконання дисертаційної роботи, в першу чергу, визначається принциповою відсутністю системних досліджень з визначення валсартану та атенололу, що дозволяє отримувати співставні результати від субстанції до стандартизації АФІ у бінарних ЛЗ та дасть змогу вирішити не тільки науково-теоретичне, але й значне прикладне завдання та оптимізувати аналітичне забезпечення фармацевтичної розробки антигіпертензивних ЛЗ на основі валсартану та атенололу у твердих дозованих лікарських формах (ЛФ) і як наслідок, забезпечити належний лікувальний ефект та безпеку застосування.

Шлях розв'язання окресленої проблеми полягає в площині створення уніфікованих підходів до розробки та валідації аналітичних методик валсартану та атенололу з урахуванням їх особливостей, цілей та задач.

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 валсартану та атенололу в субстанціях та ЛЗ.

Завдання дослідження:

- узагальнити інформацію щодо цілей, завдань, особливостей досліджень, ускладнень, які виникають під час розробки та валідації методик визначення валсартану та атенололу;
- розробити та валідувати спектрофотометричні методики кількісного визначення валсартану у складі готових ЛФ з бромфеноловим синім та метиловим червоним;

- експериментально обґрунтувати оптимальні умови утворення продуктів взаємодії валсартану з барвниками – вибір концентрації реагента, органічного розчинника, рН середовища; встановити коефіцієнти стехіометричних співвідношень «валсартан – реагент»;
- розробити та валідувати спектрофотометричну методику одночасного визначення валсартану та атенололу в бінарній суміші та ЛЗ;
- запропонувати ТШХ-методику визначення валсартану та атенололу в ЛЗ;
- розробити та валідувати хроматографічні методики визначення одночасного визначення валсартану та атенололу в бінарній суміші на колонках Zorbax C8, Discovery C18, LiChrospher® 60 RP-select B;
- запропонувати уніфіковану схему розробки аналітичних методик кількісного визначення валсартану та атенололу для оцінки еквівалентності *in vitro*.

Об'єкт дослідження: контроль якості ЛЗ на основі валсартану та атенололу.

Предмет дослідження: розробка спектрофотометричних та хроматографічних методик ідентифікації та кількісного визначення валсартану та атенололу і їх застосування для визначення кількісного вмісту основної речовини в АФІ, в моно- та багатокomпонентних ЛЗ, для оцінки еквівалентності *in vitro*.

Методи дослідження: високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), тонкошарова хроматографія (ТШХ) та 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 Caco-2).

Наукова новизна отриманих результатів

Вперше продемонстровано новітні підходи до розробки та валідації експресних аналітичних методик контролю якості АФІ та готових ЛФ валсартану та атенололу.

Вперше розроблено та валідовано спектрофотометричні методики визначення валсартану та атенололу в субстанціях та ЛЗ. Встановлено можливість застосування бромфенолового синього та метилового червоного при розробці спектрофотометричних методик визначення валсартану в субстанціях та ЛЗ. Досліджено оптимальні умови утворення продуктів взаємодії валсартану з барвниками – вибір концентрації реагента, органічного розчинника; встановлено коефіцієнти стехіометричних співвідношень «валсартан – реагент». Розроблено та валідовано спектрофотометричну методику одночасного визначення валсартану та атенололу в бінарній суміші та ЛЗ.

Вперше розроблено та валідовано хроматографічні методики одночасного визначення валсартану та атенололу в субстанціях та ЛЗ з використанням методів ТШХ та ВЕРХ (на хроматографічних колонках Zorbax C₈, Discovery C₁₈, LiChrospher® 60 RP-select B).

Вперше експериментально обґрунтовано процедуру розробки методик кількісного визначення валсартану та атенололу для оцінки еквівалентності *in vitro* з застосуванням спектрофотометричних та хроматографічних методів.

У процесі виконання експериментальної частини автором вперше розроблено та валідовано методики визначення валсартану для вивчення проникності через кишкову мембрану.

Вперше розроблено оригінальні методики кількісного визначення валсартану та атенололу для застосування у тесті «Розчинення».

На підставі запропонованих, принципів та підходів розроблено спосіб ізократичного хроматографічного визначення валсартану та атенололу в ЛЗ (Метод I) (патент України на корисну модель № 146653 від 10.03.2021), спосіб ізократичного хроматографічного визначення валсартану та атенололу в ЛЗ (Метод II) (патент України на корисну модель № 145731 від 29.12.2020), спосіб хроматографічного визначення валсартану та атенололу в ЛЗ (патент України на корисну модель № 145966 від 14.01.2021).

Практичне значення одержаних результатів

Розроблено оригінальні спектрофотометричні та хроматографічні методики визначення валсартану та атенололу в субстанціях та ЛЗ. Запропоновані методики можуть бути введені в проекти монографій ДФУ на таблетки валсартану та атенололу, а також застосовуватися аналітичними лабораторіями. Хроматографічні методики кількісного визначення валсартану в ЛЗ опрацьовано в умовах промислового виробництва публічного акціонерного товариства «Фармак», що засвідчено відповідним актом впровадження.

Розроблено та валідовано методики визначення валсартану 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 оригінальні методики кількісного визначення валсартану та атенололу для застосування у тесті «Розчинення» при вивченні 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 02.09.2021 р.), кафедри загальної, біонеорганічної та фізколоїдної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (акт впровадження від 03.09.2021 р.), кафедри фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету (акт впровадження від 01.09.2021 р.), кафедри медичної хімії Національного фармацевтичного університету (акт впровадження від 01.09.2021 р.), кафедри аналітичної хімії Запорізького державного медичного університету (акт впровадження від 02.09.2021 р.), кафедри фізколоїдної хімії Запорізького державного медичного університету (акт впровадження від 02.09.2021 р.), кафедри медичної та фармацевтичної хімії Буковинського державного медичного університету (акт впровадження від 02.09.2021 р.), кафедри хімії, фармацевтичного аналізу та післядипломної освіти Івано-Франківського

національного медичного університету (акт впровадження від 04.09.2021 р.), в практику роботи Державної служби з лікарських засобів та контролю за наркотиками в Тернопільській області (акт впровадження від 18.10.2021 р.).

Особистий внесок здобувача

Автором особисто:

- проаналізовано нормативні документи і оригінальні наукові публікації в галузі розробки та валідації методик аналізу валсартану та атенололу, інформацію щодо існуючих підходів до розробки і валідації аналітичних методик та процедури «біоверифікації» для стандартизації ЛЗ;
- розроблено та валідовано спектрофотометричні методики визначення валсартану та атенололу в субстанціях та ЛЗ;
- встановлено оптимальні умови проведення спектрофотометричних методик визначення валсартану та атенололу в субстанціях та ЛЗ;
- розроблено та валідовано хроматографічні методики визначення валсартану та атенололу в субстанціях та ЛЗ;
- підібрано оптимальні хроматографічні умови щодо рухомих фаз та хроматографічних колонок ;
- розроблено процедуру розробки методик кількісного визначення валсартану для оцінки еквівалентності *in vitro*;
- розроблено хроматографічну методику визначення валсартану та атенололу для вивчення проникності через кишкову мембрану;
- запропоновано методики кількісного визначення валсартану та атенололу 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 результати та положення дисертаційної роботи оприлюднено на XII Всеукраїнській науковій конференції студентів та аспірантів «Хімічні Каразінські читання – 2020» (Харків, 21-23 квітня 2020 р.), EFMC-ISMC&EFMC-YMCS, Virtual Poster Session Powered by the EFMC Young Scientists Network (9 вересня 2020), VIII науково-практичній конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 23-24 вересня 2020 р.), International conference «Contemporary pharmacy: issues, challenges and expectation. 2020 autumn» (Kaunas, 23 жовтня 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.), XXVIII міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених та студентів, присвяченій 150-річчю з дня народження М.О. Валяшка «Topical issues of new medicines development» (Харків, 18-19 березня 2021 р.), XXV міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених (Тернопіль, 12-14 квітня 2021 р.), науково-практичній конференції за міжнародною участю «Current trends in pharmaceutical chemistry and standardization of medicines» (Тернопіль, 25-26 травня 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.).

Обсяг та структура дисертації

Дисертаційна робота викладена на 216 сторінках машинописного тексту, складається з анотації, вступу, п'яти розділів, висновків, списку використаних джерел, що містить 192 найменувань (41 кирилицею та 151 латиною), додатків. Робота ілюстрована 55 таблицями, 49 рисунками. Список використаних джерел і додатки викладено на 41 сторінці.

РОЗДІЛ 1
АНАЛІЗ ІСНУЮЧИХ ПІДХОДІВ ЩОДО РОЗРОБКИ ТА ВАЛІДАЦІЇ
МЕТОДІВ АНАЛІЗУ ВАЛСАРАНУ ТА АТЕНОЛОЛУ В
СУБСТАНЦІЯХ, ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ ТА БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ
(ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Загальна характеристика валсартану та атенололу

Валсартан та атенолол – антигіпертензивні препарати з різними механізмами дії.

Валсартан – антигіпертензивний ЛЗ, специфічний антагоніст рецепторів ангіотензину II. Валсартан діє вибірково на рецептори підтипу AT₁. Призначається при артеріальній гіпертензії, при постінфарктному стані, для лікування симптоматичної серцевої недостатності, коли неможливим є застосування інгібіторів АПФ або як допоміжна терапія з інгібіторами АПФ, коли неможливим є застосування β-блокаторів [1]. У хімічному відношенні валсартан є (2S)-3-метил-2-[пентаноїл[[2'-(1H-тетразол-5-іл)біфеніл-4-іл]метил]аміно]бутановою кислотою [2].

Рекомендованою є доза 80 мг валсартану, яку можна підвищувати до 160 мг 1 раз на добу. Антигіпертензивний ефект досягається впродовж 2 тижнів, а максимальний ефект – через 4 тижні. Валсартан можна комбінувати з іншими антигіпертензивними ЛЗ.

Валсартан запатентовано у 1996 році у Європі [3]. Незважаючи на те, валсартан є одним з найбільш використовуваних сартанів та став препаратом-еталоном порівняно з іншими сартанами.

В Україні валсартан зареєстрований під такими торговими назвами: Аденіз, Вазар, Валмісар, Валсар, Валсартан КРКА, Валсартан Сандоз®, Валсартан-Тева, Вальсакор®, Вальсарія, Діован®, Діокор Соло, Кардопан-Сановель, Сакорд, Сартокад-В, Тіара Соло.

Атенолол – антигіпертензивний ЛЗ із антиангінальною та антиаритмічною дією, β -адреноблокатор. Призначається для лікування артеріальної гіпертензії, лікування та профілактики нападів стенокардії, аритмії, інфаркті міокарда [1]. У хімічному відношенні атенолол є 2-[4-[(2RS)-2-гідрокси-3-[(пропан-2-іл)аміно]пропокси]-феніл]ацетамідом [2].

Рекомендованою дозою є 50-100 мг на добу атенололу. Його можна комбінувати з іншими антигіпертензивними ЛЗ.

В Україні атенолол зареєстрований в Україні під торговою назвою АТЕНОЛОЛ-АСТРАФАРМ.

Аналіз інформації у Pubmed та ScienceDirect щодо комбінації валсартану з атенололом показав, що валсартан та атенолол є вдалим поєднанням у пацієнтів з важкою есенціальною гіпертензією [4]. Вчені фармацевтичної компанії Novartis підтвердили безпеку застосування комбінації валсартану та атенололу [5]. Науковець з Преторійського університету Кер J. описав переваги комбінацій («fixed dose combination») для лікування гіпертензії, а саме антагоністів рецепторів ангіотензину II та β -адреноблокатор [6].

1.2 Огляд методик контролю якості АФІ та лікарських засобів з валсартаном

У ДФУ немає монографії на субстанцію валсартану, проте, є на таблетки і капсули валсартану [7-15]. Для ідентифікації валсартану у таблетках та капсулах пропонується абсорбційна спектрофотометрія в інфрачервоній області та ВЕРХ/УФ. Для кількісного визначення валсартану в таблетках та капсулах – ВЕРХ/УФ відповідно. Хроматографічні умови для визначення препарату Валсартан (таблетки та капсули) наведені в монографії ДФУ, де використовується октадесильльна хроматографічна колонка 0.125 м X 3.0 мм та рухома фаза, яка складається з трьох компонентів: оцтової кислоти льодяної Р, ацетонітрилу Р1 і води Р (1:500:500). Розчинник – рухома фаза, швидкість рухомої фази – 0.4 мл/хв, довжина хвилі детектування – 225 нм відповідно.

У ЄФ [2] є монографія на субстанцію валсартану. Ідентифікацію валсартану ЄФ регламентує здійснювати абсорбційною спектрофотометрією в інфрачервоній області, визначення енантімерної чистоти та оптичного обертання, кількісне визначення – титриметрія (розчинник – 2-пропанол, титрант – 0.1 М тетрабутиламоній гідроксид). Для визначення енантімерної чистоти пропонується методика ВЕРХ/УФ з використанням хіральної колонки 0.25 м X 4.6 мм та рухомої фази, що складається з трифлуороцтової кислоти Р, 2-пропанолу Р та гексану Р (0.1:15:85). Розчинник – рухома фаза, швидкість рухомої фази – 0.8 мл/хв, довжина хвилі детектування – 230 нм.

У 2018 році Європейська агенція з ЛЗ (ЕМА) повідомила про те, що канцерогенна домішка N-нітрозодиметиламіну (NDMA) виявлена в субстанції валсартану багатьох виробників [16]. ЄФ регламентує визначення канцерогенних домішок нітрозамінів в валсартані. Вміст N-нітрозодиметиламіну (NDMA) у валсартані не має перевищувати 0.3 ppm, N-нітрозодидетиламіну (NDEA) – 0.082 ppm. Одна із найбільш часто використовуваною методикою визначення домішок нітрозамінів в сартанах представлена French National Agency for Medicines and Health Products Safety, Laboratory Controls Division – French OMCL [17]. ВЕРХ/УФ методика передбачає використання хроматографічної колонки Inertsil ODS-3, 4.6 x 250 мм, 5 мкм та градієнтного елюювання (рухома фаза А – метанол – вода (35:65), рухома фаза Б – вода – метанол (25:75)), довжина хвилі детектування – 228 нм. Межа виявлення (МВ) та межа кількісного визначення (МКВ) NDMA у валсартані становить 0.02 ppm та 0.04 ppm, NDEA – 0.04 ppm та 0.08 ppm відповідно.

У науковій літературі описані методики кількісного визначення валсартану методом спектрофотометрії – за власним світлопоглинанням [18-24] та за продуктами реакції з різними реагентами [25, 26], методами хроматографії [18, 27-43].

Вченими Tatar S., Sağlık S. розроблено три методики кількісного визначення валсартану у ЛЗ. Перша методика полягала у використанні УФ-

спектрофотометрії та вимірюванні оптичної густини розчину валсартану в глибокому ультрафіолеті при 205.6 нм. Лінійність методики вивчалася в діапазоні концентрацій 2.0-100 мкг/мл. Для другої методики, відстані між двома екстремальними значеннями (амплітуди від піку до піку) 221.6 і 231.2 нм були виміряні у похідних спектрах другого порядку стандартних розчинів валсартану. Третя методика базувалася на ВЕРХ/УФ на колонці C_{18} з використанням ацетонітрилу, фосфатного буфера як рухомої фази та лозартану як внутрішнього стандарту. Довжина хвилі детектування – 265 нм. Лінійність методики вивчалася в діапазоні концентрацій 1.0-5.0 мкг/мл [18].

Pradhan Kishanta Kumar et al. описано УФ-спектрофотометричну методику вивчення стресової деградації валсартану. Вимірювання оптичної густини проводили при 249 нм. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 5-100 мкг/мл. Валсартан піддавали впливу кислотного та лужного гідролізу, окиснення, фотолітичної та термічної деградації та аналізували зразки за допомогою запропонованого способу, щоб продемонструвати специфічність методики [19].

Вченими Gupta K. R., Wadodkar A. R., Wadodkar S. G. розроблено дві спектрофотометричні методики визначення валсартану в таблетках. Спектри нульового порядку валсартану в метанолі давали максимум поглинання при 250 нм (Методика I), спектри другого порядку – при 241 нм (Методика II). Калібрувальні графіки були лінійними ($R^2 = 0.999$) у діапазоні концентрацій 10-50 мкг/мл. Розроблені методики були валідовані та можуть використовуватися при його рутинному аналізі таблеток валсартану [20].

Trupti Sureshrao Tajane запропоновано спектрофотометричну методику визначення валсартану за площею під кривою. Площа між двома довжинами хвиль 238.2 нм та 254.4 нм на спектрі була прямо пропорційно концентрації валсартану. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 2-10 мкг/мл ($R^2 = 0.996$). Запропонована спектрофотометрична методика була валідована та може застосовуватися для рутинного аналізу валсартану в ЛЗ [21].

Monika L. Jadhav et al. описано дві спектрофотометричні методики сумісного визначення валсартану та гідрохлортіазиду в таблетках. Перша методика базувалася на вирішенні одночасних рівнянь на основі вимірювання поглинання при двох довжинах хвиль 249.4 нм та 272.6 нм відповідно для валсартану та гідрохлортіазиду. Друга методика була розроблена з використанням методу коефіцієнта поглинання, який передбачав формування рівняння Q-поглинання при 258.4 нм (точка ізоабсорбції), а також при 272.6 нм (гідрохлортіазиду). Методики були лінійними в діапазоні концентрацій 5–30 мкг/мл для валсартану та 4–24 мкг/мл для гідрохлортіазиду з використанням 0.1 М натрію гідроксиду як розчинника. Обидві запропоновані методики сумісного визначення валсартану та гідрохлортіазиду у таблетках є простими, експресними та можуть бути використані для контролю якості ЛЗ [22].

Вченими Nayam M. Lotfy, Maha A. Hegazy, Shereen Mowaka, Ekram Hany Mohamed розроблено спектрофотометричні методики визначення валсартану, амлодипіну та гідрохлортіазиду в потрійній суміші. Запропоновані методики мали декілька послідовних кроків, що використовували нульовий та/або співвідношення та/або похідні спектри. Застосовуючи послідовне віднімання спектра у поєднанні з методом постійного множення, досліджувані лікарські засоби були отримані у спектрах поглинання їх нульового порядку та визначені на їх максимумах 237.6 нм, 270.5 нм та 250 нм відповідно; в той час як шляхом послідовного віднімання похідних вони були отримані в їхніх перших похідних спектрах і визначені за P230.8–246, P261.4–278.2, P233.7–246.8 для амлодипіну, гідрохлортіазиду та валсартану. Запропоновані методики застосовані для аналізу ЛЗ [23].

Amira H. Kamal et al. запропоновано чотири спектрофотометричні методики визначення валсартану та небівололу гідрохлориду в таблетках. Методика I – це площа під кривою (AUC), яка ґрунтувалася на вимірюванні площі між 246 і 256 нм для валсартану та 273 та 283 нм для небівололу. Методика II застосовувала першу похідну спектрів співвідношень (1DD), використовуючи 40.0 мкг/мл валсартану для визначення небівололу, амплітуда

піку при 294.5 нм була прямо пропорційна концентрації небівололу. 30.0 мкг/мл небівололу використовували для визначення валсартану. Амплітуда піку при 253.4 нм була прямо пропорційна концентрації валсартану. Методка III – метод різниці у співвідношеннях (RD), який базувався на вимірюванні різниці амплітуд (ΔP) у спектрах співвідношень; ΔP (291-275) був прямо пропорційний концентрації небівололу, а ΔP (239.2-301.5) був прямо пропорційний концентрації валсартану. Калібрувальні криві трьох методик були лінійними у діапазонах концентрацій 2.0–80.0 мкг/мл та 4.0–80.0 мкг/мл для небівололу та валсартану відповідно. Методика IV передбачала багатоваріантні спектрофотометричні методи, включаючи класичні найменші квадрати, регресію головних компонентів та часткові найменші квадрати, застосовані до спектрів УФ-поглинання стандартних розчинів, що містять обидва ЛЗ, зафіксовані в діапазоні 272–282 нм. Лінійність була вивчена в діапазоні концентрацій 5.0–60.0 мкг/мл небівололу та 15.0–80.0 мкг/мл валсартану. Чотири розроблені методики були валідовані та показали успішне застосування для сумісного визначення валсартану та небівололу у їх синтетичних сумішах [24].

Індійськими вченими розроблено спектрофотометричні методики визначення валсартану та езетимібу в ЛЗ з використанням сульффтаїнових барвників таких як бромфенолового синього та бромкрезолового зеленого. Методика базувалася на утворенні іонного асоціату – продукту взаємодії валсартану з сульффталеїновими барвниками. Утворений жовтий іон-парний продукт давав батохромний зсув у спектрі з максимумами поглинання 425 нм (бромфеноловий синій) та 428 нм (бромкрезоловий зелений). Авторами встановлено, що стехіометричні співвідношення реагуючих компонентів становили 1:1 для обох продуктів реакцій. Підпорядкування закону Бугера-Ламберта-Бера за реакцією з бромфеноловим синім – 5-50 мкг/мл для валсартану та 1-50 мкг/мл для езетимібу. Запропонований метод був успішно застосований на ЛЗ, зокрема таблетки [25].

Єгипетськими науковцями з Мінійського університету запропоновано спектрофотометричні та спектрофлуориметричні методики визначення деяких антагоніст рецепторів ангіотензину II таких як лосартан, ірбесартан, телмісартан та валсартан у субстанціях та таблетках. Спектрофотометричні методики базувалися на взаємодії лосартану, ірбесартану, телмісартану з сульфоталеїновими барвниками для утворення стабільного комплексу жовтого кольору з максимум поглинання при 413-419 нм. Спектрофлуориметрична методика ґрунтувалася на утворенні між ними не екстрагуючого бінарного комплексу еозину та лосартану, ірбесартану, телмісартану та валсартану. Запропоновані методики рекомендовані для рутинного фармацевтичного аналізу, де час та економічна ефективність мають велике значення [26].

Методи рідинної хроматографії широко застосовуються в аналізі валсартану як в субстанції, так і в моно- та комбінованих ЛЗ та плазмі крові [18-27-43].

Вченими Patro S. K., Kanungo S. K., Patro V. J., Choudhury N. S. розроблено ВЕРХ/УФ методику визначення валсартану в субстанції та таблетованих ЛФ з використанням рухомої фази, що складалася з буфера рН 3.5 та метанолу (50:50) та хроматографічної колонки Phenomenex Gemini C₁₈ (4.6 мм × 250 мм, 5 мкм). Детектування проводили за довжини хвилі 210 нм та швидкості рухомої фази 1.0 мл/хв. Час утримування валсартану в запропонованих хроматографічних умовах становив 11.04 хв. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 50-175 мкг/мл. Розроблена методика була валідована та може бути використана при рутинному контролі таблетованих форм валсартану [27].

Обернено-фазова ВЕРХ з УФ-спектрофотометричним детектуванням методика визначення валсартану в таблетках була описана Vinzuda D. U. et al. В запропонованій методиці використовується хроматографічна колонка Thermo-hypersil ODS (150 мм × 4.6 мм i.d., 5 мкм) та рухома фаза – суміш води, ацетонітрилу та льодяної оцтової кислоти (500:500:0.1), швидкість рухомої

фази – 1.0 мл/хв, довжина хвилі детектування – 273 нм. МВ становила 2.72 мкг/мл, МКВ – 8.25 мкг/мл відповідно. Час утримування валсартану складав 4.6 хв. Розроблена методика була успішно застосована для кількісного визначення валсартану в таблетованих ЛФ [28].

Parambi D. G. T. et al. розроблено методику обернено-фазової ВЕРХ з УФ-спектрофотометричним детектуванням валсартану в таблетках. Методика пропонувалась з використанням рухомої фази, яка містить суміш амонію дигідрогенфосфатного буфера та метанолу(33.5:66.5). Швидкість рухомої фази – 1.0 мл/хв, хроматографічна колонка – C₁₈ (250 мм x 4.6 мм), детектування при довжині хвилі – 265 нм. Час утримування валсартану становив 11.9 хв. Запропонована методика може бути застосована для проведення контролю якості таблеток валсартану [29].

Вченими Krishnaiah S., Reddy A. R., Kumar R., Mukkanti K. запропоновано УВЕРХ/УФ методику визначення валсартану та продуктів його деградації в АФІ та лікарських формах з використанням хроматографічної колонки Waters Aquity VEN C₁₈ (100 мм x 2.1 мм) та градієнтного елюювання. Довжина хвилі детектування становила 225 нм, загальний час хроматографування – 9.5 хв. Розроблена методика була валідована відповідно до керівних принципів Міжнародної конференції з гармонізації (ICH) щодо специфічності, лінійності, МВ, МКВ, правильності, прецизійності та робастності [30].

Індійськими науковцями розроблено ВЕРХ/УФ методику сумісного визначення валсартану та езетимібу в ЛЗ. В запропонованій методиці застосовується хроматографічна колонка C₁₈ та фосфатний буфер і ацетонітрил (58:42, рН 3.15) як рухома фаза. Швидкість рухомої фази – 0.8 мл/хв, детектування при довжині хвилі – 230 нм. Авторами також було вивчено стресову деградацію для демонстрації стабільності аналітичної методики. МВ становила 0.2 мкг/мл та 0.3 мкг/мл для валсартану та езетимібу відповідно, МКВ – 1 мкг/мл для обох аналітів. Розроблена методика є простою, точною та може бути використаною для сумісного визначення валсартану та езетимібу в ЛФ [31].

Tian D. F. et al. запропоновано методику обернено-фазової ВЕРХ з УФ-спектрофотометричним детектуванням валсартану та гідрохлортіазиду в таблетках з використанням колонки Diamonsil (TM) C₁₈ (200 мм × 4.6, 5 мм мкм) та рухомої фази, що складалася із метанолу, ацетонітрилу, води та ізопропанолу (22:18:68:2; рН 8.0). Швидкість рухомої фази – 1.0 мл/хв, детектування при довжині хвилі – 270 нм. Час утримування валсартану становив 3.42 хв, гідрохлортіазиду – 8.43 хв. Запропонована методика є правильною та прецизійною та може застосовуватися для сумісного визначення валсартану та гідрохлортіазиду в таблетках [32].

Обернено-фазова ВЕРХ з УФ-спектрофотометричним детектуванням методика визначення валсартану та небівололу гідрохлориду в субстанціях та ЛФ була описана Kalpana Nekkala et al. В запропонованій методиці використовується хроматографічна колонка Inertsil ODS 3V (150 мм x 4.6 мм, 5 мкм) та рухома фаза – суміш ацетонітрилу, метанолу та калію гідрогенфосфатного буфера рН 4.0 (50:20:30), швидкість рухомої фази – 1.0 мл/хв, довжина хвилі детектування – 210 нм. Час утримування небівололу та валсартану складав 2.3 хв та 4.3 хв відповідно. Розроблена методика була успішно використана для рутинного аналізу небівололу та валсартану в комбінованих ЛФ [33].

Вченими Syed Sarim Imam, Abdul Ahad, Mohammed Aqil, Yasmin Sultana, Asgar Ali розроблено ВЕРХ/УФ методику визначення валсартану та пропранололу в АФІ та комбінованих ЛФ з використанням хроматографічної колонки Hypersil ODS (200 мм x 4.6 мм, 5 мкм) та рухомої фази, що складалася з ацетонітрилу, метанолу та 0.01 М розчину динатрію гідроген фосфату рН 3.5 (50:35:15). Час утримування валсартану та небівололу становив 9.76 хв та 6.62 хв відповідно. Розроблена методика була успішно застосована для аналізу пропранололу та валсартану в ЛФ [34].

Lakshmi K. S. et al. запропоновано методику обернено-фазової ВЕРХ з УФ-спектрофотометричним детектуванням валсартану та рамиприлу в бінарній комбінації з використанням колонки Hypersil C₁₈ (250 мм × 4.6 мм, 5 мкм) та

рухомої фази, що складалася із ацетонітрилу та води (55:45). Швидкість рухомої фази – 1.0 мл/хв, детектування при довжині хвилі – 215 нм. Час утримування валсартану становив 4.82 хв, рамиприлу – 1.91 хв відповідно. Розроблена методика може застосовуватися для сумісного визначення валсартану та рамиприлу в бінарній суміші [35].

Турецькими науковцями розроблено ВЕРХ/УФ методику одночасного визначення валсартану та амлодипіну в комбінованих ЛФ. В запропонованій методиці застосовується хроматографічна колонка Waters Spherisorp ODS 2 (200 мм x 4.6 мм, 10 мкм) та фосфатний буфер рН 3.6, ацетонітрил та метанол (46:44:10) як рухома фаза. Швидкість рухомої фази – 1.0 мл/хв, детектування при довжині хвилі – 240 нм. Час утримування валсартану та амлодипіну становив 3.4 хв та 7.1 хв відповідно. Розроблена методика успішно застосована для контролю якості амлодипіну та валсартану в їх комбінованому ЛЗ та дослідженні розчинення *in vitro* [36].

Вченими Chitlange S. S., Bagri K., Sakarkar D. M. запропоновано ВЕРХ/УФ методику визначення валсартану та амлодипіну в капсулах з використанням хроматографічної колонки Kromasil C₁₈ (250 мм x 4.6 мм) та рухомої фази, що складалася з ацетонітрилу та фосфатного буфера (0.02 М, рН 3.0) (56:44). Довжина хвилі детектування становила 234 нм, швидкість рухомої фази – 1.0 мл/хв. Час утримування амлодипіну та валсартану становив 3.07 хв та 6.20 хв відповідно. Розроблена методика була валідована відповідно до керівних принципів Міжнародної конференції з гармонізації (ICH). Розроблена методика була застосована для визначення амлодипіну та валсартану в присутності продуктів деградації [37].

Українськими вченими Olga Yuryeva, Yuliya Kondratova, Liliya Logoyda розроблено ВЕРХ/УФ методику визначення валсартану та амлодипіну в комбінованих ЛЗ та проведено вивчення розчинення *in vitro*. В запропонованій методиці застосовується хроматографічна колонка Zorbax Eclipse XDB-C18 (2.1 мм × 150 мм, 5 мкм) та вода, ацетонітрил та трифлуороцтова кислота (55:45:0.1) як рухома фаза. Швидкість рухомої фази – 0.4 мл/хв, детектування при довжині

хвилі – 265 нм. Час утримування валсартану та амлодипіну становив 4.08 хв та 1.64 хв відповідно Розроблена методика успішно застосована для контролю якості амлодипіну та валсартану в їх комбінованих ЛЗ та дослідженні розчинення *in vitro* [38].

Методи ВЕРХ/УФ визначення валсартану в ЛЗ, які описані в літературних джерелах, наведено в табл. 1.1.

Вченими Масек J., Klíma J., Ptáček P. запропоновано експресну методику визначення валсартану в плазмі крові з використанням метанолу як протейнового преципітуючого агента, оксадецилсилікагельної хроматографічної колонки (50 мм x 4 мм, 5 мкм), рухомої фази, що складалася з ацетонітрилу та 15 мМ дишідрогенкалію фосфату рН 2.0 (45:55). Час хроматографування становив, відповідно, 2.8 хв. Методика була застосована для вивчення фармакокінетики [39].

Piao Z. Z. et al. розроблено методику обернено-фазової ВЕРХ з УФ-спектрофотометричним детектуванням валсартану для вивчення фармакокінетики. Методика пропонувалась з використанням рухомої фази, яка містила суміш 42% ацетонітрилу з 15 мМ калію дигідрогенфосфатом у воді (рН 2.0), хроматографічної колонки Phenomenex Luna C₁₈ та швидкості рухомої фази – 1.2 мл/хв. Спіронолактон був використаний як внутрішній стандарт. Час утримування валсартану становив 10.25 хв та внутрішнього стандарту 12.17 хв. Запропонована методика є експресною та специфічною та може бути використана для клінічних випробувань [40].

Вченими Koseki N., Kawashita H., Nara H., Niina M., Tanaka M., Kawai R., Nagaе Y., Masuda N. запропоновано методику визначення валсартану в плазмі крові з використанням ВЕРХ/МС/МС. Авторами використано метод твердофазної екстракції. Розроблена методика була повністю валідована у відповідності до вимог валідації біоаналітичних методик. Науковцями було встановлено, що запропонована методика ВЕРХ/МС/МС покращує кількісне визначення валсартану, дозволяючи його фармакокінетичну оцінку з клінічно значущими дозами [41].

Таблиця 1.1 – Методи ВЕРХ/УФ визначення валсартану в ЛЗ, описані в літературних джерелах

№	Зразок	Колонка	Рухома фаза	Детектор	Хроматографічні умови	Посилання на джерело літератури
1	Таблетки	Phenomenex Gemini C ₁₈ (4.6 мм × 250 мм, 5 мкм)	Буфер рН 3.5 та метанол (50:50)	УФ (210 нм)	Швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв	[27]
2	Таблетки	Thermo-hypersil ODS (150 мм × 4.6 мм i.d., 5 мкм)	Вода, ацетонітрил та льодяна оцтова кислота (500:500:0.1)	УФ (273 нм)	Швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв	[28]
3	Таблетки	C ₁₈ (250 мм × 4.6 мм)	Амонію дигідрогенфосфатний буфер та метанол(33.5:66.5)	УФ (265 нм)	Швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв	[29]
4	ЛФ	Waters Aquity BEH C ₁₈ (100 мм × 2.1 мм)	Градiєнтне елюювання	УФ (225 нм)	Не вказано	[30]
5	ЛЗ	C ₁₈	Фосфатний буфер та ацетонітрил (58:42, рН 3.15)	УФ (230 нм)	Швидкість рухомої фази 0.8 мл/хв	[31]
6	Таблетки	Diamonsil (TM) C ₁₈ (200 мм × 4.6, 5 мм мкм)	Метанол:ацетонітрил:вода:ізопропанол (22:18:68:2; рН 8.0)	УФ (270 нм)	Швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв	[32]
7	ЛФ	Inertsil ODS 3V (150 мм × 4.6 мм, 5 мкм)	Ацетонітрил, метанол та калію гідрогенфосфатний буфер рН4.0 (50:20:30)	УФ (210 нм)	Швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв	[33]
8	ЛФ	Hypersil ODS (200 мм × 4.6 мм, 5 мкм)	Ацетонітрил, метанол та 0.01 М розчин динатрію гідроген фосфату рН 3.5 (50:35:15)	Не вказано	Швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв	[34]
9	Бінарна комбінація з рамиприлом	Hypersil C ₁₈ (250 мм × 4.6 мм, 5 мкм)	Ацетонітрил та вода (55:45)	УФ (215 нм)	Швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв	[35]
10	ЛФ	Waters Spherisorp ODS 2 (200 мм × 4.6 мм, 10 мкм)	Фосфатний буфер рН 3.6, ацетонітрил та метанол (46:44:10)	УФ (240 нм)	Швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв	[36]
11	Капсули	Kromasil C ₁₈ (250 мм × 4.6 мм)	Ацетонітрил та фосфатний буфер (0.02 М, рН 3.0) (56:44)	УФ (234 нм)	Швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв	[37]
12	ЛФ	Zorbax Eclipse XDB-C18 (2.1 мм × 150 мм, 5 мкм)	Вода, ацетонітрил та трифлуороцтова кислота (55:45:0.1)	УФ (265 нм)	Швидкість рухомої фази 0.4 мл/хв	[38]

Нао Li. et al. розроблено ВЕРХ/МС/МС методику одночасного визначення валсартану та гідрохлортіазиду в плазмі крові з використанням ацетонітрилу як протеїнового преципітуючого агента, хроматографічної колонки Zorbax SB-Aq C₁₈, рухомої фази, що складалася з ацетонітрилу та 10 мМ розчину амонію ацетату (60:40, рН 4.5). Час утримування валсартану становив 2.08 хв, гідрохлортіазиду – 1.50 хв. Методика була застосована для вивчення фармакокінетики [42].

Вченими Р. Senthamil Selvan, К. Veeran Gowda, U. Mandal, W. D. Sam Solomon, Т. К. Pal описано ВЕРХ/МС/МС методику визначення валсартану та небівололу в плазмі крові. Небіволол та валсартан екстрагували з плазми за допомогою ацетонітрилу та розділяли на колонці C₁₈. Рухома фаза – суміш ацетонітрилу та 0.05 мМ мурашиної кислоти (50:50, рН 3.5). Методика була успішно застосована для фармакокінетичного дослідження фіксованих комбінації небівололу та валсартану після перорального введення здоровим людям [43].

1.3 Огляд методик контролю якості АФІ та лікарських засобів з атенололом

У ДФУ представлена монографія на субстанцію атенололу [7-15]. Для ідентифікації атенололу у субстанції пропонуються методи визначення температури плавлення, абсорбційна спектрофотометрія в УФ-, видимій та інфрачервоній областях та ТШХ, для кількісного визначення атенололу в субстанції – ацидиметрія у неводному середовищі з потенціометричним фіксуванням кінцевої точки титрування. Для визначення супровідних домішок пропонується ВЕРХ методика з використанням октадецилсілільної колонки (125 мм x 4 мм) та рухомої фази, що містить 1.0 г натрію октансульфонату Р, 0.4 г тетрабутиламонію гідроксиду Р, які розчиняють в 1 л суміші тетрагідрофурану Р – метанолу Р2 – розчину 3.4 г/л калію дигідрофосфату Р

(20:180:800); рН доводять до 3.0 фосфорною кислотою Р. Швидкість рухомої фази – 0.6 мл/хв, детектування – за довжини хвилі 226 нм.

У ЄФ [2] є монографія на субстанцію атенололу і вона ідентична монографії, яка представлена в ДФУ.

У науковій літературі описані методики кількісного визначення атенололу методом спектрофотометрії – за продуктами реакції з різними реагентами [44-56] та за власним світлопоглинанням [57-62], методами хроматографії [63-82].

Значний внесок у розробку аналітичних методик визначення атенололу в ЛЗ зробили українські вчені. Так, під керівництвом проф. Васюк С. О. розроблено ряд методик визначення атенололу методами спектрофотометрії. Одна із них полягала у взаємодії 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону з атенололом у середовищі ДМФА з утворенням забарвленої сполуки з максимумом абсорбції при довжині хвилі 493 нм. Підпорядкування закону Бера спостерігалось в межах концентрацій 11.20–19.60 мг/100 мл, коефіцієнт кореляції становив 0,9990 відповідно. Запропонована методика була повністю валідована та застосована для аналізу атенололу у готових ЛФ [44].

Ще однією методикою, яка була розроблена Запорізькою науковою школою під проф. Васюк С. О., була розроблена спектрофотометрична методика, яка базувалася на взаємодії атенололу з бромтимоловим синім в ацетоні з утворення сполуки з максимумом поглинання при 402 нм. Оптимальні умови кількісного визначення атенололу та коефіцієнти стехіометричного співвідношення між атенололом та бромтимоловим синім було встановлено. Запропонована методика є валідованою та підходить для рутинного контролю якості ЛЗ, що містять атенолол [45].

Вченими Малецькою О. Р. та Васюк С. О. запропоновано спектрофотометричну методику визначення атенололу в таблетках за реакцією з діазолем червоним ЖЖ у середовищі вода-метанол. Методами насичення та неперервних змін встановлено стехіометричне співвідношення «атенолол – діазоль червоний ЖЖ» – 1:1. Авторами також проведена валідація розробленої

методики. З огляду на отримані дані розроблена методика може бути використана у відділах контролю якості хіміко-фармацевтичних підприємств [46].

Науковцями Національного фармацевтичного університету розроблена спектрофотометрична методика визначення атенололу в присутності ніфедипіну і хлорталідону у комбінованих таблетках «Тонорма». Атенлол містить естерне угруповання, за рахунок чого, утворює похідне гідроксамової кислоти, яке з солями Fe(III) в кислому середовищі забарвлюється у червоно-фіолетовий колір з максимумом поглинання 500 нм. Авторами встановлено підпорядкованість стандартних розчинів гідроксамового похідного атенололу закону Бугера-Ламберта-Бера (від 0,01 % до 0,005 %), МВ = 1,04; МКВ = 7,32. Ніфедипін та хлорталідон не вступають в дану реакцію, тому не заважають визначенню атенолола [47].

Agrawal Y. K. et al. запропоновано просту спектрофотометричну методику визначення атенололу шляхом утворення гідроксамової кислоти у ЛФ. Методика базувалася на здатності атенололу реагувати з гідроксиламіну гідрохлоридом в лужному середовищі з одержанням 2-*n*-гідрокси-3-ізо-пропіламінопропоксифенілацетогідроксамової кислоти, який утворював червонувато-фіолетовий колірний комплекс з залізо (III) у кислому середовищі, що мав максимум поглинання при 510 нм, допоміжні речовини не заважали визначенню атенололу [48].

Вченими Kudige N. Prashanth та Kanakapura Basavaiah описано три спектрофотометричні методики визначення атенололу в субстанціях та таблетках. Методики базувалися на бромованні атенололу бромом, утвореним *in situ* під дією кислоти на суміш бромат-броміду, з подальшим визначенням непрореагованого броду шляхом взаємодії з фіксованою кількістю або мета-крезолового пурпурового, і вимірювання поглинання при 540 нм (методика А) та 445 нм (методика В) або еріоглауцину та вимірювання поглинання при 630 нм (методика С). Запропоновані спектрофотометричні методи були валідовані [49].

Bashir N. et al. розроблено спектрофотометричну методику визначення атенололу, яка базувалася на дезамінуванні атенололу в лужному середовищі з наступним додаванням нітропрусиду натрію для утворення забарвленого комплексу, який мав максимум поглинання при довжині хвилі 495 нм. Запропонована спектрофотометрична методика була успішно застосована для визначення атенололу в ЛФ [50].

Індійськими вченими запропоновано три спектрофотометричні методики визначення атенололу в ЛЗ з використанням хлораміну-Т та двох барвників метанілового жовтого та індигокарміну. У спектрофотометричних методиках атенолол окислювався відомим надлишком хлораміну-Т у кислому середовищі з наступним визначенням непрореагованого окислювача, шляхом взаємодії з фіксованою кількістю або метанілового жовтого (методика В), або індигокарміну (методика С) та вимірювання збільшення поглинання при довжині хвилі 530 нм або 610 нм. Розроблені спектрофотометричні методики були валідовані та мали застосування в аналізі атенололу в готових ЛФ [51].

Saleem B. A. описано спектрофотометричну методику визначення атенололу в субстанції та ЛФ, яка базувалася на окисленні атенололу хроматом у кислому середовищі. Залишкова кількість окислювача реагувала з барвником індигокарміну у присутності оксалату як каталізатора. Максимум поглинання продукту реакції спостерігався при 610 нм. Запропонована методика була успішно застосована для визначення атенололу в субстанціях та ЛФ [52].

Сирійськими вченими з Університету Алеппо розроблено спектрофотометричну методику визначення атенололу в субстанції та таблетках, яка базувалася на взаємодії атенололу з бромкрезоловим зеленим у середовищі 1,2-дихлоретану з утворенням жовтого іонно-парного комплексу з максимумом поглинання 414 нм. Авторами оптимізовано різні параметри, що впливають на реакцію, такі як: вплив розчинників, часу, концентрація реагенту, коефіцієнт кореляції тощо. Методика була успішно застосована для визначення атенололу в ЛЗ шести сирійських виробників ліків [53].

Бразильськими науковцями запропоновано спектрофотометричну методику визначення атенололу в ЛФ, яка ґрунтувалася на взаємодії атенололу з *n*-хлоранілом з утворенням забарвленого продукту реакції з максимумом поглинання при 550 нм. Запропонована методика була успішно застосована для аналізу ЛЗ різних виробників ліків, і результати, отримані розробленою методикою, добре узгоджувалися з результатами, отриманими за допомогою методики, яка представлена у Британській фармакопеї [54].

Akram M. El-Didamony, Moftah A. Moustafa розроблено спектрофотометричну методику визначення атенололу та тимололу в субстанціях та ЛФ. Розроблена методика базувалася на окисно-відновній реакції між досліджуваними аналітами та KMnO_4 у лужному середовищі та утворенні блакитно-зеленого продукту реакції з максимумом поглинання при довжині хвилі 610 нм. Методика була повністю валідована та може бути застосована для визначення атенололу та тимололу в ЛФ [55].

Amal H. Mhemeed описано спектрофотометричну методику визначення метопрололу та атенололу в субстанціях, яка базувалася на реакції відновлення Fe (III) у кислому середовищі та подальшій взаємодії Fe (II) з фериціанідом з утворенням берлінської лазурі з максимумом поглинання при 762 нм [56].

Турецьким вченим з Університету Ататюрка Bilal Yilmaz запропоновано спектрофотометричні методики похідних нульового, першого, другого та третього порядку для кількісного визначення атенололу в ЛЗ. У спектрофотометрії нульового порядку абсорбцію вимірювали при довжині хвилі 276 нм у спектрах нульового порядку розчину атенололу в метанолі в діапазоні 245-310 нм. У першій похідній спектрофотометрії значення поглинання вимірювали при 273 нм, 276 нм та 285 нм. У другій похідній спектрофотометрії значення поглинання вимірювали при 276 нм, 279 нм, 282 нм та 287 нм. У третій похідній спектрофотометрії значення поглинання вимірювали при 275 нм, 278 нм та 281 нм. Такі валідаційні параметри, як лінійність, правильність, прецизійність, специфічність, стабільність, МВ та МКВ, були вивчені відповідно до Міжнародної конференції з настанов щодо

гармонізації (ICH). Калібрувальні криві були лінійними між діапазоном концентрацій 2,5-17,5 мкг/мл. Розроблені методики були успішно застосовані для аналізу таблеток атенололу, і результати були статистично порівняні між собою [57].

Avula S. et al. розроблено спектрофотометричну методику визначення атенололу та амлодипіну безилату в комбінованих ЛФ. Довжини хвиль, вибрані для визначення атенололу, становили 230 нм та 242 нм, тоді як довжини хвиль, вибрані для визначення амлодипіну безилату – 263 нм та 277 нм відповідно. Методика була успішно застосована для визначення цих аналітів у лабораторно підготовлених сумішах та комерційних таблетках [58].

Індійськими вченими описано спектрофотометричну методику визначення атенололу в комбінації з калію лозартаном та гідрохлортіазидом. Методика використовувалася формування та розв'язування одночасного рівняння з використанням максимумів поглинання 251.60 нм і 224.20 нм для калію лозартану та атенололу, 224.20 нм і 271.60 нм для атенололу та гідрохлортіазиду як двох аналітичних довжин хвиль, використовуючи метанол як розчинник. Запропонована методика була валідована [59].

Shoab Syed та Mubashir Mohammed запропоновано спектрофотометричну методику визначення атенололу в таблетках з використанням максимуму поглинання при довжини хвилі 226.6 нм. Зразки готували з розчином фосфатного буфера рН 6.8. Розроблена методика була простою, швидкою і мала застосування для визначення атенололу в таблетках [60].

Karam Mohamad Aboud et al. розроблено спектрофотометричну методику визначення атенололу в субстанції та ЛФ з використанням максимуму поглинання атенололу в метанолі 225 нм. Запропонована методика була успішно застосована для визначення атенололу у субстанції та комерційних таблетках [61].

Вченими Pooja A. Patil, Hasumati A. Raj, Gautam B. Sonara описано спектрофотометричну методику визначення атенололу та івабрадину

гідрохлориду у синтетичній суміші. Авторами було встановлено, що максимуми поглинання атенололу та івабрадину гідрохлориду становили 276.00 нм та 286.50 нм відповідно. Запропонована методика була ефективно застосована для визначення атенололу та івабрадину гідрохлориду у бінарній суміші [62].

Методи рідинної хроматографії широко застосовуються в аналізі атенололу як в субстанції, так і в моно- та комбінованих ЛЗ та плазмі крові [63-82].

Ceresole R. et al. розроблено ВЕРХ/УФ методику визначення атенололу за наявності продуктів деградації в таблетках з використанням хроматографічної колонки Waters μ Bondapak[®] C₁₈ та рухомої фази, що складалася з ацетонітрилу та 0.08 М розчину динатрію гідроген фосфату рН 3.0 (10:90). Швидкість рухомої фази – 1.0 мл/хв, детектування при довжині хвилі – 284 нм. Розроблена методика була успішно застосована для аналізу атенололу в таблетках [63].

Обернено-фазова ВЕРХ з УФ-спектрофотометричним детектуванням методика визначення атенололу в ЛФ була описана Belal F. et al. В запропонованій методиці використовується хроматографічна колонка LiChrospher[®] 100-RP₈ (250 мм × 4.0 мм i.d., 5 мкм) та рухома фаза – суміш ацетонітрилу, метанолу та 0.02 М фосфатного буфера рН 5.0 (20:20:60), швидкість рухомої фази – 1.0 мл/хв, довжина хвилі детектування – 226 нм. Методика показала хорошу лінійність в діапазоні концентрації 0,05-10 мкг/мл з МВ 0.01 мкг/мл та МКВ 0.03 мкг/мл. Авторами вивчено прискорену деградацію та встановлено, що розроблена методика була успішно застосована для кількісного визначення атенололу в ЛФ [64].

Вченими V.L. Bhaskar, S. Anil Kumar, Kumar, U. RbAnil описано ВЕРХ/УФ методику визначення атенололу в ЛФ з використанням хроматографічної колонки Atlantis dC₁₈ (250 мм × 4.6 мм, 5 мкм). Швидкість рухомої фази – 1.0 мл/хв, довжина хвилі детектування – 225 нм. Авторами було продемонстровано, що методика є правильною та прецизійною, що дає змогу

використовувати її для рутинного контролю якості атенололу у відповідних лабораторіях [65].

Бразильськими науковцями розроблено ВЕРХ/УФ методику визначення атенололу в ЛФ. В запропонованій методиці використовується хроматографічна колонка Purospher RP-18 (250 мм х 4.6 мм, 5 мкм) та рухома фаза – суміш 10 мМ амонію ацетату буферного розчину рН 5.0 та ацетонітрилу (80:20), швидкість рухомої фази – 0.8 мл/хв, довжина хвилі детектування – 275 нм. Час утримування атенололу складав 2.7 хв. Запропонована методика була простою, експресною, прецизійною і може використовуватися для рутинного контролю якості ЛЗ [66].

Naveen Kumar et al. розроблено ВЕРХ/УФ методику визначення атенололу в ЛФ з використанням хроматографічної колонки Inertsil ODS C₁₈ (250 мм х 4.6 мм, 5 мкм) та рухомої фази, що складалася з фосфатного буферного розчину та ацетонітрилу (53:47). Швидкість рухомої фази – 1.2 мл/хв, детектування при довжині хвилі – 230 нм. Час утримування атенололу у зазначених хроматографічних умовах становив 2.1 хв. Розроблена методика була успішно застосована для рутинного аналізу атенололу в ЛФ [67].

Вченими K. G. Baheti, N. Shah, S. Shaikh запропоновано ВЕРХ/УФ методику визначення атенололу та індапаміду в субстанціях та комбінованих ЛФ з використанням хроматографічної колонки Xterra® C₁₈ (150 мм × 4.6 мм, 5 мкм) та іонпарних реагентів в складі рухомої фази (0.1% розчину октансульфонатної кислоти натрійної солі у воді та метанолу (55:45)). Довжина хвилі детектування – 235 нм. Час утримування атенололу складав 2.0, індапаміду – 6.1 хв відповідно. Запропонована методика була повністю валідована [68].

Обернено-фазова ВЕРХ з УФ-спектрофотометричним детектуванням методика визначення атенололу та амлодипіну безилату в таблетованих ЛФ була описана Palani Shanmugasundaram et al. В запропонованій методиці використовується хроматографічна колонка Kromasil C₁₈ (250 мм х 4.6 мм, 5 мкм) та рухома фаза – суміш ацетонітрилу, калію дигідрогенфосфату (0.01 М,

pH 3.0) та метанолу (15:30:55), довжина хвилі детектування – 254 нм. Час утримування амлодипіну безилату складав 2.59 хв, атенололу – 3.71 хв відповідно. МВ становила 0,001 мкг/мл та 0,005 мкг/мл, а МКВ – 0,004 мкг/мл та 0,015 мкг/мл для амлодипіну безилату та атенололу відповідно. Методика придатна для аналізу амлодипіну безилату та атенололу в таблетованих ЛФ в біорелевантних середовищах розчинення [69].

Md. Ahsanul Haque et al. розроблено ВЕРХ/УФ методику визначення атенололу та амлодипіну в таблетованих ЛФ з використанням хроматографічної колонки Waters C₁₈ (150 мм х 4.6 мм, 5 мкм) та рухомої фази – суміші буферного розчину, метанолу та ацетонітрилу (35:55:10). Швидкість рухомої фази – 1.0 мл/хв, детектування при довжині хвилі – 237 нм. Час утримування атенололу у запропонованих хроматографічних умовах становив 1.67 хв, амлодипіну – 5.00 хв відповідно. Розроблену методику можна використовувати як більш зручний та ефективний варіант для аналізу атенололу і амлодипіну у таблетованій ЛФ [70].

Індійськими вченими Blessen P., Juddy J., Sundarapandian M. запропоновано ВЕРХ/УФ методику визначення атенололу та амлодипіну безилату в ЛФ з використанням хроматографічної колонки Inertsil C₁₈ (250 мм × 4.6 мм, 5 мкм) та рухомої фази – суміші буферного розчину, ацетонітрилу та метанолу (4:3.5:2.5), довжини хвилі детектування – 225 нм та швидкості рухомої фази – 1.0 мл/хв. Час утримування атенололу складав 2.23 хв, амлодипіну безилату – 5.97 хв відповідно. Запропонована методика може використовуватися для рутинного контролю якості обох аналітів у поєднанні в таблетованій ЛФ [71].

Обернено-фазова ВЕРХ з УФ-спектрофотометричним детектуванням методика визначення амлодипіну безилату, атенололу та аспірину в субстанціях та ЛФ описано Bhusari Vidhya K. et al. У розробленій методиці використовується хроматографічна колонка Thermo Hypersil BDS–C₁₈ (250 мм х 4.6 мм, 5 мкм) та рухома фаза – суміш метанолу та 10 мМ фосфатного буфера pH 3.0 (70:30), довжина хвилі детектування – 235 нм та швидкість рухомої фази

– 1.0 мл/хв. Час утримування амлодипіну безилату склав 2.58 хв, атенололу – 3.40 хв та аспіріну – 4.23 хв відповідно. Аналітична методика придатна для аналізу амлодипіну безилату, атенололу та аспіріну в ЛФ [72].

Бразильськими вченими запропоновано ВЕРХ/УФ методику визначення чотирьох аналітів (атенололу, фуросеміду, лозартану, спіронолактону) в антигіпертензивних суміші з використанням хроматографічної колонки Kinetex® C-18 (100 мм × 4.6 мм, 2.6 мкм) та рухомої фази, що складалася з метанолу та води (75:25). Довжина хвилі детектування атенололу – 225 нм, фуросеміду, лозартану, спіронолактону – 240 нм. Швидкість рухомої фази – 0.4 мл/хв. Загальний час хроматографування склав 5 хв. Розроблена методика була успішно застосована для сумісного визначення атенололу, фуросеміду, лозартану та спіронолактону в сумішах [73].

Науковцями Maitreyi N. Zaveri та Amit Khandhar розроблено ВЕРХ/УФ методику визначення атенололу та гідрохлортіазиду в ЛФ з використанням хроматографічної колонки Zorbax SB-CN (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм) та рухомої фази, що складалася з води, буфера та метанолу (50:35:15). Швидкість рухомої фази – 1.2 мл/хв, детектування при довжині хвилі – 286 нм. Час утримування атенололу становив 5.02 хв та гідрохлортіазиду – 7.67 хв відповідно. Запропонована методика була успішно застосована для рутинного аналізу атенололу та гідрохлортіазиду в ЛФ [74].

Обернено-фазова ВЕРХ з УФ-спектрофотометричним детектуванням методика визначення аспіріну, рамиприлу, гідрохлортіазиду, симвастатину та атенололу в ЛФ описано Bhusari Savita S. Yadav et al. У розробленій методиці використовується хроматографічна колонка Hypersil Gold (250 мм X 4.6 мм, 5 мкм) та рухома фаза – суміш метанолу та води (95:5), довжина хвилі детектування – 230 нм та швидкість рухомої фази – 1.0 мл/хв. Час утримування аспіріну склав 1.98 хв, рамиприлу – 2.52 хв, гідрохлортіазиду – 3.11 хв, симвастатину – 3.87 хв та атенололу – 7.83 хв відповідно. Аналітична методика була повністю валідована та придатною для аналізу аспіріну, рамиприлу, гідрохлортіазиду, симвастатину та атенололу в ЛФ [75].

Ehab Farouk Elkady et al. розроблено ВЕРХ/УФ методику визначення атенололу, гідрохлортіазиду та хлорталідону за наявності продуктів деградації у ЛФ з використанням хроматографічної колонки Inertsil® ODS-3V C₁₈ (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм) та рухомої фази – суміші 25 мМ водного розчину калію дигідрогенфосфату рН 6.8 та ацетонітрилу (77:23). Швидкість рухомої фази – 1.0 мл/хв, детектування при довжині хвилі – 235 нм. Запропонована методика продемонструвала специфічність, робастність та правильність для контролю якості аналізованих АФІ у ЛФ [76].

Вченими A.B. Thomas, U.B. Chavan, R.K. Nanda, L.P. Kothapalli, S.N. Jagdale, S.B. Dighe, And A.D. Deshpande запропоновано ВЕРХ/УФ методику визначення атенололу, гідрохлортіазиду та лозартану калію в таблетках з використанням хроматографічної колонки Kinetex® C-18 (100 мм × 4.6 мм, 2.6 мкм) та градієнтного елюювання (рухома фаза А – вода – ацетонітрил, рухома фаза В – натрію дигідрогенфосфат – ацетонітрил). Довжина хвилі детектування атенололу – 225 нм, час утримування атенололу становив 2.91 хв, гідрохлортіазиду – 4.75 хв, лозартану калію – 7.52 хв. Запропонована методика була успішно застосована для сумісного визначення атенололу, гідрохлортіазиду та лозартану калію в таблетках [77].

Методи ВЕРХ/УФ визначення атенололу в ЛЗ, які описані в літературних джерелах, наведено в табл. 1.2.

Вченими Bilal Yilmaz, Sakir Arslan, Ali Ascı запропоновано ВЕРХ методику визначення атенололу в плазмі крові з використанням флуоресцентного детектора, метопрололу як внутрішнього стандарту, хроматографічної колонки Ace C18 (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм), рухомої фази, що складалася з метанолу та води (50:50). Розроблена біоаналітична методика була успішно застосована для вивчення фармакокінетики у шести пацієнтів з артеріальною гіпертензією, які приймали перорально таблетки атенололу 50 мг [78].

Таблиця 1.2 – Методи ВЕРХ/УФ визначення атенололу в ЛЗ, описані в літературних джерелах

№	Зразок	Колонка	Рухома фаза	Детектор	Хроматографічні умови	Посилання на джерело літератури
1	2	3	4	5	6	7
1	Таблетки	Waters μ Bondapak [®] C ₁₈	Ацетонітрил та 0.08 М розчин динатрію гідроген фосфату рН 3.0 (10:90).	УФ (284 нм)	Швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв	[63]
2	ЛФ	LiChrospher [®] 100-RP8 (250 мм ×4.0 мм i.d., 5 мкм)	Ацетонітрил, метанол та 0.02 М фосфатний буфер рН 5.0 (20:20:60)	УФ (226 нм)	Швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв	[64]
3	ЛФ	Atlantis dC ₁₈ (250 мм × 4.6 мм, 5 мкм)	Не вказано	УФ (225 нм)	Швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв	[65]
4	ЛФ	Purospher RP-18 (250 мм × 4.6 мм, 5 мкм)	10 мМ амонію ацетату буферний розчин рН 5.0 та ацетонітрил(80:20)	УФ (275 нм)	Швидкість рухомої фази 0.8 мл/хв	[66]
5	ЛФ	Inertsil ODS C ₁₈ (250 мм × 4.6 мм, 5 мкм)	Фосфатний буферний розчин та ацетонітрил (53:47)	УФ (230 нм)	Швидкість рухомої фази 1.2 мл/хв	[67]
6	Комбіновані ЛФ	Xterra [®] C ₁₈ (150 мм × 4.6 мм, 5 мкм)	0.1% розчин октансульфонатної кислоти натрійної солі у воді та метанол (55:45)	УФ (235 нм)	Не вказано	[68]
7	Таблетовані ЛФ	Kromasil C ₁₈ (250 мм × 4.6 мм, 5 мкм)	Ацетонітрил, калію дигідрогенфосфат (0.01 М, рН 3.0) та метанол (15:30:55)	УФ (254 нм)	Не вказано	[69]
8	Таблетовані ЛФ	Waters C ₁₈ (150 мм × 4.6 мм, 5 мкм)	Буферний розчин, метанол та ацетонітрил (35:55:10)	УФ (237 нм)	Швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв	[70]
9	Таблетовані ЛФ	Inertsil C ₁₈ (250 мм × 4.6 мм, 5 мкм)	Буферний розчин, ацетонітрил та метанол (4:3.5:2.5)	УФ (225 нм)	Швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв	[71]
10	ЛФ	Thermo Hypersil BDS-C ₁₈ (250 мм × 4.6 мм, 5 мкм)	Метанол та 10 мМ фосфатний буфер рН 3.0 (70:30)	УФ (235 нм)	Швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв	[72]

Продовження таблиці 1.2

1	2	3	4	5	6	7
11	Модельні суміші	Kinetex® C-18 (100 мм × 4.6 мм, 2.6 мкм)	Метанол та вода (75:25)	УФ (225 нм)	Швидкість рухомої фази 0.4 мл/хв	[73]
12	ЛФ	Zorbax SB-CN (250 мм × 4.6 мм, 5 мкм)	Вода, буфер та метанол (50:35:15)	УФ (286 нм)	Швидкість рухомої фази 1.2 мл/хв	[74]
13	ЛФ	Hypersil Gold (250 мм × 4.6 мм, 5 мкм)	Метанол та вода (95:5)	УФ (230 нм)	Швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв	[75]
14	ЛФ	Inertsil® ODS-3V C ₁₈ (250 мм × 4.6 мм, 5 мкм)	25 мМ водний розчин калію дигідрогенфосфату рН 6.8 та ацетонітрил (77:23)	УФ (235 нм)	Швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв	[76]
15	Таблетки	Kinetex® C-18 (100 мм × 4.6 мм, 2.6 мкм)	Градiєнтне елюювання (рухома фаза А – вода – ацетонітрил, рухома фаза В – натрію дигідрогенфосфат – ацетонітрил)	УФ (225 нм)	Не вказано	[77]

З метою визначення атенололу у зразках плазми крові людини Luis Renato Pires de Abreu et al. було розроблено методику ВЕРХ для порівняння біодоступності таблеток атенололу (50 мг) у 24 добровольців обох статей з вивченням таких фармакокінетичних параметрів як: AUC_{0-24h} , $AUC_{0-\infty}$, and C_{max} [79].

Єгипетськими вченими запропоновано ВЕРХ/УФ методику визначення атенололу та хлорталідону в плазмі крові з використанням внутрішнього стандарту гідрохлортиазиду, Shim-pack ціанопропільної колонки та рухомої фази – суміші 10 мМ калію дигідрогенфосфату рН 6.0 та метанолу (70:30), довжини хвилі детектування – 225 нм та швидкості рухомої фази – 1.0 мл/хв. Методика була повністю валідована відповідно до настанови з валідації біоаналітичних методик [80].

Jaivik V. Shah et al. розроблено ВЕРХ/МС/МС методику одночасного визначення атенололу та хлорталідону в плазмі крові з використанням атенололу-d7 та хлорталідону-d4 як внутрішніх стандартів, хроматографічної колонки Acquity UPLC BEH C_{18} (50 мм × 2.1 мм, 1.7 мкм), рухомої фази, що складалася з 0.1 % мурашинної кислоти та ацетонітрилу (25:75). Запропонована методика була успішно застосована для вивчення біоеквівалентності 50 мг атенололу+12,5 мг хлорталідону у 28 здорових добровольців-індусів [81].

Ізраїльськими вченими запропоновано ВЕРХ методику визначення атенололу в плазмі крові з використанням внутрішнього стандарту метопрололу та ціанопропільної колонки. Біоаналітична методика була валідована відповідно до настанови з валідації біоаналітичних методик та успішно застосована для вивчення фармакокінетики ЛФ атенололу [82].

1.4 «Дерево рішень» щодо вибору методик аналізу валсартану та атенололу

Аналізуючи матеріал, обговорений у даному розділі можна зробити висновок, що найбільш розповсюдженими методами кількісного визначення

валсартану та атенололу в субстанціях, ЛЗ та плазмі крові є УФ-спектрофотометрія та рідинна хроматографія. Метод ВЕРХ має беззаперечні переваги, пов'язані з селективністю, точністю та універсальністю методу. Проте, необхідність використання великої кількості органічних розчинників та дороговартісність обладнання і хроматографічних колонок є недоліками даного методу.

Метод УФ-спектрофотометрії можна віднести до експресних, недороговартісних та «зелених» методів аналізу, однак його недостатня селективність, особливо, у аналізі бінарних сумішей відноситься до недоліків методу [83-91].

На рис. 1.1 представлено «Дерево рішень» щодо вибору методик аналізу валсартану та атенололу.

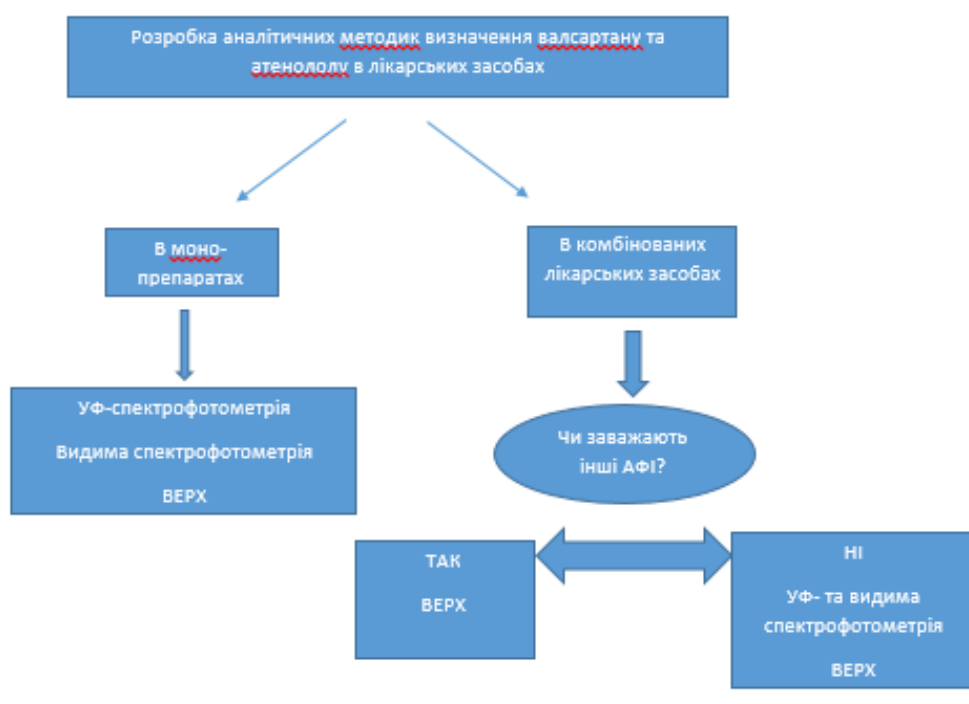


Рисунок 1.1 – «Дерево рішень» щодо вибору методик аналізу валсартану та атенололу

Насамперед, необхідно проаналізувати мету та завдання щодо проведення аналізу. Якщо це розробка аналітичних методик визначення валсартану та

атенололу в моно-препаратах, то безперечно аналітики можуть застосувати УФ- та видиму спектрофотометрію, а також – ВЕРХ.

Якщо ж перед аналітиками стоїть завдання розробити методики визначення валсартану та атенололу в комбінованих ЛЗ, то необхідно врахувати, чи будуть заважати визначенню інші АФІ, які входять в склад ЛЗ. Коли інші АФІ не заважають, то можна обрати методи УФ- та видимої спектрофотометрії, а також – ВЕРХ. Якщо ж інші компоненти ЛЗ, все ж таки, впливають на результати аналізу, то необхідно застосувати метод ВЕРХ.

Важливим аспектом сучасного фармацевтичного аналізу є дотримання принципів «зеленої хімії» [92-101], які повинні бути враховані при розробці аналітичних методик визначення валсартану та атенололу в субстанціях та ЛЗ.

Висновки до розділу 1

1. Валсартан та атенолол є вдалою комбінацією для лікування пацієнтів з важкою есенціальною гіпертензією. Вчені підтвердили безпеку застосування комбінації валсартану та атенололу та описали її переваги для лікування гіпертензії.

2. Аналіз існуючих методів визначення валсартану та атенололу показав, що найбільш використовуваними методами є ВЕРХ та УФ-та видима спектрофотометрія. Проте, і ці методи мають ряд недоліків: необхідність використання великої кількості органічних розчинників, а також тривалість та дороговартісність аналізу методом ВЕРХ; недостатня селективність УФ-та видимої спектрофотометрії.

3. Більшість методик ідентифікації та кількісного визначення валсартану та атенололу стосується їх визначення в моно-препаратах та ЛФ в комбінаціях з іншими АФІ. Методи одночасного визначення валсартану та атенололу залишаються не вирішеними.

4. З урахуванням недоліків існуючих методів визначення валсартану та атенололу у субстанціях та ЛЗ передбачається розробка і валідація нових методик аналізу.

5. Розроблено «Дерево рішень» щодо вибору методик аналізу валсартану та атенололу. Запропонована методологія дає змогу підібрати методи для розробки методів кількісного визначення ЛЗ на основі валсартану та атенололу.

РОЗДІЛ 2

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ОБ'ЄКТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА МОДЕЛЮВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ

Для експериментального підтвердження теоретичних підходів, які пропонуються нами у роботі, на підставі статистичних даних та аналітичних оглядів було обрано валсартан та атенолол, що відображає чітке розуміння питання щодо фармацевтичного аналізу та стандартизації ЛЗ валсартану та атенололу з використанням спектрофотометричних та хроматографічних методів; розроблено низку методик їх ідентифікації та кількісного визначення в субстанціях та ЛЗ, а також методик кількісного визначення аналітів для вивчення проникності через кишкову мембрану та для застосування в тесті «кінетика розчинення», проведено їх валідацію. Дизайн експерименту наведено на рис. 2.1.

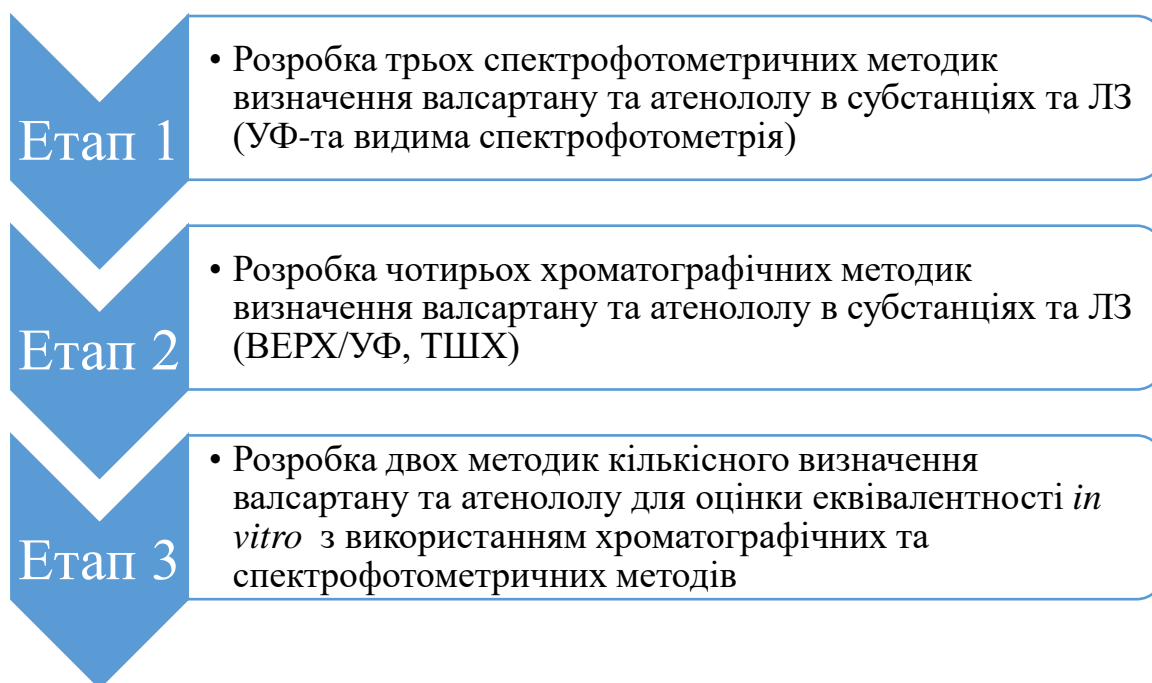


Рисунок 2.1 – Дизайн експерименту

У п. 2.1 цього розділу детально викладено фізико-хімічні властивості валсартану та атенололу.

2.1 Фізико-хімічні властивості об'єктів дослідження

У хімічному відношенні валсартан є (2S)-3-метил-2-[пентаноїл[[2'-(1H-тетразол-5-іл)біфеніл-4-іл]метил]аміно]бутановою кислотою [2] (рис. 2.2).

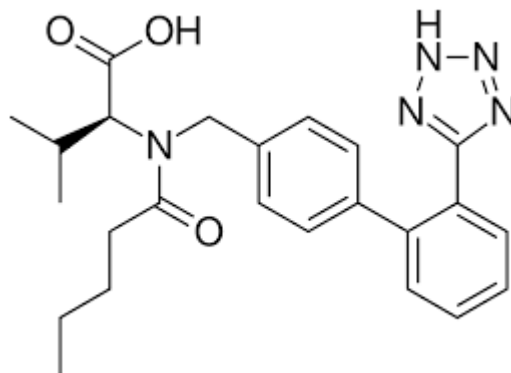
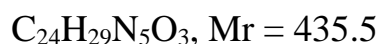


Рисунок 2.2 – Структурна формула валсартану



Фізико-хімічні властивості: білий чи майже білий гігроскопічний порошок. Практично нерозчинний у воді, розчинний у етанолі та метиленхлориді. Температура плавлення – 116-117 °С.

У роботі використовували Valsartan Ph. Eur. виробництва Sigma-Aldrich ($\geq 98\%$, ВЕРХ), ЛЗ Валсартану, таблетки по 80 мг та 160 мг, виробництва КРКА с. D77832, D93656, D75705, D77483, D77484, ТЕВА, Сандоз с. 049821, ЛЗ Амлосартан, таблетки 5/160 мг, виробництва Фармак с.10321.

У хімічному відношенні ателолол є 2-[4-[(2RS)-2-гідрокси-3-[(пропан-2-іл)аміно]пропокси]-феніл]ацетамідом [2] (Рис. 2.3).

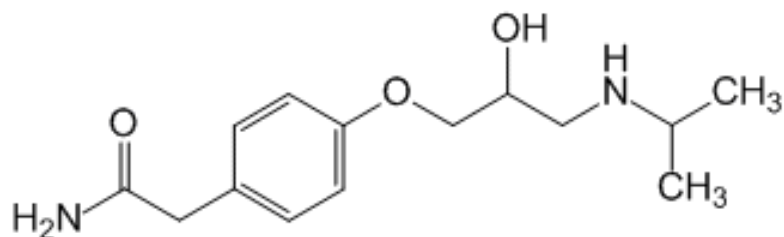
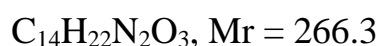


Рисунок 2.3 – Структурна формула ателололу



Фізико-хімічні властивості: білий чи майже білий порошок. Розчинний у воді, етанолі та метиленхлориді. Температура плавлення – 152-155°C.

У роботі використовували Atenolol Ph. Eur. виробництва Sigma-Aldrich ($\geq 98\%$, ТШХ) та Tokyo Chemical Industry CO., LTD (Японія), ЛЗ Атенололу, таблетки по 50 мг та 100 мг, виробництва АСТРАФАРМ с. 020819, 010221, 020520.

2.2 Характеристика методик дослідження

На основі власних, попередніх досліджень та аналізу наукових публікацій для ілюстрації процедури вибору оптимальних методик ідентифікації та кількісного визначення валсартану та атенололу в субстанціях та ЛЗ було обрано методи спектрофотометрії та хроматографії.

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, що відповідають ГОСТ 29169-91 «Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной меткой» (ISO 648-77) [102], 1770-74 «Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия» (ISO 1042-83, ISO 4788-80) [103].

2.2.1 Спектрофотометрична методика визначення валсартану в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромфеноловим синім [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., рН метр И-160МИ, мірний посуд класу А. Вимірювання абсорбції проводили у видимій 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 до вимог ДФУ.

Приготування випробовуваного розчину таблеток валсартану: точну наважку порошку розтертих таблеток, еквівалентну 25 мг валсартану, переносять до мірної колби на 25.00 мл, 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 0.4 мл розчину, переносять до мірної колби на 25.00 мл, додають 1.00 мл 1.3×10^{-3} М розчину бромфенолового синього (БФС) в метанолі *P*, доводять метанолом *P* до позначки та перемішують. Вимірюють абсорбцію забарвлених розчинів на фоні компенсаційного розчину за аналітичної довжини хвилі 424 нм.

Приготування випробовуваного розчину субстанції валсартану: 25 мг субстанції валсартану, переносять до мірної колби місткістю 25.00 мл, доводять метанолом *P* до позначки, витримують в ультразвуковій бані впродовж 2 хв.

0.4 мл отриманого розчину, переносять у мірну колбу об'ємом 25.00 мл, додають 1.00 мл 1.3×10^{-3} М розчину бромфенолового синього (БФС) в метанолі *P*, доводять метанолом *P* до позначки та перемішують. Вимірюють абсорбцію забарвлених розчинів на фоні компенсаційного розчину за аналітичної довжини хвилі 424 нм.

Приготування розчину порівняння валсартану: 25 мг ФСЗ валсартану вміщують до мірної колби місткістю 25.00 мл, розчиняють у метанолі *P* та доводять метанолом до позначки, перемішують.

0.4 мл розчину, переносять до мірної колби об'ємом 25.00 мл, додають 1.00 мл 1.3×10^{-3} М розчину бромфенолового синього (БФС) в метанолі *P*, доводять метанолом *P* до позначки та перемішують. Вимірюють абсорбцію забарвлених розчинів на фоні компенсаційного розчину за аналітичної довжини хвилі 424 нм.

Приготування компенсаційного розчину: 22 мг бромфенолового синього (БФС) вміщують до мірної колби місткістю 25.00 мл, розчиняють у метанолі *P* та доводять метанолом *P* до позначки, перемішують.

Вимірюють абсорбцію досліджуваного розчину та розчину порівняння на фоні компенсаційного розчину за аналітичної довжини хвилі 424 нм. Розрахунок вмісту діючої речовини проводять за загальноприйнятою формулою.

Для вивчення лінійності беруть 0.1-0.6 мл досліджуваного розчину.

2.2.2 Спектрофотометрична методика визначення валсартану в субстанції та лікарських засобах за реакцією з метиловим червоним [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., рН метр И-160МИ, мірний посуд класу А. Вимірювання абсорбції проводили у видимій 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 до вимог ДФУ.

Приготування випробовуваного розчину таблеток валсартану: точну наважку порошку розтертих таблеток, еквівалентну 11.75 мг валсартану, переносять до мірної колби об'ємом 25.00 мл, доводять етанолом *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 0.3 мл розчину, переносять до мірної колби місткістю 25.00 мл, додають 0.5 мл 3.7×10^{-3} М розчину метилового червоного (МЧ) в етанолі *P*, доводять етанолом *P* до позначки та перемішують. Вимірюють абсорбцію забарвлених розчинів на фоні компенсаційного розчину за аналітичної довжини хвилі 494 нм.

Приготування випробовуваного розчину субстанції валсартану: 11.75 мг субстанції валсартану, переносять до мірної колби об'ємом 25.00 мл, доводять етанолом *P* до позначки, витримують в ультразвуковій бані впродовж 2 хв.

0.3 мл отриманого розчину, переносять до мірної колби на 25.00 мл, додають 0.5 мл 3.7×10^{-3} М розчину метилового червоного (МЧ) в етанолі *P*, доводять етанолом *P* до позначки та перемішують. Вимірюють абсорбцію забарвлених розчинів на фоні компенсаційного розчину за аналітичної довжини хвилі 494 нм.

Приготування розчину порівняння валсартану: 11.75 мг ФСЗ валсартану вміщують до мірної колби місткістю 25.00 мл, розчиняють в етанолі *P* та доводять етанолом *P* до позначки, перемішують.

0.3 мл розчину, переносять до мірної колби на 25.00 мл, додають 0.5 мл 3.7×10^{-3} М розчину метилового червоного (МЧ) в етанолі *P*, доводять етанолом *P* до позначки та перемішують. Вимірюють абсорбцію забарвлених розчинів на фоні компенсаційного розчину за аналітичної довжини хвилі 494 нм.

Приготування компенсаційного розчину: 25 мг метилового червоного (МЧ) вміщують до мірної колби місткістю 25.00 мл, розчиняють в етанолі *P* та доводять етанолом *P* до позначки, перемішують.

Вимірюють абсорбцію досліджуваного розчину та розчину порівняння на фоні компенсаційного розчину за аналітичної довжини хвилі 494 нм. Розрахунок вмісту діючої речовини проводять за загальноприйнятою формулою.

Для вивчення лінійності беруть 0.1-0.5 мл досліджуваного розчину.

2.2.3 Спектрофотометрична методика одночасного визначення валсартану та атенололу в бінарній суміші [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 видимій 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 до вимог ДФУ.

Приготування випробовуваного розчину таблеток валсартану та атенололу: точну наважку порошку таблеток, еквівалентну 80 мг валсартану та 100 мг атенололу, поміщають у мірну колбу місткістю 100.00 мл, додають 60 мл метанолу Р, розчиняють протягом 5-10 хв при нагріванні на водяній бані при температурі 50 °С, охолоджують і доводять об'єм розчину метанолом Р до мітки, перемішують і фільтрують.

1 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу 25.0 мл, додають 15 мл метанолу Р, розчиняють і доводять об'єм розчину метанолом Р до мітки, перемішують.

Приготування випробовуваного розчину субстанцій валсартану та атенололу: 80 мг субстанції валсартану та 100 мг субстанції атенололу, поміщають у мірну колбу місткістю 100.00 мл, додають 60 мл метанолу Р, розчиняють і доводять об'єм розчину метанолом Р до мітки, перемішують.

1 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу 25.0 мл, додають 15 мл метанолу Р, розчиняють і доводять об'єм розчину метанолом Р до мітки, перемішують.

Приготування розчину порівняння валсартану: 20 мг ФСЗ валсартану поміщають у мірну колбу місткістю 25.00 мл, додають 15 мл метанолу Р, розчиняють і доводять об'єм розчину метанолом Р до мітки, перемішують.

1 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу 25.0 мл, додають 15 мл метанолу Р, розчиняють і доводять об'єм розчину метанолом Р до мітки, перемішують.

Приготування розчину порівняння атенололу: 25 мг ФСЗ атенололу поміщають у мірну колбу місткістю 25.00 мл, додають 15 мл метанолу Р, розчиняють і доводять об'єм розчину метанолом Р до мітки, перемішують.

1 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу 25.0 мл, додають 15 мл метанолу *P*, розчиняють і доводять об'єм розчину метанолом *P* до мітки, перемішують.

Компенсаційний розчин. Метанол P.

Оптичну густину випробовуваних розчинів і розчинів порівняння вимірюють за довжин хвиль 249.5 нм (валсартан) та 282 нм (атенолол) відносно компенсаційного розчину.

2.2.4 ТШХ-методика визначення валсартану та атенололу в субстанції та лікарських засобах [2.2.27 ДФУ]

Хроматографування проводили на пластинках Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ (100×150 мм) (Росія). Всі типи пластинок, які використовувалися в експерименті, відповідали вимогам ДФУ щодо роздільної здатності.

Приготування випробовуваного розчину таблеток валсартану та атенололу: точну наважку порошку розтертих таблеток, еквівалентну 80 мг валсартану та 100 мг атенололу, розчиняють у метанолі *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл, перемішують та фільтрують.

Приготування випробовуваного розчину субстанцій валсартану та атенололу: 80 мг субстанції валсартану та 100 мг субстанції атенололу розчиняють у метанолі *P* і доводять об'єм розчину тим же розчинником до 10 мл.

Приготування розчину порівняння валсартану: 40 мг ФСЗ валсартану розчиняють у метанолі *P* і доводять об'єм розчину тим же розчинником до 5 мл.

Приготування розчину порівняння атенололу: 50 мг ФСЗ атенололу розчиняють у метанолі *P* і доводять об'єм розчину тим же розчинником до 5 мл.

Пластинка: ТШХ пластинка з шаром силікагелю F_{254} *P*.

Рухома фаза:

- хлороформ *P* – метанол *P* (9:1);

- хлороформ Р – етанол Р (8:2);
- хлороформ Р – метанол Р – розчин аміаку Р (25 %) (4:4:2);
- н-бутанол Р – метанол Р (3:2);
- розчин аміаку Р (25 %) – пропанол Р (30:70);
- пропанол Р – вода Р (70:30);
- н-бутанол – кислота оцтова льодяна Р – вода Р (40:10:20);
- ацетон Р – вода Р (3:2).

Об'єм проб: 20 мкл.

Відстань, яку має пройти рухома фаза: 10 см.

Висушування: на повітрі.

Виявлення: переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.

Результати: на хроматограмі випробовуваних розчинів мають виявлятися основні плями на рівні основних плям на хроматограмі розчинів порівняння, відповідні їй за розміром.

2.2.5 ВЕРХ-методика кількісного визначення валсартану та атенололу у субстанції та лікарських засобах на колонці Zorbax C₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм) [2.2.29 ДФУ]

При виконанні даного дослідження застосовували таке обладнання: хроматограф «Dionex Ultimate 3000 UHPLC system» (Chromeleon версія 6.80), що складається з четвертинного насоса LPG ultimate 3000, автосамплера ultimate 3000, детектора UV-Vis ultimate 3000 RS. Система UPLC Shimadzu Nexera XR з четвертинним насосом LPG LC-20AD з дегазатором DGU-20A5R, автосемплером SIL-20AC, детектором КПК M20-A та контролером CBM-20A. 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. Хроматографічна колонка Zorbax C₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм), Sigma-Aldrich Supelco.

Випробовуваний розчин таблеток. До наважки порошку розтертих таблеток, що еквівалентна 80 мг валсартану та 100 мг атенололу, додають 50 мл метанолу *P*, витримують на УЗ-бані протягом 2 хв. Розчин охолоджують та доводять розчинником до об'єму 100.0 мл. Фільтрують крізь мембранний фільтр з розміром пор 0.45 мкм, відкидаючи перші 5 мл фільтрату.

Випробовуваний розчин субстанції валсартану. 80 мг (точна наважка) субстанції валсартану розчиняють у метанолі *P* і доводять тим самим розчинником до об'єму 100.0 мл.

Випробовуваний розчин субстанції атенололу. 100 мг (точна наважка) субстанції атенололу розчиняють у метанолі *P* і доводять тим самим розчинником до об'єму 100.0 мл.

Розчин порівняння валсартану. 80 мг (точна наважка) ФСЗ валсартану розчиняють у метанолі *P* і доводять тим самим розчинником до об'єму 100.0 мл.

Розчин порівняння атенололу. 100 мг (точна наважка) ФСЗ атенололу розчиняють у метанолі *P* і доводять тим самим розчинником до об'єму 100.0 мл.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі Dionex Ultimate 3000 UHPLC зі спектрофотометричним детектором за таких умов:

- колонка Zorbax C₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм);
- рухома фаза: метанол *P* – 25 мМ розчин калію дигідрогенфосфату рН 7.3 (55:45);
- швидкість рухомої фази: 1.0 мл/хв;
- температура колонки: 40° С;
- детектування за довжини хвилі: 225 нм;
- об'єм проби, що вводиться: 5 мкл.

Хроматографують розчин порівняння.

2.2.6 ВЕРХ-методика кількісного визначення валсартану та атенололу у субстанції та лікарських засобах на колонці Discovery C₁₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм) [2.2.29 ДФУ]

При виконанні даного дослідження застосовували таке обладнання: хроматограф «Dionex Ultimate 3000 UHPLC system» (Chromeleon версія 6.80), що складається з четвертинного насоса LPG ultimate 3000, автосамплера ultimate 3000, детектора UV-Vis ultimate 3000 RS. Система UPLC Shimadzu Nexera XR з четвертинним насосом LPG LC-20AD з дегазатором DGU-20A5R, автосемплером SIL-20AC, детектором КПК M20-A та контролером CBM-20A. 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. Хроматографічна колонка Discovery C₁₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм), Sigma-Aldrich Supelco.

Випробовуваний розчин таблеток. До наважки порошку розтертих таблеток, що еквівалентна 80 мг валсартану та 100 мг атенололу, додають 50 мл метанолу Р, витримують на УЗ-бані протягом 2 хв. Розчин охолоджують та доводять розчинником до об'єму 100.0 мл. Фільтрують крізь мембранний фільтр з розміром пор 0.45 мкм, відкидаючи перші 5 мл фільтрату.

Випробовуваний розчин субстанції валсартану. 80 мг (точна наважка) субстанції валсартану розчиняють у метанолі Р і доводять тим самим розчинником до об'єму 100.0 мл.

Випробовуваний розчин субстанції атенололу. 100 мг (точна наважка) субстанції атенололу розчиняють у метанолі Р і доводять тим самим розчинником до об'єму 100.0 мл.

Розчин порівняння валсартану. 80 мг (точна наважка) ФСЗ валсартану розчиняють у метанолі Р і доводять тим самим розчинником до об'єму 100.0 мл.

Розчин порівняння атенололу. 100 мг (точна наважка) ФСЗ атенололу розчиняють у метанолі *P* і доводять тим самим розчинником до об'єму 100.0 мл.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі Dionex Ultimate 3000 UHPLC зі спектрофотометричним детектором за таких умов:

- колонка Discovery C₁₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм);
- рухома фаза: *ацетонітрил P – 16 % розчин амонію ацетату P – 1.5 M розчину тетраметиламонію гідроксиду (20:80:0.2)*;
- швидкість рухомої фази: 1.0 мл/хв;
- температура колонки: 30° С;
- детектування за довжини хвилі: 225 нм, 237 нм;
- об'єм проби, що вводиться: 5 мкл.

Хроматографують розчин порівняння.

2.2.7 ВЕРХ-методика кількісного визначення валсартану та атенололу у субстанції та лікарських засобах на колонках LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 125 мм, 5 мкм) та LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 250 мм, 5 мкм) [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), ваги лабораторні електронні RAD WAG AS 200/С, ультразвукова баня Sonorex Digitec DT100Н., рН метр И-160МИ, мірний посуд класу А. Для обробки хроматограм використовували програмний пакет Lab Solutions version 5.97. Хроматографічні колонки LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 125 мм, 5 мкм) та LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 250 мм, 5 мкм), Merck Darmstadt, Німеччина.

Випробовуваний розчин таблеток. До наважки порошку розтертих таблеток, що еквівалентна 40 мг валсартану та 50 мг атенололу, додають 25 мл метанолу *P*, витримують на УЗ-бані протягом 2 хв. Розчин охолоджують та

доводять розчинником до об'єму 50.0 мл. Фільтрують крізь мембранний фільтр з розміром пор 0.45 мкм, відкидаючи перші 5 мл фільтрату.

Випробовуваний розчин субстанції валсартану. 40 мг (точна наважка) субстанції валсартану розчиняють у метанолі *P* і доводять тим самим розчинником до об'єму 50.0 мл.

Випробовуваний розчин субстанції атенололу. 50 мг (точна наважка) субстанції атенололу розчиняють у метанолі *P* і доводять тим самим розчинником до об'єму 50.0 мл.

Розчин порівняння валсартану. 40 мг (точна наважка) ФСЗ валсартану розчиняють у метанолі *P* і доводять тим самим розчинником до об'єму 50.0 мл.

Розчин порівняння атенололу. 50 мг (точна наважка) ФСЗ атенололу розчиняють у метанолі *P* і доводять тим самим розчинником до об'єму 50.0 мл.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі Varian Pro Star PDA 330 зі спектрофотометричним детектором за таких умов:

- колонки LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 125 мм, 5 мкм) (CA) та LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 250 мм, 5 мкм) (CB);

- рухомі фази: метанол *P* – 25 мМ розчин калію дигідрогенфосфату рН 7.3 (50:50) (MA); метанол *P* – 50 мМ розчин амонію дигідрогенфосфату рН 7.25 (50:50) (MB); метанол *P* – 50 мМ розчин амонію дигідрогенфосфату рН 7.2 (55:45) (MC)

- швидкість рухомої фази: 0.5 мл/хв, 1.0 мл/хв;

- температура колонки: 40° С, 42° С;

- детектування за довжини хвилі: 225 нм, 237 нм ;

- об'єм проби, що вводиться: 5 мкл.

Хроматографують розчин порівняння.

2.2.8 ВЕРХ-методика кількісного визначення валсартану та атенололу для застосування в дослідженнях на моделях *in vitro* (тест Сасо-2)

Реагенти та витратні матеріали

- DMEM (4.5 г/л) рідкий без L-глутаміну (РАА, Велика Британія)
- L-глутамін (200 мМ) (РАА, Велика Британія)
- DMEM з високим вмістом глюкози та L-глутаміном (HyClone, США)
- Суміш незамінних амінокислот для середовища MEM (Gibco)
- Ембріональна теляча сироватка (Gibco)
- Натрію дикарбонат (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) (РАА, Велика Британія)
- ДМСО $\geq 99.7\%$ (Sigma-Aldrich, США)
- Планшет з фільтр-мембраною (HTS Multiwell Insert system) (Falcon, США)
- 24-лунковий планшет Multiwell™ (Falcon, 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 в мікросхативі (Thermo Scientific, США)
- Кришечки для мікропробірок (Thermo Scientific, Ізраїль, Cat# 44720)
- 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 API4000 QTRAP з Turbo V 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 5×10⁵ клітин у флакон площею 75 см². Після 5 днів культивування клітини трипсинізували і ресуспендували в повному середовищі до кінцевої концентрації 300 × 10³ клітин/мл. Аліквоти (500 мкл) клітинної суспензії додавали до кожної лунки планшету (Millicell-24 Multiwell Insert System) з фільтрмембраною (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 6-10 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. Для визначення швидкості транспортування в базолатерально-апикальному напрямку (БА), 1000 мкл розчину досліджуваної речовини додавали в базолатеральну камеру, а верхню (апикальну) камеру транспортної лунки заповнювали 300 мкл буфера. Участь транспортера Р-глікопротеїну (Р-gp) у абсорбції тестових речовин оцінювали шляхом визначення двонаправленого транспорту у присутності інгібітора Р-gp верапамілу. Клітини Сасо-2 попередньо інкубували впродовж 30 хв при 37°C зі 100 мкМ верапамілу в апікальній та базолатеральній камерах. Після преінкубації середовище видаляли, в донорну камеру вносили в досліджувані сполуки разом з верапамілом (100 мкМ) у транспортному буфері, а лунки-приймачі заповнювали відповідним об'ємом транспортного буфера зі 100 мкМ верапамілу. Кінцева концентрація тестової та референтних речовин становила 10 мкМ. Інкубацію проводили впродовж 90 хв при 37°C 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 – вода Р – мурашина кислота (5:95:0.1); елюент Б: ацетонітрил – мурашина кислота (100:0.1). Хроматографічна колонка – Phenomenex Luna (50 мм x 2.0 мм, 5 мкм).

Налаштування хроматографічних параметрів для валсартану (параметри Acquisition method Valsartan).

Початковий вміст елюента Б 15 %, який лінійно збільшується до 100 % за 0.9 хв і до 1.2 хв складає 100 %, з 1.21 хв повертається до вихідних 15 %. Швидкість потоку – 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 0.85 хв до 1.5 хв

Коефіцієнт проникності клітинного моношару розраховують за формулою (2.1):

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

де V_A – об'єм транспортного буфера в акцепторній лунці, см³

$Area$ – площа поверхні моношару, см²

$Time$ – час експерименту, с

$[drug]_{acc}$ – концентрація досліджуваної сполуки в акцепторній лунці в кінці експерименту, яка визначається в ВЕРХ/МС/МС як площа піку,

$[drug]_{initial,d}$ – концентрація досліджуваної сполуки в донорній лунці в початковий момент часу, яка визначається в ВЕРХ/МС/МС як площа піку.

Коефіцієнт проникності P_{app} виражають в 10⁻⁶ см/с.

Розрахунок коефіцієнта вилучення (2.2):

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

$$= \frac{[drug_{acc}] \times V_{acc} + [drug_d] \times V_d}{[drug_{initial,d}] \times V_d} \times 100,$$

$\Delta e V_{acc}$ – об'єм розчину в акцепторному компартменті (см²),

V_d – об'єм розчину в донорному компартменті (см²),

C_{acc} – концентрація розчину в акцепторній лунці в кінці експерименту (мМ),

C_d – концентрація розчину в донорній лунці в кінці експерименту (мМ),

$C_{initial,d}$ – початкова концентрація розчину в донорній лунці (мМ),

$[drug]_{acc}$ – концентрація досліджуваної сполуки в акцепторній лунці в кінці експерименту, яка визначається в ВЕРХ/МС/МС як площа піку,

$[drug]_d$ – концентрація досліджуваної сполуки в донорній лунці в кінці експерименту, яка визначається в ВЕРХ/МС/МС як площа піку,

$[drug]_{initial,d}$ – концентрація досліджуваної сполуки в донорній лунці в початковий момент часу, яка визначається в ВЕРХ/МС/МС як площа піку.

2.2.9 Методики кількісного визначення валсартану та атенололу для вивчення тесту «Розчинення»

Методики кількісного визначення валсартану та атенололу в субстанціях та ЛЗ, які були описані у пунктах 2.2.4, 2.2.6, були адаптовані для визначення валсартану та атенололу для вивчення тесту «кінетика розчинення» та проведено їх трансфер.

Вивчення кінетики розчинення проводили в стандартних фармакопейних середовищах з рН 1.2, 4.5 та 6.8. Відповідно, при цьому використовували автоматичний прилад для тесту «Розчинення» з лопаттю (ДФУ 2.0) зі швидкістю обертання 50 об/хв та об'ємом середовища 900 мл. Температура середовища підтримувалася автоматично і складала 37 ± 1 °С. Точки контролю: 5, 15, 30, 45 хв.

РОЗДІЛ 3

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИХ МЕТОДИК ВИЗНАЧЕННЯ ВАЛСАРТАНУ ТА АТЕНОЛОЛУ В СУБСТАНЦІЯХ ТА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ

3.1 Розробка та валідація спектрофотометричної методики визначення валсартану в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромфеноловим синім

Розробці спектрофотометричних методик визначення АФІ в ЛЗ з використанням різних барвників присвячено ряд робіт [104-133].

В результаті попередніх досліджень встановлено, що неекстрактивні бінарні комплекси між валсартаном та бромфеноловим синім (БФС) і метиловим червоним (МЧ) утворюються на основі іонних асоціатів. Це може бути пов'язано з групами донорів електронів (тетразол та амінобутанова кислота), наявними у структурі валсартану. Валсартан утворює іонно-парні комплекси вибірково з барвниками, про що свідчить утворення забарвленого комплексу з БФС при рН 5.5 з λ_{max} при 424 нм та МЧ при рН 4.3 з λ_{max} при 494 нм. Утворенні іонні асоціати є малорозчинними у воді, але в оптимізованих експериментальних умовах є вільно розчинними і не потребують екстракції органічними розчинниками, що є значною перевагою для майбутньої розробленої аналітичної методики [142, 143].

З метою розробки методики визначення валсартану в субстанції та ЛЗ ми розглядали можливість застосування методу диференціальної спектрофотометрії за реакцією з БФС із використанням максимуму поглинання продукту реакції за довжини хвилі 424 нм. Запропоновану схему взаємодії валсартану з БФС наведено на рис. 3.1. Спектри поглинання продукту реакції валсартану та БФС представлено на рис. 3.2.

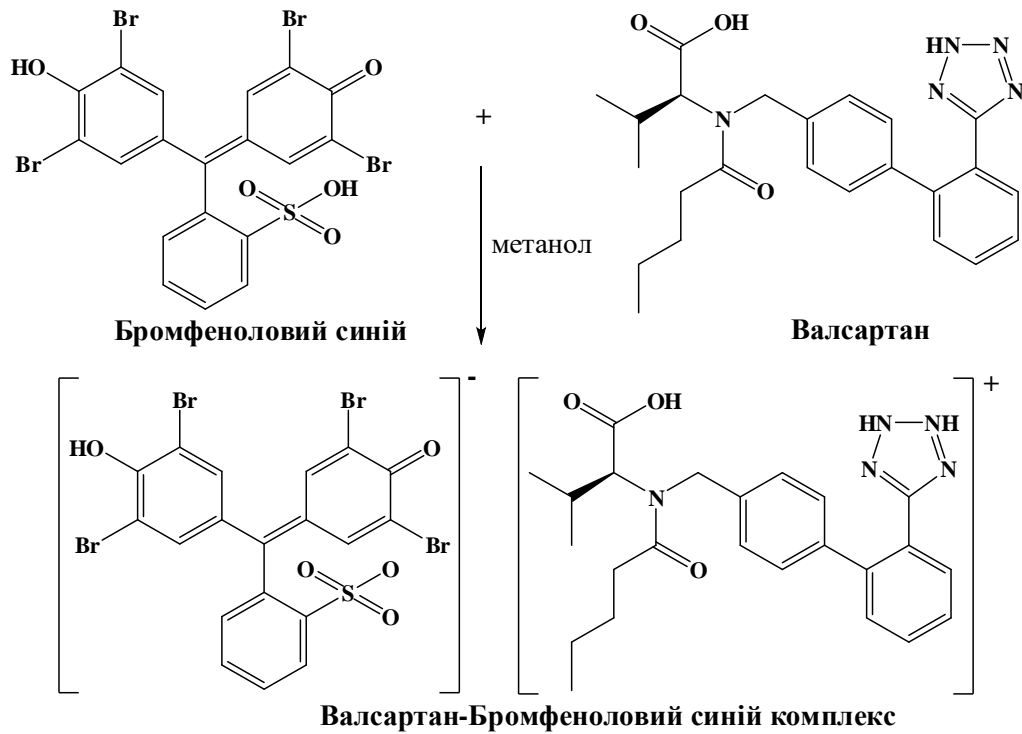


Рисунок 3.1 – Схема взаємодії валсартану з БФС

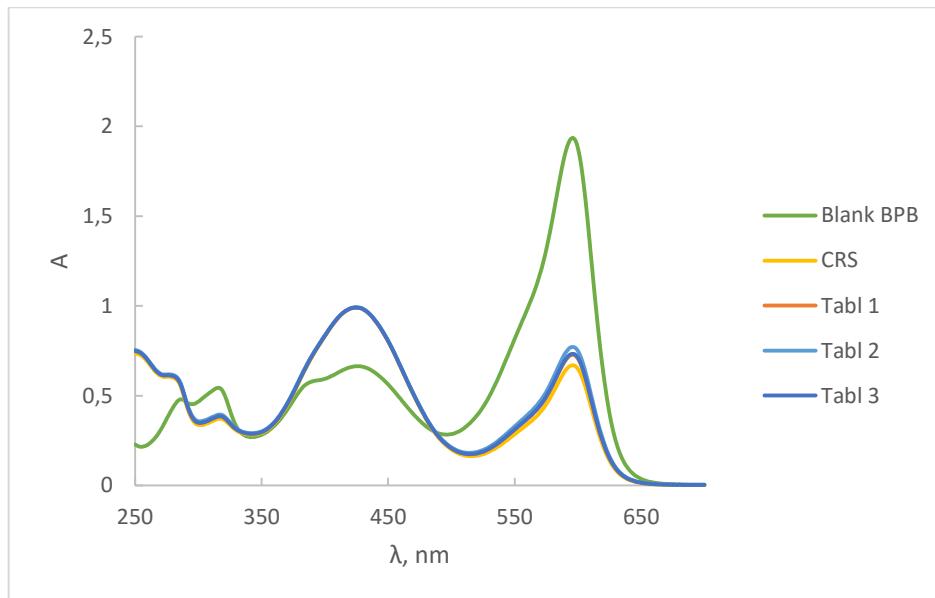


Рисунок 3.2 – Спектри поглинання продукту реакції валсартану та БФС (ФСЗ валсартану та таблетки 1 – Валсартан 160 мг, КРКА, 2- Валсартан 160 мг, ТЕВА, 3- Валсартан 160 мг, Сандоз)

Оптимізація умов проведення спектрофотометричного визначення необхідна для швидкого та кількісного утворення кольорових комплексів

іонних асоціатів з максимальною стабільністю та чутливістю. Максимальне поглинання спостерігалось в розчині метанолу з БФС, тоді як етанол, пропанол, хлороформ, ацетонітрил та етилацетат були непридатними. Спектри поглинання БФС та валсартану з БФС у різних розчинниках представлено на рис. 3.3.

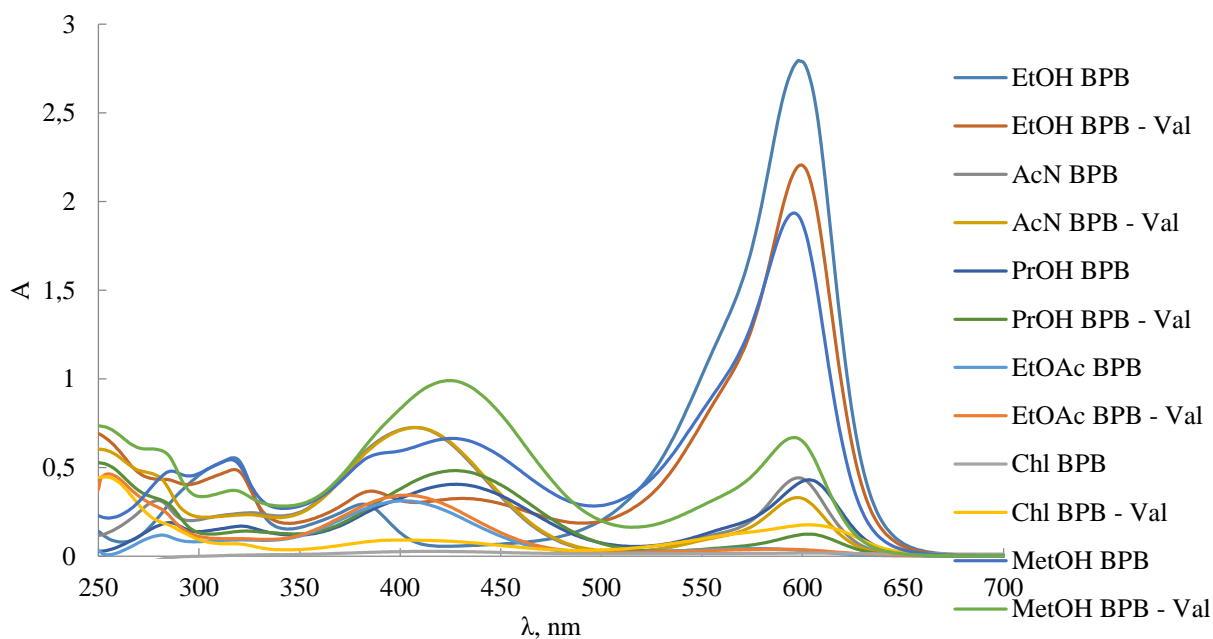


Рисунок 3.3 – Спектри поглинання БФС та валсартану з БФС у різних розчинниках (скорочення: метанол – MetOH, етанол – EtOH, ацетонітрил – AcN, пропанол – PrOH, хлороформ – Chl, етилацетат – EtOAc)

Абсолютні значення ΔA різниці в абсорбції валсартану з БФС у різних розчинниках із абсорбцією БФС у різних розчинниках представлено на рис. 3.4.

На наступному етапі досліджено стабільність аналізованого розчину в часі. Для цього вимірювали абсорбцію отриманого розчину в оптимальних умовах впродовж 45 хв. Графік залежності абсорбції продукту реакції валсартану з БФС від часу наведено на рис. 3.5. Встановлено, що досліджувані розчини стабільні впродовж 45 хв.

Для встановлення аналітичних показників чутливості реакції валсартану з БФС були розраховані показники чутливості реакції. Молярний показник

поглинання (ϵ) становив 4.43×10^3 , питоме поглинання (a) – 1.07×10^{-1} , коефіцієнт Сендела (Ws) – 9.83×10^{-2} відповідно.

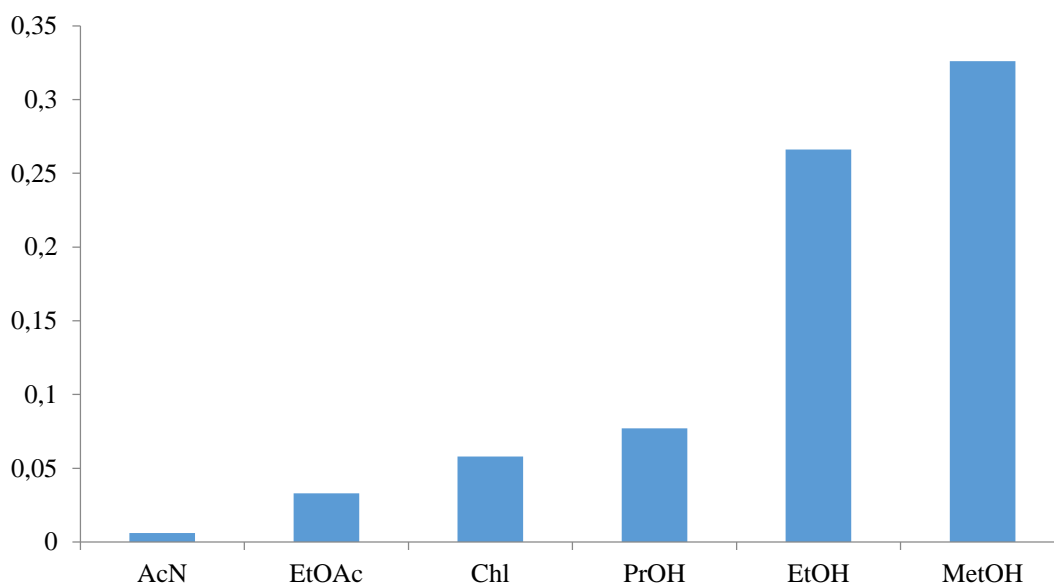


Рисунок 3.4 – Абсолютні значення ΔA різниці в абсорбції валсартану з БФС у різних розчинниках із абсорбцією БФС у різних розчинниках (скорочення: метанол – MetOH, етанол – EtOH, ацетонітрил – AcN, пропанол – PrOH, хлороформ – Chl, етилацетат – EtOAc)

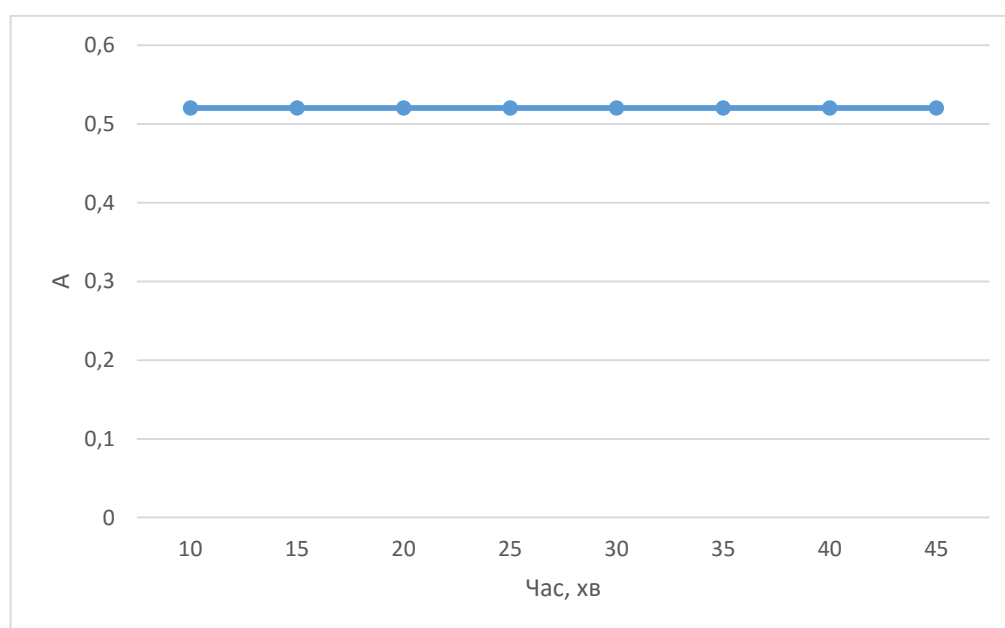


Рисунок 3.5 – Графік залежності абсорбції продукту реакції валсартану з БФС від часу

Стехіометричні коефіцієнти реагуючих компонентів між валсартаном та БФС були встановлені з використанням методу Жоба (метод ізомолярних серій) [134], для цього готували розчини БФС та валсартану однакової молярної концентрації (1.3×10^{-3} М) та змішували їх в антибарних співвідношеннях. Реакції проводили згідно розробленої методики. Вимірювання абсорбції отриманих розчинів проводили за довжини хвилі 424 нм. За отриманими даними було побудовано графіки залежності величини оптичної густини від співвідношення об'ємів компонентів ізомолярних серій (рис. 3.6).

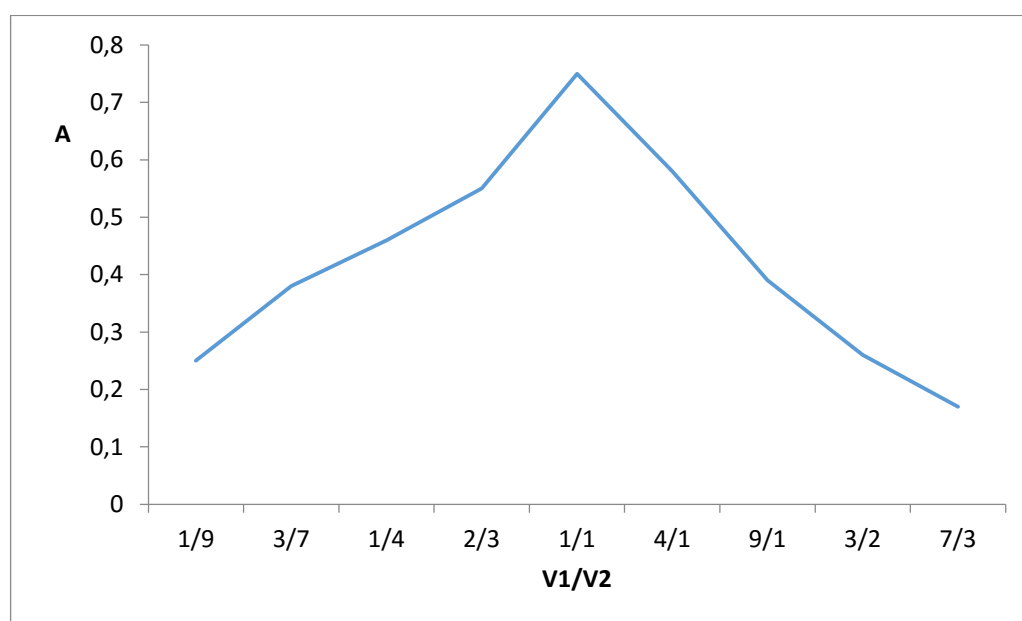


Рисунок 3.6 – Графік залежності оптичної густини від складу ізомолярного розчину ($V_1 - 1.3 \times 10^{-3}$ М БФС, $V_2 - 1.3 \times 10^{-3}$ М розчин валсартану) за довжини хвилі 424 нм

Згідно з даними, отриманими на рис. 3.6, стехіометричні співвідношення реагуючих компонентів «валсартан – БФС» становлять 1:1.

Результати кількісного визначення валсартану у складі ЛЗ представлено в табл. 3.1.

Аналіз даних табл. 3.1 показує, що результати кількісного визначення валсартану у складі трьох ЛЗ різних виробників є точними та вірогідними.

Таблиця 3.1 – Результати кількісного визначення валсартану в ЛЗ (n=6, p=0.95)

Лікарський засіб	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
Таблетки «Валсартан КРКА» 0.16 г	0.1601	$\bar{m} = 0.1603$ г $S = 5.61 \times 10^{-4}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 5.89 \times 10^{-4}$ RDS = 0.35 $\varepsilon = 0.37$ %
	0.1608	
	0.1611	
	0.1602	
	0.1595	
	0.1604	
Таблетки «Валсартан ТЕВА» 0.16 г	0.1609	$\bar{m} = 0.1603$ г $S = 7.87 \times 10^{-4}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 8.25 \times 10^{-4}$ RDS = 0.49 $\varepsilon = 0.52$ %
	0.1611	
	0.1602	
	0.1607	
	0.1591	
	0.1596	
Таблетки «Валсартан Сандоз» 0.16 г	0.1593	$\bar{m} = 0.1598$ г $S = 1 \times 10^{-3}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 1.05 \times 10^{-3}$ RDS = 0.63 $\varepsilon = 0.66$ %
	0.1613	
	0.1604	
	0.1601	
	0.1592	
	0.1585	

Розроблена аналітична методика була валідована відповідно до вимог ДФУ [135] та ІСН Q2 [136] за наступними показниками: селективність, лінійність, діапазон застосування, правильність, прецизійність та робастність [137-141].

3.1.1 Прогноз повної невизначеності методики

Для підтвердження коректності аналітичної методики проводять прогнозування повної невизначеності методики. Повну прогнозовану відносну невизначеність включає невизначеність пробопідготовки та невизначеність кінцевої аналітичної операції. Невизначеність кінцевої аналітичної операції для спектрофотометричного аналізу становить 0.70 %. Невизначеність пробопідготовки включає взяття наважки, аліквоти малого об'єму, доведення до об'єму в мірній колбі тощо. Розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення таблеток «Валсартан КРКА» 0.16 г наведено у табл. 3.2.

Таблиця 3.2 – Розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення таблеток «Валсартан КРКА» 0.16 г

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
1	2	3
Розчин порівняння		
1) взяття наважки ФСЗ валсартану	m_0	$0.2 \text{ мг}/50 \text{ мг} \times 100\% = 0.4 \%$
2) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.00 мл	25	0.23 %
3) взяття аліквоти піпеткою 0.5 мл	0.4	1.23 %
4) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.00 мл	25	0.23 %
Випробовуваний розчин		
5) взяття наважки таблеток	m_1	$0.2 \text{ мг}/25 \text{ мг} \times 100\% = 0.8 \%$

Продовження таблиці 3.2

1	2	3
б) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.00 мл	25	0.23 %
7) взяття аліквоти піпеткою 0.5 мл	0.4	1.23 %
8) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.00 мл	25	0.23 %

Згідно з табл. 3.2 невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) становить 2.01 %. Розподіл невизначеності пробопідготовки за операціями для кількісного визначення таблеток «Валсартан КРКА» 0.16 г показує, що найбільшу невизначеність в пробопідготовку вносять операції 3 та 7 – взяття аліквоти піпеткою 0.5 мл.

Повна невизначеність аналітичної методики (Δ_{As}) становить 2.13 %.

$$\Delta_{As} = 2.13 \% \leq \max \Delta_{As} = 3.2 \%$$

Отже, прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не перевищувала критичного значення ($\max \Delta_{As}$), тобто розроблена спектрофотометрична методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях.

3.1.2 Селективність методики

Допоміжні речовини таблеток валсартану (лактози моногідрат, целюлоза мікрокристалічна, повідон, натрію кроскармелоза, кремнію діоксид колоїдний безводний, магнію стеарат, гіпромелоза, титану діоксид, макрогол 4000, заліза оксид жовтий) не впливають на результати визначення валсартану, що підтверджено рис. 3.2. Спектр плацебо таблеток мав вигляд прямої лінії. Виходячи з цього, можна зробити висновок, що розроблена методика є селективною.

3.1.3 Лінійність, діапазон застосування методики

Вивчення лінійності проводили на всьому діапазоні застосування методики з використанням модельних розчинів зразків. Отримані результати були статистично оброблені методом найменших квадратів відповідно до вимог ДФУ. Отримані результати були оброблені за допомогою методу найменших квадратів для рівняння $y=a+b \cdot x$, де y – оптична густина, x – концентрація визначуваної лікарської речовини, a – вільний член лінійної залежності для розрахованої регресійної прямої, b – кутовий коефіцієнт для розрахованої регресійної прямої. Графік залежності оптичної густини від концентрації валсартану за реакцією з БФС наведено на рис. 3.7. Результати розрахунків рівняння лінійної регресії представлено у таблиці 3.3.

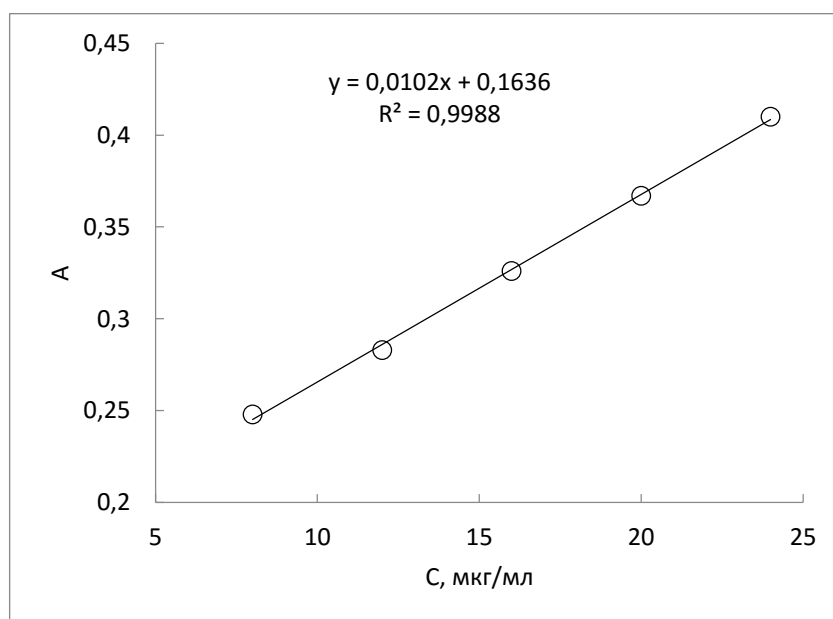


Рисунок 3.7 – Графік залежності оптичної густини від концентрації валсартану за реакцією з БФС

Параметри лінійності (рис. 3.7, табл. 3.3) відповідають вимогам ДФУ на всьому діапазоні застосування аналітичної методики (8-24 мкг/мл). МВ та МКВ становили 1.03 мкг/мл та 3.43 мкг/мл відповідно.

Таблиця 3.3 – Метрологічні характеристики лінійної залежності

Величина	Значення	Критерій	Висновок (відповідає або не відповідає)
$b \pm (S_b)$	0.0102±(0.0014)	–	
$a \pm (S_a)$	0.1636±(0.1214)	$ a \leq \Delta a = t(95\%; 5) \cdot S_a = 0.3363$	Відповідає
R^2	0.9988	> 0.9921	Відповідає

3.1.4 Правильність та прецизійність методики

Для перевірки правильності та прецизійності методики готували суміші з точно відомим вмістом АФІ, які охоплювали діапазон застосування методики (з концентраціями 70-130 % від номінальної). Відповідно до вимог ДФУ розраховували такі критерії: систематична похибка $\delta\%$ (для правильності) та відносний довірчий інтервал Δz (для прецизійності). Результати проведених розрахунків наведено в табл. 3.4.

Таблиця 3.4 – Результати вивчення правильності та прецизійності методики

Модельні розчини	Вміст валсартану, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100\%$
	Введено, $X_i = (m_i / m_{rs}) 100 \%$	Знайдено, $Y_i = (A_i / A_{rs}) 100 \%$	
1	2	3	4
M ₁	70.08	70.11	100.04
M ₂	80.55	80.41	99.83
M ₃	89.87	90.04	100.19
M ₄	95.02	94.84	99.81

Продовження таблиці 3.4

1	2	3	4
M ₅	100.05	99.82	99.77
M ₆	104.91	105.02	100.10
M ₇	110.45	110.87	100.38
M ₈	120.28	120.63	100.29
M ₉	130.00	130.05	100.04
Середнє значення, Z, %			100.05
Стандартне відхилення, S _z , %			0.05
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 8) \cdot S_z = 2.3060 S_z$, %			0.12
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta_{As}$ = 3.2 %			виконується (< 3.2)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 $, %			0.05
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta\%$			виконується (< 0.58)
Загальний висновок про методику			Коректна

Експериментальні результати прецизійності характеризуються припустимим розкидом відносно середнього і, відповідно низьким стандартним відхиленням S_z % на всьому діапазоні концентрацій. Середня похибка методики становить $\delta \% = 0.05$, що характеризує достатню близькість середнього результату отриманої оптичної густини до його номінального значення.

3.1.5 Робасність методики

Вивчення робасності було проведено на етапі розробки спектрофотометричної методики визначення валсартану за реакцією з БФС під час встановлення оптимальних умов проведення перебігу реакцій та визначення

факторів, які можуть впливати на величину оптичної густини (кількість БФС та стабільність розчинів у часі).

Встановлено, що зміна кількості БФС у межах $\pm 10\%$ не впливає на результати дослідження (рис. 3.8, табл. 3.5) та аналізовані розчини стабільні впродовж 45 хв (рис. 3.5).

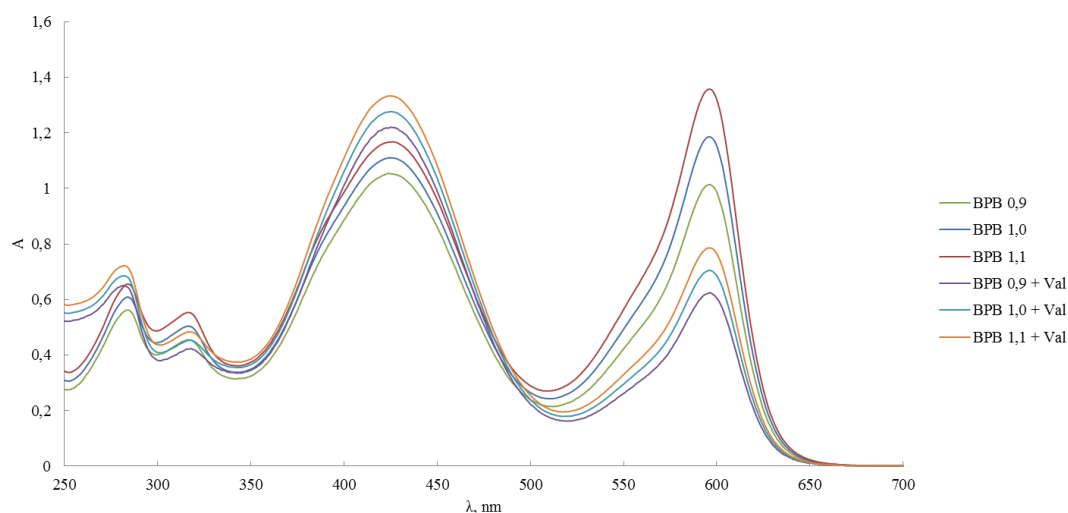


Рисунок 3.8 – Спектри поглинання БФС та валсартану з БФС за умов вивчення кількості доданого БФС

Таблиця 3.5 – Результати зміни оптичної густини від кількості доданого БФС

Кількість доданого БФС, мл	ΔA
0.9	0.164
1.0	0.165
1.1	0.166

3.1.6 Оцінки озеленіння аналітичної методики

Принципи «зеленої хімії» були враховані при розробці спектрофотометричної методики визначення валсартану в субстанціях та ЛЗ за реакцією з БФС [92-101]. У табл. 3.6 узагальнено результати оцінки озеленіння аналітичної методики.

Таблиця 3.6 – Аналітична еко-шкала для оцінки озеленіння розробленої методики

Параметри	Пенальті бали
Реактиви	
Метанол	4
БФС	1
Споживання енергії	1
Професійні шкідливості	0
Відходи	5
Загальна кількість пенальті балів	11
Бал аналітичної еко-шкали	89
Висновок	Відмінний зелений аналіз

Результати, представлені у табл. 3.6, показують, що розроблена спектрофотометрична методика визначення валсартану в субстанції та ЛЗ є відмінною у відповідності до принципів «зеленої хімії».

3.2 Розробка та валідація спектрофотометричної методики визначення валсартану в субстанції та лікарських засобах за реакцією з метиловим червоним

Як зазначалося у підрозділі 3.1, в результаті проведених попередніх досліджень встановлено, що валсартан утворює іонно-парні комплекси вибірково з барвниками, про що свідчить утворення забарвленого комплексу з МЧ при рН 4.3 за довжини хвилі 494 нм [142].

З метою розробки методики визначення валсартану в субстанції та ЛЗ ми розглянули можливість застосування методу диференціальної спектрофотометрії за реакцією з МЧ з використанням максимуму поглинання утвореного продукту реакції за довжини хвилі 494 нм. Запропоновану схему взаємодії валсартану з МЧ наведено на рис. 3.9. Спектри поглинання продукту реакції валсартану та МЧ представлено на рис. 3.10.

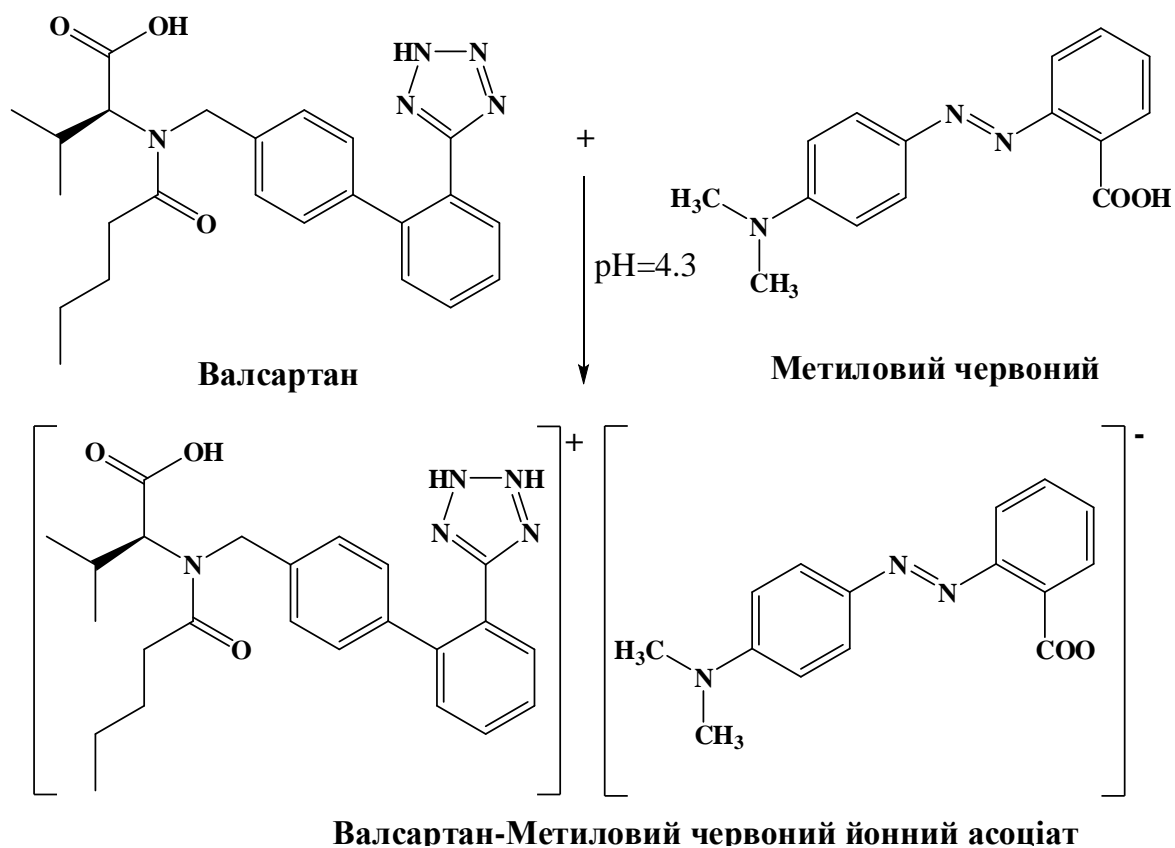


Рисунок 3.9 – Схема взаємодії валсартану з МЧ

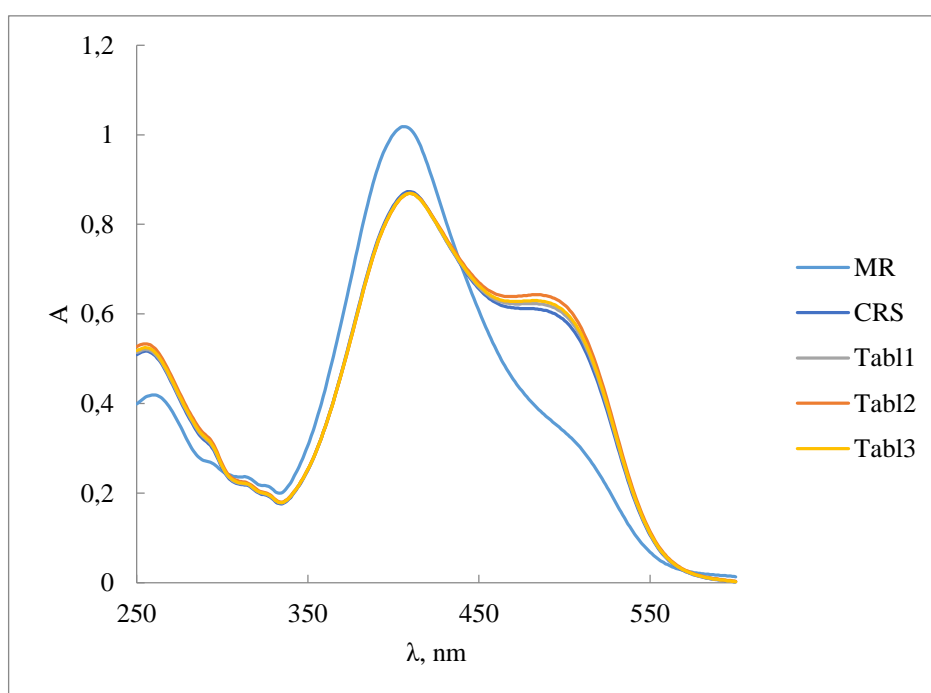


Рисунок 3.10 – Спектри поглинання продукту реакції валсартану та МЧ (ФСЗ валсартану та таблетки 1 – Валсартан 160 мг, КРКА, 2- Валсартан 160 мг, ТЕВА, 3- Валсартан 160 мг, Сандоз)

Максимальне поглинання спостерігалось в розчині етанолу з МЧ, тоді як метанол, пропанол, хлороформ, ацетонітрил та етилацетат були непридатними. Спектри поглинання МЧ та валсартану з МЧ у різних розчинниках представлено на рис. 3.11.

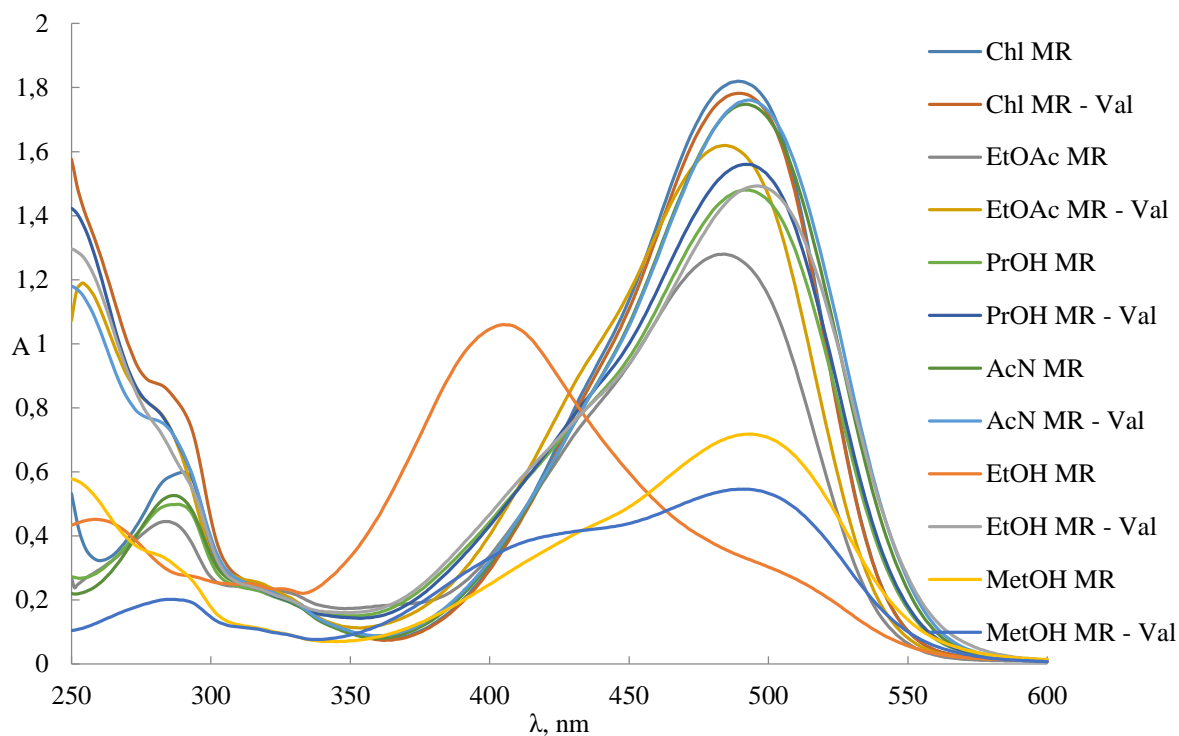


Рисунок 3.11 – Спектри поглинання МЧ та валсартану з МЧ у різних розчинниках (скорочення: метанол – MetOH, етанол – EtOH, ацетонітрил – AcN, пропанол – PrOH, хлороформ – Chl, етилацетат – EtOAc)

Абсолютні значення ΔA різниці в абсорбції валсартану з МЧ у різних розчинниках із абсорбцією МЧ у різних розчинниках представлено на рис. 3.12.

На наступному етапі експерименту досліджено стабільність аналізованого розчину в часі. Графік залежності абсорбції утвореного продукту реакції валсартану з МЧ від часу наведено на рис. 3.13. Встановлено, що досліджувані розчини є стабільними впродовж 45 хв.

Для встановлення аналітичних показників чутливості реакції валсартану з МЧ були розраховані показники чутливості реакції. Молярний показник поглинання (ϵ) становив 2.36×10^4 , питоме поглинання (a) – 5.4×10^{-1} ,

коефіцієнт Сендела (W_s) – 1.84×10^{-2} . В результаті проведених розрахунків аналітичних показників чутливості реакцій встановлено, що вищу чутливість має реакція валсартану з МЧ за реакцією валсартану з БФС, про що свідчить високе значення молярного коефіцієнта поглинання та низьке значення відкриваного мінімуму.

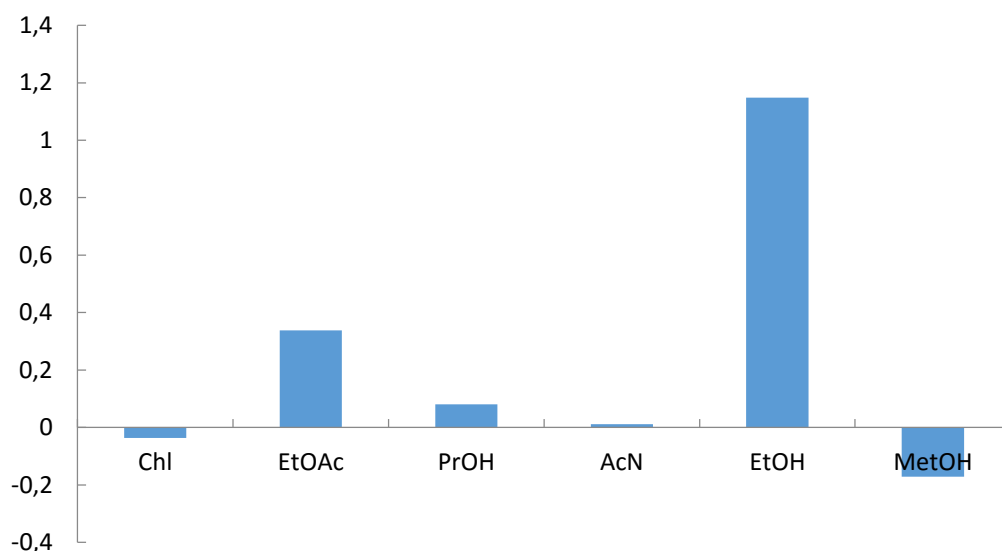


Рисунок 3.12 – Абсолютні значення ΔA різниці в абсорбції валсартану з МЧ у різних розчинниках із абсорбцією МЧ у різних розчинниках (скорочення: метанол – MetOH, етанол – EtOH, ацетонітрил – AcN, пропанол – PrOH, хлороформ – Chl, етилацетат – EtOAc)

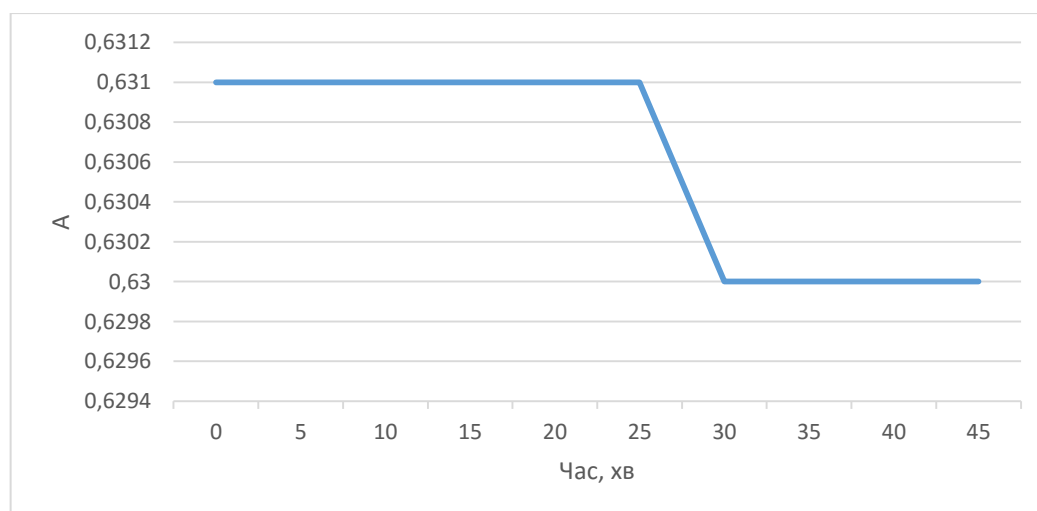


Рисунок 3.13 – Графік залежності абсорбції утвореного продукту реакції валсартану з МЧ від часу

Стехіометричні коефіцієнти реагуючих компонентів між валсартаном та МЧ були встановлені з використанням методу Жоба (метод ізомолярних серій) [134], для цього готували розчини МЧ та валсартану однакової молярної концентрації (3.7×10^{-3} М) та змішували їх в антибарних співвідношеннях. Вимірювання абсорбції отриманих розчинів проводили за довжини хвилі 494 нм. За отриманими даними було побудовано графіки залежності величини оптичної густини від співвідношення об'ємів компонентів ізомолярних серій (рис. 3.14).

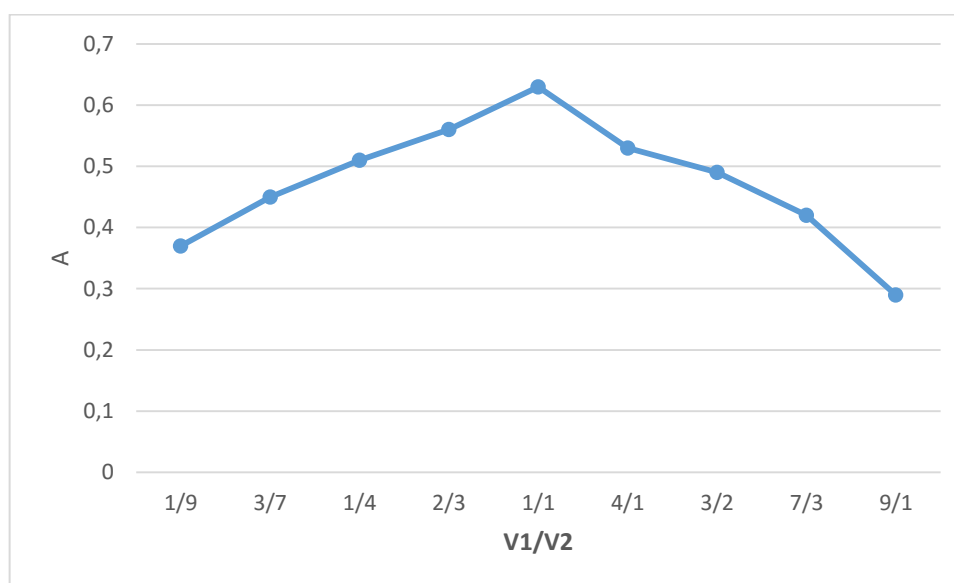


Рисунок 3.14 – Графік залежності оптичної густини від складу ізомолярного розчину ($V_1 - 3.7 \times 10^{-3}$ М МЧ, $V_2 - 3.7 \times 10^{-3}$ М розчин валсартану) за довжини хвилі 494 нм

Згідно з даними, отриманими на рис. 3.14, стехіометричні співвідношення реагуючих компонентів «валсартан – МЧ» становлять 1:1.

Результати кількісного визначення валсартану у складі ЛЗ представлено у табл. 3.7.

Аналіз даних табл. 3.7 вказує, що результати кількісного визначення валсартану у складі трьох ЛЗ різних виробників є точними та вірогідними.

Розроблена аналітична методика була валідована відповідно до вимог ДФУ [135] та ІСН Q2 [136] за наступними показниками: селективність,

лінійність, діапазон застосування, правильність, прецизійність та робасність [137-141].

Таблиця 3.7 – Результати кількісного визначення валсартану в ЛЗ ($n=6$, $p=0.95$)

Лікарський засіб	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
Таблетки «Валсартан КРКА» 0.16 г	0.1608	$\bar{m} = 0.1601$ г $S = 5.91 \times 10^{-4}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 6.21 \times 10^{-4}$ RDS = 0.37 $\varepsilon = 0.39$ %
	0.1602	
	0.1591	
	0.1601	
	0.1598	
	0.1605	
Таблетки «Валсартан ТЕВА» 0.16 г	0.1604	$\bar{m} = 0.1600$ г $S = 5.72 \times 10^{-4}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 6 \times 10^{-4}$ RDS = 0.36 $\varepsilon = 0.37$ %
	0.1601	
	0.1593	
	0.1609	
	0.1596	
	0.1599	
Таблетки «Валсартан Сандоз» 0.16 г	0.1598	$\bar{m} = 0.1601$ г $S = 8.06 \times 10^{-3}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 8.46 \times 10^{-4}$ RDS = 0.5 $\varepsilon = 0.53$ %
	0.1611	
	0.1605	
	0.1607	
	0.1591	
	0.1593	

3.2.1 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 «Валсартан КРКА» 0.16 г наведено у табл. 3.8.

Таблиця 3.8 – Розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення таблеток «Валсартан КРКА» 0.16 г

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
Розчин порівняння		
1) взяття наважки ФСЗ валсартану	m_0	$0.2 \text{ мг}/11.75 \text{ мг} \times 100\% = 1.70 \%$
2) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.00 мл	25	0.23 %
3) взяття аліквоти піпеткою 0.5 мл	0.3	1.23 %
4) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.00 мл	25	0.23 %
Випробовуваний розчин		
5) взяття наважки таблеток	m_1	$0.2 \text{ мг}/24.3 \text{ мг} \times 100\% = 0.82 \%$
6) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.00 мл	25	0.23 %
7) взяття аліквоти піпеткою 0.5 мл	0.3	1.23 %
8) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.00 мл	25	0.23 %

Згідно з табл. 3.8, невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) становить 2.61 %. Розподіл невизначеності пробопідготовки за операціями для кількісного визначення таблеток «Валсартан КРКА» 0.16 г показує, що найбільшу

невизначеність в пробопідготовку вносить операція 1 – взяття наважки ФСЗ валсартану.

Повна невизначеність аналітичної методики (Δ_{As}) становить 2.71 %.

$$\Delta_{As} = 2.71 \% \leq \max \Delta_{As} = 3.2 \%$$

Отже, прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не перевищувала критичного значення ($\max \Delta_{As}$), що доводить, що розроблена спектрофотометрична методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях.

3.2.2 Селективність методики

Допоміжні речовини таблеток валсартану (лактози моногідрат, целюлоза мікрокристалічна, повідон, натрію кроскармелоза, кремнію діоксид колоїдний безводний, магнію стеарат, гіпромелоза, титану діоксид, макрогол 4000, заліза оксид жовтий) не впливають на результати визначення валсартану, що підтверджено рис. 3.10. Спектр плацебо таблеток мав вигляд прямої лінії, тому можна зробити висновок, що розроблена методика є селективною.

3.2.3 Лінійність, діапазон застосування методики

Вивчення лінійності проводили на всьому діапазоні застосування методики з використанням модельних розчинів зразків, відповідно до вимог ДФУ. Отримані результати були оброблені за допомогою методу найменших квадратів для рівняння $y=a+b \cdot x$, де y – оптична густина, x – концентрація визначуваної лікарської речовини, a – вільний член лінійної залежності для розрахованої регресійної прямої, b – кутовий коефіцієнт для розрахованої регресійної прямої. Графік залежності оптичної густини від концентрації валсартану за реакцією з МЧ наведено на рис. 3.15. Результати розрахунків рівняння лінійної регресії представлено в таблиці 3.9.

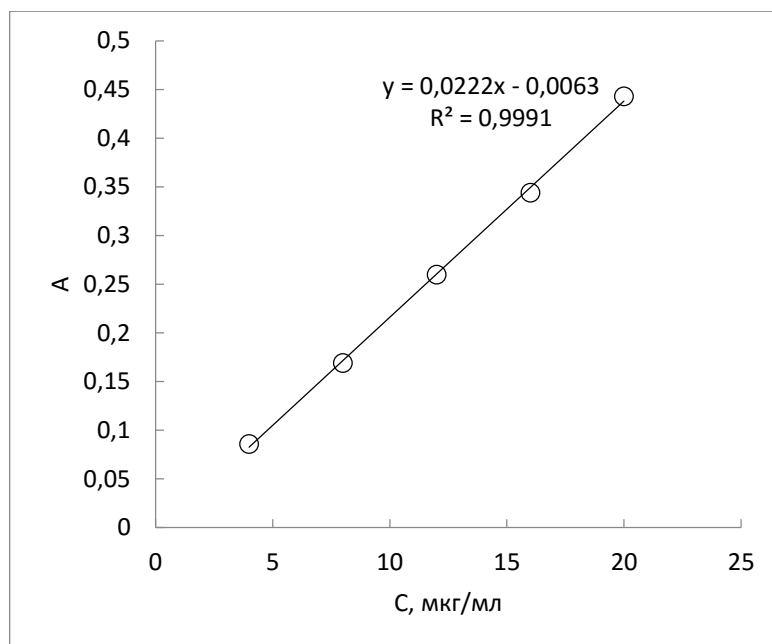


Рисунок 3.15 – Графік залежності оптичної густини від концентрації валсартану за реакцією з МЧ

Таблиця 3.9 – Метрологічні характеристики лінійної залежності

Величина	Значення	Критерій	Висновок (відповідає або невідповідає)
$b \pm (S_b)$	$0.0022 \pm (0.0035)$	–	
$a \pm (S_a)$	$0.0063 \pm (0.1754)$	$ a \leq \Delta a = t(95\%; 5) \cdot S_a = 0.4859$	Відповідає
R^2	0.9991	> 0.9973	Відповідає

Параметри лінійності (див. рис. 3.15, табл. 3.9) відповідають вимогам ДФУ на всьому діапазоні застосування аналітичної методики (4-20 мкг/мл). МВ та МКВ становили 0.68 мкг/мл та 2.26 мкг/мл відповідно.

3.2.4 Правильність та прецизійність методики

Для перевірки правильності та прецизійності методики готували суміші з точно відомим вмістом АФІ, які охоплювали діапазон застосування методики (з концентраціями 70-130 % від номінальної). Відповідно до вимог ДФУ, розраховували такі критерії: систематична похибка $\delta\%$ (для правильності) та відносний довірчий інтервал Δz (для прецизійності). Результати проведених розрахунків наведено в табл. 3.10.

Таблиця 3.10 – Результати вивчення правильності та прецизійності методики

Моделльні розчини	Вміст валсартану, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100\%$
	Введено, $X_i = (m_i/m_{rs}) \cdot 100\%$	Знайдено, $Y_i = (A_i/A_{rs}) \cdot 100\%$	
M ₁	70.05	70.04	99.98
M ₂	80.12	80.09	99.96
M ₃	89.93	90.02	100.10
M ₄	95.02	95.07	100.05
M ₅	100.03	99.92	99.89
M ₆	104.99	105.11	100.11
M ₇	110.47	110.79	100.29
M ₈	120.05	120.12	100.06
M ₉	130.02	130.11	100.07
Середнє значення, Z, %			100.06
Стандартне відхилення, S _z , %			0.06
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 8) \cdot S_z = 2.3060 S_z$, %			0.14
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta_{As} = 3.2\%$			виконується (< 3.2)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 $, %			0.06
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta\%$			виконується (< 0.77)
Загальний висновок про методику			Коректна

Отже, експериментальні результати прецизійності характеризуються припустимим розкидом відносно середнього \bar{i} , відповідно низьким стандартним відхиленням Sz % на всьому діапазоні концентрацій. Середня похибка методики становить δ % = 0.06, що характеризує достатню близькість середнього результату отриманої оптичної густини до його номінального значення.

3.2.5 Робастність методики

Вивчення робастності було проведено на етапі розробки спектрофотометричної методики визначення валсартану за реакцією з МЧ під час встановлення оптимальних умов проведення перебігу реакцій та визначення факторів, які можуть впливати на величину оптичної густини (кількість МЧ та стабільність розчинів у часі).

Встановлено, що коливання кількості МЧ у межах ± 10 % не впливає на результати дослідження (рис. 3.16, табл. 3.11) та досліджувані розчини стабільні впродовж 45 хв (рис. 3.13).

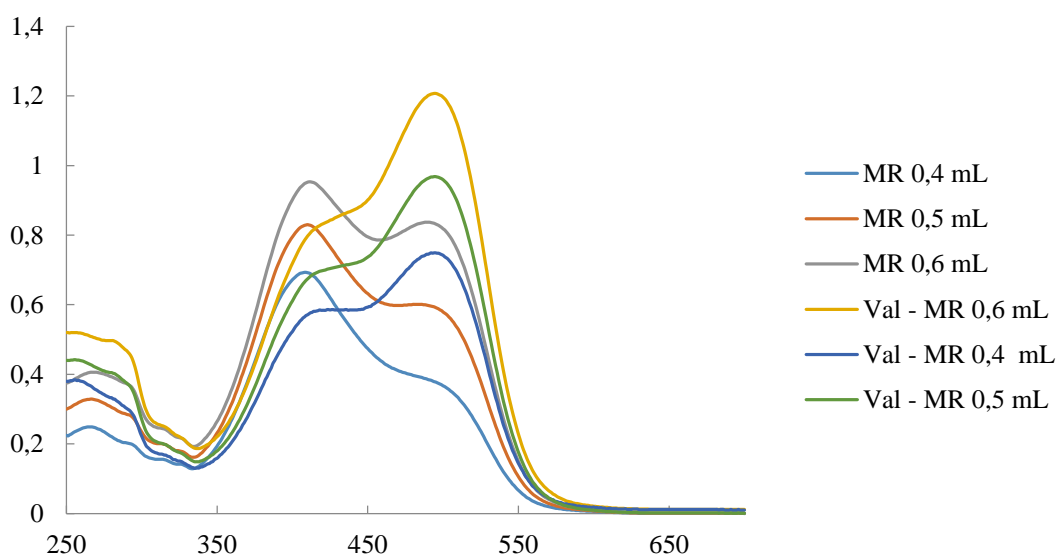


Рисунок 3.16 – Спектри поглинання МЧ та валсартану з МЧ за умов вивчення кількості доданого МЧ

Таблиця 3.11 – Результати зміни оптичної густини від кількості доданого МЧ

Кількість доданого МЧ, мл	ΔA
0.4	0.370
0.5	0.374
0.6	0.373

3.2.6 Оцінки озеленіння аналітичної методики

Принципи «зеленої хімії» були враховані при розробці спектрофотометричної методики визначення валсартану в субстанціях та ЛЗ за реакцією з МЧ [92-101]. У табл. 3.12 узагальнено результати оцінки озеленіння аналітичної методики.

Таблиця 3.12 – Аналітична еко-шкала для оцінки озеленіння розробленої методики

Параметри	Пенальті бали
Реактиви	
Етанол	4
МЧ	1
Споживання енергії	1
Професійні шкідливості	0
Відходи	5
Загальна кількість пенальті балів	11
Бал аналітичної еко-шкали	89
Висновок	Відмінний зелений аналіз

Результати, представлені у табл. 3.12, показують, що розроблена спектрофотометрична методика визначення валсартану в субстанції та лікарських засобах є відмінною у відповідності до принципів «зеленої хімії».

3.3 Розробка та валідація спектрофотометричної методики одночасного визначення валсартану та атенололу в бінарній суміші та ЛЗ

З метою розробки методики одночасного кількісного визначення валсартану та атенололу в бінарній суміші, яка містила 80 мг валсартану та 100 мг атенололу (фіксована комбінація) ми розглянули можливість застосування методу УФ-спектрофотометрії. Попередніми випробуваннями були вибрані належні умови пробопідготовки і кількісного визначення [144, 145]. Попередньо спектрофотометрували метанольні вилучення з таблеток валсартану та атенололу. Як випливає із спектральних кривих на рис. 3.17, УФ-спектр метанольного вилучення валсартану та атенололу з таблеток має інтенсивно виражені смуги поглинання при 230.5 нм, 249.5 нм, 276 нм та 282 нм, ФСЗ валсартану в метанолі – 230.5 нм та 249.5 нм, ФСЗ атенололу в метанолі 276 нм та 282 нм.

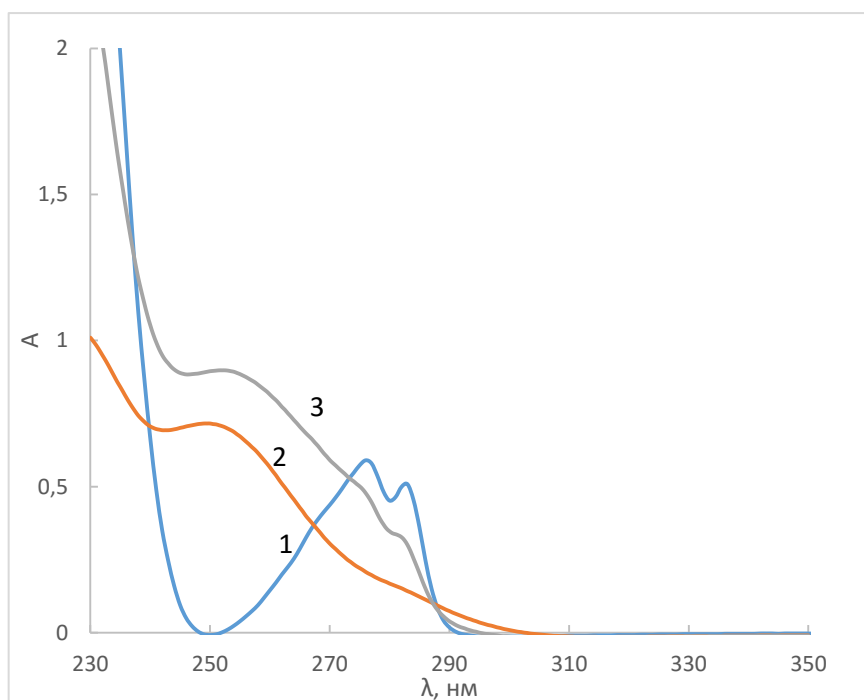


Рисунок 3.17 – Електронні спектри поглинання метанольних розчинів за умов кількісного визначення для: 1 – ФСЗ атенололу, 2 – ФСЗ валсартану, 3 – метанольного вилучення з таблеток валсартану та атенололу (випробовуваний розчин)

Для розрахунку кількісного вмісту валсартану та атенололу вимірювали оптичну густину за довжин хвиль 249.5 нм (визначення валсартану) та 282 нм (визначення атенололу) відносно компенсаційного розчину.

Результати визначення вмісту валсартану та атенололу у ЛЗ наведено в табл. 3.13, 3.14.

Таблиця 3.13 – Результати кількісного визначення валсартану в лікарських засобах ($n=6, p=0.95$)

Лікарський засіб	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
Таблетки «Валсартан КРКА» 0.08 г	0.0803 0.0806 0.0794 0.0796 0.0809 0.0802	$\bar{m} = 0.0802$ г $S = 5.75 \times 10^{-4}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 6.03 \times 10^{-4}$ RDS = 0.72 $\varepsilon = 0.75$ %
Таблетки «Валсартан ТЕВА» 0.08 г	0.0803 0.0807 0.0801 0.0787 0.0812 0.0809	$\bar{m} = 0.0803$ г $S = 8.86 \times 10^{-4}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 9.3 \times 10^{-4}$ RDS = 1.10 $\varepsilon = 1.16$ %
Таблетки «Валсартан Сандоз» 0.08 г	0.0804 0.0801 0.0792 0.0791 0.0812 0.0794	$\bar{m} = 0.0799$ г $S = 8.2 \times 10^{-4}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 8.6 \times 10^{-4}$ RDS = 1.03 $\varepsilon = 1.08$ %

Таблиця 3.14 – Результати кількісного визначення атенололу в ЛЗ ($n=6$, $p=0.95$)

Лікарський засіб	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
Таблетки «Атенолол АСТРАФАРМ» 0.1 г	0.1032	$\bar{m} = 0.1009$ г $S = 1.58 \times 10^{-3}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 1.65 \times 10^{-3}$ RDS = 1.56 $\varepsilon = 1.64$ %
	0.1012	
	0.0994	
	0.0991	
	0.1021	
	0.1005	

Валідацію аналітичної методики проводили за основними валідаційними характеристиками: специфічність, лінійність, прецизійність, правильність, робасність, діапазон застосування [135, 136].

3.3.1 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. 3.15.

Згідно з табл. 3.15 невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) для визначення валсартану в ЛЗ становить 1.77 %. Розподіл невизначеності пробопідготовки за операціями для кількісного визначення валсартану в ЛЗ показує, що найбільшу невизначеність в пробопідготовку вносить операція 1 – взяття наважки ФСЗ валсартану. Невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) для визначення атенололу в бінарній суміші становить 1.67 %. Розподіл невизначеності пробопідготовки за операціями для кількісного визначення атенололу в ЛЗ показує, що найбільшу невизначеність в пробопідготовку вносять операції 7, 11 – взяття аліквоти піпеткою 1.0 мл.

Таблиця 3.15 – Розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення ЛЗ

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
Розчин порівняння валсартану		
1) взяття наважки ФСЗ валсартану	m_0	$0.2 \text{ мг}/20 \text{ мг} \times 100\% = 1.00 \%$
2) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.00 мл	25	0.23 %
3) взяття аліквоти піпеткою 1.0 мл	1.0	0.98 %
4) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.00 мл	25	0.23 %
Розчин порівняння атенололу		
5) взяття наважки ФСЗ атенололу	m_0	$0.2 \text{ мг}/25 \text{ мг} \times 100\% = 0.80 \%$
6) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.00 мл	25	0.23 %
7) взяття аліквоти піпеткою 1.0 мл	1.0	0.98 %
8) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.00 мл	25	0.23 %
Випробовуваний розчин		
9) взяття наважки таблеток	m_1	$0.2 \text{ мг}/150 \text{ мг} \times 100\% = 0.13 \%$
10) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.00 мл	25	0.23 %
11) взяття аліквоти піпеткою 1.0 мл	1.0	0.98 %
12) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.00 мл	25	0.23 %

Повна невизначеність аналітичної методики (Δ_{As}) визначення валсартану становить 1.90 %.

$$\Delta_{As} = 1.90 \% \leq \max \Delta_{As} = 3.2 \%$$

Повна невизначеність аналітичної методики (Δ_{As}) визначення атенололу становить 1.81 %.

$$\Delta_{As} = 1.81 \% \leq \max \Delta_{As} = 3.2 \%$$

Отже, прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не перевищувала критичних значень ($\max \Delta_{As}$), що доводить, що розроблена спектрофотометрична методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях.

3.3.2 Специфічність методики

При знятті спектру розчину, отриманого з метанольного вилучення модельної таблетної суміші, що містила допоміжні речовини, і підготовленого аналогічно випробовуваному розчину, не спостерігалось поглинання за довжини хвилі поглинання 249.5 нм та 282 нм, тобто, плацебо аналізованих таблеток за умов кількісного визначення не дає смуг поглинання, а, отже – не впливає на оптичну густину під час кількісного визначення валсартану та атенололу.

3.3.3 Лінійність, діапазон застосування методики

Вивчення лінійності проводили на всьому діапазоні застосування аналітичної методики з використанням модельних розчинів зразків відповідно до вимог ДФУ. Отримані результати були оброблені за допомогою методу найменших квадратів для рівняння $y=a+b \cdot x$, де y – оптична густина, x – концентрація визначуваної лікарської речовини, a – вільний член лінійної залежності для розрахованої регресійної прямої, b – кутовий коефіцієнт для розрахованої регресійної прямої. Електронні спектри поглинання метанольних розчинів валсартану та атенололу за умов вивчення лінійності аналітичної методики представлено на рис. 3.18, 3.19.

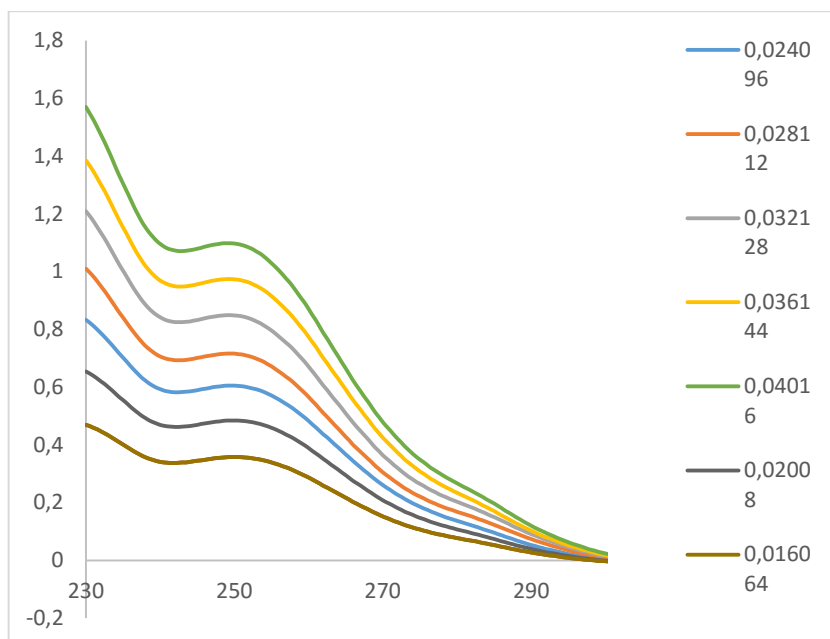


Рисунок 3.18 – Електронні спектри поглинання метанольних розчинів валсартану за умов вивчення лінійності аналітичної методики

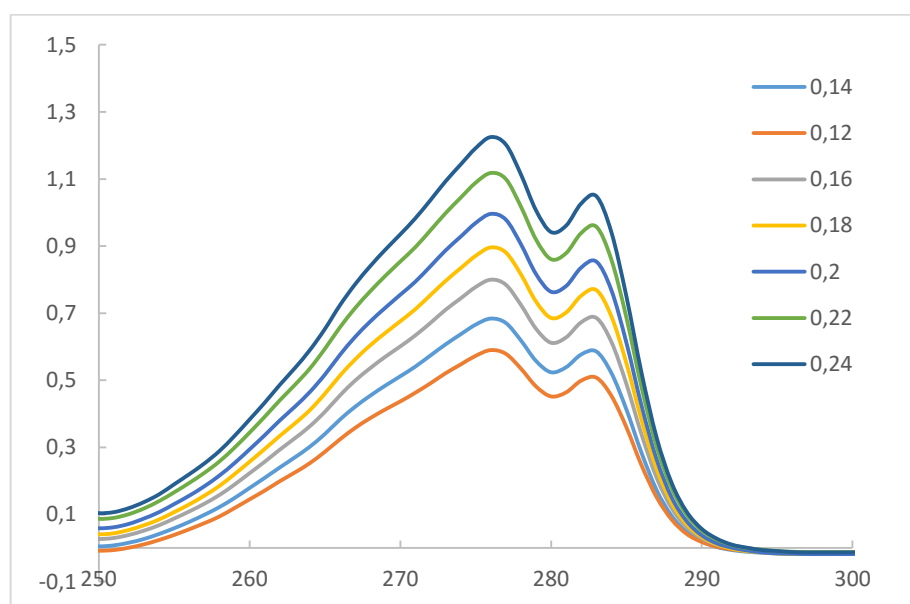


Рисунок 3.19 – Електронні спектри поглинання метанольних розчинів атенололу за умов вивчення лінійності аналітичної методики

Графіки залежності оптичної густини від концентрації валсартану та атенололу наведено на рис. 3.20, 3.21. Результати розрахунків рівнянь лінійної регресії представлено в табл. 3.16.

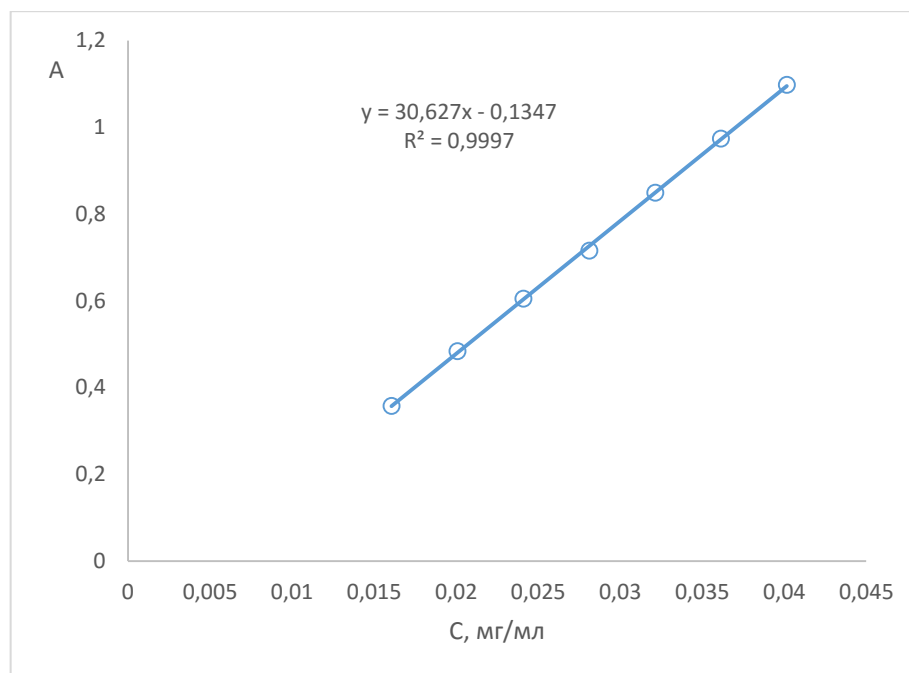


Рисунок 3.20 – Графік залежності оптичної густини від концентрації валсартану

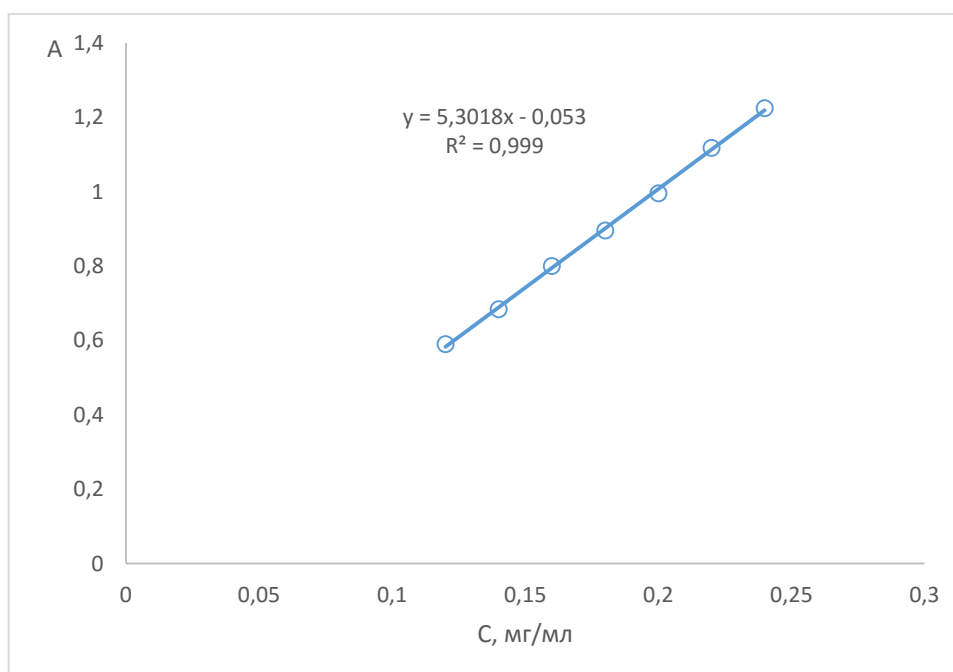


Рисунок 3.21 – Графік залежності оптичної густини від концентрації атенололу

Параметри лінійності (рис. 3.20, 3.21, табл. 3.16) відповідають вимогам ДФУ на всьому діапазоні застосування аналітичної методики (0.015-0.045 мг/мл для валсартану та 0.12-0.25 мг/мл для атенололу).

Таблиця 3.16 – Метрологічні характеристики лінійної залежності

Величина	Значення	Критерій	Висновок (відповідає або не відповідає)
Валсартан			
$b \pm (S_b)$	30.6270 $\pm(0.3563)$	–	
$a \pm (S_a)$	0.1347 $\pm(0.0154)$	$ a \leq \Delta a = t(95\%;7) \cdot S_a = 0.0377$	Відповідає
R^2	0.9997	> 0.9957	Відповідає
Атенолол			
$b \pm (S_b)$	5.3018 $\pm(0.3574)$	–	
$a \pm (S_a)$	0.0530 $\pm(0.0059)$	$ a \leq \Delta a = t(95\%;7) \cdot S_a = 0.0144$	Відповідає
R^2	0.9990	> 0.9961	Відповідає

3.3.4 Правильність та прецизійність методики

Для перевірки правильності та прецизійності методики готували суміші з точно відомим вмістом валсартану та атенололу, які охоплювали діапазон застосування методики (з концентраціями 70-130 % від номінальної). Відповідно до вимог ДФУ, розраховували такі критерії: систематична похибка $\delta\%$ (для правильності) та відносний довірчий інтервал Δz (для прецизійності). Результати проведених розрахунків наведено в табл. 3.17, 3.18.

Як випливає з табл. 3.17, 3.18, експериментальні результати прецизійності характеризуються припустимим розкиданням відносно середнього \bar{i} , відповідно низьким стандартним відхиленням S_z % на всьому діапазоні концентрацій. Середня похибка методик становить δ % 0.01 та 0.05, що характеризує достатню близькість середніх результатів отриманих оптичних густин до номінальних значень.

Таблиця 3.17 – Результати вивчення правильності та прецизійності методики визначення валсартану

Моделльні розчини	Вміст валсартану, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100\%$
	Введено, $X_i = (m_i/m_{rs}) \cdot 100\%$	Знайдено, $Y_i = (A_i/A_{rs}) \cdot 100\%$	
M ₁	70.11	70.07	99.94
M ₂	80.04	80.01	99.96
M ₃	89.99	90.04	100.05
M ₄	95.09	95.03	99.94
M ₅	100.12	99.99	99.87
M ₆	104.99	105.05	100.06
M ₇	110.53	110.62	100.08
M ₈	120.01	120.07	100.05
M ₉	130.12	130.04	99.94
Середнє значення, Z, %			99.99
Стандартне відхилення, S _z , %			0.01
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 8) S_z = 2.3060 S_z, \%$			0.02
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta_{As} = 3.2\%$			виконується (< 3.2)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 , \%$			0.01
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta\%$			виконується (< 0.01)
Загальний висновок про методику			Коректна

Таблиця 3.18 – Результати вивчення правильності та прецизійності методики визначення атенололу

Модельні розчини	Вміст атенололу, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100\%$
	Введено, $X_i = (m_i/m_{rs}) \cdot 100\%$	Знайдено, $Y_i = (A_i/A_{rs}) \cdot 100\%$	
M ₁	69.91	69.86	99.93
M ₂	80.01	80.05	100.05
M ₃	89.96	89.91	99.94
M ₄	95.11	95.02	99.91
M ₅	100.09	99.97	99.88
M ₆	104.95	104.99	100.04
M ₇	110.52	110.42	99.91
M ₈	120.07	120.01	99.95
M ₉	130.15	130.07	99.94
Середнє значення, Z, %			99.95
Стандартне відхилення, S _z , %			0.05
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 8) \cdot S_z = 2.3060 S_z$, %			0.12
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta_{As} = 3.2\%$			виконується (< 3.2)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 $, %			0.05
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta\%$			виконується (< 0.05)
Загальний висновок про методику			Коректна

3.3.5 Робасність методики

Для вивчення робасності методики був обраний 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 ми обрали діапазон часу – 2 години. Отримані результати наведено в таблиці 3.19. Розчини стабільні впродовж 100 хв (табл. 3.19).

Таблиця 3.19 – Результати вивчення стабільності досліджуваних розчинів валсартану (1) та атенололу (2) і їх розчинів порівняння валсартану (3) та атенололу (4)

№	t, хв						A сер	RSD _t , %
	0	20	40	60	80	100		
1	0.854	0.854	0.854	0.853	0.852	0.852	0.853	0.12
2	0.327	0.327	0.325	0.325	0.325	0.322	0.325	0.56
3	0.703	0.703	0.703	0.703	0.701	0.701	0.702	0.15
4	0.508	0.505	0.505	0.505	0.505	0.505	0.506	0.24

3.3.6 Оцінки озеленіння аналітичної методики

Принципи зеленої хімії були враховані при розробці спектрофотометричної методики визначення валсартану та атенололу в бінарній суміші та ЛЗ [92-101]. У табл. 3.20 узагальнено результати оцінки озеленіння аналітичної методики.

Таблиця 3.20 – Аналітична еко-шкала для оцінки озеленіння розробленої методики

Параметри	Пенальті бали
1	2
Реактиви	
Метанол	4

Продовження таблиці 3.20

1	2
Споживання енергії	1
Професійні шкідливості	0
Відходи	5
Загальна кількість пенальті балів	9
Бал аналітичної еко-шкали	91
Висновок	Відмінний зелений аналіз

Результати, представлені у табл. 3.20, показують, що розроблена спектрофотометрична методика визначення валсартану та атенололу в бінарній суміші та ЛЗ є відмінною у відповідності до принципів «зеленої хімії».

Висновки до розділу 3

1. Розроблено спектрофотометричні методики визначення валсартану в субстанції та ЛЗ за реакціями з БФС та МЧ. Встановлено оптимальні умови проведення реакцій валсартану з запропонованими барвниками (визначено й порівняно чутливість реакцій, обрано оптимальну кількість реагенту, підібрано розчинники та вивчено стабільність розчинів у часі). Підібрано оптимальні умови пробопідготовки.

2. Розраховано аналітичні показники чутливості реакцій «валсартан – барвник» за реакціями з БФС та МЧ. Отримані значення свідчать про високу чутливість даних реакцій. Встановлено стехіометричні співвідношення «валсартан – барвник», які складають 1:1 для продуктів реакцій барвників з валсартаном.

3. Розроблено спектрофотометричну методику одночасного визначення валсартану та атенололу в бінарній суміші та ЛЗ.

4. Проведено процедуру валідації розроблених аналітичних методик відповідно до вимог ДФУ та ІСН Q2 та підтверджено їх

специфічність/селективність, лінійність, правильність, прецизійність та робасність. Усі валідаційні параметри були в межах критеріїв прийнятності.

5. Запропоновані спектрофотометричні методики визначення валсартану та атенололу в субстанціях та ЛФ є простими, точними, експресними, «зеленими», неекстраційними, не вимагають застосування тривалої пробопідготовки та дороговартісного обладнання.

6. Усі розроблені методики можуть використовуватися в рутинному аналізі для визначення валсартану та атенололу в препаратах, що містять ці АФІ.

7. Запропоновані методики можуть бути введені в проєкти монографій ДФУ на таблетки валсартану та атенололу, а також застосовуватися аналітичними лабораторіями.

Результати експериментальних досліджень 3 розділу наведено в наукових працях автора [142, 143, 144, 145].

РОЗДІЛ 4

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ ХРОМАТОГРАФІЧНИХ МЕТОДИК ВИЗНАЧЕННЯ ВАЛСАРТАНУ ТА АТЕНОЛОЛУ В СУБСТАНЦІЯХ ТА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ

4.1 Розробка та валідація ТШХ-методики визначення валсартану та атенололу в субстанції та лікарських засобах

При розробці методик ідентифікації валсартану та атенололу в субстанціях та ЛЗ нами було обрано метод хроматографії в тонкому шарі сорбенту (ТШХ). Для ТШХ аналізу валсартану та атенололу проводили підбір рухомих фаз згідно даних літератури та з урахуванням фізико-хімічних властивостей АФІ.

При аналізі субстанцій та ЛЗ валсартану та атенололу, паралельно наносили розчини порівняння ФСЗ валсартану та атенололу. Одержану зону (пляму) випробовуваного розчину порівнювали візуально з відповідною плямою розчину порівняння за забарвленням, розміром та коефіцієнтом утримування.

Нами досліджувалися різні рухомі фази з метою вибору оптимальної для ідентифікації валсартану та атенололу методом ТШХ в субстанціях та ЛЗ. Значення коефіцієнтів утримування у досліджуваних рухомих фазах наведено в табл. 4.1.

З даних, приведених у табл. 4.1 випливає, що найоптимальніші значення коефіцієнта утримування валсартану та атенололу для їх одночасного визначення спостерігаються при використанні рухомої фази – *n*-бутанол *P* – кислота оцтова льодяна *P* – вода *P* (40:10:20) [146, 147].

Таким чином, для ідентифікації валсартану та атенололу в субстанціях та ЛЗ нами пропонується ТШХ-методики аналізу з використанням рухомих фаз, що були підібрані експериментальним шляхом.

Таблиця 4.1 – Хроматографічні характеристики валсартану та атенололу у різних рухомих фазах

Рухома фаза	Нерухома фаза (пластинка) R_f на «Sorbfil»	
	Валсартан	Атенолол
<i>хлороформ P – метанол P (9:1)</i>	0.07	0.05
<i>ацетон P – вода P (3:2)</i>	0.87	0.18
<i>хлороформ P – метанол P – розчин аміаку P (25 %) (4:4:2)</i>	0.84	0.86
<i>хлороформ P – етанол P (8:2)</i>	0.12	0.08
<i>н-бутанол P – метанол P (3:2)</i>	0.70	0.20
<i>розчин аміаку P (25 %) – пропанол P (30:70)</i>	0.69	0.71
<i>пропанол P – вода P (70:30)</i>	0.72	0.12
<i>н-бутанол P – кислота оцтова льодяна P – вода P (40:10:20)</i>	0.78	0.34

4.2 Розробка та валідація методики кількісного визначення валсартану та атенололу в субстанції та лікарських засобах методом ВЕРХ/УФ на колонці Zorbax C₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм)

Атенолол та валсартан завдяки своїй хімічній структурі мають різну розчинність у воді та органічних розчинниках, $\text{Log } P = 0.16$ та $\text{Log } P = 1.499$ відповідно [148]. Ця варіація ускладнює створення швидкого успішного та точного хроматографічного методу для їх одночасного визначення. Методи фармакопейного аналізу валсартану та атенололу використовували досить різний відсоток органічного модифікатора в рухомій фазі, що свідчить про неминуче використання градієнтного елюювання для їх одночасного визначення.

Тому, для контролю якості валсартану та атенололу, особливо в бінарній суміші, потрібні нові аналітичні методики для їх хроматографічного розділення

та кількісного визначення у ЛЗ [149]. Сучасні наукові підходи до розробки та валідації хроматографічних методик аналізу АФІ були враховувані нами при розробці хроматографічних методик визначення валсартану та атенололу в ЛЗ [150, 151]. Крім того, нами була проведена оптимізація та критична оцінка рухомої фази, швидкості потоку, довжини хвилі детектування та хроматографічної колони (Zorbax C₈, Discovery C₁₈, LiChrospher® 60 RP-select B) [152-154].

При розробці ВЕРХ/УФ методики одночасного визначення валсартану та атенололу в субстанціях та ЛЗ нами було використано колонку Zorbax C₈, яка є класичною колонкою з оберненою фазою і має високу площу поверхні і стабільність фази. Нами були підібрані умови ізократичного елюювання з бінарною рухомою фазою, що складалася з *метанолу Р* та *25 мМ розчину калію дигідрогенфосфату рН 7.3* (55:45) [155, 156]. Обрані експериментальні умови зменшували час хроматографування та кількість використовуваної рухомої фази, що знижувало вартість аналізу, та водночас забезпечувало необхідну специфічність, правильність та прецизійність результатів аналізу під час проведення контролю якості.

Розроблена хроматографічна методика визначення валсартану та атенололу у субстанції і таблетках включала приготування випробовуваного та стандартних розчинів з подальшим їх хроматографуванням і розрахунком кількісного вмісту валсартану та атенололу. Приготування випробовуваного розчину проводилося шляхом розчинення таблеткової маси валсартану та атенололу у *метанолі Р* з використанням хроматографічної колонки Zorbax C₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм) та детектуванням за довжини хвилі 225 нм. Крім цього скорочення часу аналізу досягається за рахунок спрощення умов пробопідготовки завдяки використанню як розчинника *метанолу Р*.

ВЕРХ-хроматограму, одержану за умов кількісного визначення валсартану та атенололу в субстанції та таблетках, наведено на рис. 4.1. Час утримування валсартану становив 1.75 хв, атенололу – 3.06 хв. Це свідчить про експресність аналітичної методики.

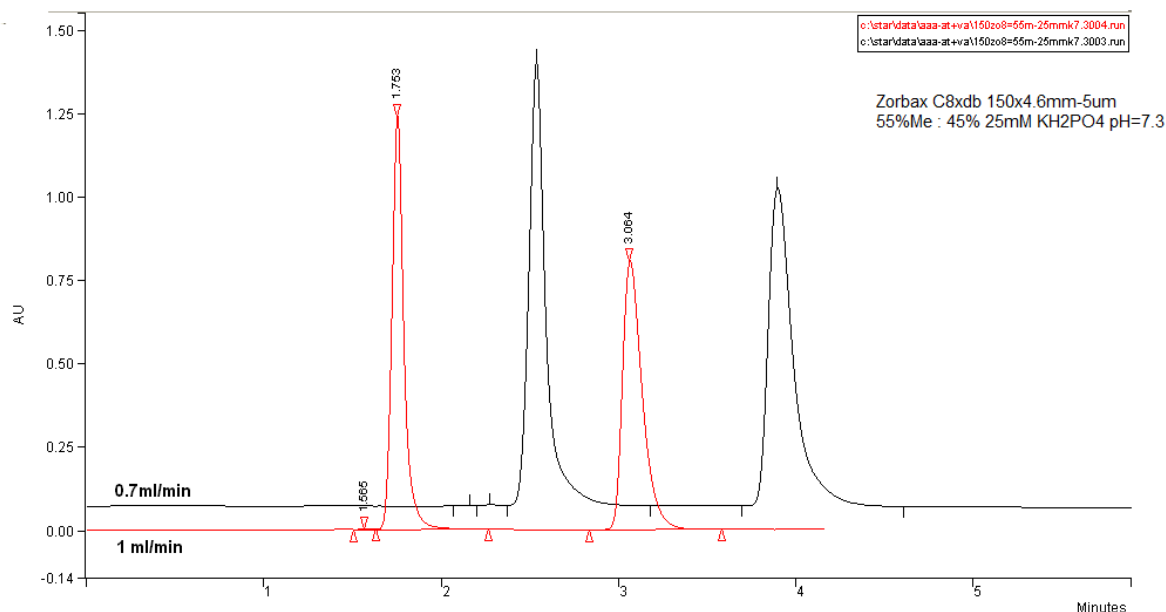


Рисунок 4.1 – ВЕРХ-хроматограма випробовуваного розчину валсартану та атенололу за швидкості рухомої фази – 0.7 мл/хв та 1.0 мл/хв

Валідацію методики кількісного визначення валсартану та атенололу в таблетках проводили за такими валідаційними характеристиками як специфічність, лінійність, правильність та прецизійність та робастність.

4.2.1 Прогноз повної невизначеності методики

Для підтвердження коректності аналітичної методики проводять прогнозування повної невизначеності методики. Розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення таблеток «Валсартан КРКА» 0.08 г наведено у табл. 4.2, таблеток «Атенолол-АСТРАФАРМ» 0.1 г – у табл. 4.3.

Згідно з табл. 4.2, невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) становить 0.33 %. Розподіл невизначеності пробопідготовки за операціями для кількісного визначення таблеток «Валсартан КРКА» 0.08 г показує, що найбільшу невизначеність в пробопідготовку вносить операція 1 – взяття наважки ФСЗ валсартану.

Повна невизначеність аналітичної методики (Δ_{As}) становить 1.61 %.

$$\Delta_{As} = 1.61 \% \leq \max \Delta_{As} = 3.2 \%$$

Таблиця 4.2 – Розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення таблеток «Валсартан КРКА» 0.08 г

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
Розчин порівняння		
1) взяття наважки ФСЗ валсартану	m_0	$0.2 \text{ мг}/80 \text{ мг} \times 100\% = 0.25 \%$
2) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 100.00 мл	100	0.12 %
Випробовуваний розчин		
3) взяття наважки таблеток	m_1	$0.2 \text{ мг}/150 \text{ мг} \times 100\% = 0.13 \%$
4) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 100.00 мл	100	0.12 %

Таблиця 4.3 – Розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення таблеток «Атенолол-АСТРАФАРМ» 0.1 г

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
Розчин порівняння		
1) взяття наважки ФСЗ атенололу	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 %
Випробовуваний розчин		
3) взяття наважки таблеток	m_1	$0.2 \text{ мг}/150 \text{ мг} \times 100\% = 0.13 \%$
4) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 100.00 мл	100	0.12 %

Згідно з табл. 4.3, невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) становить 0.29 %. Розподіл невизначеності пробопідготовки за операціями для кількісного визначення таблеток «Атенолол-АСТРАФАРМ» 0.1 г показує, що найбільшу невизначеність в пробопідготовку вносить операція 1 – взяття наважки ФСЗ атенололу.

Повна невизначеність аналітичної методики (Δ_{As}) становить 1.58 %.

$$\Delta_{As} = 1.58 \% \leq \max \Delta_{As} = 3.2 \%$$

Тобто, прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не перевищувала критичного значення ($\max \Delta_{As}$), що доводить, що розроблена хроматографічна методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях.

4.2.2 Специфічність методики

Специфічність хроматографічної методики визначення валсартану та атенололу в таблетках з використанням колонки Zorbax C₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм) доводили шляхом порівняння хроматограм стандартного, випробовуваного та холостого розчинів. Час утримування валсартану та атенололу на хроматограмі випробовуваного розчину відповідає часу утримування відповідних піків з хроматограми розчину порівняння. На хроматограмі холостого розчину не виявлено піків, вищих за шум базової лінії, час утримування яких збігався б з часом утримування валсартану чи атенололу.

4.2.3 Лінійність, діапазон застосування методики

Підтвердження лінійності здійснювали на всьому діапазоні застосування аналітичної методики з використанням стандартної процедури. Отримані результати були оброблені за допомогою методу найменших квадратів для рівняння $y = a + b \cdot x$, де y – площа піка, x – концентрація визначуваної лікарської речовини, a – вільний член лінійної залежності для розрахованої регресійної прямої, b – кутовий коефіцієнт для розрахованої регресійної прямої. Результати розрахунків рівняння лінійної регресії представлено в таблиці 4.4.

Таблиця 4.4 – Метрологічні характеристики лінійної залежності

Величина	Значення	Критерій	Висновок (відповідає або не відповідає)
Валсартан			
$b \pm (S_b)$	45.0023 $\pm(1.3296)$	–	
$a \pm (S_a)$	12099 $\pm(1.4523)$	$ a \leq \Delta a = t(95\%;7) \cdot S_a = 3.5581$	Відповідає
R^2	0.9997	> 0.9912	Відповідає
Атенолол			
$b \pm (S_b)$	12.4593 $\pm(0.9427)$	–	
$a \pm (S_a)$	78985 $\pm(1.1939)$	$ a \leq \Delta a = t(95\%;7) \cdot S_a = 2.9251$	Відповідає
R^2	0.9995	> 0.9953	Відповідає

Параметри лінійності (див. табл. 4.4) відповідають вимогам ДФУ на всьому діапазоні застосування аналітичної методики (0.16-0.96 мг/мл для валсартану та 0.20-1.20 мг/мл для атенололу).

4.2.4 Правильність та прецизійність методики

Для перевірки правильності та прецизійності методики готували суміші з точно відомим вмістом АФІ, які охоплювали діапазон застосування методики (з концентраціями 70, 80, 90, 95, 100, 105, 110, 120, 130 від номінальної). Відповідно до вимог ДФУ розраховували такі критерії: систематична похибка $\delta\%$ (для правильності) та відносний довірчий інтервал Δz (для прецизійності).

Результати дослідів та проведених розрахунків наведено в таблицях 4.5, 4.6.

Таблиця 4.5 – Результати вивчення правильності та прецизійності методики кількісного визначення валсартану методом ВЕРХ/УФ з використанням хроматографічної колонки Zorbax C8 (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм)

Моделльні розчини	Вміст валсартану, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100\%$
	Введено, $X_i = (m_i/m_{rs}) \cdot 100\%$	Знайдено, $Y_i = (S_i/S_{rs}) \cdot 100\%$	
M ₁	69.91	69.95	100.06
M ₂	80.05	79.96	99.89
M ₃	89.98	90.04	100.07
M ₄	95.08	95.02	99.94
M ₅	100.01	99.91	99.90
M ₆	104.98	105.06	100.08
M ₇	110.02	110.09	100.06
M ₈	120.07	120.01	99.95
M ₉	130.13	130.04	99.93
Середнє значення, Z , %			99.99
Стандартне відхилення, S_z , %			0.01
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 8) \cdot S_z = 2,3060 \cdot S_z$, %			0.02
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta \leq \max \Delta_{As} = 3.2\%$			виконується (< 3.2)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 $, %			0.01
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta\%$			виконується (< 0.01)
Загальний висновок про методику			Коректна

Таблиця 4.6 – Результати вивчення правильності та прецизійності методики кількісного визначення атенололу методом ВЕРХ/УФ з використанням хроматографічної колонки Zorbax C₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм)

Моделльні розчини	Вміст атенололу, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100\%$
	Введено, $X_i = (m_i/m_{rs}) \cdot 100\%$	Знайдено, $Y_i = (S_i/S_{rs}) \cdot 100\%$	
M ₁	70.06	69.99	99.90
M ₂	80.09	79.98	99.86
M ₃	89.96	90.01	100.06
M ₄	95.05	95.01	99.96
M ₅	100.08	99.95	99.87
M ₆	105.03	105.09	100.06
M ₇	110.05	110.12	100.06
M ₈	120.09	119.98	99.91
M ₉	130.03	130.07	100.03
Середнє значення, Z, %			99.97
Стандартне відхилення, S _z , %			0.03
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 8) \cdot S_z = 2,3060 \cdot S_z$ %			0.07
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta \leq \max \Delta_{As} = 3.2$ %			виконується (< 3.2)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 $, %			0.03
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta\%$			виконується (< 0.03)
Загальний висновок про методику			Коректна

Як випливає з табл. 4.5, 4.6, експериментальні результати прецизійності характеризуються припустимим розкидом відносно середнього \bar{x} , відповідно низьким стандартним відхиленням S_z % на всьому діапазоні концентрацій. Середня похибка методик становить δ % 0.01 та 0.03, що характеризує достатню близькість середніх результатів отриманих площ піків до номінальних значень.

4.2.5 Робасність методики

Робасність методики продемонстрована на стабільності випробовуваного розчину, розчину порівняння та стійкості методики до змін хроматографічної системи. Стабільність розчину вивчалась на порівнянні концентрацій випробовуваного розчину з використанням одного і того ж стандартного розчину протягом доби. Результати підтвердження стабільності модельних розчинів валсартану та атенололу наведено в таблиці 4.7.

Таблиця 4.7 – Підтвердження стабільності модельних розчинів валсартану та атенололу

Випробовувані розчини	Вміст, X %	Різниця вмісту, %
Свіжоприготований розчин валсартану	100.05	0.55
Розчин валсартану через 24 год	100.6	
вимоги: ≤ 1.6 % (Витримуються)		
Свіжоприготований розчин атенололу	100.02	0.10
Розчин атенололу через 24 год	99.92	
вимоги: ≤ 1.6 % (Витримуються)		

Знайдене значення (знайдено/введено) валсартану та атенололу на хроматограмах модельних розчинів, проаналізованих через 24 год після приготування, відрізняється від 100 % менше як на 1.6 %, що підтверджує робасність даної хроматографічної методики.

Стійкість методики до змін хроматографічної системи перевірялась на випробовуваному розчині. Умови хроматографування змінювалися в межах ± 10 % від вказаних в методиці. Результати вивчення робасності методики кількісного визначення валсартану та атенололу представлено в таблицях 4.8, 4.9.

Таблиця 4.8 – Результати вивчення робасності методики кількісного визначення валсартану

Умови проведення аналізу	Час утримування, хв
Стандартні умови	1.75
Швидкість потоку 1.1 мл/хв, (+10 %)	1.74
Швидкість потоку 0.9 мл/хв, (-10 %)	1.91
Температура колонки 38°C	1.79
Температура колонки 42°C	1.73

Таблиця 4.9 – Результати вивчення робасності методики кількісного визначення атенололу

Умови проведення аналізу	Час утримування, хв
Стандартні умови	3.06
Швидкість потоку 1.1 мл/хв, (+10 %)	3.04
Швидкість потоку 0.9 мл/хв, (-10 %)	3.19
Температура колонки 38°C	3.18
Температура колонки 42°C	3.03

4.2.6 Оцінки озеленіння аналітичної методики

Принципи «зеленої хімії» були враховані при розробці хроматографічної методики визначення валсартану та атенололу в ЛЗ [92-101]. У таблиці 4.10 узагальнено результати оцінки озеленіння аналітичної методики.

Таблиця 4.10 – Аналітична еко-шкала для оцінки озеленіння розробленої хроматографічної методики на колонці Zorbax C8 (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм)

Параметри	Пенальті бали
Реактиви	
Метанол	3
Калію дигідрогенфосфат	3
Споживання енергії	2
Професійні шкідливості	0
Відходи	5
Загальна кількість пенальті балів	13
Бал аналітичної еко-шкали	87
Висновок	Відмінний зелений аналіз

Результати, представлені у табл. 4.10, вказують на те, що розроблена хроматографічна методика визначення валсартану та атенололу в ЛЗ є відмінною у відповідності до принципів «зеленої хімії».

Таким чином, розроблена методика хроматографічного визначення валсартану та атенололу в субстанції та таблетках на колонці Zorbax C₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм) є простою, експресною, економічною, доступною, з дотриманням принципів «зеленої хімії» і може бути використана для аналізу якості в лабораторіях з контролю якості ЛЗ, та рекомендована до введення до монографії ДФУ.

4.3 Розробка та валідація методики кількісного визначення валсартану та атенололу в субстанції та лікарських засобах методом ВЕРХ/УФ на колонці Discovery C₁₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм)

При розробці ВЕРХ/УФ методики одночасного визначення валсартану та атенололу в субстанціях та ЛЗ нами була використана хроматографічна колонка Discovery C₁₈. Щоб знайти відповідні умови ВЕРХ нами були попередньо апробовані ізократичні та градієнтні системи рухомої фази.

Перш за все, суміш ацетонітрилу та 0.16 % розчину амонію ацетату випробовували в різних співвідношеннях, проте АФІ не були чітко розділені. Іонпарний реагент тетраметиламоній гідроксид був апробований і його не слід замінювати на інші, подібні до нього, такі як тетраметиламоній гідроксид сульфат, який не працював в наших експериментах. Збільшуючи концентрацію солі амонію ацетату більш ніж на 0.2 %, підштовхує пік атенололу ближче до мертвого об'єму, що є неприйнятним. Проаналізувавши деякі дослідження з розробки методик аналізу атенололу з іншими більш гідрофобними і менш полярними компонентами, зробили висновок, що вони непридатні для використання. Атенолол у багатоконпонентних сумішах елюється у мертвому об'ємі, тому необхідним є застосування сильнішої гідрофобної рухомої фази для одночасного визначення з валсартаном. З 1 мг/мл розчину атенололу та 0.8 мг/мл розчину валсартану помітно чутливіший 225 нм сигнал, який створює неідеальну лінійність (CV нижче 0.999), тоді як сигнал при довжинні хвилі 237 нм створює ідеальне значення (CV = 1). Тому, якщо потрібно працювати при 225 нм, розчини необхідно розводити до кінцевої аналітичної концентрації атенололу 0.5 мг/мл та валсартану 0.4 мг/мл. Цей крок в пробопідготовці не є суттєвим, проте демонструє кращу лінійність.

При розробці ВЕРХ/УФ методики кількісного визначення валсартану та атенололу в субстанції та ЛЗ використовували умови ізократичного елювання

з рухомою фазою, що складалася з *ацетонітрилу P – 16 % розчину амонію ацетату P – 1.5 M розчину тетраметиламонію гідроксиду (20:80:0.2)* для досягнення оптимальної симетрії піка АФІ, та хроматографічну колонку Discovery C18 (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм) [157, 158].

ВЕРХ-хроматограми, одержані за умов кількісного визначення валсартану та атенололу в таблетках, наведено на рис. 4.2, 4.3.

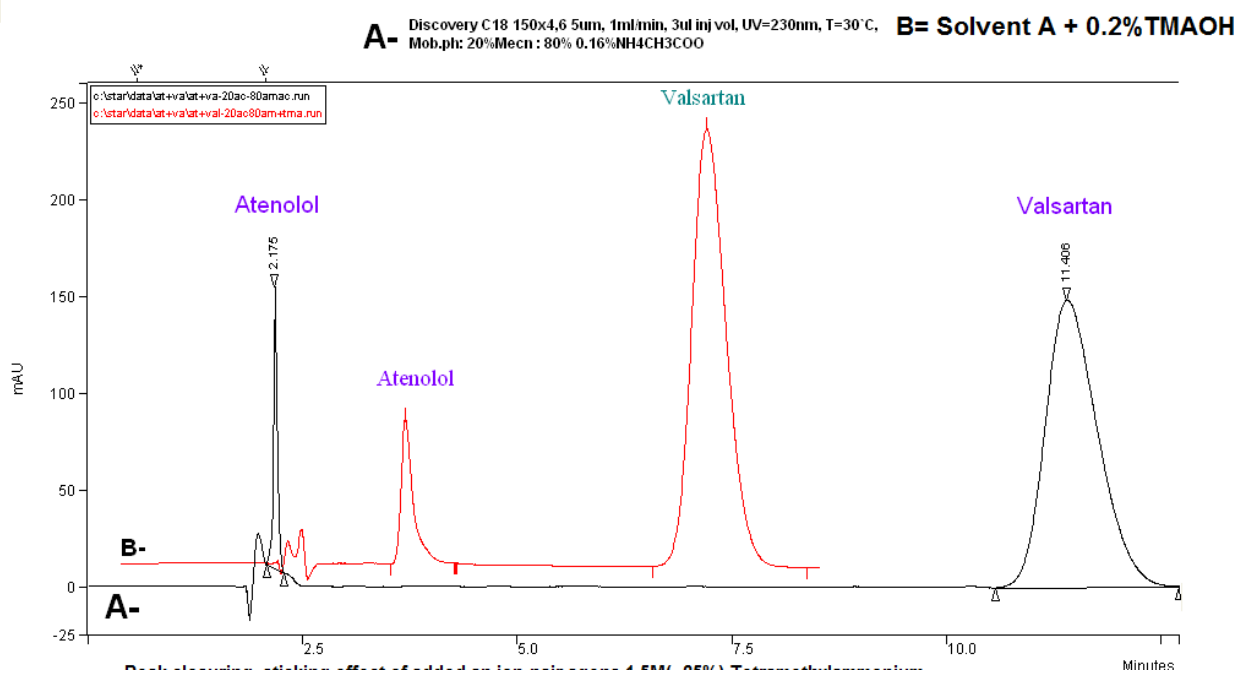


Рисунок 4.2 – ВЕРХ-хроматограма розчину валсартану та атенололу за умов кількісного визначення методом ВЕРХ/УФ з використанням хроматографічної колонки Discovery C₁₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм) та різних рухомих фаз

Хроматограми отримано із задовільними факторами утримування та хорошою піковою симетрією обох піків аналіту.

Валідацію методик кількісного визначення валсартану та атенололу в таблетках проводили за такими валідаційними характеристиками як специфічність, лінійність, правильність та прецизійність, робасність.

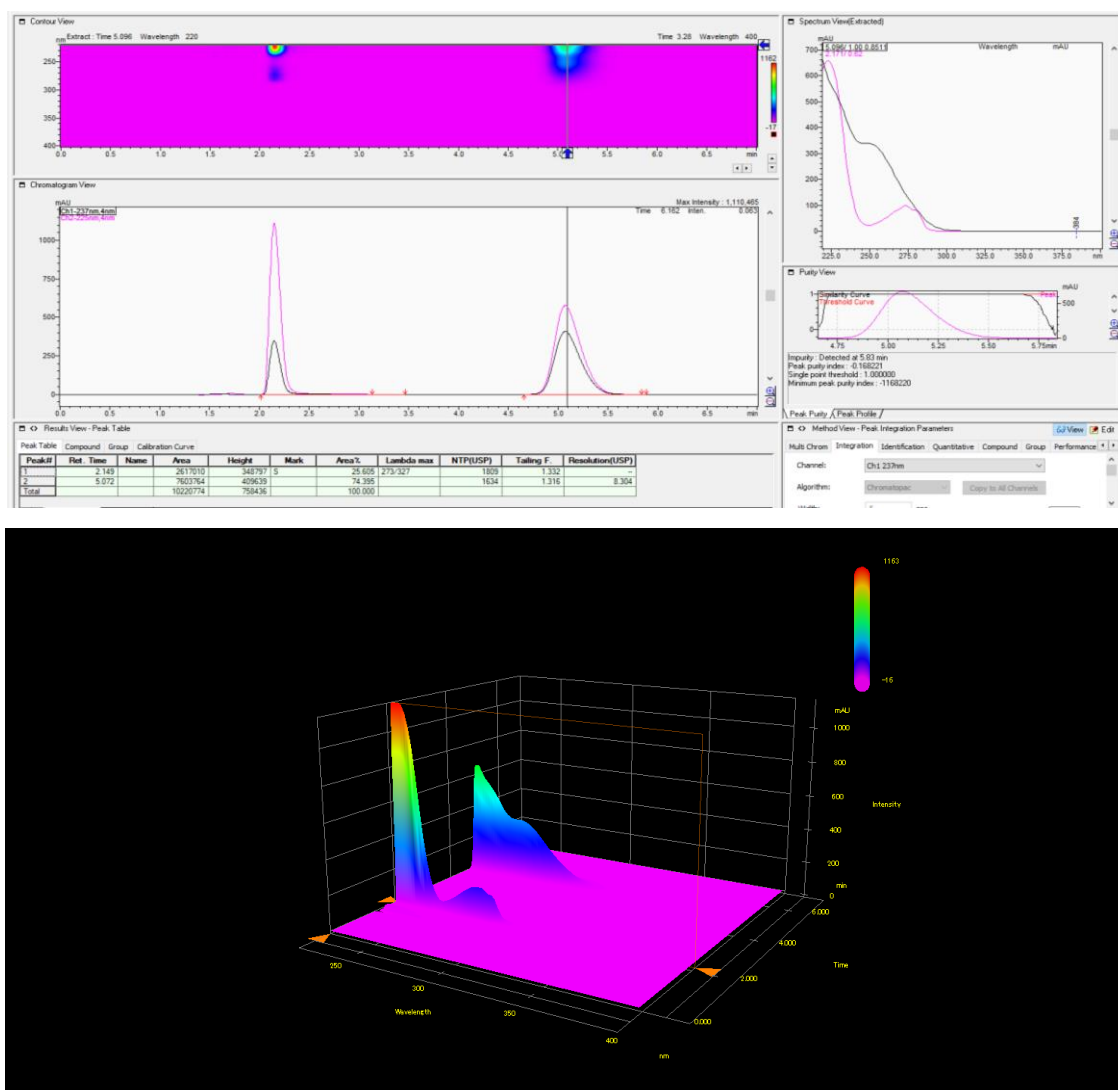


Рисунок 4.3 – Типова хроматограма розчину валсартану та атенололу за умов кількісного визначення методом ВЕРХ/УФ з використанням хроматографічної колонки Discovery C₁₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм) та рухомої фази, що складалася з ацетонітрилу P – 16 % розчину амонію ацетату P – 1.5 M розчину тетраметиламонію гідроксиду (20:80:0.2, V/V/V) і довжини хвиль детектування 225 нм та 237 нм, 3D-діаграма

4.3.1 Прогноз повної невизначеності методики

Для підтвердження коректності аналітичної методики проводять прогнозування повної невизначеності методики. Розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення таблеток «Валсартан КРКА» 0.08 г наведено у табл. 4.11, таблеток «Атенолол-АСТРАФАРМ» 0.1 г – у табл. 4.12.

Таблиця 4.11 – Розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення таблеток «Валсартан КРКА» 0.08 г

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
Розчин порівняння		
1) взяття наважки ФСЗ валсартану	m_0	$0.2 \text{ мг}/80 \text{ мг} \times 100\% = 0.25 \%$
2) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 100.00 мл	100	0.12 %
Випробовуваний розчин		
3) взяття наважки таблеток	m_1	$0.2 \text{ мг}/150 \text{ мг} \times 100\% = 0.13 \%$
4) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 100.00 мл	100	0.12 %

Згідно з табл. 4.11, невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) становить 0.33 %. Розподіл невизначеності пробопідготовки за операціями для кількісного визначення таблеток «Валсартан КРКА» 0.08 г показує, що найбільшу невизначеність в пробопідготовку вносить операція 1 – взяття наважки ФСЗ валсартану.

Повна невизначеність аналітичної методики (Δ_{As}) становить 1.61 %.

$$\Delta_{As} = 1.61 \% \leq \max \Delta_{As} = 3.2 \%$$

Згідно з табл. 4.12, невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) становить 0.29 %. Розподіл невизначеності пробопідготовки за операціями для кількісного визначення таблеток «Атенолол-АСТРАФАРМ» 0.1 г показує, що найбільшу невизначеність в пробопідготовку вносить операція 1 – взяття наважки ФСЗ атенололу.

Повна невизначеність аналітичної методики (Δ_{As}) становить 1.58 %.

$$\Delta_{As} = 1.58 \% \leq \max \Delta_{As} = 3.2 \%$$

Таблиця 4.12 – Розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення таблеток «Атенолол-АСТРАФАРМ» 0.1 г

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
Розчин порівняння		
1) взяття наважки ФСЗ атенололу	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 %
Випробовуваний розчин		
3) взяття наважки таблеток	m_1	$0.2 \text{ мг}/150 \text{ мг} \times 100\% = 0.13 \%$
4) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 100.00 мл	100	0.12 %

Тобто, прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не перевищувала критичного значення ($\max \Delta_{As}$), що доводить, що розроблена хроматографічна методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях.

4.3.2 Специфічність методики

Специфічність хроматографічної методики визначення валсартану та атенололу в таблетках з використанням колонки Discovery C₁₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм) доводили шляхом порівняння хроматограм стандартного, випробовуваного та холостого розчинів. Час утримування валсартану та атенололу на хроматограмі випробовуваного розчину відповідає часу утримування відповідних піків з хроматограми розчину порівняння. На

хроматограмі холостого розчину не виявлено піків, вищих за шум базової лінії, час утримування яких збігався б з часом утримування валсартану чи атенололу.

4.3.3 Лінійність, діапазон застосування методики

Підтвердження лінійності здійснювали на всьому діапазоні застосування методики з використанням стандартної процедури. Отримані результати були оброблені за допомогою методу найменших квадратів для рівняння $y=a+b \cdot x$, де y – площа піка, x – концентрація визначуваної лікарської речовини, a – вільний член лінійної залежності для розрахованої регресійної прямої, b – кутовий коефіцієнт для розрахованої регресійної прямої. ВЕРХ-хроматограми розчинів валсартану та атенололу за умов вивчення лінійності аналітичної методики за довжин хвиль детектування 225 нм та 237 нм представлено на рис. 4.4, 4.5. Графіки залежностей площей піків від концентрації наведено на рис. 4.6, 4.7.

Параметри лінійності (рис. 4.6, 4.7) відповідають вимогам ДФУ на всьому діапазоні застосування аналітичної методики (0.16-0.96 мг/мл для валсартану та 0.20-1.20 мг/мл для атенололу).

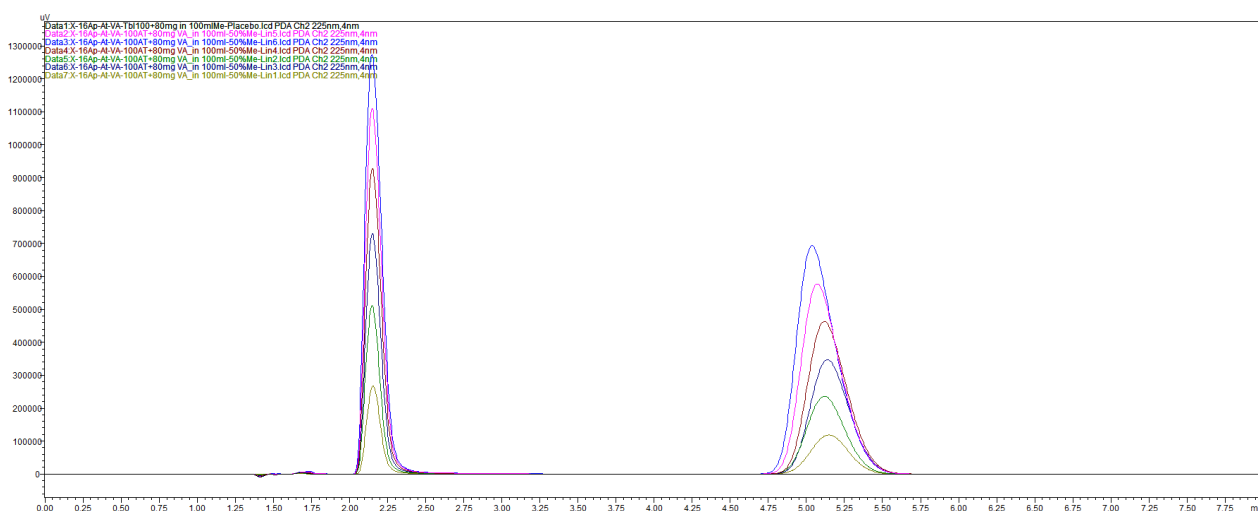


Рисунок 4.4 – ВЕРХ-хроматограми розчинів валсартану та атенололу за умов вивчення лінійності аналітичної методики (довжина хвилі детектування 225 нм)

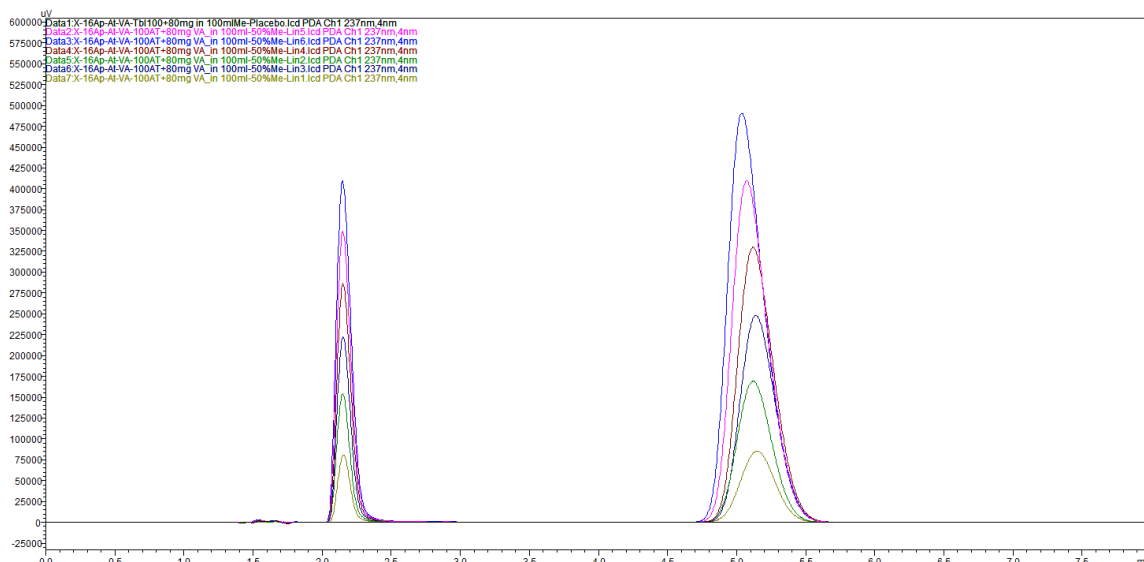


Рисунок 4.5 – ВЕРХ-хроматограми розчинів валсартану та атенололу за умов вивчення лінійності аналітичної методики (довжина хвилі детектування 237 нм)

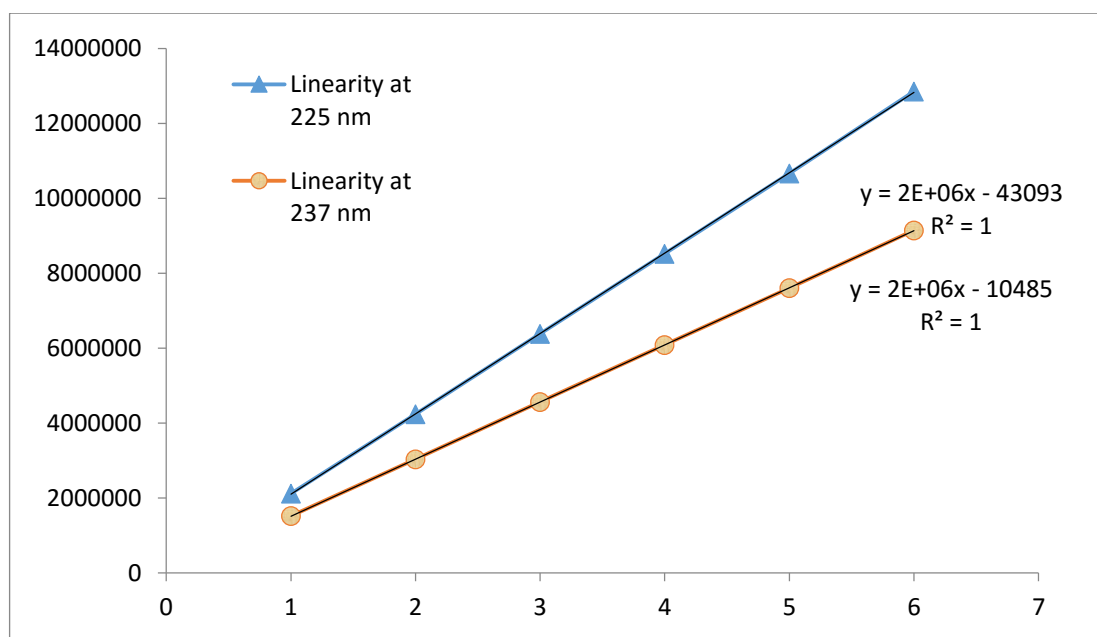


Рисунок 4.6 – Графік лінійної залежності площі піку від концентрації за умов ВЕРХ визначення валсартану в таблетках з використанням хроматографічної колонки Discovery C₁₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм) та рухомої фази, що складалася з ацетонітрилу P – 16 % розчину амонію ацетату P – 1.5 M розчину тетраметиламонію гідроксиду (20:80:0.2) і довжин хвиль детектування 225 нм та 237 нм

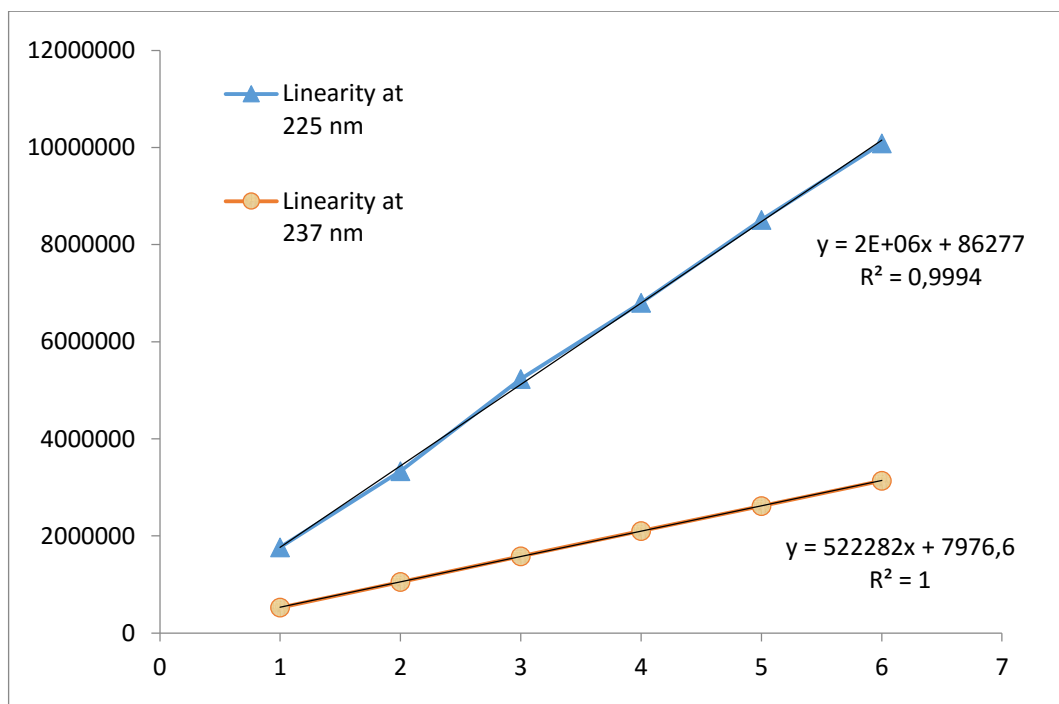


Рисунок 4.7 – Графік лінійної залежності площі піку від концентрації за умов ВЕРХ визначення атенололу в таблетках з використанням хроматографічної колонки Discovery C_{18} (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм) та рухомої фази, що складалася з ацетонітрилу $P - 16\%$ розчину амонію ацетату $P - 1.5 M$ розчину тетраметиламонію гідроксиду (20:80:0.2) і довжин хвиль детектування 225 нм та 237 нм

4.3.4 Правильність та прецизійність методики

Для перевірки правильності та прецизійності методики готували суміші з точно відомим вмістом АФІ, які охоплювали діапазон застосування методики (з концентраціями 70, 80, 90, 95, 100, 105, 110, 120, 130 від номінальної). Відповідно до вимог ДФУ розраховували такі критерії: систематична похибка $\delta\%$ (для правильності) та відносний довірчий інтервал Δz (для прецизійності).

Результати дослідів та проведених розрахунків наведено в таблицях 4.13, 4.14.

Як впливає з табл. 4.13, 4.14, експериментальні результати прецизійності характеризуються припустимим розкидом відносно середнього \bar{i} , відповідно низьким стандартним відхиленням $Sz\%$ на всьому діапазоні концентрацій.

Середня похибка методик становить $\delta \approx 0.01$, що характеризує достатню близькість середніх результатів отриманих площ піків до номінальних значень.

Таблиця 4.13 – Результати вивчення правильності та прецизійності методики кількісного визначення валсартану методом ВЕРХ/УФ з використанням хроматографічної колонки Discovery C₁₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм)

Моделльні розчини	Вміст валсартану, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100\%$
	Введено, $X_i = (m_i/m_{rs}) \cdot 100\%$	Знайдено, $Y_i = (S_i/S_{rs}) \cdot 100\%$	
M ₁	70.01	69.92	99.87
M ₂	80.09	79.98	99.86
M ₃	89.99	90.11	100.13
M ₄	95.01	95.05	100.04
M ₅	100.08	99.93	99.85
M ₆	104.97	105.09	100.11
M ₇	110.01	110.12	100.09
M ₈	120.05	119.91	99.88
M ₉	130.03	130.08	100.04
Середнє значення, Z , %			99.99
Стандартне відхилення, S_z , %			0.01
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 8) \cdot S_z = 2,3060 \cdot S_z$, %			0.02
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta \leq \max \Delta_{As} = 3.2\%$			виконується (< 3.2)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 $, %			0.01
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta\%$			виконується (< 0.01)
Загальний висновок про методику			Коректна

Таблиця 4.14 – Результати вивчення правильності та прецизійності методики кількісного визначення атенололу методом ВЕРХ/УФ з використанням хроматографічної колонки Discovery C₁₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм)

Модельні розчини	Вміст атенололу, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100\%$
	Введено, $X_i = (m_i/m_{rs}) \cdot 100\%$	Знайдено, $Y_i = (S_i/S_{rs}) \cdot 100\%$	
M ₁	70.02	70.11	100.13
M ₂	80.05	79.95	99.88
M ₃	89.98	90.07	100.10
M ₄	95.09	95.02	99.93
M ₅	100.12	99.94	99.82
M ₆	105.01	105.07	100.06
M ₇	110.01	110.14	100.12
M ₈	120.05	119.93	99.90
M ₉	130.08	130.02	99.95
Середнє значення, Z, %			99.99
Стандартне відхилення, S _z , %			0.01
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 8) \cdot S_z = 2,3060 \cdot S_z$, %			0.02
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta \leq \max \Delta_{As} = 3.2\%$			виконується (< 3.2)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 $, %			0.01
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta\%$			виконується (< 0.01)
Загальний висновок про методику			Коректна

4.3.5 Робасність методики

Робасність методики продемонстрована на стабільності випробовуваного розчину, розчину порівняння та стійкості методики до змін хроматографічної системи. Стабільність розчину вивчалась на порівнянні концентрацій випробовуваного розчину з використанням одного і того ж стандартного розчину впродовж доби. Результати підтвердження стабільності модельних розчинів валсартану та атенололу наведено в таблиці 4.15.

Таблиця 4.15 – Підтвердження стабільності модельних розчинів валсартану та атенололу

Випробовувані розчини	Вміст, X %	Різниця вмісту, %
Свіжоприготований розчин валсартану	100.42	0.39
Розчин валсартану через 24 год	100.03	
вимоги: ≤ 1.6 % (Витримуються)		
Свіжоприготований розчин атенололу	100.37	0.42
Розчин атенололу через 24 год	99.95	
вимоги: ≤ 1.6 % (Витримуються)		

Знайдене значення (знайдено/введено) валсартану та атенололу на хроматограмах модельних розчинів, проаналізованих через 24 год після приготування, відрізняється від 100 % менше як на 1.6 %, що підтверджує робасність даної хроматографічної методики.

Стійкість методики до змін хроматографічної системи перевірялась на випробовуваному розчині. Умови хроматографування змінювалися в межах ± 10 % від вказаних в методиці. Результати вивчення робасності методики кількісного визначення валсартану та атенололу представлено в таблицях 4.16, 4.17.

Таблиця 4.16 – Результати вивчення робастності методики кількісного визначення валсартану

Умови проведення аналізу	Час утримування, хв
Стандартні умови	5.07
Швидкість потоку 1.1 мл/хв, (+10 %)	5.05
Швидкість потоку 0.9 мл/хв, (-10 %)	5.11
Температура колонки 28°C	5.17
Температура колонки 32°C	5.04

Таблиця 4.17 – Результати вивчення робастності методики кількісного визначення атенололу

Умови проведення аналізу	Час утримування, хв
Стандартні умови	2.15
Швидкість потоку 1.1 мл/хв, (+10 %)	2.13
Швидкість потоку 0.9 мл/хв, (-10 %)	2.19
Температура колонки 28°C	2.18
Температура колонки 32°C	2.11

4.3.6 Оцінки озеленіння аналітичної методики

Принципи «зеленої хімії» були враховані при розробці хроматографічної методики визначення валсартану та атенололу в ЛЗ [92-101]. У таблиці 4.18 узагальнено результати оцінки озеленіння аналітичної методики.

Результати, наведені у табл. 4.18, доводять те, що розроблена хроматографічна методика визначення валсартану та атенололу в ЛЗ є відмінною у відповідності до принципів «зеленої хімії».

Таким чином, розроблена методика хроматографічного визначення валсартану та атенололу в субстанції та таблетках на колонці Discovery C₁₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм) є експресною, економічною, доступною, з дотриманням принципів «зеленої хімії», проте вимагає використання

іонпарного реагента тетраметиламонію гідроксиду. Запропонована хроматографічна методика може бути використана для аналізу якості в лабораторіях з контролю якості ЛЗ та рекомендована до введення до монографії ДФУ.

Таблиця 4.18 – Аналітична еко-шкала для оцінки озеленіння розробленої хроматографічної методики на колонці Discovery C₁₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм)

Параметри	Пенальті бали
Реактиви	
Метанол	3
Ацетонітрил	2
Амонію ацетат	2
Тетраметиламонію гідроксид	1
Споживання енергії	2
Професійні шкідливості	0
Відходи	5
Загальна кількість пенальті балів	15
Бал аналітичної еко-шкали	85
Висновок	Відмінний зелений аналіз

4.4 Розробка та валідація методик кількісного визначення валсартану та атенололу в субстанції та лікарських засобах методом ВЕРХ/УФ на колонках LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 125 мм, 5 мкм) та LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 250 мм, 5 мкм)

У попередній двох хроматографічних методиках (розділ 4.2, 4.3) ми працювали на хроматографічних колонках Zorbax C₈ та Discovery C₁₈, які значно відрізняються від колонок LiChrospher® 60 RP-select B навантаженням

вуглецю, активними поверхнями, кількістю теоретичних тарілок, залишками катіонів металів та розмірами колонок. Хроматографічні колонки Zorbax C₈, Discovery C₁₈ та LiChrospher® 60 RP-select В продемонстрували різницю в ефективності колонки та пікових симетриях аналіту при зміні швидкості потоку. Зменшуючи швидкість потоку, Zorbax C₈ збільшує асиметрію піків із зменшенням роздільної здатності, тоді як менша швидкість потоку із застосуванням LiChrospher® 60 RP-select В демонструє посилення пікових симетрій із зменшенням хвостового ефекту та підвищеною роздільною здатністю аналітів. При розробці цієї аналітичної методики ми продемонстрували повернення піку елюювання внаслідок зміни типу фосфатного буфера або залежності типу катіону фосфатного буфера від профілю елюювання різних молекул. Це має велике значення при виборі методу для вивчення домішок, продуктів розпаду або метаболітів при дослідженні різних аналітів, продуктів деградації та біоеквівалентності чи фармакокінетичних досліджень.

При розробці хроматографічної методики одночасного визначення валсартану та атенололу в бінарній суміші та ЛЗ ми вирішили вибрати та апробувати досить різні колонки на основі оксилсилану C₈, LiChrospher® 60 RP-select В з двома розмірами 125 та 250 мм. Якщо коротко порівнювати характеристики Zorbax C₈ – це матриця з меншим навантаженням вуглецю на 7.6 %, з нижчою активною поверхнею 180 м²/г, деактивованими на основі катіонами металу, з діапазоном рН 2-9 та 100 000 теоретичних тарілок на метр для толуолу, тоді як LiChrospher® 60 RP-select В (C₈) – це матриця старшого покоління одиночних кінцевих частинок, з майже вдвічі більшим навантаженням вуглецю 12.6 % та 360 м²/г, але з вдвічі меншою кількістю теоретичних тарілок до 55 000 та діапазоном рН 2-8, без дезактивації основи катіонів металів у силікагелі. Усі ці відмінності в хроматографічних матрицях спонукали нас перевірити зручність використання та придатність старих, економічно ефективних колонок LiChrospher® 60 RP-select В, які можна придбати у картриджі. Нашою метою у порівнянні з попередніми,

розробленими нами методиками – це використання хроматографічної колонки 4 мм і.д. X 250 мм, 5 мкм, що дасть можливість отримати кращу хроматограму з відмінною симетрією піків, збільшити вдвічі більше кількість теоретичних тарілок, тому що колонка в два рази більше завантажена хроматною матрицею. Це дасть нам можливість також працювати з меншою витратою аналіту 0.5-0.6 мл, що використовується для колонок 125 мм, оскільки піки добре збалансовані завдяки подвійній матриці заповнення колонки.

Для кількісного визначення вмісту валсартану та атенололу в субстанції, бінарній суміші та ЛЗ нами було розроблено ВЕРХ/УФ методику з використанням хроматографічних колонок LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм і.д. X 125 мм, 5 мкм) та LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм і.д. X 250 мм, 5 мкм) [159, 160]. Як розчинник для приготування розчинів використовується *метанол Р*.

ВЕРХ-хроматограми, одержані за умов кількісного визначення валсартану та атенололу, наведено на рис. 4.8-4.10. З наведених на рис. 4.8-4.10 типових хроматограм видно, що піки відповідають вимогам симетрії, а їх інтенсивність достатня для інтегрування і проведення подальших розрахунків. Розроблені хроматографічні методики є експресними.

Відповідно до всіх результатів, представлених вище, ми можемо зробити висновок, що перехід від тестування з попередньої колонки Zorbax C₈ до LiChrospher® 60 RP-select B дав велику кількість нових цікавих експериментальних результатів, фактів та переваг у підході до розробки методики одночасного визначення валсартану та атенололу. Для порівняння Zorbax C₈ дав більш чіткі піки завдяки кращій хімії матриці з удвічі вищими теоретичними тарілками на метр, що забезпечує несуттєву роздільну здатність між атенололом та валсартаном близько 7.2. Ця колонка показала більшу асиметрію піків зі зменшенням швидкості рухомої фази. Використання коротшої колонки LiChrospher® 60 RP-select B 125 мм було кращим вибором у експериментах зі змінами складів рухомих фаз та інших експериментальних

змінних, температури, швидкості рухомої фази, об'єму проби, що вводиться, і показало значення роздільної здатності близько 3 та кількість теоретичних тарілок близько 2000.

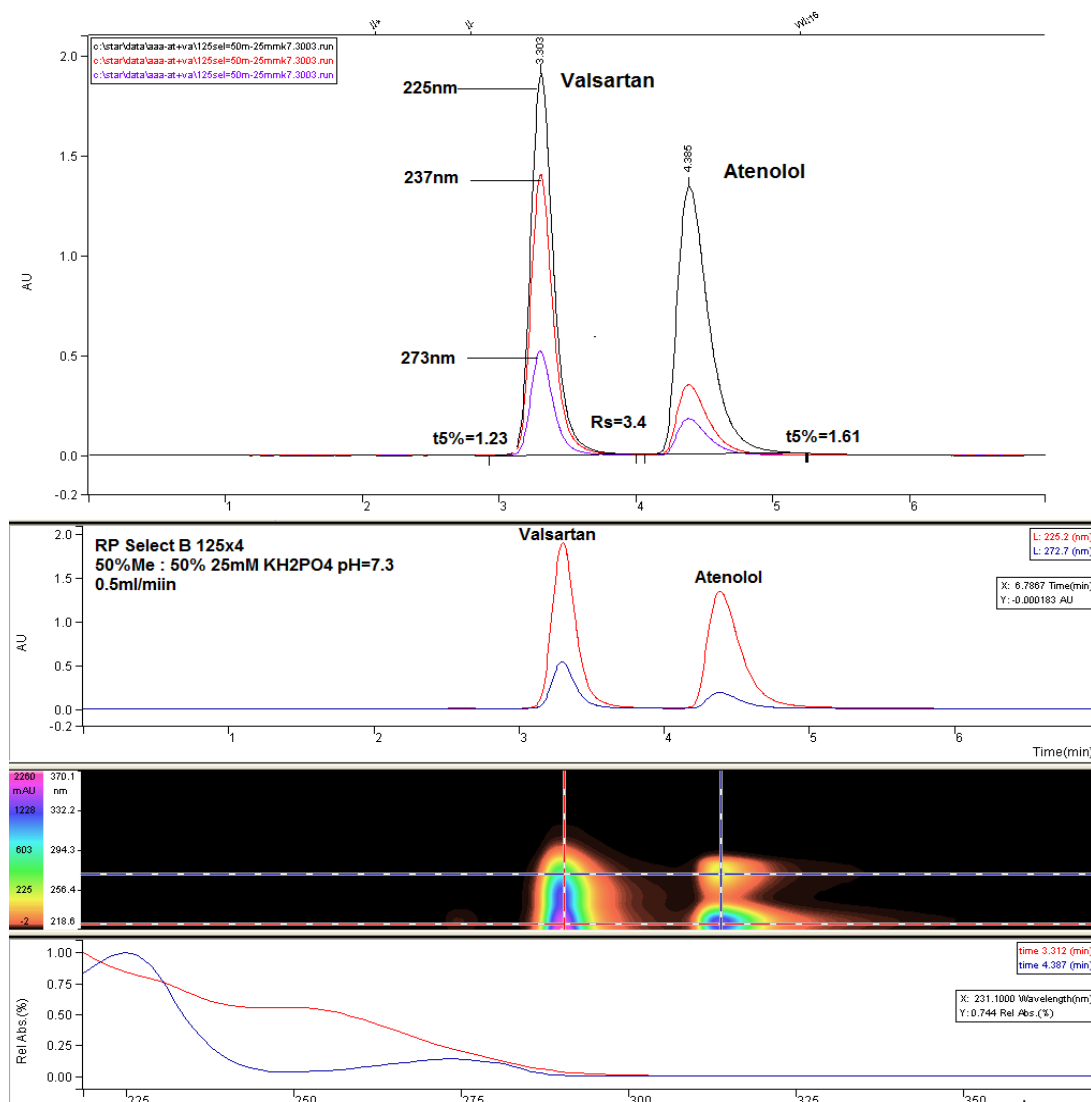


Рисунок 4.8 – Типова хроматограма розчину валсартану та атенололу за умов кількісного визначення методом ВЕРХ/УФ з використанням хроматогафічної колонки LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 125 мм, 5 мкм) та рухомої фази, що складалася з метанолу $P - 25$ мМ розчину калію дигідрогенфосфату pH 7.3 (50:50) (МА)

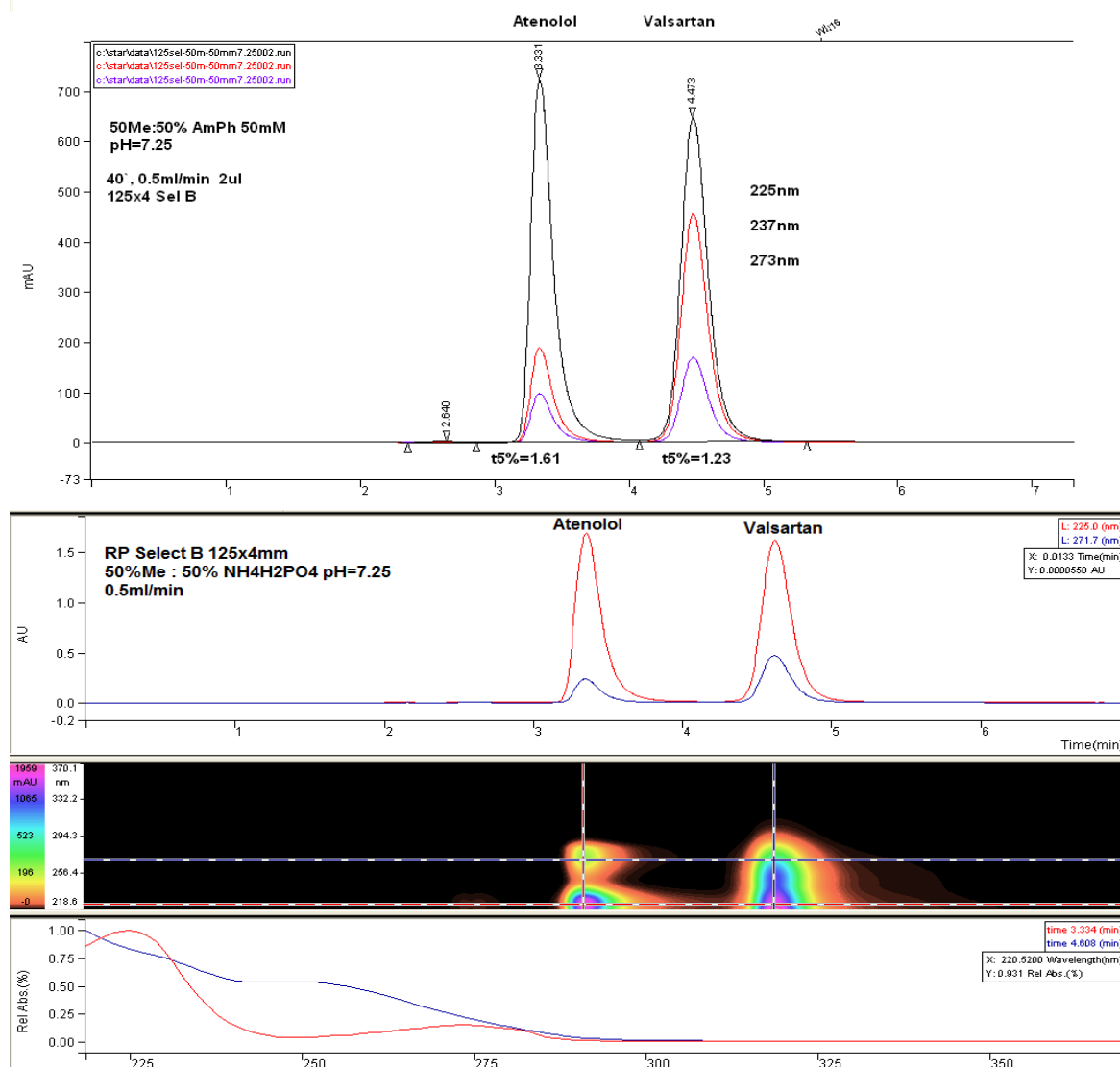


Рисунок 4.9 – Типова хроматограма розчину валсартану та атенололу за умов кількісного визначення методом ВЕРХ/УФ з використанням хроматогафічної колонки LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 125 мм, 5 мкм) та рухомої фази, що складалася з метанолу Р – 50 мМ розчину амонію дигідрогенфосфату рН 7.25 (50:50) (МВ)

Колонка LiChrospher® 60 RP-select B 125 мм продемонструвала повернення профілю елюювання атенололу та валсартану після несподівано «незначних» змін у типі фосфатного буфера, що використовувався у рухомих фазах. Після встановлення напрямку вибору оптимального складу рухомої фази, підготовки зразка та інших зазначених змінних, було застосовано та апробовано колонку LiChrospher® 60 RP-select B 250 мм, що дозволяє значно

краще побачити симетричні піки майже незалежно від швидкості потоку, більшу роздільну здатність між піками (близько 4), вдвічі більше число теоретичних тарілок для піків (4100-4440), що може бути важливим аспектом у випадках, коли необхідна краща роздільна здатність.

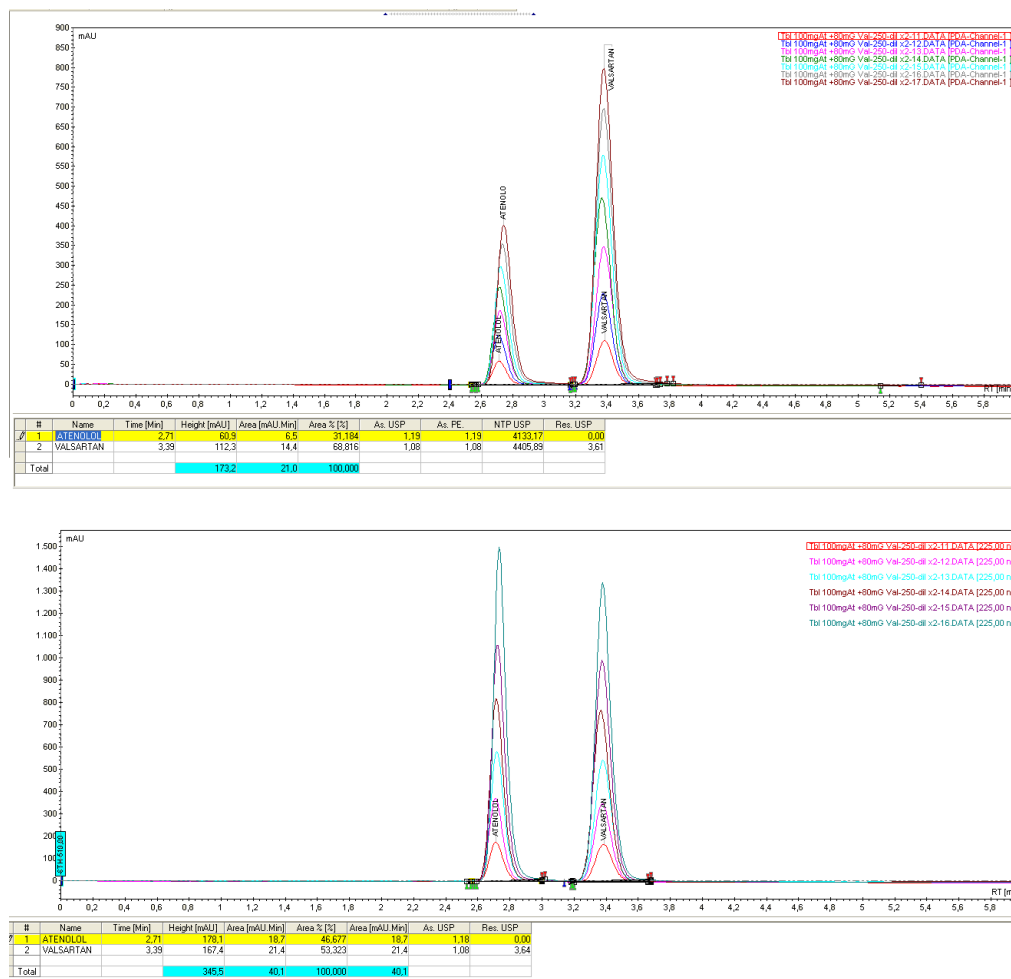


Рисунок 4.10 – Типова хроматограма розчину валсартану та атенололу за умов кількісного визначення методом ВЕРХ/УФ з використанням хроматографічної колонки LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 250 мм, 5 мкм) та рухомої фази, що складалася з метанолу $P - 50$ мМ розчину амонію дигідрогенфосфату $pH 7.2$ (55:45) (МС)

Валідацію методик кількісного визначення валсартану та атенололу в таблетках проводили за такими валідаційними характеристиками як специфічність, лінійність, правильність та прецизійність, робасність.

4.4.1 Прогноз повної невизначеності методики

Для підтвердження коректності аналітичної методики проводять прогнозування повної невизначеності методики. Розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення таблеток «Валсартан КРКА» 0.08 г наведено у табл. 4.19, таблеток «Атенолол-АСТРАФАРМ» 0.1 г – у табл. 4.20.

Таблиця 4.19 – Розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення таблеток «Валсартан КРКА» 0.08 г

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
Розчин порівняння		
1) взяття наважки ФСЗ валсартану	m_0	$0.2 \text{ мг}/40 \text{ мг} \times 100\% = 0.5 \%$
2) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 50.00 мл	50	0.17 %
Випробовуваний розчин		
3) взяття наважки таблеток	m_1	$0.2 \text{ мг}/120 \text{ мг} \times 100\% = 0.17 \%$
4) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 50.00 мл	50	0.17 %

Згідно з табл. 4.19, невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) становить 0.58 %. Розподіл невизначеності пробопідготовки за операціями для кількісного визначення таблеток «Валсартан КРКА» 0.08 г показує, що найбільшу невизначеність в пробопідготовку вносить операція 1 – взяття наважки ФСЗ валсартану.

Повна невизначеність аналітичної методики (Δ_{As}) становить 1.16 %.

$$\Delta_{As} = 1.16 \% \leq \max \Delta_{As} = 3.2 \%$$

Таблиця 4.20 – Розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення таблеток «Атенолол-АСТРАФАРМ» 0.1 г

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
Розчин порівняння		
1) взяття наважки ФСЗ атенололу	m_0	$0.2 \text{ мг}/50 \text{ мг} \times 100\% = 0.4 \%$
2) доведення до об'єму в мірній колбі ємністю 50.00 мл	50	0.17 %
Випробовуваний розчин		
3) взяття наважки таблеток	m_1	$0.2 \text{ мг}/120 \text{ мг} \times 100\% = 0.17 \%$
4) доведення до об'єму в мірній колбі ємністю 50.00 мл	50	0.17 %

Згідно табл. 4.20 невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) становить 0.50 %. Розподіл невизначеності пробопідготовки за операціями для кількісного визначення таблеток «Атенолол-АСТРАФАРМ» 0.1 г показує, що найбільшу невизначеність в пробопідготовку вносить операція 1 – взяття наважки ФСЗ атенололу.

Повна невизначеність аналітичної методики (Δ_{As}) становить 1.13 %.

$$\Delta_{As} = 1.13 \% \leq \max \Delta_{As} = 3.2 \%$$

Отже, прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не перевищувала критичного значення ($\max \Delta_{As}$), що доводить, що розроблена хроматографічна методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях.

4.4.2 Специфічність методики

Специфічність хроматографічних методик визначення валсартану та атенололу в таблетках з використанням колонок LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 125 мм, 5 мкм) та LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 250мм, 5 мкм) доводили шляхом порівняння хроматограм стандартного, випробовуваного та холостого розчинів. Час утримування валсартану та атенололу на хроматограмі випробовуваного розчину відповідає часу утримування відповідних піків з хроматограми розчину порівняння. На хроматограмі холостого розчину не виявлено піків, вищих за шум базової лінії, час утримування яких збігався б з часом утримування валсартану чи атенололу.

4.4.3 Лінійність, діапазон застосування методики

Підтвердження лінійності здійснювали на всьому діапазоні застосування аналітичної методики з використанням стандартної процедури. Отримані результати були оброблені за допомогою методу найменших квадратів для рівняння $y=a+b \cdot x$, де y – площа піка, x – концентрація визначуваної лікарської речовини, a – вільний член лінійної залежності для розрахованої регресійної прямої, b – кутовий коефіцієнт для розрахованої регресійної прямої. Графіки залежностей площей піків від концентрації наведено на рис. 4.11-4.14.

Досліджували та доводили лінійність при різних рівнях концентрацій у діапазоні робочої концентрації валсартану (0.1-0.7 мг/мл) та атенололу (0.1-0.7 мг/мл) за усіх хроматографічних умов. Метрологічні характеристики лінійної залежності представлено в таблиці 4.21.

Параметри лінійності (рис. 4.11-4.14, табл. 4.21) відповідають вимогам ДФУ на всьому діапазоні застосування аналітичної методики. Отримані результати експериментального визначення валідаційних характеристик підтверджують коректність методики при відтворюваності її в інших лабораторіях.

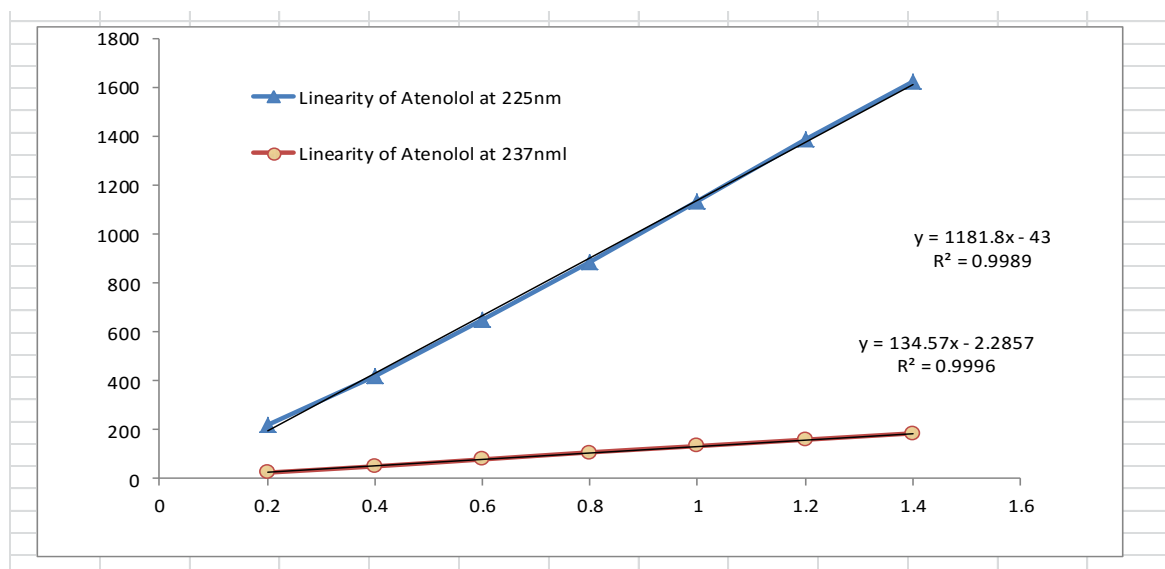


Рисунок 4.11 – Графік лінійної залежності площі піку від концентрації за умов ВЕРХ визначення атенололу в таблетках з використанням хроматографічної колонки LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм і.д. X 125 мм, 5 мкм) та рухомої фази, що складалася з метанолу $P - 50$ мМ розчину амонію дигідрогенфосфату pH 7.25 (50:50) (МВ), довжини хвиль детектування 225 нм та 237 нм

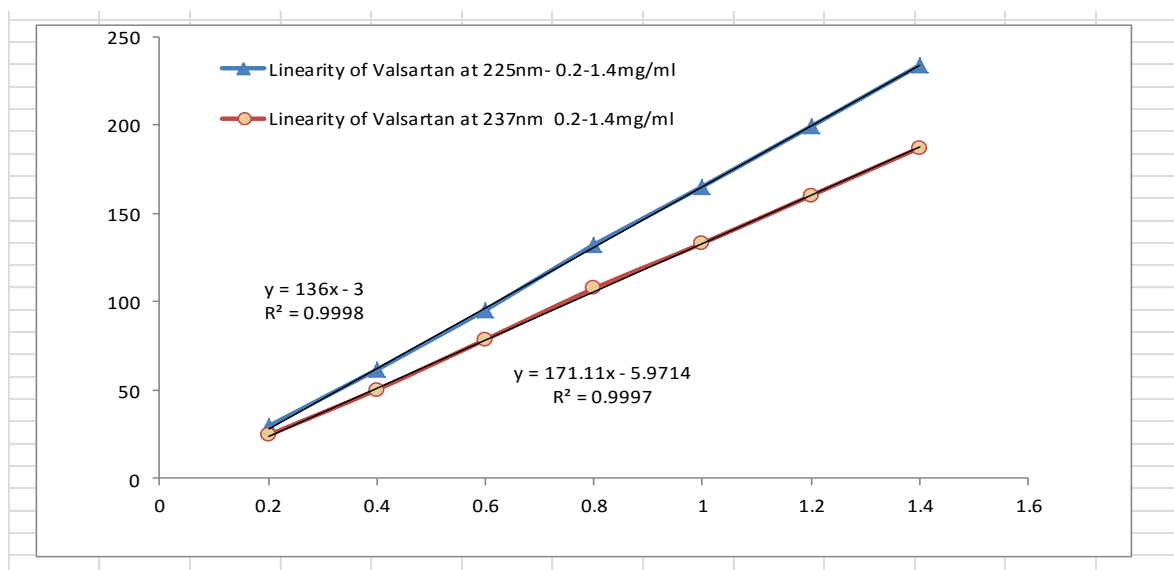


Рисунок 4.12 – Графік лінійної залежності площі піку від концентрації за умов ВЕРХ визначення валсартану в таблетках з використанням хроматографічної колонки LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм і.д. X 125 мм, 5 мкм) та рухомої фази, що складалася з метанолу $P - 50$ мМ розчину амонію дигідрогенфосфату pH 7.25 (50:50) (МВ), довжини хвиль детектування 225 нм та 237 нм

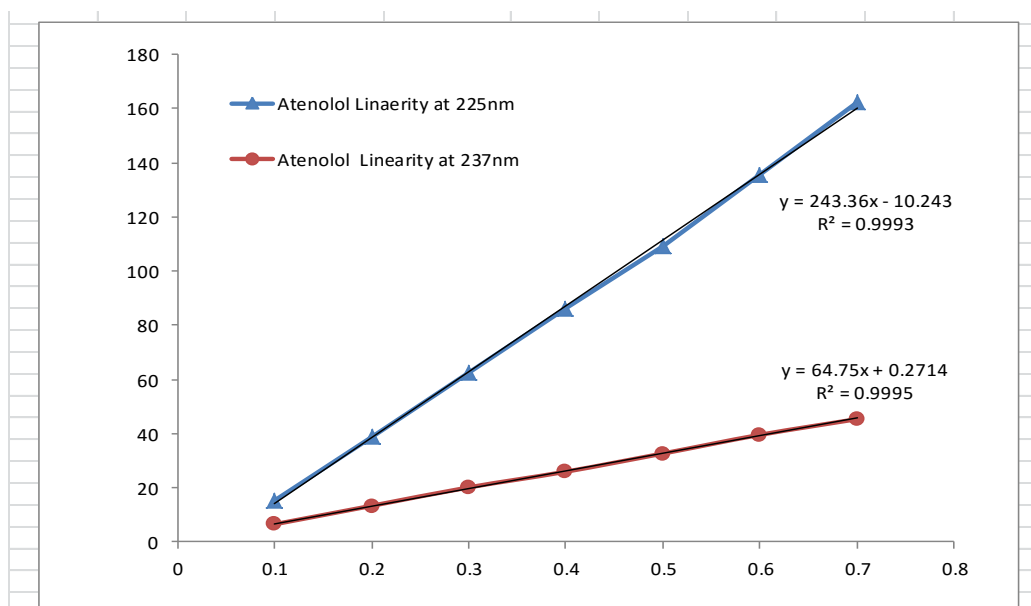


Рисунок 4.13 – Графік лінійної залежності площі піку від концентрації за умов ВЕРХ визначення атенололу в таблетках з використанням хроматографічної колонки LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 125 мм, 5 мкм) та рухомої фази, що складалася з метанолу $P - 25$ мМ розчину калію дигідрогенфосфату рН 7.3 (50:50) (МА), довжини хвиль детектування 225 нм та 237 нм

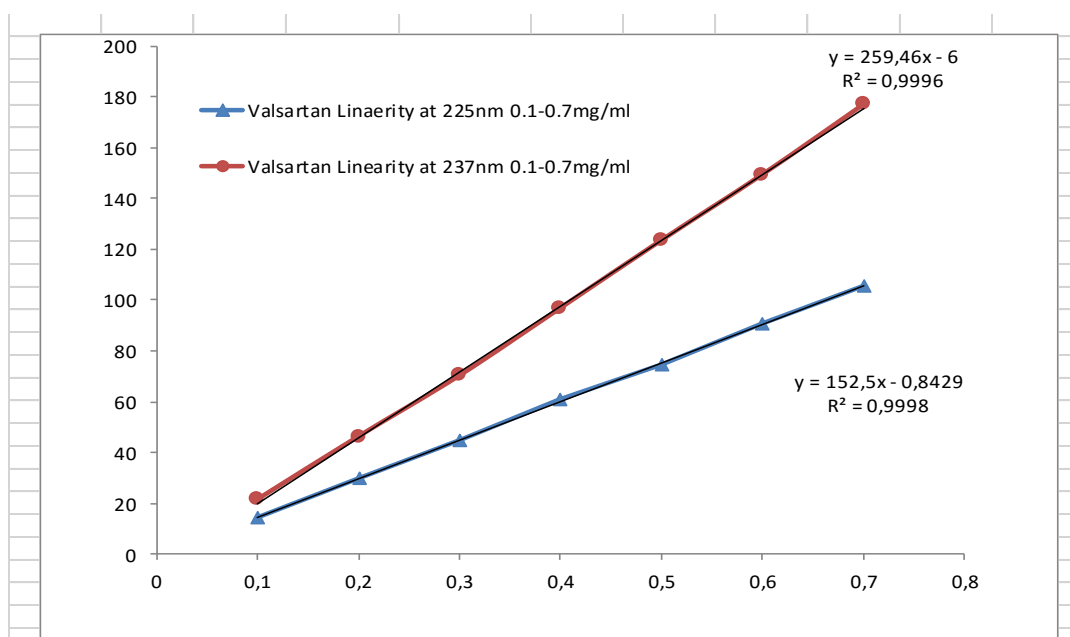


Рисунок 4.14 – Графік лінійної залежності площі піку від концентрації за умов ВЕРХ визначення валсартану в таблетках з використанням хроматографічної колонки LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 125 мм, 5 мкм) та рухомої фази, що складалася з метанолу $P - 25$ мМ розчину калію дигідрогенфосфату рН 7.3 (50:50, V/V) (МА), довжини хвиль детектування 225 нм та 237 нм

Таблиця 4.21 – Метрологічні характеристики лінійної залежності

Хроматографічні умови	Аналіт	Рівняння регресії, критерій, МВ та МКВ	Висновок (відповідає або не відповідає)
1	2	3	4
Колонка LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 125 мм, 5 мкм), рухома фаза – метанол P – 25 mM розчин калію дигідрогенфосфату рН 7.3 (50:50) (МА), швидкість рухомої фази 0.5 мл/хв, температура колонки 40° С, детектування за довжини хвилі 225 нм	Валсартан	$y = 152.5x - 0.8429$ $R^2 = 0.9998$ МВ – 0.8 мкг/мл МКВ – 4 мкг/мл	Відповідає $R^2 > 0.9924$ $ a \leq \Delta a = t(95\%; 7) \cdot S_a = 2.3429$
	Атенолол	$y = 243.36x - 10.243$ $R^2 = 0.9993$ МВ – 0.6 мкг/мл МКВ – 3 мкг/мл	Відповідає $R^2 > 0.9941$ $ a \leq \Delta a = t(95\%; 7) \cdot S_a = 2.6389$
Колонка LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 125 мм, 5 мкм), рухома фаза – метанол P – 25 mM розчин калію дигідрогенфосфату рН 7.3 (50:50) (МА), швидкість рухомої фази 0.5 мл/хв, температура колонки 40° С, детектування за довжини хвилі 237 нм	Валсартан	$y = 259.46x - 6$ $R^2 = 0.9996$ МВ – 0.8 мкг/мл МКВ – 4 мкг/мл	Відповідає $R^2 > 0.9956$ $ a \leq \Delta a = t(95\%; 7) \cdot S_a = 1.9578$
	Атенолол	$y = 64.75x + 0.2714$ $R^2 = 0.9995$ МВ – 0.6 мкг/мл МКВ – 3 мкг/мл	Відповідає $R^2 > 0.9911$ $ a \leq \Delta a = t(95\%; 7) \cdot S_a = 2.4284$
Колонка LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 125 мм, 5 мкм), рухома фаза – метанол P – 50 mM розчин амонію дигідрогенфосфату рН 7.25 (50:50) (МВ), швидкість рухомої фази 0.5 мл/хв, температура колонки 40° С, детектування за довжини хвилі 225 нм	Валсартан	$y = 136x - 3$ $R^2 = 0.9998$ МВ – 0.8 мкг/мл МКВ – 4 мкг/мл	Відповідає $R^2 > 0.9964$ $ a \leq \Delta a = t(95\%; 7) \cdot S_a = 1.4247$
	Атенолол	$y = 1181.8x - 43$ $R^2 = 0.9989$ МВ – 0.6 мкг/мл МКВ – 3 мкг/мл	Відповідає $R^2 > 0.9932$ $ a \leq \Delta a = t(95\%; 7) \cdot S_a = 1.9911$

Продовження таблиці 4.21

1	2	3	4
Колонка LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 125 мм, 5 мкм), рухома фаза – метанол P – 50 mM розчин амонію дигідрогенфосфату рН 7.25 (50:50) (МВ), швидкість рухомої фази 0.5 мл/хв, температура колонки 40° С, детектування за довжини хвилі 237 нм	Валсартан	$y = 171.11x - 5.9714$ $R^2 = 0.9997$ МВ – 0.8 мкг/мл МКВ – 4 мкг/мл	Відповідає $R^2 > 0.9967$ $ a \leq \Delta a = t(95\%; 7) \cdot Sa = 1.3275$
	Атенолол	$y = 134.57x - 2.2857$ $R^2 = 0.9996$ МВ – 0.6 мкг/мл МКВ – 3 мкг/мл	Відповідає $R^2 > 0.9955$ $ a \leq \Delta a = t(95\%; 7) \cdot Sa = 2.0019$
Колонка LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 250 мм, 5 мкм), рухома фаза – метанол P – метанол P – 50 mM розчин амонію дигідрогенфосфату рН 7.2 (55:45) (МС), швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв, температура колонки 42° С, детектування за довжини хвилі 225 нм	Валсартан	$y = 53.064x - 8.7429$ $R^2 = 0.9975$ МВ – 0.4 мкг/мл МКВ – 1.3 мкг/мл	Відповідає $R^2 > 0.9935$ $ a \leq \Delta a = t(95\%; 7) \cdot Sa = 2.9532$
	Атенолол	$y = 48.936x - 10.357$ $R^2 = 0.9952$ МВ – 0.3 мкг/мл МКВ – 1.0 мкг/мл	Відповідає $R^2 > 0.9917$ $ a \leq \Delta a = t(95\%; 7) \cdot Sa = 2.7482$
Колонка LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 250 мм, 5 мкм), рухома фаза – метанол P – метанол P – 50 mM розчин амонію дигідрогенфосфату рН 7.2 (55:45) (МС), швидкість рухомої фази 1.0 мл/хв, температура колонки 42° С, детектування за довжини хвилі 237 нм	Валсартан	$y = 30.5x - 0.8429$ $R^2 = 0.9998$ МВ – 0.4 мкг/мл МКВ – 1.3 мкг/мл	Відповідає $R^2 > 0.9962$ $ a \leq \Delta a = t(95\%; 7) \cdot Sa = 1.3481$
	Атенолол	$y = 12.95x + 0.4$ $R^2 = 0.9994$ МВ – 0.3 мкг/мл МКВ – 1.0 мкг/мл	Відповідає $R^2 > 0.9973$ $ a \leq \Delta a = t(95\%; 7) \cdot Sa = 1.9437$

4.4.4 Правильність та прецизійність методики

Для перевірки правильності та прецизійності методики готували суміші з точно відомим вмістом АФІ, які охоплювали діапазон застосування методики (з концентраціями 70, 80, 90, 95, 100, 105, 110, 120, 130 від номінальної). Відповідно до вимог ДФУ розраховували такі критерії: систематична похибка $\delta\%$ (для правильності) та відносний довірчий інтервал Δz (для прецизійності).

Результати дослідів та проведених розрахунків наведено в таблицях 4.22, 4.23.

Таблиця 4.22 – Результати вивчення правильності та прецизійності методики кількісного визначення валсартану методом ВЕРХ/УФ з використанням хроматографічної колонки LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 250 мм, 5 мкм) та рухомої фази – метанол Р – метанол Р – 50 мМ розчин амонію дигідрогенфосфату рН 7.2 (55:45) (МС)

Моделльні розчини	Вміст валсартану, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100\%$
	Введено, $X_i = (m_i / m_{rs}) 100 \%$	Знайдено, $Y_i = (S_i / S_{rs}) 100 \%$	
M ₁	70.07	69.95	99.83
M ₂	80.11	79.99	99.85
M ₃	89.92	90.12	100.22
M ₄	95.04	94.95	99.91
M ₅	100.12	99.95	99.83
M ₆	104.92	105.01	100.09
M ₇	110.04	110.15	100.10
M ₈	120.09	119.92	99.86
M ₉	130.10	130.07	99.98

Продовження таблиці 4.22

Середнє значення, Z , %	99.96
Стандартне відхилення, S_z , %	0.04
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 8) \cdot S_z = 2,3060 \cdot S_z$, %	0.09
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta \leq \max \Delta_{As}$ $= 3.2$ %	виконується (< 3.2)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 $, %	0.04
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max$ $\delta\%$	виконується (< 0.04)
Загальний висновок про методику	Коректна

Таблиця 4.23 – Результати вивчення правильності та прецизійності методики кількісного визначення атенололу методом ВЕРХ/УФ з використанням хроматографічної колонки LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 250 мм, 5 мкм) та рухомої фази – метанол Р – метанол Р – 50 мМ розчин амонію дигідрогенфосфату рН 7.2 (55:45) (МС)

Моделльні розчини	Вміст атенололу, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100\%$
	Введено, $X_i = (m_i / m_{rs}) \cdot 100\%$	Знайдено, $Y_i = (S_i / S_{rs}) \cdot 100\%$	
M ₁	70.12	70.03	99.87
M ₂	80.07	79.91	99.80
M ₃	89.92	90.14	100.24
M ₄	95.05	95.01	99.96
M ₅	100.03	99.88	99.85
M ₆	105.05	105.11	100.06
M ₇	110.00	110.09	100.08
M ₈	120.01	119.97	99.97

Продовження таблиці 4.23

M ₉	130.14	130.05	99.93
Середнє значення, Z, %			99.97
Стандартне відхилення, S _z , %			0.03
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 8) S_z = 2,3060 S_z$, %			0.07
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta \leq \max \Delta_{As}$ = 3.2 %			виконується (< 3.2)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 $, %			0.03
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max$ $\delta\%$			виконується (< 0.03)
Загальний висновок про методику			Коректна

Як випливає з табл. 4.22, 4.23, експериментальні результати прецизійності характеризуються припустимим розкидом відносно середнього і, відповідно низьким стандартним відхиленням S_z % на всьому діапазоні концентрацій. Середня похибка методик становить δ % 0.04 та 0.03, що характеризує достатню близькість середніх результатів отриманих площ піків до номінальних значень.

4.4.5 Робастність методики

Результати вивчення робастності методик кількісного визначення представлено в табл. 4.24. Встановлено, що хроматографічні методики відповідає вимогам ДФУ за специфічністю, правильністю, прецизійністю та робастністю в діапазоні від 70 до 130 % від номінального вмісту валсартану та атенололу і є коректними.

Таблиця 4.24 – Результати вивчення робасності аналітичних методик визначення валсартану та атенололу

Хроматографічні умови	Варіації	Час утримування валсартану, хв	Час утримування атенололу, хв	Резолюція	Атенолол – валсартан (tailing at 5% of height)
МА, СА, 225 нм	Швидкість потоку 0.6 мл/хв	2.80	3.49	3.40	1.61 - 1.23
		3.28	4.17	3.07	1.68 – 1.28
	Швидкість потоку 0.4 мл/хв	3.95	4.93	3.51	1.58 – 1.24
		3.07	4.01	3.30	1.63 – 1.24
	Температура колонки 38° С Температура колонки 42° С	3.21	4.08	3.41	1.69 – 1.25
МВ, СА, 225 нм	Швидкість потоку 0.6 мл/хв	3.71	2.71	3.71	1.60 – 1.28
		4.42	3.22	3.49	1.68 – 1.32
	Швидкість потоку 0.4 мл/хв	5.28	3.75	3.78	1.55 – 1.21
		4.21	3.09	3.85	1.63 – 1.26
	Температура колонки 38° С Температура колонки 42° С	4.33	3.15	3.60	1.57 – 1.31
МС, СВ, 225 нм	Швидкість потоку 1.1 мл/хв	3.09	2.51	3.64	1.18 – 1.08
		3.39	2.81	3.59	1.19 – 1.09
	Швидкість потоку 0.9 мл/хв	3.71	2.97	3.71	1.14 – 1.09
		3.08	2.41	3.66	1.17 – 1.08
	Температура колонки 40° С Температура колонки 44° С	3.19	2.63	3.57	1.19 – 1.09
МС, СВ, 237 нм	Швидкість потоку 1.1 мл/хв	3.09	2.48	3.65	1.17 – 1.08
		3.36	2.75	3.54	1.18 – 1.08
	Швидкість потоку 0.9 мл/хв	3.77	3.02	3.71	1.15 – 1.07
		3.11	2.45	3.69	1.18 – 1.07
	Температура колонки 40° С Температура колонки 44° С	3.25	2.59	3.51	1.19 – 1.09

4.4.6 Оцінки озеленіння аналітичної методики

Принципи «зеленої хімії» були враховані при розробці хроматографічної методики визначення валсартану та атенололу в ЛЗ [92-101]. У таблиці 4.25 узагальнено результати оцінки озеленіння аналітичних методик.

Таблиця 4.25 – Аналітична еко-шкала для оцінки озеленіння розроблених хроматографічних методик на колонках LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 125 мм, 5 мкм) та LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 250 мм, 5 мкм)

Параметри	Пенальті бали
Реактиви	
Метанол	3
Калію дигідрогенфосфат / Амонію дигідрогенфосфат	2
Споживання енергії	2
Професійні шкідливості	0
Відходи	5
Загальна кількість пенальті балів	12
Бал аналітичної еко-шкали	88
Висновок	Відмінний зелений аналіз

Результати, наведені у табл. 4.25, доводять те, що розроблені хроматографічні методики визначення валсартану та атенололу в ЛЗ є відмінними у відповідності до принципів «зеленої хімії».

Таким чином, розроблені методики хроматографічного визначення валсартану та атенололу в субстанції та таблетках на колонках LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 125 мм, 5 мкм) та LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 250 мм, 5 мкм) є простими, експресними, економічними, доступними, з дотриманням принципів «зеленої хімії», не вимагають використання

іонпарного реагента. Запропоновані хроматографічні методики може бути використані для аналізу якості в лабораторіях з контролю якості ЛЗ та рекомендовані до введення до монографії ДФУ.

Висновки до розділу 4

1. У роботі наведено експериментальне вирішення наукової задачі, що виявляється у розробці та валідації хроматографічних методик ідентифікації та кількісного визначення валсартану та атенололу в субстанції та ЛЗ відповідно до вимог ДФУ.

2. Проведено розробку методик ідентифікації валсартану та атенололу в субстанції та ЛЗ методом ТШХ. Найоптимальніші значення коефіцієнта утримування валсартану та атенололу для їх одночасного визначення спостерігаються при використанні рухомої фази – *n*-бутанол *P* – кислота оцтова льодяна *P* – вода *P* (40:10:20).

3. Розроблено та валідовано ВЕРХ/УФ методику одночасного визначення валсартану та атенололу в ЛЗ із використанням хроматографічної колонки Zorbax C₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм) та ізократичного елюювання з бінарною рухомою фазою, що складалася з *метанолу та 25 мМ розчину калію дигідрогенфосфату рН 7.3* (55:45). Результати досліджень можуть бути рекомендовані до введення монографії ДФУ. Результати дослідження підтверджено патентом на корисну модель.

4. Розроблено ВЕРХ/УФ методику одночасного визначення валсартану та атенололу в ЛЗ, використовуючи умови ізократичного елюювання з рухомою фазою, що складалася з *ацетонітрилу, 16 % розчину амонію ацетату P та 1.5 М розчину тетраметиламонію гідроксиду* в співвідношенні 20:80:0.2, та хроматографічну колонку Discovery C₁₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм). Проаналізовані валідаційні характеристики показали прийнятність запропонованих методик для цілей фармацевтичного аналізу. Результати дослідження підтверджено патентом на корисну модель. Результати досліджень можуть бути рекомендовані до введення монографії ДФУ.

5. Розроблено та валідовано ВЕРХ/УФ методику одночасного визначення валсартану та атенололу в ЛЗ, використовуючи умови ізократичного елюювання з бінарними рухомими фазами (*метанол P – 25 мМ розчин калію дигідрогенфосфату рН 7.3 (50:50) (МА); метанол P – 50 мМ розчин амонію дигідрогенфосфату рН 7.25 (50:50) (МВ); метанол P – 50 мМ розчин амонію дигідрогенфосфату рН 7.2 (55:45) (МС)*) та хроматографічними колонками LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 125 мм, 5 мкм) (СА) та LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 250 мм, 5 мкм) (СВ), які мають ряд переваг з ряду колонок L1. Застосування колонки LiChrospher® 60 RP-select B 250 мм дозволяє отримати симетричні піки незалежно від швидкості потоку, більшу роздільну здатність між піками (близько 4), вдвічі більше число теоретичних тарілок для піків (4100-4440). Результати дослідження підтверджено патентом на корисну модель. Представлені результати досліджень можуть бути рекомендовані до введення монографії ДФУ.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в наукових публікаціях автора [146, 147, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160].

РОЗДІЛ 5
УНІФІКОВАНА ПРОЦЕДУРА РОЗРОБКИ ТА
ВАЛІДАЦІЇ МЕТОДИК КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ
ВАЛСАРТАНУ ТА АТЕНОЛОЛУ ДЛЯ ОЦІНКИ ЕКВІВАЛЕНТНОСТІ *IN*
***VITRO* З ВИКОРИСТАННЯМ ХРОМАТОГРАФІЧНИХ ТА**
СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИХ МЕТОДІВ

Якість ЛЗ закладається ще на етапі розробки ЛЗ. На сьогоднішній день недостатньо тільки проводити визначення якісного складу та кількісного вмісту АФІ у ЛЗ. Необхідною також є оцінка еквівалентності *in vitro* ЛЗ. Відповідно до біофармацевтичної системи класифікації (БСК) потрібно вивчати розчинність та абсорбцію АФІ [161]. Для цього мають бути розроблені валідовані аналітичні методики кількісного визначення АФІ.

5.1 Обґрунтування процедури розробки методики визначення валсартану для вивчення проникності через кишкову мембрану

Тест Сасо-2 широко застосовується для визначення біодоступності та біоеквівалентності ЛЗ [162-177]. Дана модель використовується для проведення скринінгових досліджень при вивченні абсорбції ЛР, впливу допоміжних речовин та лікарської взаємодії на процеси всмоктування, для проведення процедури «біоверифікації».

Нами було розроблено аналітичну методику кількісного визначення валсартану для вивчення проникності через кишкову мембрану (тест Сасо-2) [178, 179].

Хроматографування проводили із використанням хроматографічної колонки Phenomenex Luna (50 мм x 2.0 мм, 5 мкм) та градієнтного елюювання. Елюент А: ацетонітрил – вода – мурашина кислота (5:95:0.1); елюент Б: ацетонітрил – мурашина кислота (100:0.1). Початковий вміст елюента Б 15 %, який лінійно збільшується до 100 % за 0.9 хв і до 1.2 хв складає 100 %, з 1.21 хв

повертається до вихідних 15 %. Швидкість потоку – 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 1.1 хв до 1.7 хв.

MRM-параметри наведено в табл. 5.1.

Таблиця 5.1 – MRM-параметри

Аналіт	Parent, m/z	Daughter, m/z	Time, ms	DP, V	EP, V	CE, V	CXP, V
Валсартан	436.1	235.2	120	36	10	27	10

Як впливає з таблиці 5.1, m/z для валсартану становить 436.1.

Типові хроматограми, одержані за умов кількісного визначення валсартану та трьох еталонних речовин (пропранололу, атенололу, хінідину), наведено на рис. 5.1-5.4.

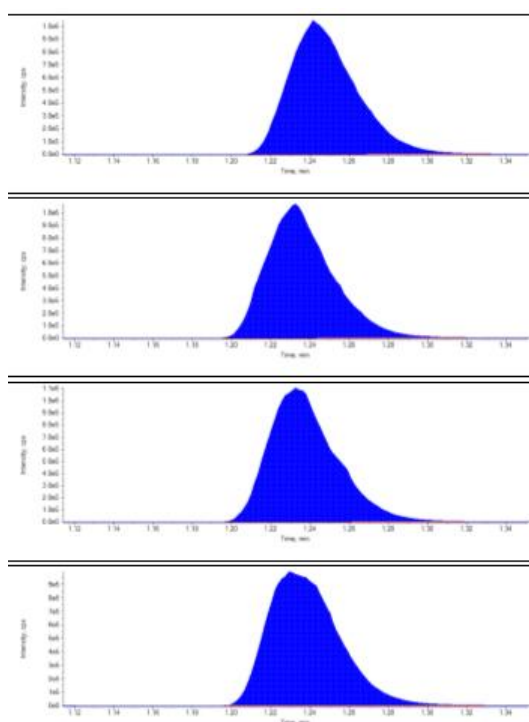


Рисунок 5.1 – Типові хроматограми валсартану, одержані за умов кількісного визначення валсартану

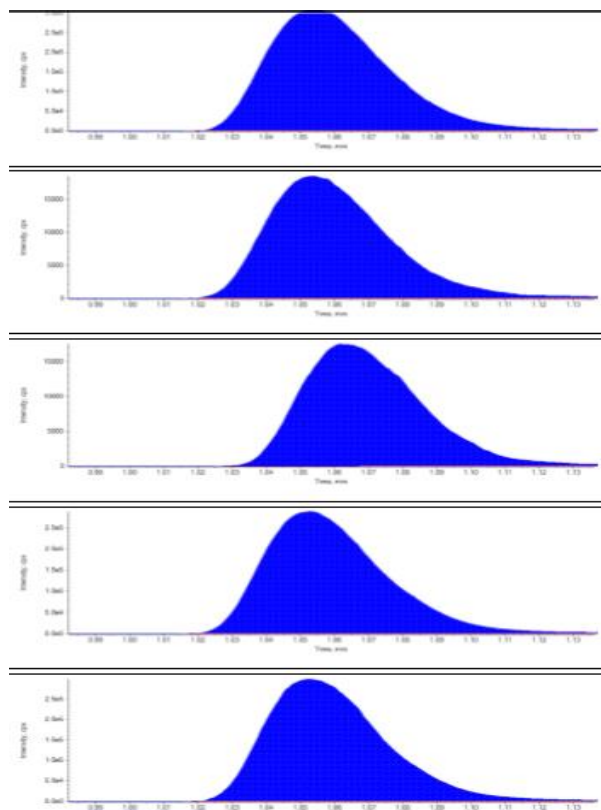


Рисунок 5.2 – Типові хроматограми пропранололу, одержані за умов кількісного визначення валсартану

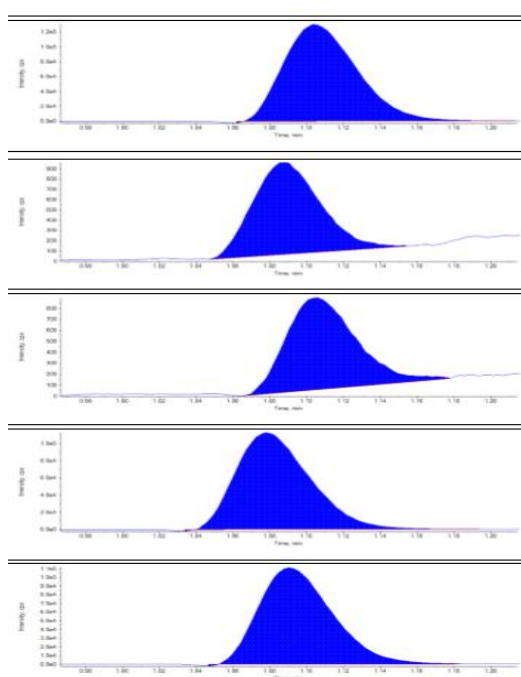


Рисунок 5.3 – Типові хроматограми атенололу, одержані за умов кількісного визначення валсартану

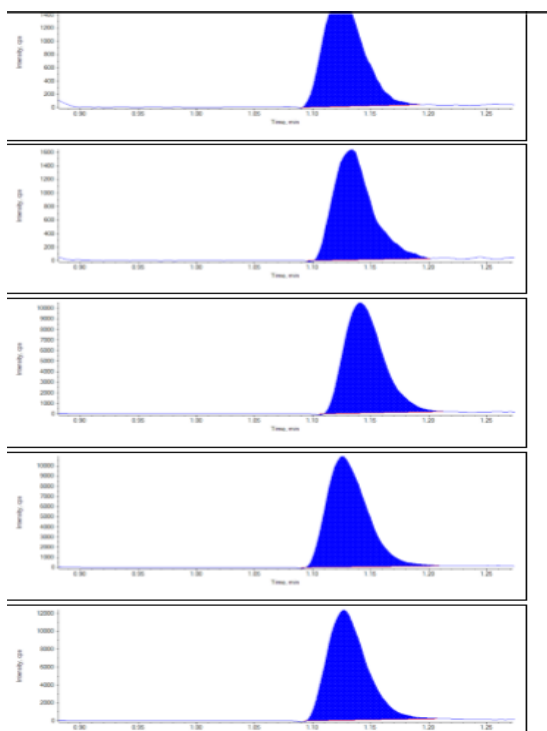


Рисунок 5.4 – Типові хроматограми хінідину, одержані за умов кількісного визначення валсартану

За даних хроматографічних умов пік валсартану елюються близько 1.23 хв (рис. 5.1). Загальний час хроматографування складав 1.5 хв, що свідчить про те, тому розроблена аналітична методика визначення валсартану для вивчення кишкової проникності на моделі тесту Сасо-2 є експресною.

Дані про проникність (А-Б та Б-А), а також коефіцієнт ефлюксу для випробовуваної та еталонних речовин наведено в табл. 5.2, 5.3.

Таблиця 5.2 – Коефіцієнт проникності (P_{app}) валсартану через моношар клітин Сасо-2 в апікально-базолатеральному та базолатерально-апикальному напрямках

Аналіт	P_{app} (АБ), 10^{-6} см/с				P_{app} (БА), 10^{-6} см/с				Коефіцієнт ефлюксу
	1	2	М	m	1	2	М	m	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Пропранолол	17.3	21.4	19.3	2.9	11.6	10.9	11.2	0.5	0.6

Продовження таблиці 5.2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Атенолол	0.2	0.5	0.3*	0.2	1.2	1.2	1.2	0.0	3.5
Хінідин	5.0	9.5	7.3*	3.2	36.8	35.7	36.3	0.8	5.0
Валсартан	0.3	0.3	0.3	0.0	0.9	0.8	0.8	0.1	2.9
Примітка 1. М – середнє арифметичне значення коефіцієнта проникності; m – середнє квадратичне відхилення. Примітка 2. *Отримане експериментальне значення акцепторній камері менше LOD (3 x [значення сигнал / шум]) для речовини									

Таблиця 5.3 – Коефіцієнт проникності (Papp) валсартану через моношар клітин Caco-2 в присутності інгібітора P-gp транспортера верапамілу

Аналіт	Papp (АБ), 10 ⁻⁶ см/с				Papp (БА), 10 ⁻⁶ см/с				Коефіцієнт ефлюксу
	1	2	М	m	1	2	М	m	
Хінідин	25.1	23.6	24.4	1.1	27.6	26.2	26.9	1.0	1.1
Валсартан	0.7	0.6	0.6	0.1	0.6	0.6	0.6	0.0	0.9
Примітка 1. М – середнє арифметичне значення коефіцієнта проникності; m – середнє квадратичне відхилення. Примітка 2. *Отримане експериментальне значення акцепторній камері менше LOD (3 x [значення сигнал / шум]) для речовини									

Значення масового балансу (recovery) транспортування випробовуваної та еталонних речовин через моношар клітин лінії Caco-2 представлено у табл. 5.4.

Таблиця 5.4 – Масовий баланс (recovery) транспортування тестової та контрольних речовин через моношар клітин лінії Caco-2

Аналіт	% recovery			Відповідність критеріям прийнятності
	1	2	М	
Пропранолол	71	80	76	-
Атенолол	91	86	89	-
Хінідин	106	102	104	-
Валсартан	94	95	94	<± 15% Відповідає

Значення масового балансу (recovery) транспортування випробовуваної та еталонних речовин через моношар клітин лінії Caco-2 (табл. 5.4) вказують на те, що результати експерименту можна вважати достовірними. Випробовувана субстанція валсартан в тест-системі Caco-2 виявляє низьку проникність та зазнає активного транспортування. Зниження коефіцієнта ефлюксу у присутності верапамілу вказує на те, що ця речовина є субстратом P-gp транспортера.

Розроблена аналітична методика визначення валсартану для вивчення проникності через кишкову мембрану (тест Caco-2) є простою та експресною, що дозволяє зменшити час і витрати аналізу.

5.2 Уніфікована процедура розробки та валідації методик кількісного визначення валсартану та атенололу для застосування в тесті «Розчинення»

Тест «Розчинення» для твердих дозованих ЛФ належить до основних фармако-технологічних випробувань на етапі створення ЛЗ. Результати тесту «Розчинення» свідчать про якість ЛЗ, а також про його еквівалентність [180-188]. Для валсартану та атенололу важливо розробити методики їх одночасного визначення, оскільки це є зручним в рутинному аналізі ЛЗ, економить час та дає можливість оцінити кінетику вивільнення АФІ з однієї і тієї ж дозованої одиниці (таблетки). Таке завдання є складним, як вже було представлено у розд. 3, 3, оскільки АФІ мають різні фізико-хімічні властивості.

Нами було проведено трансфер аналітичних методик визначення валсартану та атенололу (спектрофотометрична та хроматографічна методики), які описані у розд. 3.3, 4.1 [189-192].

Вивчення розчинення проводили в стандартних фармакопейних середовищах з рН 1.2, 4.5 та 6.8.

Результати вивчення кінетики вивільнення валсартану та атенололу в стандартних фармакопейних середовищах з рН 1.2, 4.5 та 6.8 із застосуванням спектрофотометричної методики представлено на рис. 5.5-5.7.

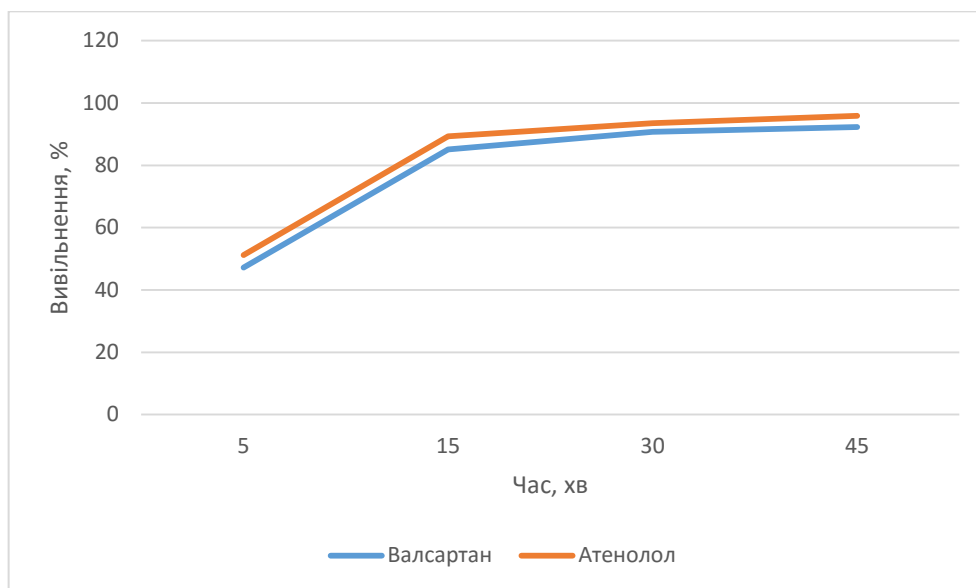


Рисунок 5.5 – Профіль розчинення валсартану та атенололу з таблеток у середовище з рН 1.2 при 50 об/хв, прилад з лопаттю

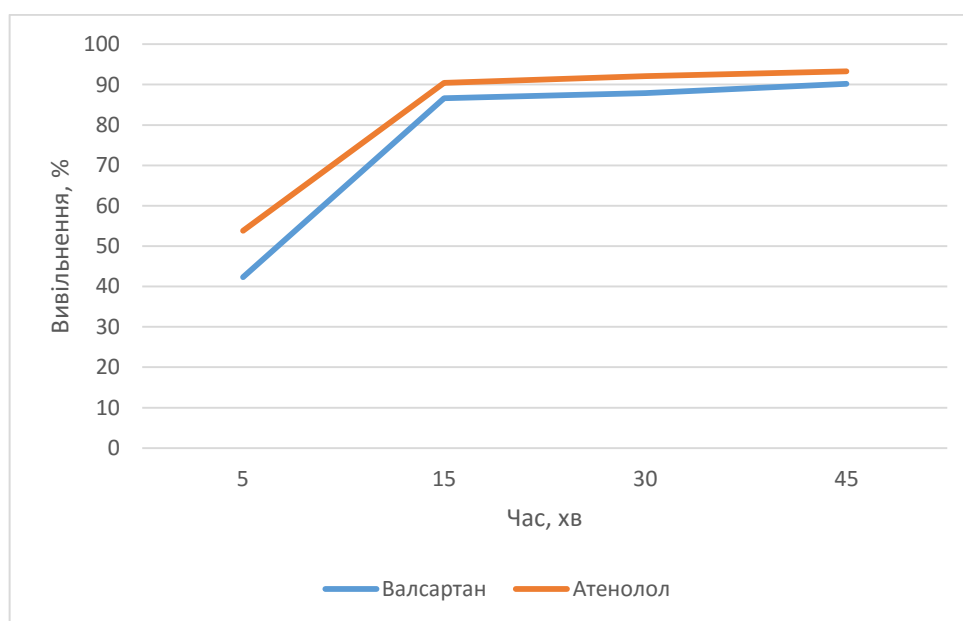


Рисунок 5.6 – Профіль розчинення валсартану та атенололу з таблеток у середовище з рН 4.5 при 50 об/хв, прилад з лопаттю

Як видно з рис. 5.5-5.7, в середовище з рН 1.2 вивільнення валсартану з таблеток через 5 хв становить 47.21 %, через 15 хв – 85.12 %, в середовище з рН 4.5 вивільнення валсартану з таблеток через 5 хв становить 42.38 %, а через 15 хв – 86.62 %, в середовище з рН 6.8 вивільнення валсартану з таблеток через 5 хв становить 40.85 %, а через 15 хв – 87.30 %. В середовище з рН 1.2

вивільнення атенололу з таблеток через 5 хв становить 51.21 %, через 15 хв – 89.34 %, в середовище з рН 4.5 вивільнення атенололу з таблеток через 5 хв становить 53.82 %, а через 15 хв – 90.42 %, в середовище з рН 6.8 вивільнення атенололу з таблеток через 5 хв становить 55.11 %, а через 15 хв – 91.90 %.

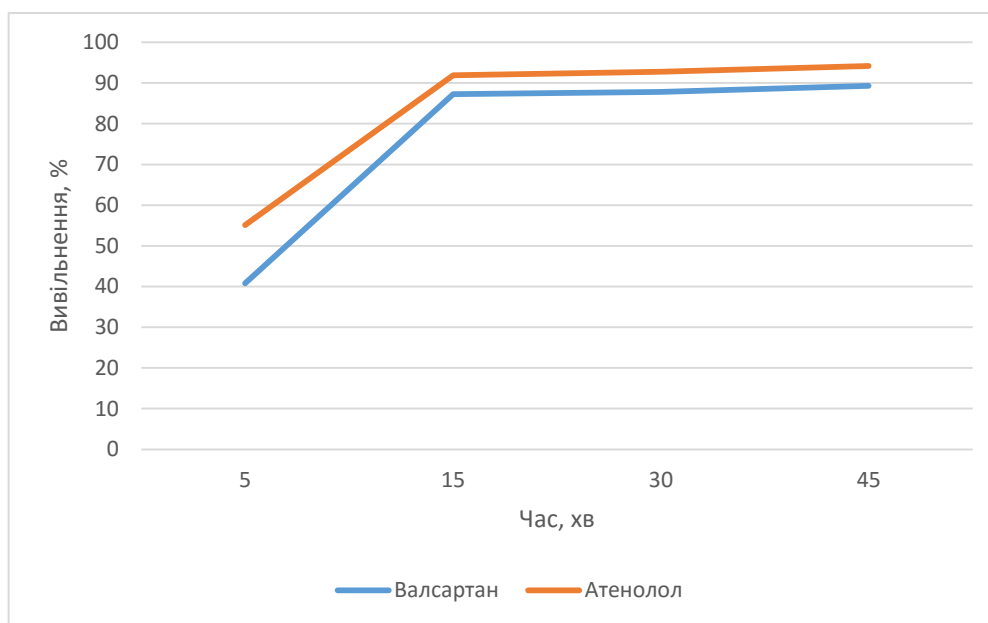


Рисунок 5.7 – Профіль розчинення валсартану та атенололу з таблеток у середовище з рН 6.8 при 50 об/хв, прилад з лопаттю

Вивчення лінійності проводили в широкому діапазоні концентрацій (25-200 % при трьох значеннях рН). Рівняння регресії та коефіцієнти кореляції представлено в табл. 5.5, 5.6.

Таблиця 5.5 – Результати вивчення валідаційного параметру «лінійність/калібрувальна модель» методики спектрофотометричного визначення валсартану у таблетках за умов вивчення кінетики розчинення

рН	Рівняння регресії	R ²	Відповідність критеріям прийнятності
1.2	$y=2.76x-0.64$	0.9991	Відповідає
4.5	$y = 5.73x -1.56$	0.9988	Відповідає
6.8	$y = 3.76 x + 0.12$	0.9995	Відповідає

Вимоги до параметрів лінійної залежності (табл. 5.5, 5.6) в даному випадку виконуються в усьому діапазоні застосування методики. Висновок щодо розробленої методики по валідаційному параметру «лінійність/калібрувальна модель» є коректною.

Таблиця 5.6 – Результати вивчення валідаційного параметру «лінійність/калібрувальна модель» методики спектрофотометричного визначення атенололу у таблетках за умов вивчення кінетики розчинення

pH	Рівняння регресії	R ²	Відповідність критеріям прийнятності
1.2	$y=12.64x+1.45$	0.9992	Відповідає
4.5	$y = 9.88x -0.98$	0.9979	Відповідає
6.8	$y = 8.11 x -1.23$	0.9993	Відповідає

Результати вивчення кінетики вивільнення валсартану та атенололу в стандартних фармакопейних середовищах з pH 1.2, 4.5 та 6.8 з застосуванням хроматографічної методики представлено на рис. 5.8-5.10.

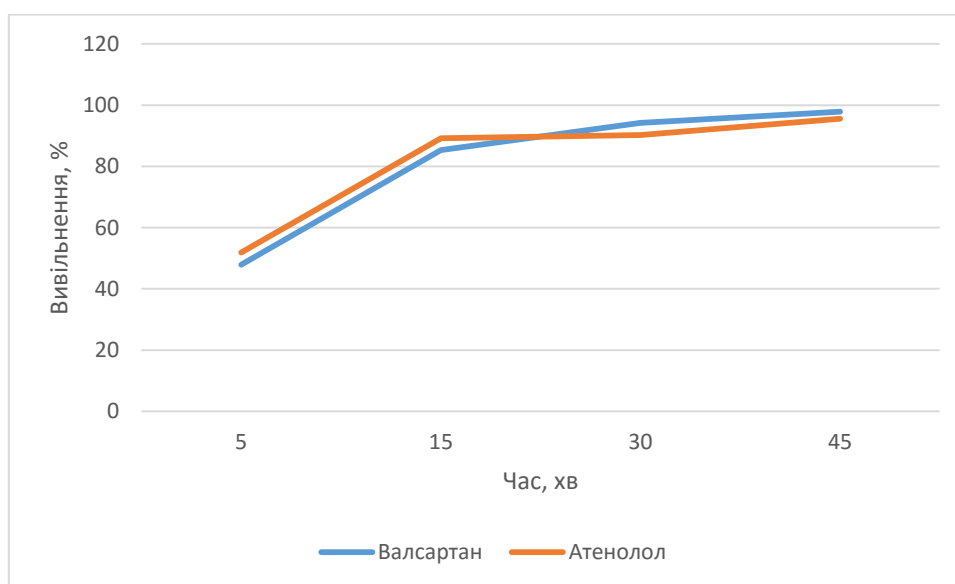


Рисунок 5.8 – Профіль розчинення валсартану та атенололу з таблеток у середовище з pH 1.2 при 50 об/хв, прилад з лопаттю

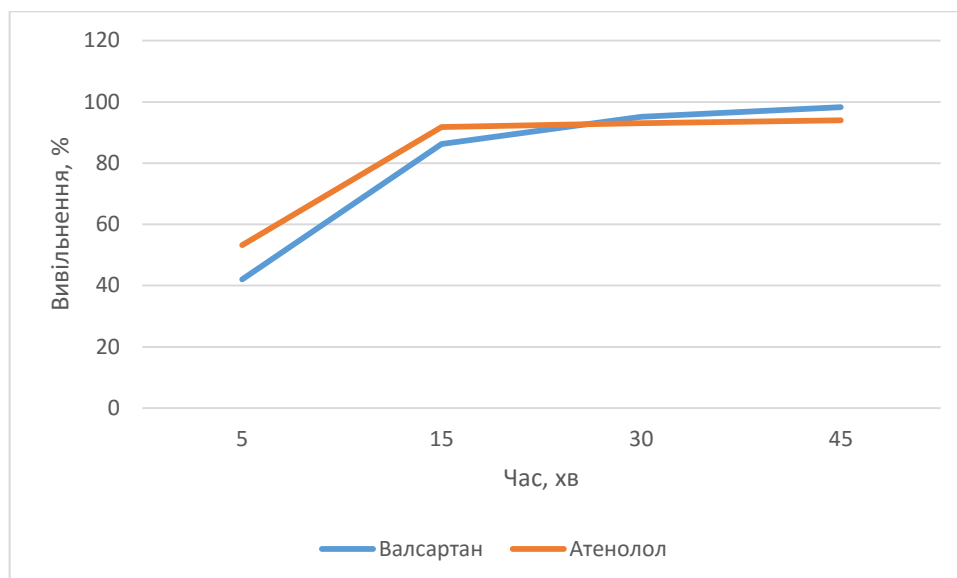


Рисунок 5.9 – Профіль розчинення валсартану та атенололу з таблеток у середовище з рН 4.5 при 50 об/хв, прилад з лопаттю

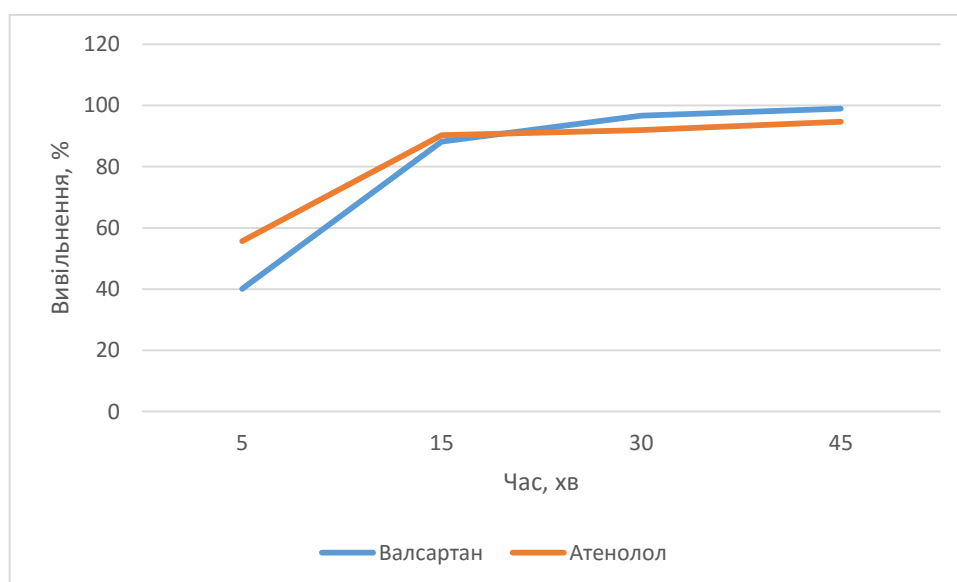


Рисунок 5.10 – Профіль розчинення валсартану та атенололу з таблеток у середовище з рН 6.8 при 50 об/хв, прилад з лопаттю

Як видно з рис. 5.8-5.10, в середовище з рН 1.2 вивільнення валсартану з таблеток через 5 хв становить 47.83 %, через 15 хв – 85.34 %, в середовище з рН 4.5 вивільнення валсартану з таблеток через 5 хв становить 41.98 %, а через 15 хв – 86.24 %, в середовище з рН 6.8 вивільнення валсартану з таблеток через 5 хв становить 40.11 %, а через 15 хв – 88.14 %. В середовище з рН 1.2 вивільнення атенололу з таблеток через 5 хв становить 51.89 %, через 15 хв –

89.18 %, в середовище з рН 4.5 вивільнення атенололу з таблеток через 5 хв становить 53.22 %, а через 15 хв – 91.84 %, в середовище з рН 6.8 вивільнення атенололу з таблеток через 5 хв становить 55.68 %, а через 15 хв – 90.32 %.

Вивчення лінійності проводили в широкому діапазоні концентрацій (25-200 % при трьох значеннях рН). Рівняння регресії та коефіцієнти кореляції представлено у табл. 5.7, 5.8.

Вимоги до параметрів лінійної залежності (табл. 5.7, 5.8) в даному випадку виконуються в усьому діапазоні застосування методики. Висновок щодо розробленої методики по валідаційному параметру «лінійність/калібрувальна модель» є коректною.

Таблиця 5.7 – Результати вивчення валідаційного параметру «лінійність/калібрувальна модель» методики хроматографічного визначення валсартану у таблетках за умов вивчення кінетики розчинення

рН	Рівняння регресії	R ²	Відповідність критеріям прийнятності
1.2	$y=344.12x-23.67$	0.9998	Відповідає
4.5	$y = 245.67x -55.43$	0.9997	Відповідає
6.8	$y = 257.76x + 33.12$	0.9992	Відповідає

Таблиця 5.8 – Результати вивчення валідаційного параметру «лінійність/калібрувальна модель» методики хроматографічного визначення атенололу у таблетках за умов вивчення кінетики розчинення

рН	Рівняння регресії	R ²	Відповідність критеріям прийнятності
1.2	$y=453.56x+43.23$	0.9989	Відповідає
4.5	$y = 286.86x -38.87$	0.9994	Відповідає
6.8	$y = 375.67x -19.76$	0.9998	Відповідає

На основі результатів проведеного дослідження можна зробити висновок, що запропоновані спектрофотометрична та хроматографічна методики одночасного визначення валсартану та атенололу у таблетках для застосування її для вивчення розчинення є коректними, а результати аналізу корелюють між собою.

Висновки до розділу 5

1. Запропоновано та валідовано методики кількісного визначення валсартану та атенололу для оцінки еквівалентності *in vitro*.

2. Розроблено аналітичну методику кількісного визначення валсартану для вивчення проникності через кишкову мембрану (тест Сасо-2). Валсартан в тест-системі Сасо-2 виявляє низьку проникність та зазнає активного транспортування. Зниження коефіцієнта ефлюксу у присутності верапамілу вказує на те, що ця речовина є субстратом P-gp транспортера.

3. Розроблена аналітична методика визначення валсартану для вивчення проникності через кишкову мембрану (тест Сасо-2) є простою та експресною, що дозволяє зменшити час і витрати аналізу.

4. Проведено трансфер спектрофотометричної та хроматографічної методик визначення валсартану та атенололу для вивчення тесту «Розчинення».

5. Запропоновані спектрофотометрична та хроматографічна методики одночасного визначення валсартану та атенололу у таблетках для застосування її для вивчення розчинення є коректними, а результати аналізу корелюють між собою.

Результати експериментальних досліджень даного розділу 5 наведено у наукових публікаціях автора [178, 179, 189, 190, 191, 192]

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 валсартану та атенололу 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 валсартану та атенололу.

2. Розроблено спектрофотометричні методики кількісного визначення валсартану у складі готових ЛФ з бромфеноловим синім та метиловим червоним. Проведено процедуру валідації розроблених аналітичних методик відповідно до вимог ДФУ та ІСН Q2 та підтверджено їх селективність, лінійність, правильність, прецизійність і робастність.

3. Встановлено оптимальні умови проведення реакцій валсартану з запропонованими барвниками (визначено й порівняно чутливість реакцій, обрано оптимальну кількість реагенту, підібрано розчинники та вивчено стабільність розчинів у часі). Отримані значення свідчать про високу чутливість даних реакцій. Встановлено стехіометричні співвідношення «валсартан – барвник», які складають 1:1 для утворених продуктів реакцій барвників з валсартаном.

4. Розроблено спектрофотометричну методику одночасного визначення валсартану та атенололу в бінарній суміші та ЛЗ. Запропоновані спектрофотометричні методики визначення валсартану та атенололу в субстанціях та ЛФ є простими, точними, експресними, «зеленими», неекстраційними, не вимагають застосування тривалої пробопідготовки та дорогого вартісного обладнання.

5. Запропоновано ТШХ-методику ідентифікації валсартану та атенололу в субстанції та ЛЗ. Найоптимальніші значення коефіцієнта утримування валсартану та атенололу для їх одночасного визначення спостерігаються при використанні рухомої фази – *n*-бутанол *P* – кислота оцтова льодяна *P* – вода *P* (40:10:20).

6. Розроблено та валідовано хроматографічні методики ідентифікації та кількісного визначення валсартану та атенололу в субстанції та ЛЗ відповідно до вимог ДФУ. Розроблено та валідовано ВЕРХ/УФ методику одночасного визначення валсартану та атенололу в ЛЗ із використанням хроматографічної колонки Zorbax C₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм) та ізократичного елюювання з бінарною рухомою фазою, що складалася з *метанолу та 25 мМ розчину калію дигідрогенфосфату рН 7.3* (55:45). Розроблено ВЕРХ/УФ методику одночасного визначення валсартану та атенололу в ЛЗ, використовуючи умови ізократичного елюювання з рухомою фазою, що складалася з *ацетонітрилу, 16 % розчину амонію ацетату *P* та 1.5 М розчину тетраметиламонію гідроксиду* в співвідношенні 20:80:0.2 та хроматографічну колонку Discovery C₁₈ (4.6 мм i.d. X 150 мм, 5 мкм). Розроблено та валідовано ВЕРХ/УФ методику одночасного визначення валсартану та атенололу в ЛЗ, використовуючи умови ізократичного елюювання з бінарними рухомими фазами (*метанол *P* – 25 мМ розчин калію дигідрогенфосфату рН 7.3* (50:50) (МА); *метанол *P* – 50 мМ розчин амонію дигідрогенфосфату рН 7.25* (50:50) (МВ); *метанол *P* – 50 мМ розчин амонію дигідрогенфосфату рН 7.2* (55:45) (МС)) та хроматографічними колонками LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 125 мм, 5 мкм) (СА) та LiChrospher® 60 RP-select B (4 мм i.d. X 250 мм, 5 мкм) (СВ), які мають ряд переваг з ряду колонок L1. Застосування підібраної колонки LiChrospher® 60 RP-select B 250 мм дозволяє отримати симетричні піки незалежно від швидкості потоку, більшу роздільну здатність між піками (близько 4), вдвічі більше число теоретичних тарілок для піків (4100-4440). Проаналізовані валідаційні характеристики показали прийнятність розроблених методик для цілей фармацевтичного аналізу.

7. Запропоновано та валідовано методики кількісного визначення валсартану та атенололу для оцінки еквівалентності *in vitro*. Розроблено аналітичну методику кількісного визначення валсартану для вивчення проникності через кишкову мембрану (тест Сасо-2), яка є простою та експресною, що дозволяє зменшити час і витрати аналізу. Проведено трансфер спектрофотометричної та хроматографічної методик визначення валсартану та атенололу для вивчення тесту «Розчинення» в стандартних фармакопейних середовищах з рН 1.2, 4.5 та 6.8.

8. Результати проведених досліджень розширюють горизонти фармацевтичного аналізу і стандартизації фіксованих антигіпертензивних комбінацій.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Компендиум – лекарственные препараты. URL: [https://compendium.com.ua/https://compendium.com.ua.](https://compendium.com.ua/)
2. European Pharmacopoeia. 10th edn. 2020. URL: [https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-10th-edition.](https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-10th-edition)
3. Health-ua.com: Спеціалізований медичний портал. URL: [https://health-ua.com.](https://health-ua.com)
4. Valsartan and atenolol in patients with severe essential hypertension / R. Cifkova, J. Peleška, J. Hradec et al. *Journal of Human Hypertension*. 1998. Vol. 12, № 8. P. 563–567.
5. Safety and Efficacy of Valsartan vs Atenolol and Hydrochlorothiazide Combination on Blood Flow in Hypertensive Patients. 2011. URL: [https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00396656.](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00396656)
6. Ker J. Combination treatment for hypertension. *SA Fam. Pract.* 2013. Vol. 55, № 4. P. 326–329.
7. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Харків : РІРЕГ, 2001. 556 с.
8. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Харків : РІРЕГ, 2001. Доповнення 1. 2004. 520 с.
9. Державна Фармакопея України. 1-е вид. Доповнення 2. Харків : Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. 620 с.
10. Державна Фармакопея України. 1-е вид. Доповнення 3. Харків : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2009. 280 с.
11. Державна Фармакопея України. 1-е вид. Доповнення 4. Харків : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2011. 540 с.

12. Державна Фармакопея України : в 3 т. 2-е вид. Харків : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2015. 1128 с.
13. Державна фармакопея України : в 3 т. 2-е вид. Харків : Державне підприємство «Український науково-експертний фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2015. Т. 1. 1128 с.
14. Державна фармакопея України : в 3 т. 2-е вид. Харків : Державне підприємство «Український науково-експертний фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2014. Т. 2. 724 с.
15. Державна фармакопея України: в 3 т. 2-е вид. Харків : Державне підприємство «Український науково-експертний фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2014. Т. 3. 732 с.
16. European Medicine Agency. CHMP List of questions. 2018. URL: https://www.ema.europa.eu/documents/referral/valsartan-article-31-referral-chmp-list-questions-be-addressed-api-manufacturers-valsartan_en.pdf.
17. Determination of NDMA and NDEA in SARTAN drug substances by HPLC/UV. Method reference : 19A0416-01. French National Agency for Medicines and Health Products Safety Laboratory Controls Division – French OMCL. URL: https://www.edqm.eu/sites/default/files/method_19a0416-01_ndma_and_ndea_in_sartan_by_hplc-uv_-_ansm.pdf.
18. Tatar S., Sağlık S. Comparison of UV-and second derivative-spectrophotometric and LC methods for the determination of valsartan in pharmaceutical formulation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2002. Vol. 30, № 2. P. 371–375.
19. Stress Degradation Studies on Valsartan and Development of a Validated Method by UV Spectrophotometric in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form / K. K. Pradhan, U. S. Mishra, S. Pattnaik et al. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 2011. Vol. 8, № 02. P. 1–8

20. Gupta K. R., Wadodkar A. R., Wadodkar S. G. UV-Spectrophotometric methods for estimation of Valsartan in bulk and tablet dosage form. *International Journal of Chem Tech Research*. 2010. Vol. 2, № 2. P. 985–989.
21. Trupti Sureshrao Tajane. Estimation of Valsartan in Pharmaceutical Formulation by Area under Curve Spectrophotometric Method. *International Journal of Advances in Pharmaceutics*. 2018. Vol. 07, № 01. P. 01–04.
22. Development and Validation of Spectrophotometric Methods for Simultaneous Estimation of Valsartan and Hydrochlorothiazide in Tablet Dosage Form / M. L. Jadhav, M. V. Girase, S. K. Tidme, M. S. Junagade. *International Journal of Spectroscopy*. 2014. Vol. 2014. Article ID 873819.
23. Novel spectrophotometric methods for simultaneous determination of Amlodipine, Valsartan and Hydrochlorothiazide in their ternary mixture / H. M. Lotfy, M. A. Hegazy, S. Mowaka, E. H. Mohamed.. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015. Vol. 140. P. 495–508.
24. Kamal A. H., Marie A. A., Hammad S. F. Validated spectrophotometric methods for simultaneous determination of nebivolol hydrochloride and valsartan in their tablet. *Microchemical Journal*. 2020. Vol. 155. P. 104741.
25. Ramachandran S., Mandal B. K., Navalgund S. G. Simultaneous Spectrophotometric Determination of Valsartan and Ezetimibe in Pharmaceuticals. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2011. Vol. 10, № 6. P. 809–815.
26. Spectrophotometric and Spectrofluorimetric Determination of Certain Angiotensin Receptor Blockers Through Complex Formation / M. A. Omar, O. H. Abdelmageed, A. A. Abdel-Gaber, A. M. Abdel-Megied. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2011 Vol. 3, № 10. P. 1499–1510.
27. Stability indicating RP-HPLC method for determination of valsartan in pure and pharmaceutical formulation / S. K. Patro, S. K. Kanungo, V. J. Patro, N. S. Choudhury. *Journal of Chemistry*. 2010. Vol. 7, № 1. P. 246–252.
28. Vinzuda D. U., Sailor G. U., Sheth N. R. RP-HPLC method for determination of valsartan in tablet dosage form. *International Journal of Chem Tech Research*. 2010. Vol. 2, № 3. P. 1461–1467.

29. Parambi D. G. T., Mathew M., Ganesan V. A validated stability indicating HPLC method for the determination of Valsartan in tablet dosage forms. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2011. Vol. 1, № 04. P. 97–99.
30. Stability-indicating UPLC method for determination of Valsartan and their degradation products in active pharmaceutical ingredient and pharmaceutical dosage forms / C. Krishnaiah, A. R. Reddy, R. Kumar, K. Mukkanti. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2010. Vol. 53, № 3. P. 483–489.
31. Ramachandran S., Mandal B. K., Naval Gund S. G. Stability-indicating HPLC method for the simultaneous determination of valsartan and ezetimibe in pharmaceuticals. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2014. Vol. 13, № 5. P. 809–817.
32. Simultaneous determination of valsartan and hydrochlorothiazide in tablets by RP-HPLC / D. F. Tian, X. L. Tian, T. Tian et al. *Indian journal of pharmaceutical sciences*. 2008. Vol. 70, № 3. P. 372–374.
33. Method Development and Validation of Stability Indicating RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Nebivolol HCL and Valsartan in Bulk and its Pharmaceutical Formulations / K. Nekkala, V. S. Kumar J., D. Ramachandran et al. *American Journal of Advanced Drug Delivery*. 2014. Vol. 2, № 5. P. 624–637.
34. A validated RP-HPLC method for simultaneous determination of propranolol and valsartan in bulk drug and gel formulation/ S. S. Imam, A. Ahad, M. Aqil et al. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* 2013. Vol. 5, № 1. P. 61–65.
35. Lakshmi K. S., Sivasubramanian L. A stability indicating HPLC method for the simultaneous determination of valsartan and ramipril in binary combination. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 2010. Vol. 55, № 2. P. 223–226.
36. HPLC method development for the simultaneous analysis of amlodipine and valsartan in combined dosage forms and *in vitro* dissolution studies / M. Çelebier, M. S. Kaynak, S. Altınöz, S. Sahin. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010. Vol. 46, № 4. P. 4761–4768.

37. Chitlange S. S., Bagri K., Sakarkar D. M. Stability indicating RP- HPLC method for simultaneous estimation of valsartan and amlodipine in capsule formulation. *Asian J. Res. Chem.* 2008. Vol. 1, № 1. P. 15–18.
38. Yuryeva O., Kondratova Y., Logoyda L. Development of high-performance liquid chromatography method for simultaneous analysis of amlodipine and valsartan in combined dosage form and *in vitro* dissolution studies. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.* 2018. Vol. 11, № 5. P. 200–204.
39. Macek J, Klima J, Ptáček P. Rapid determination of valsartan in human plasma by protein precipitation and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B.* 2006. Vol. 832, № 1. P. 169–172.
40. Improved analytical validation and pharmacokinetics of valsartan using HPLC with UV detection / Z. Z. Piao, E. S. Lee, H. T. Tran, B. J. Lee. *Archives of pharmacal research.* 2008. Vol. 31, № 8. P. 1055–1059.
41. Development and validation of a method for quantitative determination of valsartan in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry / N. Koseki, H. Kawashita, H. Hara et al. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis.* 2007. Vol. 43, № 5. P. 1769–1774.
42. A liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of valsartan and hydrochlorothiazide in human plasma / H. L. Y. Wang, Y. Jiang, Y. Tang et al. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2007. Vol. 852, № 1–2. P. 436–442.
43. Simultaneous determination of fixed dose combination of nebivolol and valsartan in human plasma by liquid chromatographic-tandem mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study / P. S. Selvan, K. V. Gowda, U. Mandal et al. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2007. Vol. 858, № 1–2. P. 143–150.
44. Донченко А. О., Васюк С. О. Спектрофотометричне Визначення Атенололу В Лікарських Формах Із Використанням 2,3-Дихлор-1,4-Нафтохінону. *Фармацевтичний часопис.* 2017. № 4. С. 63–68.

45. Zhuk Y. N., Vasyuk S. O. Quantitative determination of Atenolol in tablets. *IJAPBC*. 2015. Vol. 5, № 3. P. 350–354.
46. Малецька О. Р., Васюк С. О. Спектрофотометричне визначення атенололу в таблетках. *Фармацевтичний часопис*. 2021. № 1. С. 50–58.
47. Количественное определение атенолола в таблетках Тонорма методом спектрофотометрии / О. А. Вислоус, Н. Ю. Бевз, Н. В. Живора, П. А. Безуглый. *Вестник фармации*. 2014. № 4 (66). С. 68–73.
48. Spectrophotometric determination of atenolol via hydroxamic acid formation / Y. K. Agrawal, K. Raman, S. Rajpu, S. K. Menon. *Analytical Letters*. 1992. Vol. 25, № 8. P. 1503–1510.
49. Prashanth K. N., Basavaiah K. Sensitive Spectrophotometric Determination of Atenolol in Pharmaceutical Formulations Using Bromate-Bromide Mixture as an Eco-Friendly Brominating Agent. *J. Anal. Methods Chem*. 2012. Vol. 2012. P. 810156.
50. A novel spectrophotometric determination of atenolol using sodium nitroprusside / N. Bashir, S. W. H. Shah, M. Bangesh, R. Riazullah. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 2011. Vol. 70, № 1. P. 51–54.
51. Basavaiah K., Chandrashekar U., Nagegowda P. Sensitive determination of atenolol in tablets using chloramine-T and two dyes. *Indian Journal of Chemical Technology*. 2004. Vol. 11, № 6. P. 769–776.
52. Saleem B. A. Spectrophotometric Determination of Atenolol Using Indigo Carmine Dye. *Kirkuk University Journal for Scientific Studies*. 2019. Vol. 14, № 2. P. 15–39.
53. Antakli S., Nejem L., Joumaa M. A. Determination of Atenolol in Tablet Formulation by Analytical Spectrophotometry. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2020. Vol. 13, № 2. P. 609–614.
54. Determination of Atenolol in Pharmaceutical Formulations by Diffuse Reflectance Spectroscopy / M. A. Gotardo, R. Sequinel, L. Pezza, H. R. Pezza. *Eclectica Quimica*. 2008. Vol. 33, № 4. P. 7–12.

55. El-Didamony A. M., Moustafa M. A. Direct Spectrophotometric Determination of Atenolol and Timolol Antihypertensive Drugs. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2017. Vol. 9, № 3. P. 47–53.

56. Mhemeed A. H. Spectrophotometric Determination of Metoprolol and Atenolol by Iron (III) and Ferricyanide. *Sys. Rev. Pharm.* 2021. Vol. 12, № 1. P. 34–39.

57. Yilmaz B. Determination of Atenolol in Pharmaceutical Preparation by Zero-, First-, Second- and ThirdOrder Derivative Spectrophotometric Methods. *FABAD J. Pharm. Sci.* 2008. Vol. 33, № 3. P. 119–129.

58. Avula S., Madhu S., Ummaraspaty U. R. A new method development and validation of dual wavelength UV Spectro Photometric method for Simultaneous estimation of Atenolol and Amlodipine besylate in combined dosage form. *J. Compr. Phar.* 2015. Vol. 2, № 3. P. 98–104.

59. Spectrophotometric method for simultaneous estimation of atenolol in combination with losartan potassium and hydrochlorothiazide in bulk and tablet formulation / S. Bari, S. Sathe, P. Jain, S. Surana. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2010. Vol. 2, № 4. P. 372–375.

60. Syed S. M., Mohammed M. Validation of UV Spectrophotometric Method for Determination of Atenolol. *International Journal of Pharmaceutical Research*. 2014. Vol. 6, № 1. P. 25–27.

61. Development and Validation Uv Spectrophotometric Method for Determination of Atenolol in Pure Materials and Pharmaceutical Dosage / K. M. Aboud, A. Mohammad, M. Isbera, M. Beesh.. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*. 2017. Vol. 7, № 04. P. 1–6.

62. Patil P. A., Raj H. A., Sonara G. B. Simultaneous Estimation of Atenolol and Ivabradine HCl using UV-Spectrophotometry. *Asian J. Pharm. Ana.* 2016. Vol. 6, № 2. P. 109–114.

63. Validated Reversed-Phase HPLC Method for the Determination of Atenolol in the Presence of Its Major Degradation Product / R. Ceresole, M. A.

Moyano, M. T. Pizzorno, A. I. Segall. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2006. Vol. 29, № 20. 3009–3019.

64. Stability-indicating HPLC Method for the Determination of Atenolol in Pharmaceutical Preparations / F. Belal, M. Sharaf El-Din, F. Aly et al. *J. Chromat. Separation Techniq.* 2013. Vol. 4, № 1. Article 1000164. P. 1–7.

65. Bhaskar B. L., Kumar S. A., Kumar U. R. A. A facile and rapid HPLC method for the determination of atenolol in pharmaceutical formulations. *Asian Journal of Applied Sciences*. 2011. Vol. 4, № 3. P. 306–313.

66. Validation of UV Spectrophotometric and HPLC Methods for Quantitative Determination of Atenolol in Pharmaceutical Preparations / A. Weich, D. C. de Oliveira, J. de Melo et al. *Latin American Journal of Pharmacy (formerly Acta Farmacéutica Bonaerense)*. 2007. Vol. 26, № 5. P. 765–770.

67. Estimation of Atenolol by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography / N. Kumar, N. Verma, O. Songh et al. *E-Journal of Chemistry*. 2010. Vol. 7, № 3. P. 962–966.

68. Baheti K. G., Shah N., Shaikh S. Ion-pairing reverse-phase high performance liquid chromatography method for simultaneous estimation of atenolol and indapamide in bulk and combined dosage form. *Indian J. Pharm. Sci.* 2012. Vol. 74, № 3. P. 271–274.

69. Shanmugasundaram P., Kamarapu S. K. RP-HPLC Method for the Simultaneous Estimation and Validation of Amlodipine Besylate and Atenolol in Bulk and Tablet Dosage Form in Biorelevant Dissolution Medium (Fassif). *Research J. Pharm. and Tech.* 2017. Vol. 10, № 10. P. 3379–3385.

70. Development and Validation of RP-HPLC Method for the Simultaneous Estimation of Atenolol and Amlodipine in Tablet Dosage Form / Md. A. Haque, A. Naznin, A. N. M H. Kabir et al.. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010. Vol. 9, № 2. P. 131–138.

71. Philip B., Joseph J., Sundarapandian M. Rp-Hplc Method Development And Validation For Simultaneous Estimation Of Atenolol And Amlodipine Besylate

In Pharmaceutical Dosage Forms. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2011. Vol. 2, № 8. P. 2156–2161.

72. Bhusari V. K., Dhaneshwar S. R. Validated HPLC Method for Simultaneous Quantitation of Amlodipine Besylate, Atenolol and Aspirin in Bulk Drug and Formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 2012. Vol. 17, № 09. P. 1–6.

73. Development and Validation of an Isocratic HPLC Method for Simultaneous Determination of Quaternary Mixtures of Antihypertensive Drugs in Pharmaceutical Formulations / J. F. F. Anderson, M. C. G. Gerlin, R. A. Sversut et al. *Acta Chromatographica*. 2017. Vol. 29, № 1. P. 95–110.

74. Zaveri M. N., Khandhar A. Development and Validation of a RP-HPLC for the Simultaneous Estimation of Atenolol and Hydrochlorothiazide in Pharmaceutical Dosage forms. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Health Care*. 2010. Vol. 2, № 3. P. 248–252.

75. Yadav S. S., Rao J. R. RP-HPLC Method For Simultaneous Estimation Of Aspirin, Ramipril, Hydrochlorothiazide, Simvastatin And Atenolol From Pharmaceutical Dosage Form. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*. Vol. 6, № 9. P. 443–448.

76. Elkady E. F., Fouad M. A., Faquih A. A. E. A Versatile Stability-indicating Liquid Chromatographic Method for the Simultaneous Determination of Atenolol, Hydrochlorothiazide and Chlorthalidone. *Current Pharmaceutical Analysis*. 2020. Vol. 16, № 8. P. 1037–1051.

77. Simultaneous RP-HPLC Analysis of Atenolol, Hydrochlorothiazide, and Losartan Potassium in a Tablet Formulation / A. B. Thomas, U. B. Chavan, R. K. Nanda et al. *Acta Chromatographica*. 2010. Vol. 22, № 2. P. 219–226.

78. Yilmaz B., Arslan S., Asci A. HPLC Method for Determination of Atenolol in Human Plasma and Application to a Pharmacokinetic Study in Turkey. *Journal of Chromatographic Science*. 2012. Vol. 50, № 10. P. 914–919.

79. Luis Renato Pires de Abreu, Silvana Aparecida Calafatti de Castro, José Pedrazzoli Jr. Atenolol quantification in human plasma by high-performance liquid

chromatography: application to bioequivalence study. *AAPS Pharm. Sci.* 2003. Vol. 5, № 2. P. E21.

80. Elgawish M. S., Mostafa S. M., Elshanawane A. A. Simple and rapid HPLC method for simultaneous determination of atenolol and chlorthalidone in spiked human plasma. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2011. Vol. 19, № 1. P. 43–49.

81. Simultaneous quantification of atenolol and chlorthalidone in human plasma by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry / J. V. Shah, D. P. Patel, P. A. Shah et al. *Biomedical Chromatography*. 2016. Vol. 30, № 2. P. 208–216.

82. Teitelbaum Z., Ben-dom N., Terry S. A Liquid Chromatographic Method for the Determination of Atenolol in Human Plasma. *Journal of Liquid Chromatography*. 1991. Vol. 14, № 20. P. 3735–3744.

83. Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material / ed. by A. C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop. 4th ed. London : Pharmaceutical Press, 2011. 2609 c.

84. Watson D. G. *Pharmaceutical analysis*. Elsevier, 2017. 461 p.

85. Analytical Techniques (Chromatography, Spectroscopy, Electrophoresis) In *Pharmaceutical Analysis: A Review* / I. Khan, K. Mulpuri, B. Das et al. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Nano Sciences*. 2015. Vol. 4, № 1. P. 19–27.

86. Kupiec T. Quality control Analytical Methods: high-performance liquid chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. 2004. Vol. 8, № 3. P. 233–237.

87. Lindholm J. Development and Validation of HPLC Methods for Analytical and Preparative Purposes. Acta Universitatis Upsaliensis. *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology* 995. 2004. 87 p.

88. Kazakevich Y., Lobrutto R. *HPLC for pharmaceutical scientists*. New Jersey : John Wiley, 2007. 1135 p.

89. Ahuja S., Dong M.W. Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC. Amsterdam : Elsevier science, 2005. 679 p.
90. Хацаюк А. С., Павлова О. Е., Эхова М. Э. Роль и значение высокоэффективной жидкостной хроматографии в практике высокотехнологичных лабораторных исследований. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2016. № 3 (66). С. 215–219.
91. Siddiqui M. R., Alothman Z. A., Rahman N. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017. Vol. 10. P. S1409–S1421.
92. Van Aken K., Streckowski L., Patiny L. EcoScale, a semi-quantitative tool to select an organic preparation based on economical and ecological parameters. *Beilstein J. Org. Chem*. 2006. Vol. 2. P. 3.
93. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures / A. Gałuszka, P. Konieczka, Z. M. Migaszewski, J. Namiesnik. *Trends in Analytical Chemistry*. 2012. Vol. 37. P. 61–72.
94. Watson W. J. W. How do the fine chemical, pharmaceutical, and related industries approach green chemistry and sustainability? *Green Chemistry*. 2012. Vol. 14. P. 251–259.
95. Anastas P. T., Warner J. C. Green Chemistry: Theory and Practice. New York : Oxford University Press, 1998. 135 p.
96. Greening analytical chromatography / C. J. Welch, N. Wu, M. Biba et al. *Trends Anal. Chem*. 2010. Vol. 29. P. 667–680.
97. Talaviya S., Majmudar F. Green Chemistry: A Tool in Pharmaceutical Chemistry. *NHL Journal of Medical Sciences*. 2012. Vol. 1, № 1. P. 7–13.
98. Samanidou V. F. Pharmaceutical Analysis from a Green Perspective. *Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry*. 2014. Vol. 1, № 4. P. 1016.
99. Koel M., Kaljurand M. Application of the principles of green chemistry in analytical chemistry. *Pure and Applied Chemistry*. 2006. Vol. 78. № 11. P. 1993–2002.

100. Green chromatography / J. Płotka, M. Tobiszewski, A. M. Sulej et al. *Journal of Chromatography*. 2013. Vol. 1307. P. 1–20.
101. Green chemistry: Analytical and chromatography / M. A. Korany, H. Mahgoub, R. S. Haggag et al. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2017. Vol. 40, № 16. P. 839–852.
102. ГОСТ 29169–91 (ИСО 648–77). Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой. М. : Стандартином, 2008. 9 с.
103. ГОСТ 1770–74 (ИСО 1042–83, ИСО 4788–80). Посуда лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия. М. : Стандартином, 2008. 22 с.
104. Жук Ю. М., Васюк С. О., Кейтлін І. М. Спектрофотометричне визначення бісопрололу за реакцією з тимоловим синім. *Запорізький медичний журнал*. 2012. Вип. 72, № 3. С. 62–64.
105. Лебідь Ю. М. Спектрофотометричне визначення сальбутамолу в аерозолі за реакцією з бромкрезоловим зеленим. *Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики*. 2011. Вип. XXIV, № 2. С. 90–92.
106. A New Method for the Assay of Bisoprolol Using Bromocresol Green / A. D. Panainte, N. Bibire, G. Tantarú et al. *REV. CHIM. (Bucharest)*. 2014. Vol. 65, № 8. P. 916–920.
107. Gudruman A. D., Murarasu A., Dorneanu V. Spectrophotometric determination of bisoprolol using methyl orange as reagent. *Farmacia*. 2012. Vol. 60, № 5. P. 634–641.
108. Quantitative determination of propranolol with bromate and methyl orange / K. Basavaiah, U. Chandrashekar, H. Prameela, P. Nagegowda. *Acta Ciencia Indica, Chemistry*. 2003. Vol. 29. P. 25–30.
109. Монайкіна Ю. В. Застосування сульфоталеїнових барвників у спектрофотометричному аналізі лікарських засобів : дис. ... кандидата фарм. наук : 15.00.02. Запоріжжя, 2011. 177 с.

110. Бурлака Ю. В., Тарханова О. О., Васюк С. О. Спектрофотометричне визначення цефтриаксону. *Запороз. мед. журн.* 2009. № 6. С. 93–94.

111. Спектрофотометричне визначення деяких цефалоспоринів за реакцією з крезоловим червоним / Ю. В. Бурлака, К. П. Портна, О. О. Тарханова, С. О. Васюк. *Актуальні питання фармац. та мед. науки та практики.* 2010. Вип. XXIII, № 4. С. 17–19.

112. Спектрофотометричне визначення клотримазолу у лікарських формах / Ю. В. Бурлака, О. О. Тарханова, С. О. Васюк, І. М. Кейтлін. *Запороз. мед. журн.* 2010. № 4. С. 63–66.

113. Визначення флуконазолу в лікарських формах за реакцією з бромтимоловим синім / Ю. В. Бурлака, О. О. Тарханова, С. О. Васюк, І. М. Кейтлін. *Фармац. журн.* 2010. № 3. С. 69–75.

114. Prashanth K. N., Basavaiah K., Raghu M. S. Rapid and Sensitive Spectrophotometric Measurement of Non-Specific Beta Blocker Propranolol Hydrochloride Using Three Sulphonphthalein Dyes In Pure Form, Pharmaceuticals and Human Urine. *Chemical Sciences Journal.* 2012. Vol. 2012. P. CSJ–80.

115. Cardoso S. G., Ieggli C. V., Pomblum S. C. Spectrophotometric determination of carvedilol in pharmaceutical formulations through charge-transfer and ion-pair complexation reactions. *Pharmazie.* 2007. Vol. 62, № 1. P. 34–37.

116. Spectrophotometric determination of vitamin B1 in a pharmaceutical formulation using triphenylmethane acid dyes / S. Liu, Z. Zhang, Q. Liu et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002. Vol. 30, № 3. P. 685–694.

117. Aydogmus Z., Barla A. Spectrophotometric determination of doxazosin mesylate in tablets by ion-pair and charge-transfer complexation reactions. *J. AOAC Int.* 2009. Vol. 92, № 1. P. 1231–137.

118. Extractive spectrophotometric determination of antiallergic drugs in pharmaceutical formulations using bromopyrogallol red and bromothymol blue / K. C. Ramesh, B. G. Gowda, M. B. Melwanki et al. *Anal. Sci.* 2001. Vol. 17, № 9. P 1101–1103.

119. Erk N. Spectrophotometric determination of indinavir in bulk and pharmaceutical formulations using bromocresol purple and bromothimol blue. *Pharmazie*. 2004. Vol. 59, № 3. P. 183–186.

120. Gowda B. G., Melwanki M. B., Seetharamappa J. Extractive spectrophotometric determination of ceterizine in pharmaceutical preparations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001. Vol. 25, № 5–6. P. 1021–1026.

121. El-Didamoni A. M. Extractive spectrophotometric methods for the determination of oxomemazine hydrochloride in bulk and pharmaceutical formulations using bromocresol green, bromocresol purple and bromophenol blue. *Arch. Pharm.* 2005. Vol. 338, № 4. P. 190–197.

122. Rahman N., Hejaz Azmi S. N. Extractive spectrophotometric methods for determination of diltiazem HCl in pharmaceutical formulations using bromothymol blue, bromophenol blue and bromocresol green. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000. Vol. 24, № 1. P. 33–41.

123. Rahman N., Ahmad Khan N., Hejaz Azmi S. N. Extractive spectrophotometric methods for the determination of nifedipine in pharmaceutical formulations using bromocresol green, bromophenol blue, bromothymol blue and eriochrome black T. *Farmaco*. 2004. Vol. 59, № 1. P. 47–54.

124. Ashour S., Chenna M. F., Bayram R. Spectrophotometric determination of alfuzosin HCL in pharmaceutical formulations with some sulphonaphthalein dyes. *Int. J. Biomed. Sci.* 2006. Vol. 2, № 3. P. 273–279.

125. Suslu I., Tamer A. Spectrophotometric determination of enoxacin as ion-pairs with bromophenol blue and bromocresol purple in bulk and pharmaceutical dosage form. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002. Vol. 29, № 3. P. 545–554.

126. Marona H. R., Schapoval E. E. Spectrophotometric determination of sparfloxacin in Pharmaceutical formulations using bromothimol blue. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001. Vol. 26, № 3. P. 501–504.

127. Ashour S., Al-Khalil R. Simple extractive colorimetric determination of levofloxacin by acid-dye complexation methods in pharmaceutical preparations. *Farmaco*. 2005. Vol. 60, № 9. P. 771–775.

128. Spectrophotometric determination of gatifloxacin in pure form and in pharmaceutical formulation / A. S. Amin, A. A. El-Fetouh Gouda, R. El-Sheikh, F. Zahran. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2007. Vol. 67, № 5. P. 1306–1312.

129. Mostafa S., El-Sadek M., Alla E. A. Spectrophotometric determination of enrofloxacin and pefloxacin through ion-pair complex formation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002. Vol. 28, № 1. P. 173–180.

130. Nour El-Dien F. A., Mohamed G. G., Mohamed N. A. Spectrophotometric determination of trazodone, amineptine and amitriptyline hydrochlorides through ion-pair formation using methyl orange and bromocresol green reagents. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2006. Vol. 65, № 1. P. 20–26.

131. Жук Ю. М., Васюк С. О. Застосування сульфопталеїнових барвників в аналізі бета-адреноблокаторів. *Український науковомедичний молодіжний журнал.* 2013. № 4 (74). С. 322–323.

132. Ulu S. T., Aydogmus Z. A new spectrophotometric method for the determination of tianeptine in tablets using ion-pair reagents. *Chem. Pharm. Bull.* 2008. Vol. 56, № 12. P. 1635–1638.

133. Non-extractive spectrophotometric determination of memantine HCl, clomipramine HCl and fluvoxamine maleate in pure form and in pharmaceutical products by ion-pair complex formation with rose bengal / R. A. Sayed, W. El-Alfy, O. A. Ismaiel et al. *Annales Pharmaceutiques Francaises.* 2021. Vol. 79, № 4. P. 375–386.

134. Job P. About the bivalent cobalt, copper and nickel salts in hydrochloric and hydrobromic acids. *J. Ann. Chim.* 1936. Vol. 6. P. 97–144.

135. Державна фармакопея України друге видання / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Доповнення 4. 2020. С. 123–236.

136. ICH [International Council of Harmonisation], Expert Working Group (2005) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). URL: [https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/Q2\(R1\).pdf](https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/Q2(R1).pdf)

137. Стандартизованная процедура валидации спектрофотометрических методик количественного определения лекарственных средств в варианте метода показателя поглощения / А. И. Гризодуб, О. А. Евтифеева, К. И. Проскурина, О. В. Безумова. *Фармаком*. 2014. № 1. С. 29–39; № 2. С. 45–54.

138. Гризодуб А. И. Валидация спектрофотометрических методик количественного анализа лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ. *Фармаком*. 2002. № 3. С. 42–50.

139. Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта / А. И. Гризодуб, Д. А. Леонтьев, Н. Н. Денисенко, Ю. В. Подпружников. *Фармаком*. 2004. № 3. С. 3–17; № 4. С. 96.

140. Гризодуб А. И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств. *Аналитическое обеспечение создания, стандартизации и контроля качества лекарственных средств*. Харьков : изд. «НТМТ», 2011. Т. 3. С. 934–1063.

141. Гризодуб А. И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств. Харьков : Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств», 2016. 396 с.

142. Development and validation of spectrophotometric methods for estimation of valsartan in dosage form / K. Peleshok, L. Kryskiw, T. Kucher, O. Poliak, L. Logoyda. «Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи»: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченій 100-річчю Національного фармацевтичного університету, 10 вересня 2021 р. Харків, 2021. С. 275–276.

143. Optimization of reaction variables for non-extractive spectrophotometric determination of valsartan via ion-pair complex formation with bromophenol blue / K. Peleshok, B. Bondar, L. Kryskiw, T. Kucher, O. Poliak, L. Logoyda. «100 РОКІВ УСПИХУ ТА ЯКОСТІ»: матеріали міжнародного науково-практичного симпозиуму, присвяченому 100-річчю кафедри фармацевтичної хімії

Національного фармацевтичного університету, 18 жовтня 2021 р. Харків, 2021. С. 71-72.

144. Development and validation of spectrophotometric method for simultaneous estimation of valsartan and atenolol in binary mixtures: application to tablets analysis / K. Peleshok, O. Poliak, L. Kryskiw, Agyemang F. Sarpong, N. Zarivna, D. Korobko, H. Zahrychuk, N. Horlachuk, A. Sverstiuk, L. Levytska, L. Logoyda. *Pharmakeftiki*. 2021. Vol. 33, № 1. P. 52–60.

145. Development and validation of spectrophotometric method for simultaneous estimation of valsartan and atenolol in dosage forms / K. Peleshok, L. Kryskiw, S. Kovalenko, L. Logoyda. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матеріали VIII наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 23–24 вересня 2020 р. Тернопіль, 2020. С. 138–139.

146. Peleshok K. Ye., Logoyda L. S., Poliak O. B. Development and methodology for the estimation of atenolol and valsartan in pharmaceuticals. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2020. № 1. С. 30–33.

147. Peleshok K., Logoyda L. Application of thin layer chromatography in the analysis of atenolol and valsartan. *Хімічні Каразінські читання – 2020* : матеріали XII Всеукраїнської наук. конф. студентів та аспірантів, 21–23 квітня 2020 р. Харків, 2020. С. 32.

148. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons / A. C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop, J. Watts (Ed.). Fourth edition. London : Pharmaceutical Press, Lambeth High Street, 2011. P. 1620–1622.

149. Kazakevic Yu, Lobruto R. The Book: HPLC for Practicing Scientist. John Wiley & Sons 2007. P. 206–227.

150. Analytical Method Validation Protocol for Pharmaceuticals URL: <https://www.pharmaguideline.com/2013/10/analytical-method-validation-protocol-for-pharmaceuticals.html>

151. Method Development: a Guide to Basics URL: https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715003355_dev_meth.pdf

152. Пелешок К. Є., Логойда Л. С., Піпонські М. Спосіб ізократичного хроматографічного визначення валсартану та атенололу в лікарських засобах (Метод I) : патент № 146653 Україна, МПК G01N33/15. № u202005505 ; заявл. 25.08.2020 ; опубл. 10.03.2021, Бюл. № 10.

153. Пелешок К. Є., Логойда Л. С., Піпонські М. Спосіб хроматографічного визначення валсартану та атенололу в лікарських засобах : патент № 145966 Україна, МПК G01N30/00, B01D15/08. № u202004075 ; заявл. 06.07.2020 ; опубл. 14.01.2021, Бюл. № 2.

154. Пелешок К. Є., Логойда Л. С., Піпонські М. Спосіб ізократичного хроматографічного визначення валсартану та атенололу в лікарських засобах (Метод II) : патент № 145731 Україна, МПК G01N30/00. № u202005507 ; заявл. 25.08.2020 ; опубл. 29.12.2020, Бюл. № 24.

155. Efficient Validated HPLC/UV method for determination of valsartan and atenolol in dosage form and *in vitro* dissolution studies / M. Piponski, K. Peleshok, L. Logoyda, L. Kravchuk, V. Piatnochka, U. Zakharchuk. *Biointerface research in applied chemistry*. 2020. Vol. 10, № 6. P. 6669–6675.

156. HPLC method development for valsartan and atenolol in dosage forms on column Zorbax C8 / K. Peleshok, M. F. Abdelmalek, M. Piponski, L. Logoyda. 18th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry : Abstracts, 2021 February 25–27. Athens, 2021. P. 19.

157. Novel HPLC-UV method for simultaneous determination of valsartan and atenolol in fixed dosage form; Study of green profile assessment / K. Peleshok, M. Piponski, E. A. Ajie, O. Poliak, N. Zarivna, O. Deneffil, L. Logoyda. *Pharmacia*. 2021. Vol. 68, № 1. P. 43–51.

158. Peleshok K., Piponski M., Logoyda L. Method development for simultaneous determination of valsartan and atenolol in newly formulated dosage form. *EFMC-ISM&EFMC-YMCS* : Virtual Poster Session Powered by the EFMC Young Scientists Network, 9 September. 2020. P. 189.

159. New liquid chromatography assays for simultaneous quantification of antihypertensives atenolol and valsartan in their dosage forms / K. Peleshok,

M. Piponski, S. Kovalenko, H. Ahmed, A. Abdel-Megied, O. F. Ezike, L. Logoyda. *Journal of Separation Science*. 2021. Vol. 44, № 2. P. 565–575.

160. HPLC method development for valsartan and atenolol in dosage forms on columns LiChrospher® 60 RP-select / K. Peleshok, M. Piponski, O. Florence, S. L. Kovalenko, Logoyda. *Contemporary pharmacy: issues, challenges and expectation. 2020 autumn* : Abstracts of the international conference, 2020 October 23. Kaunas, 2020. С. 49.

161. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability / G. L. Amidon, H. Lennerlas, V. P. Shah, J. R. Crison. *Pharmaceutical Research*. 1995. Vol. 12, № 3. P. 413–420.

162. Раменская Г. В., Шохин И. Е., Кукес В. Г. Важнейшие биофармацевтические свойства лекарственных веществ на стадии абсорбции в желудочно-кишечном тракте. *Химико-фармацевтический журнал*. 2011. № 45 (7). С. 37–40.

163. Wu C. Y., Benet L. Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport / Absorption / Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. *Pharmaceutical Research*. 2005. Vol. 22, № 1. P. 11–23.

164. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification / N. A. Kasim, M. Whitehouse, C. Ramachandran et al. *Molecular Pharmaceutics*. 2004. Vol. 1, № 1. P. 85–96.

165. Artursson P., Palm K., Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv. Drug Deliv*. 2001. Vol. 46, № 1–3. P. 27–43.

166. Artursson P., Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1991. Vol. 175, № 3. P. 880–890.

167. Balimane P. V., Chong S., Morrison R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. 2000. Vol. 44, № 1. P. 301–312.
168. Combined application of parallel artificial membrane permeability assay and Caco-2 permeability assays in drug discovery / E. Kerns, L. Di, S. Petusky et al. *J. Pharm Sci.* 2004. Vol. 93, № 6. P. 1440–1453.
169. Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells: *In vitro* and human jejunum *in vivo* / H. Lennernas, K. Palm, U. Fagerholm, P. Artursson. *International Journal of Pharmaceutics*. 1996. Vol. 127, № 1. P. 103–107.
170. Delie F., Rubas W. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 1997. Vol. 14, № 3. P. 221–286.
171. Effect of common excipients on Caco-2 transport of low-permeability drugs / B. Rege, L. Yu, A. Hussain, J. Polli. *J. Pharm. Sci.* 2000. Vol. 90, № 11. P. 1776–1786.
172. Yee S. *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man – Fact or myth. *Pharmaceutical Research*. 1997. Vol. 14, № 6. P. 763–766.
173. Role of Caco-2 Cell Monolayers in Prediction of Intestinal Drug Absorption / P. Shah, V. Jogani, T. Bagchi, A. Misra. *Biotechnology Progress*. 2006. Vol. 22, № 1. P. 186–198.
174. Flux measurements across Caco-2 monolayers may predict transport in human large intestinal tissue / W. Rubas, M. E. Cromwell, Z. Shahrokh et al. *J. Pharm. Sci.* 1996. Vol. 85, № 2. P. 165–169.
175. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells / S. Yamashita, T. Furubayashi, M. Kataoka et al. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2000. Vol. 10, № 3. P. 195–204.

176. Horie K., Tang F., Borchardt R. Isolation and characterization of Caco-2 subclones expressing high levels of multidrug resistance efflux transporter. *Pharm. Res.* 2003. Vol. 20, № 2. P. 161–168.

177. *In vitro* permeability through Caco-2 cells is not quantitatively predictive of *in vivo* absorption for peptide-like drugs absorbed via the dipeptide transporter system / S. Chong, S. Dando, K. Soucek, R. Morrison. *Pharm. Res.* 1996. Vol. 13, № 1. P. 120–123.

178. LC-MS/MS method development for the quantitative determination of valsartan from Caco-2 cell monolayers: application to permeability assay / K. Peleshok, O. Poliak, N. Zarivna, O. Oleshchuk, U. Mudryk, V. Hlushok, A. Sverstiuk, O. Svan, N. Terenda, A. Makhnitskyu, O. Yaremchuk, L. Logoyda. *Pharmakeftiki.* 2021. Vol. 33, № II. P. 107–115.

179. Peleshok K., Logoyda L. Method development for the quantitative determination of valsartan from caco-2 cell monolayers. *Current trends in pharmaceutical chemistry and standardization of medicines* : матеріали наук.-практ. конф. за міжнар. участю, 25–26 травня 2021 р. Тернопіль, 2021. С. 44.

180. Гребенкин Д. Ю., Станишевский Я. М., Шохин И. Е. Современные подходы к проведению сравнительного теста кинетики растворения. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2016. № 1 (14). С. 166–171.

181. Шохин И. Е., Раменская Г. В. Оценка возможности замены исследований биоэквивалентности *in vivo* на изучение сравнительной кинетики растворения *in vitro*. *Химико-фармацевтический журнал.* 2011. № 45 (2). С. 46–48.

182. Выполнение тестов «Однородность содержания» и «Растворение» при серийном контроле качества лекарственных средств. 1. Общая схема эксперимента / А. И. Гризодуб, Д. А. Леонтьев, М. Г. Левин и др. *Журнал органічної та фармацевтичної хімії.* 2004. Т. 2, № 1 (5). С. 24–34.

183. Давыдова К. С., Кулинич Ю. И., Шохин И. Е. Тест «Растворение» в контроле качества лекарственных средств. *Ремедиум.* 2010. № 5. С. 42.

184. Испытание «Растворение» в средах, моделирующих физиологические условия, как способ оценки поведения лекарственных средств *in vivo* / Г. В. Раменская, И. Е. Шохин, А. Ю. Савченко, Е. А. Волкова. *Биомедицинская химия*. 2011. Т. 57, № 5. С. 482–489.

185. Чижова Д. А., Бунятян Н. Д., Василенко Г. Ф. Современные подходы к изучению высвобождения лекарственных веществ из твердых дозированных лекарственных форм в условиях *in vitro* и *in vivo*. *Фармация*. 2008. № 2. С. 50–52.

186. Экспертные подходы к планированию и анализу результатов сравнительного теста кинетики растворения воспроизведённых лекарственных препаратов в твёрдых лекарственных формах с немедленным высвобождением / А. Н. Миронов, Д. П. Ромодановский, Р. Р. Ниязов, Д. В. Горячев. *Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2014. № 2. С. 3–8.

187. Comparison of dissolution of amlodipine besylate tablets from 3 manufactures / S-G. Fang, J. Yu, Z. Jiang et al. *J. Chin. Integr. Med.* 2007. Vol. 24. P. 326–328.

188. Hanson R., Gray V. Handbook on Dissolution Testing. 3rd ed. Publisher : Dissolution Technologies, USA, 2004. 199 p.

189. Peleshok K. Quality control measurement and *in vitro* bioequivalence of valsartan and atenolol tablets marketed in Ukraine. *International Journal of Medicine and Medical Research*. 2020. № 2. P. 52–58.

190. Sarpong. Analytical support of innovative pharmaceutical development of antihypertensive drugs / K. Peleshok, N. Shulyak, Adaeze E. Ajie, Donkor A. Abbeyquaye, Oluwatobiloba J. Omotosho, Fatma Abdelmalek M., Obianuju F. Ezike, F. Agyemang. *Scientific community: interdisciplinary research: 3th International Scientific and Practical Conference*, 2021 March 16–18. Hamburg: Busse Verlag GmbH., 2021. P. 364–368.

191. Analytical methods development for the quantification of antihypertensive active pharmaceutical ingredients in dosage forms / K. Peleshok, N.

Shulyak, Adaeze E. Ajie, Abdelmalek Mohamed F., Agyemang F. Sarpong. *Topical issues of new medicines development* : матеріали XXVIII міжнародної наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів, присв. 150-річчю з дня народження М. О. Валяшка, 18–19 березня 2021. Харків, 2021. С. 107–108.

192. Validation of analytical methods for quantification of different antihypertensive active pharmaceutical ingredients in dosage forms / K. Peleshok, N. Shulyak, O. Omotosho, A. Abbeyquaye, M. F. Abdelmalek, F. Ezike, A. Ajie, F. Sarpong. *Матеріали XXV міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених*, 12–14 квітня 2021 р. Тернопіль, 2021. С. 206–207.

ДОДАТОК А

Список публікацій здобувача:

1. Peleshok K. Ye., Logoyda L. S., Poliak O. B. Development and methodology for the estimation of atenolol and valsartan in pharmaceuticals. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2020. № 1. С. 30–33.
2. Efficient Validated HPLC/UV method for determination of valsartan and atenolol in dosage form and *in vitro* dissolution studies / M. Piponski, K. Peleshok, L. Logoyda, L. Kravchuk, V. Piatnochka, U. Zakharchuk. *Biointerface research in applied chemistry*. 2020. Vol. 10, № 6. P. 6669–6675.
3. Peleshok K. Quality control measurement and *in vitro* bioequivalence of valsartan and atenolol tablets marketed in Ukraine. *International Journal of Medicine and Medical Research*. 2020. № 2. P. 52–58.
4. Novel HPLC-UV method for simultaneous determination of valsartan and atenolol in fixed dosage form; Study of green profile assessment / K. Peleshok, M. Piponski, E. A. Ajie, O. Poliak, N. Zarivna, O. Denefil, L. Logoyda. *Pharmacia*. 2021. Vol. 68, № 1. P. 43–51.
5. New liquid chromatography assays for simultaneous quantification of antihypertensives atenolol and valsartan in their dosage forms / K. Peleshok, M. Piponski, S. Kovalenko, H. Ahmed, A. Abdel-Megied, O. F. Ezike, L. Logoyda. *Journal of Separation Science*. 2021. Vol. 44, № 2. P. 565–575.
6. Development and validation of spectrophotometric method for simultaneous estimation of valsartan and atenolol in binary mixtures: application to tablets analysis / K. Peleshok, O. Poliak, L. Kryskiw, Agyemang F. Sarpong, N. Zarivna, D. Korobko, H. Zahrychuk, N. Horlachuk, A. Sverstiuk, L. Levytska, L. Logoyda. *Pharmakeftiki*. 2021. Vol. 33, № 1. P. 52–60.
7. LC-MS/MS method development for the quantitative determination of valsartan from Caco-2 cell monolayers: application to permeability assay / K. Peleshok, O. Poliak, N. Zarivna, O. Oleshchuk, U. Mudryk, V. Hlushok,

- A. Sverstiuk, O. Svan, N. Terenda, A. Makhnitskyu, O. Yaremchuk, L. Logoyda. *Pharmakeftiki*. 2021. Vol. 33, № II. P. 107-115.
8. Пелешок К. Є., Логойда Л. С., Піпонські М. Спосіб ізократичного хроматографічного визначення валсартану та атенололу в лікарських засобах (Метод I) : патент № 146653 Україна, МПК G01N33/15. № u202005505 ; заявл. 25.08.2020 ; опубл. 10.03.2021, Бюл. № 10.
 9. Пелешок К. Є., Логойда Л. С., Піпонські М. Спосіб хроматографічного визначення валсартану та атенололу в лікарських засобах : патент № 145966 Україна, МПК G01N30/00, B01D15/08. № u202004075 ; заявл. 06.07.2020 ; опубл. 14.01.2021, Бюл. № 2.
 10. Пелешок К. Є., Логойда Л. С., Піпонські М. Спосіб ізократичного хроматографічного визначення валсартану та атенололу в лікарських засобах (Метод II) : патент № 145731 Україна, МПК G01N30/00. № u202005507 ; заявл. 25.08.2020 ; опубл. 29.12.2020, Бюл. № 24.
 11. Peleshok K., Logoyda L. Application of thin layer chromatography in the analysis of atenolol and valsartan. *Хімічні Каразинські читання – 2020* : матеріали XII Всеукраїнської наук. конф. студентів та аспірантів, 21–23 квітня 2020 р. Харків, 2020. С. 32.
 12. Peleshok K., Piponski M., Logoyda L. Method development for simultaneous determination of valsartan and atenolol in newly formulated dosage form. *EFMC-ISM&EFMC-YMCS : Virtual Poster Session Powered by the EFMC Young Scientists Network*, 9 September. 2020. P. 189.
 13. Development and validation of spectrophotometric method for simultaneous estimation of valsartan and atenolol in dosage forms / K. Peleshok , L. Kryskiw, S. Kovalenko, L. Logoyda. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матеріали VIII наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 23–24 вересня 2020 р. Тернопіль, 2020. С. 138–139.
 14. HPLC method development for valsartan and atenolol in dosage forms on columns LiChrospher® 60 RP-select / K. Peleshok, M. Piponski, O. Florence,

- S. L. Kovalenko, Logoyda. *Contemporary pharmacy: issues, challenges and expectation. 2020 autumn* : Abstracts of the international conference, 2020 October 23. Kaunas, 2020. С. 49.
- 15.HPLC method development for valsartan and atenolol in dosage forms on column Zorbax C8 / K. Peleshok, M. F. Abdelmalek, M. Piponski, L. Logoyda. 18th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry : Abstracts, 2021 February 25–27. Athens, 2021. P. 19.
- 16.Analytical methods development for the quantification of antihypertensive active pharmaceutical ingredients in dosage forms / K. Peleshok, N. Shulyak, Adaeze E. Ajie, Abdelmalek Mohamed F., Agyemang F. Sarpong. *Topical issues of new medicines development* : матеріали XXVIII міжнародної наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів, присв. 150-річчю з дня народження М. О. Валяшка, 18–19 березня 2021. Харків, 2021. С. 107–108.
- 17.Sarpong. Analytical support of innovative pharmaceutical development of antihypertensive drugs / K. Peleshok, N. Shulyak, Adaeze E. Ajie, Donkor A. Abbeyquaye, Oluwatobiloba J. Omotosho, Fatma Abdelmalek M., Obianuju F. Ezike, F. Agyemang. *Scientific community: interdisciplinary research: 3th International Scientific and Practical Conference*, 2021 March 16–18. Hamburg: Busse Verlag GmbH., 2021. P. 364–368.
- 18.Validation of analytical methods for quantification of different antihypertensive active pharmaceutical ingredients in dosage forms / K. Peleshok, N. Shulyak, O. Omotosho, A. Abbeyquaye, M. F. Abdelmalek, F. Ezike, A. Ajie, F. Sarpong. *Матеріали XXV міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених*, 12–14 квітня 2021 р. Тернопіль, 2021. С. 206–207.
- 19.Peleshok K., Logoyda L. Method development for the quantitative determination of valsartan from caco-2 cell monolayers. *Current trends in pharmaceutical chemistry and standardization of medicines* : матеріали наук.-

практ. конф. за міжнар. участю, 25–26 травня 2021 р. Тернопіль, 2021. С. 44.

20. Development and validation of spectrophotometric methods for estimation of valsartan in dosage form / K. Peleshok, L. Kryskiw, T. Kucher, O. Poliak, L. Logoyda. *«Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи»*: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченій 100-річчю Національного фармацевтичного університету, 10 вересня 2021 р. Харків, 2021. С. 275–276.
21. Optimization of reaction variables for non-extractive spectrophotometric determination of valsartan via ion-pair complex formation with bromophenol blue / K. Peleshok, B. Bondar, L. Kryskiw, T. Kucher, O. Poliak, L. Logoyda. *«100 РОКІВ УСПІХУ ТА ЯКОСТІ»*: матеріали міжнародного науково-практичного симпозіуму, присвяченому 100-річчю кафедри фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету, 18 жовтня 2021 р. Харків, 2021. С. 71-72.

ДОДАТОК Б

Відомості про апробацію результатів дисертації:

1. XII Всеукраїнська наукова конференція студентів та аспірантів «Хімічні Каразінські читання – 2020», м., Харків, 21–23 квітня 2020 р.. (*форма участі – публікація тез*);
2. Virtual Poster Session Powered by the EFMC Young Scientists Network «EFMC-ISMC&EFMC-YMCS», 9 September 2020 (*форма участі – постерна доповідь*);
3. VIII науково-практична конференція з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів», м. Тернопіль, 23–24 вересня 2020 р. (*форма участі – публікація тез*);
4. International conference «Contemporary pharmacy: issues, challenges and expectation. 2020 autumn», Kaunas, 2020 October 23 (*форма участі – публікація тез*);
5. 18th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry, Athens, 2021 February 25–27 (*форма участі – постерна доповідь та публікація тез*);
6. XXVIII міжнародної наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів, присв. 150-річчю з дня народження М. О. Валяшка «Topical issues of new medicines development», м. Харків, 18–19 березня 2021 р. (*форма участі – публікація тез*);
7. 3th International Scientific and Practical Conference «Scientific community: interdisciplinary research», Hamburg, 2021 March 16–18 (*форма участі – публікація тез*);
8. XXV міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених, м. Тернопіль, 12–14 квітня 2021 р. (*форма участі – публікація тез*);
9. Науково-практична конференція з міжнародною участю «Current trends in pharmaceutical chemistry and standardization of medicines», м. Тернопіль 25–26 травня 2021 р. (*форма участі – доповідь та публікація тез*);

10. Науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 100-річчю Національного фармацевтичного університету «Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи», м. Харків 10 вересня 2021 р. (*форма участі – публікація тез*);
11. Міжнародний науково-практичний симпозіум, присвячений 100-річчю кафедри фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету «100 років успіху та якості», м. Харків, 18 жовтня 2021 р. (*форма участі – публікація тез*).

ДОДАТОК В.1



ДОДАТОК В.2



ДОДАТОК В.3



ДОДАТОК Г.1



Проректор з наукової роботи
Львівського національного медичного
університету імені Данила Галицького

д. мед. н., проф. Наконечний А.Й.
2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Розробка спектрофотометричних та хроматографічних методик визначення валсартану та атенололу в лікарських засобах
2. **Установи, автор:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, 46001, м. Тернопіль, Майдан Волі, 1, кафедра фармацевтичної хімії, Пелешок К. Є., д.фарм.н., професор Логойда Л. С.
3. **Джерела інформації:**
 1. Peleshok K., Piponski M., Kovalenko S., Ahmed H., Abdel-Megied A., Ezike O. F., Logoyda L. New liquid chromatography assays for simultaneous quantification of antihypertensives atenolol and valsartan in their dosage forms // *Journal of Separation Science*. – 2021. – Vol. 44 (2). – P. 565-575.
 2. Peleshok K., Piponski M., Ajie E.A., Poliak O., Zarivna N., Denefil O., Logoyda L. Novel HPLC-UV method for simultaneous determination of valsartan and atenolol in fixed dosage form; Study of green profile assessment // *Pharmacia*. – 2021. – Vol. 68(1). – P. 43–51.
 3. Piponski M., Peleshok K., Logoyda L., Kravchuk L., Piatnochka V., Zakharchuk U. Efficient Validated HPLC/UV method for determination of valsartan and atenolol in dosage form and in vitro dissolution studies // *Biointerface research in applied chemistry*. – 2020. – Vol. 10(6). – P. 6669–6675.
 4. Peleshok K., Poliak O., Kryskiw L., Agyemang F. Sarpong, Zarivna N., Korobko D., Zahrychuk H., Horlachuk N., Sverstiuk A., Levytska L., Logoyda L.. Development and validation of spectrophotometric method for simultaneous estimation of valsartan and atenolol in binary mixtures: application to tablets analysis // *Pharmakeftiki*. - 2021. - Vol. 33., Issue I. - P. 52-60.
 5. Peleshok K., Poliak O., Zarivna N., Oleshchuk O., Mudryk U., Hlushok V., Sverstiuk A., Svan O., Terenda N., Makhnitskyi A., Yaremchuk O., Logoyda L.. LC-MS/MS method development for the quantitative determination of valsartan from Caco-2 cell monolayers: application to permeability assay // *Pharmakeftiki*. - 2021. - Vol. 33., Issue II. - P. 98-106.
4. **Де впроваджено:** Кафедра фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, вул. Пекарська, 69, м. Львів, Україна, 79010
5. **Форма впровадження:** науково-дослідна робота та навчальний процес.
6. **Ефективність впровадження:** результати проведених досліджень впроваджено у науково-дослідну роботу кафедри, а також у навчальний процес з метою поглиблення знань студентів з питань фармацевтичного аналізу та стандартизації лікарських засобів валсартану та атенололу.
7. **Термін впровадження:** 2021-2022 навчальний рік

« ___ » _____ 2021 р.

Відповідальний за впровадження:
Зав. кафедри фармацевтичної, органічної
і біоорганічної хімії Львівського національного
медичного університету імені Данила Галицького
д. фарм. н., професор

 Лесик Р.Б.

ДОДАТОК Г.2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Проректор з наукової роботи
 Запорізького державного медичного університету
 д.м.н., проф.  Туманський В.О.
 05 2021 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Розробка спектрофотометричних та хроматографічних методик визначення валсартану та атенололу в лікарських засобах
2. **Установа, автор:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, 46001, м. Тернопіль, Майдан Воли, 1, кафедра фармацевтичної хімії, **Автори:** Пелешок К. Є., д.фарм.н., професор Логойда Л. С.
3. **Джерела інформації:**
 1. Peleshok K., Piponski M., Kovalenko S., Ahmed H., Abdel-Megied A., Ezike O. F., Logoyda L. New liquid chromatography assays for simultaneous quantification of antihypertensives atenolol and valsartan in their dosage forms // *Journal of Separation Science*. – 2021. – Vol. 44 (2). – P. 565-575.
 2. Peleshok K., Piponski M., Ajie E.A., Poliak O., Zarivna N., Denefil O., Logoyda L. Novel HPLC-UV method for simultaneous determination of valsartan and atenolol in fixed dosage form; Study of green profile assessment // *Pharmacia*. – 2021. – Vol. 68(1). – P. 43–51.
 3. Piponski M., Peleshok K., Logoyda L., Kravchuk L., Piatnochka V., Zakharchuk U. Efficient Validated HPLC/UV method for determination of valsartan and atenolol in dosage form and in vitro dissolution studies // *Biointerface research in applied chemistry*. – 2020. – Vol. 10(6). – P. 6669–6675.
 4. Peleshok K., Poliak O., Kryskiw L., Agyemang F. Sarpong, Zarivna N., Korobko D., Zahrychuk H., Horlachuk N., Sverstiuk A., Levytska L., Logoyda L.. Development and validation of spectrophotometric method for simultaneous estimation of valsartan and atenolol in binary mixtures: application to tablets analysis // *Pharmakeftiki*. - 2021. - Vol. 33., Issue I. - P. 52-60.
 5. Peleshok K., Poliak O., Zarivna N., Oleshchuk O., Mudryk U., Hlushok V., Sverstiuk A., Svan O., Terenda N., Makhnitskyy A., Yaremchuk O., Logoyda L.. LC-MS/MS method development for the quantitative determination of valsartan from Caco-2 cell monolayers: application to permeability assay // *Pharmakeftiki*. - 2021. - Vol. 33., Issue II. - P. 98-106.
4. **Де впроваджено:** кафедра аналітичної хімії Запорізького державного медичного університету
5. **Форма впровадження:** науково-дослідна робота та навчальний процес.
6. **Ефективність впровадження:** результати проведених досліджень впроваджено у науково-дослідну роботу кафедри, а також у навчальний процес з метою поглиблення знань студентів з питань фармацевтичного аналізу та стандартизації лікарських засобів валсартану та атенололу.
7. **Термін впровадження:** 2020-2021 навчальний рік

«___» _____ 2021 р.

Відповідальний за впровадження:
 Завідувач кафедри аналітичної хімії
 Запорізького державного медичного університету
 д.фарм.н., професор



С.О. Васюк

ДОДАТОК Г.3

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор
з науково-педагогічної роботи
проф. Володимирова І. М.
„ 01 ” _____ 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Розробка спектрофотометричних та хроматографічних методик визначення валсартану та атенололу в лікарських засобах
2. **Установа, автор:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, 46001, м. Тернопіль, Майдан Волі, 1, кафедра фармацевтичної хімії, Пелешок К. Є., д.фарм.н., професор Логойда Л. С.
3. **Джерела інформації:**
 1. Peleshok K., Piponski M., Kovalenko S., Ahmed H., Abdel-Megied A., Ezike O. F., Logoyda L. New liquid chromatography assays for simultaneous quantification of antihypertensives atenolol and valsartan in their dosage forms // *Journal of Separation Science*. – 2021. – Vol. 44 (2). – P. 565-575.
 2. Peleshok K., Piponski M., Ajie E.A., Poliak O., Zarivna N., Deneffil O., Logoyda L. Novel HPLC-UV method for simultaneous determination of valsartan and atenolol in fixed dosage form; Study of green profile assessment // *Pharmacia*. – 2021. – Vol. 68(1). – P. 43–51.
 3. Piponski M., Peleshok K., Logoyda L., Kravchuk L., Piatnochka V., Zakharchuk U. Efficient Validated HPLC/UV method for determination of valsartan and atenolol in dosage form and in vitro dissolution studies // *Biointerface research in applied chemistry*. – 2020. – Vol. 10(6). – P. 6669–6675.
 4. Peleshok K., Poliak O., Kryskiw L., Agyemang F. Sarpong, Zarivna N., Korobko D., Zahrychuk H., Horlachuk N., Sverstiuk A., Levytska L., Logoyda L.. Development and validation of spectrophotometric method for simultaneous estimation of valsartan and atenolol in binary mixtures: application to tablets analysis // *Pharmakeftiki*. - 2021. - Vol. 33., Issue I. - P. 52-60.
 5. Peleshok K., Poliak O., Zarivna N., Oleshchuk O., Mudryk U., Hlushok V., Sverstiuk A., Svan O., Terenda N., Makhnitskyy A., Yaremchuk O., Logoyda L.. LC-MS/MS method development for the quantitative determination of valsartan from Caco-2 cell monolayers: application to permeability assay // *Pharmakeftiki*. - 2021. - Vol. 33., Issue II. - P. 98-106.
4. **Де впроваджено:** кафедра медичної хімії Національного фармацевтичного університету, вул. Валентинівська, 4, м. Харків, Україна, 61154
5. **Форма впровадження:** науково-дослідна робота та навчальний процес.
6. **Ефективність впровадження:** результати проведених досліджень впроваджено у науково-дослідну роботу кафедри, а також у навчальний процес з метою поглиблення знань студентів з питань фармацевтичного аналізу та стандартизації лікарських засобів валсартану та атенололу.
7. **Термін впровадження:** 2021-2022 навчальний рік
« ____ » _____ 2021 р.

Відповідальний за впровадження: д.фарм.наук, проф. Перехода Л.О



ДОДАТОК Г.4



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Розробка спектрофотометричних та хроматографічних методик визначення валсартану та атенололу в лікарських засобах
2. **Установа, автор:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, 46001, м. Тернопіль, Майдан Волі, 1, кафедра фармацевтичної хімії, Пелешок К. Є., д.фарм.н., професор Логойда Л. С.
3. **Джерела інформації:**
 1. Peleshok K., Pionski M., Kovalenko S., Ahmed H., Abdel-Megied A., Ezike O. F., Logoyda L. New liquid chromatography assays for simultaneous quantification of antihypertensives atenolol and valsartan in their dosage forms // *Journal of Separation Science*. – 2021. – Vol. 44 (2). – P. 565-575.
 2. Peleshok K., Pionski M., Ajie E.A., Poliak O., Zarivna N., Denefil O., Logoyda L. Novel HPLC-UV method for simultaneous determination of valsartan and atenolol in fixed dosage form; Study of green profile assessment // *Pharmacia*. – 2021. – Vol. 68(1). – P. 43–51.
 3. Pionski M., Peleshok K., Logoyda L., Kravchuk L., Piatnochka V., Zakharchuk U. Efficient Validated HPLC/UV method for determination of valsartan and atenolol in dosage form and in vitro dissolution studies // *Biointerface research in applied chemistry*. – 2020. – Vol. 10(6). – P. 6669–6675.
 4. Peleshok K., Poliak O., Krysiw L., Agyemang F. Sarpong, Zarivna N., Korobko D., Zahrychuk H., Horlachuk N., Sverstiuk A., Levytska L., Logoyda L.. Development and validation of spectrophotometric method for simultaneous estimation of valsartan and atenolol in binary mixtures: application to tablets analysis // *Pharmakeftiki*. - 2021. - Vol. 33., Issue I. - P. 52-60.
 5. Peleshok K., Poliak O., Zarivna N., Oleshchuk O., Mudryk U., Hlushok V., Sverstiuk A., Svan O., Terenda N., Makhnitsky A., Yaremchuk O., Logoyda L.. LC-MS/MS method development for the quantitative determination of valsartan from Caco-2 cell monolayers: application to permeability assay // *Pharmakeftiki*. - 2021. - Vol. 33., Issue II. - P. 98-106.
4. **Де впроваджено:** кафедра медичної та фармацевтичної хімії Буковинського державного медичного університету.
5. **Форма впровадження:** науково-дослідна робота та навчальний процес.
6. **Ефективність впровадження:** результати проведених досліджень впроваджено у науково-дослідну роботу кафедри, а також у навчальний процес з метою поглиблення знань студентів з питань фармацевтичного аналізу та стандартизації лікарських засобів валсартану та атенололу.
7. **Термін впровадження:** 2021-2022 навчальний рік

Завідувач кафедри медичної та фармацевтичної хімії
доктор хімічних наук, професор

Михайло БРАТЕНКО

ДОДАТОК Г.5



Проректор з наукової роботи
Запорізького державного медичного університету
д. мед. н., проф. В. О. Туманський
02 09 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Розробка спектрофотометричних та хроматографічних методик визначення валсартану та атенололу в лікарських засобах
2. **Установа, автор:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, 46001, м. Тернопіль, Майдан Волі, 1, кафедра фармацевтичної хімії, Пелешок К. Є., д. фарм. н., професор Логойда Л. С.
3. **Джерела інформації:**
 1. Peleshok K., Piponski M., Kovalenko S., Ahmed H., Abdel-Megjed A., Ezike O. F., Logoyda L. New liquid chromatography assays for simultaneous quantification of antihypertensives atenolol and valsartan in their dosage forms // *Journal of Separation Science*. – 2021. – Vol. 44 (2). – P. 565-575.
 2. Peleshok K., Piponski M., Ajje E.A., Poliak O., Zarivna N., Dencfil O., Logoyda L. Novel HPLC-UV method for simultaneous determination of valsartan and atenolol in fixed dosage form: Study of green profile assessment // *Pharmacia*. – 2021. – Vol. 68(1). – P. 43-51.
 3. Piponski M., Peleshok K., Logoyda L., Kravchuk L., Piatnochka V., Zakharchuk U. Efficient Validated HPLC/UV method for determination of valsartan and atenolol in dosage form and in vitro dissolution studies // *Biointerface research in applied chemistry*. – 2020. – Vol. 10(6). – P. 6669–6675.
 4. Peleshok K., Poliak O., Kryskiw L., Agyemang F., Sarpong, Zarivna N., Korobko D., Zahrychuk H., Horlachuk N., Sverstiuk A., Levytska L., Logoyda L. Development and validation of spectrophotometric method for simultaneous estimation of valsartan and atenolol in binary mixtures: application to tablets analysis // *Pharmakeftiki*. - 2021. - Vol. 33., Issue I. - P. 52-60.
 5. Peleshok K., Poliak O., Zarivna N., Oleshchuk O., Mudryk U., Hlushok V., Sverstiuk A., Svan O., Terenda N., Makhnitskyi A., Yaremchuk O., Logoyda L. LC-MS/MS method development for the quantitative determination of valsartan from Caco-2 cell monolayers: application to permeability assay // *Pharmakeftiki*. - 2021. - Vol. 33., Issue II. - P. 98-106.
4. **Де впроваджено:** в науковий і навчальний процес кафедрою фізикоїдної хімії Запорізького державного медичного університету, 2021 рік. Протокол № 1 від 27 серпня 2021 р.
5. **Форма впровадження:** науково-дослідна робота та навчальний процес.
6. **Ефективність впровадження:** результати проведених досліджень впроваджено у науково-дослідну роботу кафедри, а також у навчальний процес з метою поглиблення знань студентів з питань фармацевтичного аналізу та стандартизації лікарських засобів валсартану та атенололу.
7. **Термін впровадження:** 2020-2021 р.р.
«27» серпня 2021 р.

Відповідальний за впровадження:
Завідувач кафедри фізикоїдної хімії,
д. фарм. н., професор

А. Г. Каплаушенко

ДОДАТОК Г.6



“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Проректор з наукової роботи
Львівського національного
медичного університету
імені Данила Галицького
д.мед.н., професор
Наконечний А.Й.

2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Найменування пропозиції для впровадження:** Розробка спектрофотометричних та хроматографічних методик визначення валсартану та атенололу в лікарських засобах
- 2. Установа, автор:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, 46001, м. Тернопіль, Майдан Волі, 1, кафедра фармацевтичної хімії, Пелешок К. Є., д.фарм.н., професор Логойда Л. С.
- 3. Джерела інформації:**
 1. Peleshok K., Piponski M., Kovalenko S., Ahmed H., Abdel-Megied A., Ezike O. F., Logoyda L. New liquid chromatography assays for simultaneous quantification of antihypertensives atenolol and valsartan in their dosage forms // *Journal of Separation Science*. – 2021. – Vol. 44 (2). – P. 565-575.
 2. Peleshok K., Piponski M., Ajie E.A., Poliak O., Zarivna N., Denefil O., Logoyda L. Novel HPLC-UV method for simultaneous determination of valsartan and atenolol in fixed dosage form; Study of green profile assessment // *Pharmacia*. – 2021. – Vol. 68(1). – P. 43–51.
 3. Piponski M., Peleshok K., Logoyda L., Kravchuk L., Piatnochka V., Zakharchuk U. Efficient Validated HPLC/UV method for determination of valsartan and atenolol in dosage form and in vitro dissolution studies // *Biointerface research in applied chemistry*. – 2020. – Vol. 10(6). – P. 6669–6675.
 4. Peleshok K., Poliak O., Krysiw L., Agyemang F. Sarpong, Zarivna N., Korobko D., Zahrychuk H., Horlachuk N., Sverstiuk A., Levytska L., Logoyda L.. Development and validation of spectrophotometric method for simultaneous estimation of valsartan and atenolol in binary mixtures: application to tablets analysis // *Pharmakeftiki*. - 2021. - Vol. 33., Issue I. - P. 52-60.
 5. Peleshok K., Poliak O., Zarivna N., Oleshchuk O., Mudryk U., Hlushok V., Sverstiuk A., Svan O., Terenda N., Makhnitskyu A., Yaremchuk O., Logoyda L.. LC-MS/MS method development for the quantitative determination of valsartan from Caco-2 cell monolayers: application to permeability assay // *Pharmakeftiki*. - 2021. - Vol. 33., Issue II. - P. 98-106.
- 4. Де впроваджено:** кафедра загальної, біонеорганічної, фізколоїдної хімії
- 5. Форма впровадження:** науково-дослідна робота та навчальний процес.
- 6. Ефективність впровадження:** результати проведених досліджень впроваджено у науково-дослідну роботу кафедри, а також у навчальний процес з метою поглиблення знань студентів з питань фармацевтичного аналізу та стандартизації лікарських засобів валсартану та атенололу.
- 7. Термін впровадження:** 2021-2022 навчальний рік

Відповідальна за впровадження:
завідувач кафедри загальної,
біонеорганічної, фізколоїдної хімії
д.фарм.н., професор



Драпак Ірина Володимирівна

ДОДАТОК Г.7



ЗАТВЕРДЖУЮ
Проректор з НПР Національного
фармацевтичного університету

Проф. Інна ВЛАДИМИРОВА
" 09 " _____ 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Розробка спектрофотометричних та хроматографічних методик визначення валсартану та атенололу в лікарських засобах
2. **Установа, автор:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, 46001, м. Тернопіль, Майдан Волі, 1, кафедра фармацевтичної хімії, Пелешок К. С., д.фарм.н., професор Логойда Л. С.
3. **Джерела інформації:**
 1. Peleshok K., Piponski M., Kovalenko S., Ahmed H., Abdel-Megied A., Ezike O. F., Logoyda L. New liquid chromatography assays for simultaneous quantification of antihypertensives atenolol and valsartan in their dosage forms // *Journal of Separation Science*. – 2021. – Vol. 44 (2). – P. 565-575.
 2. Peleshok K., Piponski M., Ajje E.A., Poliak O., Zarivna N., Denefil O., Logoyda L. Novel HPLC-UV method for simultaneous determination of valsartan and atenolol in fixed dosage form; Study of green profile assessment // *Pharmacia*. – 2021. – Vol. 68(1). – P. 43-51.
 3. Piponski M., Peleshok K., Logoyda L., Kravchuk L., Piatnochka V., Zakharchuk U. Efficient Validated HPLC/UV method for determination of valsartan and atenolol in dosage form and in vitro dissolution studies // *Biointerface research in applied chemistry*. – 2020. – Vol. 10(6). – P. 6669-6675.
 4. Peleshok K., Poliak O., Kryskiw L., Agyemang F. Sarpong, Zarivna N., Korobko D., Zahrychuk H., Horlachuk N., Sverstiuk A., Levytska L., Logoyda L.. Development and validation of spectrophotometric method for simultaneous estimation of valsartan and atenolol in binary mixtures: application to tablets analysis // *Pharmakeftiki*. - 2021. - Vol. 33., Issue I. - P. 52-60.
 5. Peleshok K., Poliak O., Zarivna N., Oleshchuk O., Mudryk U., Hlushok V., Sverstiuk A., Svan O., Terenda N., Makhnitsky A., Yaremchuk O., Logoyda L.. LC-MS/MS method development for the quantitative determination of valsartan from Caco-2 cell monolayers: application to permeability assay // *Pharmakeftiki*. - 2021. - Vol. 33., Issue II. - P. 98-106.
4. **Де впроваджено:** кафедра фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету, вул. Валентинівська, 4, м. Харків, Україна, 61170
5. **Форма впровадження:** науково-дослідна робота та навчальний процес.
6. **Ефективність впровадження:** результати проведених досліджень впроваджено у науково-дослідну роботу кафедри, а також у навчальний процес з метою поглиблення знань студентів з питань фармацевтичного аналізу та стандартизації лікарських засобів валсартану та атенололу.
7. **Термін впровадження:** 2021-2022 навчальний рік

Протокол засідання кафедри фармацевтичної хімії № 1 від 26.08.2021

Відповідальний за впровадження

Завідувач кафедри фармацевтичної хімії, проф.

Вікторія ГЕОРГІЯНЦ

ДОДАТОК Г.8

Технічний директор
Толі А.М.
02.02.2021 р.




АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Розробка хроматографічних методик визначення валсартану у лікарських засобах
2. **Установа, автори:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, 46001, м. Тернопіль, Майдан Волі, 1, кафедра фармацевтичної хімії, Пелешок К. Є., д.фарм.н., професор Логойда Л. С.
3. **Джерела інформації:**
 1. Peleshok K., Piponski M., Kovalenko S., Ahmed H., Abdel-Megied A., Ezike O. F., Logoyda L. New liquid chromatography assays for simultaneous quantification of antihypertensives atenolol and valsartan in their dosage forms // *Journal of Separation Science*. – 2021. – Vol. 44 (2). – P. 565-575.
 2. Peleshok K., Piponski M., Ajie E.A., Poliak O., Zarivna N., Deneofil O., Logoyda L. Novel HPLC-UV method for simultaneous determination of valsartan and atenolol in fixed dosage form; Study of green profile assessment // *Pharmacia*. – 2021. – Vol. 68(1). – P. 43–51.
 3. Piponski M., Peleshok K., Logoyda L., Kravchuk L., Piatnochka V., Zakharchuk U. Efficient Validated HPLC/UV method for determination of valsartan and atenolol in dosage form and in vitro dissolution studies // *Biointerface research in applied chemistry*. – 2020. – Vol. 10(6). – P. 6669–6675.
4. **Ефективність впровадження:** розроблені експресніші хроматографічні методики визначення валсартану у лікарських засобах
5. **Термін впровадження:** 27.01.2021-02.02.2021 р.
6. **Новизна результатів науково-технічної розробки:** розроблені оригінальні методики хроматографічного визначення валсартану у лікарських засобах для впровадження у фармацевтичне виробництво при рутинному контролі якості лікарських засобів.

« 02 » 02 2021 р.

Відповідальний за впровадження:

начальник ВАР
Кондратова Ю.А.



ДОДАТОК Г.9

«Затверджую»
 Проректор з наукової роботи
 Івано-Франківського національного
 медичного університету
 проф. Вакалюк І.П.
 _____ 2021 р.




АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Розробка спектрофотометричних та хроматографічних методик визначення валсартану та атенололу в лікарських засобах
2. **Установа, автор:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, 46001, м. Тернопіль, Майдан Волі, 1, кафедра фармацевтичної хімії, Пелешок К. Є., д.фарм.н., професор Логойда Л. С.
3. **Джерела інформації:**
 1. Peleshok K., Piponski M., Kovalenko S., Ahmed H., Abdel-Megied A., Ezike O. F., Logoyda L. New liquid chromatography assays for simultaneous quantification of antihypertensives atenolol and valsartan in their dosage forms // *Journal of Separation Science*. – 2021. – Vol. 44 (2). – P. 565-575.
 2. Peleshok K., Piponski M., Ajje E.A., Poliak O., Zarivna N., Deneff O., Logoyda L. Novel HPLC-UV method for simultaneous determination of valsartan and atenolol in fixed dosage form; Study of green profile assessment // *Pharmacia*. – 2021. – Vol. 68(1). – P. 43–51.
 3. Piponski M., Peleshok K., Logoyda L., Kravchuk L., Piatnochka V., Zakharchuk U. Efficient Validated HPLC/UV method for determination of valsartan and atenolol in dosage form and in vitro dissolution studies // *Biointerface research in applied chemistry*. – 2020. – Vol. 10(6). – P. 6669–6675.
 4. Peleshok K., Poliak O., Kryskiw L., Agyemang F. Sarpong, Zarivna N., Korobko D., Zahrychuk H., Horlachuk N., Sverstiuk A., Levytska L., Logoyda L.. Development and validation of spectrophotometric method for simultaneous estimation of valsartan and atenolol in binary mixtures: application to tablets analysis // *Pharmakeftiki*. - 2021. - Vol. 33., Issue I. - P. 52-60.
 5. Peleshok K., Poliak O., Zarivna N., Oleshchuk O., Mudryk U., Hlushok V., Sverstiuk A., Svan O., Terenda N., Makhnitskyy A., Yaremchuk O., Logoyda L.. LC-MS/MS method development for the quantitative determination of valsartan from Caco-2 cell monolayers: application to permeability assay // *Pharmakeftiki*. - 2021. - Vol. 33., Issue II. - P. 98-106.
4. **Де впроваджено:** Кафедра хімії, фармацевтичного аналізу та післядипломної освіти Івано-Франківського національного медичного університету, вул. Галицька, 2, м. Івано-Франківськ, Україна, 76000
5. **Форма впровадження:** науково-дослідна робота та навчальний процес.
6. **Ефективність впровадження:** результати проведених досліджень впроваджено у науково-дослідну роботу кафедри, а також у навчальний процес з метою поглиблення знань студентів з питань фармацевтичного аналізу та стандартизації лікарських засобів валсартану та атенололу.
7. **Термін впровадження:** 2021-2022 навчальний рік

« ____ » _____ 2021 р.

Відповідальний за впровадження: завідувач кафедри хімії, фармацевтичного аналізу та післядипломної освіти, д.х.н., проф. Стецьків А.О.



ДОДАТОК Г.10

ЗАТВЕРДЖУЮ

Т.в.о. начальника Державної
служби з лікарських засобів
та контролю за наркотиками
у Тернопільській області

Марія ДМИТРІВ

«18» жовтня 2021



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Спектрофотометричні методики визначення валсартану та атенололу у лікарських засобах
2. **Установа, автори:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, 46001, м. Тернопіль, Майдан Воли, 1, кафедра фармацевтичної хімії, Пелешок К. Є., д.фарм.н., професор Логойда Л. С.
3. **Джерела інформації:**
 1. Development and validation of spectrophotometric method for simultaneous estimation of valsartan and atenolol in binary mixtures: application to tablets analysis / K. Peleshok, O. Poliak, L. Kryskiw, Agyemang P. Sarpong, N. Zarivna, D. Korobko, H. Zaluychuk, N. Horlachuk, A. Sverstiuk, L. Levytska, L. Logoyda. *Pharmaceutiki*. 2021. Vol. 33, № 1. P. 52–60.
 2. Development and validation of spectrophotometric method for simultaneous estimation of valsartan and atenolol in dosage forms / K. Peleshok, L. Kryskiw, S. Kovalenko, L. Logoyda. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матеріали VIII наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 23–24 вересня 2020 р. Тернопіль, 2020. С. 138–139.
 3. Development and validation of spectrophotometric methods for estimation of valsartan in dosage form / K. Peleshok, L. Kryskiw, T. Kucher, O. Poliak, L. Logoyda. *Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи*: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченій 100-річчю Національного фармацевтичного університету, 10 вересня 2021 р. Харків, 2021. С. 275–276.
4. **Ефективність впровадження:** запропоновані спектрофотометричні методики визначення валсартану та атенололу характеризуються простотою у виконанні та експресністю.
5. **Пропозиції:** розроблені методики може бути використані при здійсненні контролю якості лікарських засобів на основі валсартану та атенололу.

«18» жовтня 2021

Відповідальний за впровадження: Провідний фахівець, в.о. завідувача лабораторії з контролю якості лікарських засобів та медичної продукції Державної служби з лікарських засобів та контролю за наркотиками у Тернопільській області

М. Стельцюк
М. Стельцюк