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

Фармацевтичний факультет
Кафедра фармацевтичної хімії

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри
фармацевтичної хімії
_____проф. Лілія Логойда
20 травня 2024 р.

Індекс **УДК 615.074:543.422.3-76:615.22/.27**

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

На тему:

«РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ ОДНОЧАСНОГО КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ РОЗУВАСТАТИНУ КАЛЬЦІЮ ТА ЕЗЕТИМІБУ В КОМБІНОВАНОМУ ЛІКАРСЬКОМУ ПРЕПАРАТІ»

Виконала здобувачка вищої освіти 5-го курсу
денної форми навчання
спеціальності 226 Фармація, промислова фармація
_____ Ольга Поліщук

Науковий керівник:
кандидат фармацевтичних наук, доцент,
доцент закладу вищої освіти кафедри фармацевтичної хімії
_____ Ольга Поляк

ТЕРНОПІЛЬ 2024

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ 4
ВСТУП 5
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ТА МЕТОДИ АНАЛІЗУ РОЗУВАСТАТИНУ КАЛЬЦІЮ І ЕЗЕТИМІБУ В СУБСТАНЦІЯХ ТА ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТАХ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ) 8
1.1. Загальна характеристика розувастатину кальцію та езетимібу 8
1.2. Огляд аналітичних методів визначення розувастатину кальцію 10
1.3. Огляд аналітичних методів визначення езетимібу 24
1.4. «Зелена хімія» у розробці аналітичних методик 28
Висновки до розділу 1 29
РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ОБ'ЄКТІВ ТА МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕНЬ 30
2.1. Фізико-хімічні властивості об'єктів дослідження 31
2.2. Характеристика методик дослідження 32
2.3. Спектрофотометрична методика одночасного кількісного визначення розувастатину кальцію та езетимібу в капсулах Розуліп Плюс 33
РОЗДІЛ 3. РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ ОДНОЧАСНОГО КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ РОЗУВАСТАТИНУ КАЛЬЦІЮ ТА ЕЗЕТИМІБУ В КОМБІНОВАНОМУ ЛІКАРСЬКОМУ ЗАСОБІ 34
3.1. УФ-спектрофотометрична методика одночасного визначення розувастатину кальцію та езетимібу в капсулах Розуліп Плюс 34
3.2. Обчислення повної невизначеності методики 36
3.3. Валідація розробленої методики одночасного кількісного визначення розувастатину кальцію та езетимібу в капсулах Розуліп Плюс 38
3.3.1. Валідаційний параметр «специфічність» 38
3.3.2. Валідаційний параметр «правильність та прецизійність» 39
3.3.3. Валідаційні параметри «лінійність та діапазон застосування» 42

3.3.4. Валідаційний параметр «робасність» 46
3.4. Кількісне визначення розувастатину кальцію та езетимібу в капсулах Розуліп Плюс 47
3.5. Визначення «зеленості» розробленої методики 48
Висновки до розділу 3 49
ВИСНОВКИ 50
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ 51
ДОДАТКИ 60

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ХС – холестерин

ЛПНЩ – ліпопротеїди низької щільності

ТШХ – тонкошарова хроматографія

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

РХ – рідинна хроматографії

ВЕРХ-УФ – метод високоефективної рідинної хроматографії з ультрафіолетовим детектуванням

RP-HPLC – метод високоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою

QNMR – метод кількісного ядерного магнітного резонансу

LC–MS/MS – метод тандемної мас-спектрометрії

МВ – межа виявлення

МКВ – межа кількісного визначення

ЄФ – Європейська фармакопея

ІСН – Міжнародна конференція з гармонізації технічних вимог до реєстрації лікарських препаратів для людини

УФ – ультрафіолетовий

ІЧ – інфрачервоний

ЛФ – лікарська форма

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

На сьогоднішній день технології розвиваються з високою швидкістю, заміна людських ресурсів роботизованою технікою, впровадження штучного інтелекту, нові можливості з віртуальною реальністю, комп'ютеризація процесів виробництва. Все це приносить великі прибутки, полегшує життя людей, спонукає до постійного удосконалення, але є і те, що за десятиліття прогресу не змінилось, це статистика захворюваності на серцево-судинні хвороби. Зменшення фізичної активності, незбалансоване харчування, стреси, переїдання, недосипання, перевтома, виснаження – ці фактори стають причинами розвитку атеросклерозу, однієї з найнебезпечніших серцевих хвороб, ускладнення якої спричиняють інфаркт міокарда, інсульт, стенокардію, у важких випадках смерть. Препаратами вибору у лікуванні стають статини, механізм дії яких полягає в зменшенні ліпопротеїнів низької щільності у крові, та за останні роки вчені побачили, що найкращих результатів лікування досягають застосуванням комбінованої терапії. Це пов'язане з зручністю та простотою застосування ліків, покращує комплаєнс пацієнтів, зменшує кількість прийомів ліків, має вищі показники ефективності. Використання комбінованої терапії є досить новим методом лікування і знаходиться на рівні постійного вивчення та удосконалення, проводяться пошуки та розробки нових методик визначення якості субстанцій, тому що більшість попередніх методик застаріли, є складними у процесі дослідження, вимагають довгого процесу визначення, є дороговартісними або не відповідають усім принципам «зеленої хімії». Також вони можуть бути невалідованими або їх неможливо відтворити. Внаслідок цього вчені намагаються розробити прості та специфічні методи кількісного та якісного визначення, щоб спростити та пришвидшити аналіз якості субстанції, але водночас забезпечувати найвищу ефективність дослідження, тому розробка таких методик, на сьогодні, є актуальною та затребуваною на фармацевтичному ринку для експрес аналізів та розробки нових лікарських препаратів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Кваліфікаційна робота виконана згідно з планами науково-дослідних робіт кафедри фармацевтичної хімії Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України «Цілеспрямований пошук біологічно активних речовин в ряду 7,8-дизаміщених теофіліну; розробка та валідація методик контролю якості антигіпертензивних лікарських засобів зі статинами»(керівник - доц. Д. Коробко, 2021-2023 рр.), «Розробка і валідація аналітичних та біоаналітичних методик визначення лікарських засобів; ідентифікація оригінальних функціональних похідних теофіліну з антирадикальними властивостями» (керівник - проф. Л. Логойда, 2024-2026 рр.).

Мета і завдання дослідження

Мета кваліфікаційної роботи – розробка та валідація методики УФ-спектрофотометричного одночасного визначення езетимібу та розувастатину кальцію в комбінованій твердій лікарській формі.

Для досягнення поставленої мети нам потрібно було вирішити наступні завдання:

- сформувати основні цілі та завдання, виявити ключові переваги, проаналізувати різні варіанти перебігу процесу та вплив екологічних факторів;
- дослідити існуючі літературні джерела, знайти моменти, які потрібно доопрацювати, та розробити основний план досліджень;
- розробити УФ-спектрофотометричну методику одночасного визначення розувастатину кальцію в комбінації з езетимібом в капсулах;
- валідувати розроблену методику;
- провести аналіз екологічності запропонованої спектрофотометричної методики.

Об’єкт дослідження: розробка УФ-спектрофотометричної методики одночасного кількісного визначення розувастатину кальцію та езетимібу в капсулах.

Предмет дослідження: ФСЗ розувастатину кальцію та езетимібу, капсули «Розуліп Плюс».

Методи дослідження

Щоб виконати основні цілі та завдання було використано метод УФ-спектрофотометрії. Процес планування досліджень та обробку результатів здійснювали за допомогою методів моделювання, кореляційного, регресійного, валідаційного аналізів.

Наукова новизна отриманих результатів

Вперше досліджено, розроблено та валідовано УФ-спектроскопічні методики визначення розувастатину кальцію та езетимібу в комбінованій твердій лікарській формі.

Методом AGREE було розраховано екологічну безпеку запропонованих спектрофотометричних методик та отримано підтвердження відповідності методик принципам «зеленої хімії».

Практичне значення одержаних результатів

Розроблені оригінальні спектрофотометричні методики кількісного визначення розувастатину кальцію та езетимібу є відповідними для простого, чутливого та швидкого аналізу якості їх комбінованих твердих лікарських форм.

Проведено валідацію розроблених спектрофотометричних методик визначення розувастатину кальцію та езетимібу для підтвердження відповідності результатів критеріям прийнятності.

Апробація результатів кваліфікаційної роботи

Основні результати роботи викладено на XXVIII Конгресі студентів та молодих учених «Майбутнє за наукою» (Тернопіль, 8–10 квітня 2024 р.).

Публікації

За темою кваліфікаційної роботи опубліковано 1 тези доповіді на студентському конгресі.

Обсяг та структура кваліфікаційної роботи

Кваліфікаційна робота надрукована на 60 сторінках машинописного тексту, в своєму змісті містить вступ, три розділи, висновки, список використаної літератури та додатки. В роботі наведено 11 рисунків та 11 таблиць. Список опрацьованої літератури нараховує 60 найменування, з них 1 вітчизняних та 59 іноземних.

РОЗДІЛ 1
ХАРАКТЕРИСТИКА ТА МЕТОДИ АНАЛІЗУ РОЗУВАСТАТИНУ КАЛЬЦІЮ І ЕЗЕТИМІБУ В СУБСТАНЦІЯХ ТА ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТАХ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Загальна характеристика розувастатину кальцію та езетимібу

Гіперхолестеринемія—це досить поширений стан, який характеризується високим рівнем холестерину, а саме ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) та підвищеним ризиком атеросклеротичного серцево-судинного захворювання [1].

З кожним роком все більше людей стикається з цим станом. Неправильне харчування, малорухомий спосіб життя, низький соціальний рівень, зловживання ліками, зайва вага та генетична схильність є причинами підвищення холестерину. Щоб запобігти цим захворюванням, використовують статини. Це потужні гіполіпідемічні засобами, які знижують захворюваність і смертність, пов'язані з серцево-судинними захворюваннями [2]. Їх також вважають золотим стандартом в лікуванні, адже у них обмежена взаємодія з лікарськими засобами, також простота дозування, і вони є досить безпечними, тому що мають мінімальну кількість побічних дій [3]. Представниками цієї групи є Аторвастатин або Ліпітор, Розувастатин або Крестор та Симвастатин або Зокор [4].

Розувастатин – це повністю синтетичний статин, він діє шляхом втручання в ендогенний синтез холестерину внаслідок конкурентного інгібування 3-гідрокси-3-метилглутарил-коензим А-редуктази, ферменту печінки, який є відповідальним за лімітуючу швидкість синтезу холестерину [5]. Від інших статинів він відрізняється тим, що є так званим препаратом статинів «третього покоління». По суті, це найпотужніший статин на ринку. розувастатин також вважається унікальним представником класу статинів завдяки своїй високій гідрофільності, яка збільшує поглинання печінкою в місці дії, низькій біодоступності та мінімальному метаболізму через систему цитохрому Р450. Цей останній момент призводить до меншого ризику побічних реакцій, взаємодії порівняно з аторвастатином, ловастатином і симвастатином, які інтенсивно

метаболізуються цитохромом P450 (CYP) 3A4, цей фермент бере участь у метаболізмі багатьох широко використовуваних ліків [6].У 2003 році Управління з контролю за якістю харчових продуктів і медикаментів США вперше схвалило препарат для лікування хворих з високим рівнем «поганого холестерину» та серцевими захворюваннями. І вже у 2010 році FDA схвалив препарат для додаткового використання, сюди відноситься профілактика інфарктів та інсультів [7].

Одним з лідерів по виготовленню та реалізації розувастатину на світовому ринку є фірма AstraZeneca. У 2022 році дохід компанії склав 1.05 мільярда доларів США. Ці показники не є надто високими, якщо взяти до уваги показники за попередні роки. І можна прослідкувати, що у 2011 році на розувастатин кальцію припав пік популярності і компанія мала високий прибуток. З роками показники дещо впали, це пов'язано з виходом на ринок інших препаратів. Але розувастатин кальцію все одно досить міцно тримається на ринку [9]. Дозування коливається від 5 мг до 40 мг, це є двоопуклі таблетки, вкриті оболонками. Лікарі рекомендують перед початком прийому притриматись дієти для зниження холестерину. Початкову дозу для більшості пацієнтів призначають 10 мг, якщо потрібно, то дозу збільшують. Обмежене використання застосовують для людей із серйозними захворюваннями печінки та нирок: в таких випадках початкова доза становить 5 мг, а добова - 10 мг [10]. Препарат досить швидко всмоктується, період напіврозпаду становить 20 годин і є досить ефективним. Цей показник найкращий з-поміж гіполіпідемічних засобів. Тому він має перевагу у виборі серед інших статинів [11]. Препарат не рекомендується вагітним та годуючим, тому що він виділяється грудним молоком і може нести небезпеку для немовляти [12].

На світовому фармацевтичному ринку існує безліч торгівельних назв розувастатину кальцію: Крестор, Бестор, Турбовас, Разель. Ролістат Фортіус, Новастат, Ростар, Ровастат, Розукор, серед них найпопулярніша – Крестор.

Езетиміб – похідне азетидину і заміщене β-лактамом, дія якого зниження всмоктування холестерину у кишечнику [13]. Препарат належить до нового класу селективних інгібіторів всмоктування холестерину та показаний для

зниження рівня загального холестерину, ліпопротеїнів низької щільності, аполіпопротеїну В у пацієнтів з первинною гіперліпідемією, змішаною гіперліпідемією, фітостеролемією.

Езетиміб має досить тривалий період напіврозпаду, це десь 22 години, внаслідок цього його можна застосовувати перорально один раз на день, незалежно від прийому їжі. Добова доза становить 10 мг [14]. FDA схвалила езетиміб під торговою маркою Zetia 2002 року, продається компанією Merck [15].

Корейськими вченими протягом трьох років було проведено дослідження RACING, після якого вони прийшли до висновку, що комбінація розувастатину і езетимібу дає кращі результати в лікуванні, в порівнянні з монотерапією статинами високої інтенсивності, адже терапія давала змогу краще досягати цільового рівня холестерину і не знижувала шанси появи непереносимості препарату [16].

1.2. Огляд аналітичних методів визначення розувастатину кальцію

Для ідентифікації та кількісного визначення розувастатину кальцію використовують велику кількість різних методів, а саме: титраметричне титрування та інструментальні методи аналізу (ТШХ, ВЕРХ, ВЕРХ-МС, ВЕРХ-УФ, капілярний електрофорез, ІЧ-спектрофотометрію, УФ-спектрофотометрію).

У Державній фармакопеї Україні немає монографії на розувастатин кальцію, але в Європейській фармакопеї запропонована ідентифікація данрї субстанції методом інфрачервоної адсорбційної спекрофотометрії (порівнюють з ФСЗ розувастатину кальцію), визначення енантіомерної домішки та визначення йонів кальцію. Визначення енантіомерної домішки проводять методом рідинної хроматографії, як розчинник у монографії запропоновано ацетонітрил та вода Р у співвідношенні (25:75). Розмір хроматографічної колонки становить 0.15м*4.6мм, рухома фаза представлена сумішшю ацетонітрилу Р та 0.1 % розчину трифтороцтової кислоти Р(25:75). Швидкість потоку складала 0.5мл/хв, а виявлення проводилось за довжини хвилі 242 нм [17].

Для кількісного визначення використовують також рідинну хроматографію, використовують суміш розчинників ацетонітрил для хроматографії Р та воду для хроматографії Р у співвідношенні (25:75). Розміри хроматографічної колонки 0.15м*3.0мм. Рухомих фаз дві, А і В, їхній склад однаковий – це 1 % об'ємний розчин трифтороцтової кислоти Р, ацетонітрил для хроматографії Р, вода для хроматографії Р, різняться фази тільки співвідношенням реактивів, у першому – (1:29:70), у другому – (1:24:75). Швидкість потоку складає 0.75мл/хв, а довжина хвилі, при якій спектофотометр виявляє субстанцію, становить 242 нм [17].

Фармакопея Сполучених Штатів Америки також має монографію субстанції розувастатину кальцію, і в ній зазначено, що ідентифікацію та кількісне визначення проводять методом ВЕРХ – УФ. Розмір хроматографічної колонки складає 3.2 мм*25 см , рухома фаза- ацетонітрил, 1 % водний розчин трифтороцтової кислоти та вода (37:1:62). Як розчинник використовують ацетонітрил і воду (25:75). Швидкість рухомої фази становила 0.75 мл/хв, за довжини хвилі 242 нм [18].

Методом прямої обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії у журналі фармацевтичного та біомедичного аналізу італійськими вченими представлено визначення вмісту енантіомерної домішки кальцієвої солі хірального статину розувастатину в таблетках. Розділення відбувалося в колонці Lux Cellulose-2, лінійним градієнтом виступив ацетонітрил та 0.05 % трифтороцтова кислота у водному розчині. Температуру колонки та швидкість потоку рухомих фаз встановлювали на рівні 1.0 мл/хв при -1 і 40°С відповідно. В монографії Європейської фармакопеї запропоновано метод ізократичної ВЕРХ, але метод, який запропонували італійські вчені, є більш досконалим. Він скоротив час аналізу та має більш покращену енантіоселективність. Було встановлено, що межами кількісного визначення та енантіомерної домішки є 0.15 та 0.05мкг/мл [19].

Колеги з Eskisehir Osmangazi University у своєму дослідженні для визначення вмісту розувастатину в таблетці використовували метод кількісного

ядерного магнітного резонансу. Лінійність, межа виявлення, діапазон, межа кількісного визначення, точність і прецизійність були визначені під час валідаційного дослідження розувастатину. Також було проведено валідаційне дослідження розувастатину високоефективною рідинною хроматографією. Похибки методів QNMR та HPLC були визначені за допомогою EURACHEM/CITAC Guide CG 4 (3-є видання), що визначає їх в аналітичних вимірюваннях. Лінійність даної методики була в діапазонах 0.10–5.00 мг/мл та 0.001–0.0995 мг/мл, коефіцієнт регресії становив вище > 0.99. Крім того, значення МВ і МКВ за допомогою методу QNMR спостерігалися як 0.25 мг/мл і 0.80 мг/мл відповідно. Ці значення методом ВЕРХ були знайдені як 0.00051 мкг/мл і 0.001695 мкг/мл відповідно. Під час досліджень було встановлено, що QNMR є практичним і корисним методом перевірки та оптимізації розувастатину в таблетках [20].

George Machairas та інші співучасники розробили і валідували метод рідинної хроматографії гідрофільної взаємодії з діодною матрицею, для того щоб було можливо одночасно визначати домішки у комбінованих таблетках із пролонгованим вивільненням з фіксованою дозою, яка містить розувастатин і метформін у співвідношенні 1:100. Вчені для хроматографічного розділення використали розподільчу колонку марки XBridge®-HILIC при ізократичному елююванні. Рухома фаза складалася з форміату амонію при 150 Мм, що містив 0.05 % діетиламіну(Рн=8,5) ацетонітрилу 4.96 і прокачувався зі швидкістю потоку 0.5 мл/хв. Валідація методу здійснювалась згідно з рекомендаціями ICH. Калібрувальні криві для розувастатину та метформіну і їх семи домішок показали задовільну лінійність (r>0,994) у межах еталонних калібрувальних діапазонів, відносна відсоткова помилка Er була менше 2.7 % для всіх сполук. Дослідження проводились в стресових умовах при дії гідролізу, нагрівання та окиснення, щоб дослідити стабільність методу. Час дослідження складав 25 хвилин для кожного зразка, що вказує на велику продуктивність [21].

Простий, швидкий та точний метод високоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою був створений і валідований для оцінки

розувастатину і тенеліглiптину в їхній синтетичній суміші вченими з Індії. Хроматографічне розділення було здійснено на колонці Agilent Inertsil Octa Decyl Silane (ODS) C18 (250 * 4,6 мм, 5 мкм) з використанням рухомої фази композиції метанол: вода (pH=3 регулюють 10 % ортофосфорною кислотою) (70:30 V/ V), в ізократичному режимі при швидкості потоку 0.8 мл/хв при довжині хвилі детектування 244 нм. Для розувастатину і тенеліглiптину час утримування становив 7.41 і 4.35 хвилин відповідно. Вчені зазначили, що розувастатин і тенеліглiптин мають лінійність 5-15 мкг/мл і 10-30 мкг/мл відповідно, значення коефіцієнта кореляції (R^2) показало 0.998 для розувастатину та 0.999 для тенеліглiптину. Дані показники дають зрозуміти, що метод може використовуватись для дослідження розувастатину і тенеліглiптину в їх суміші [22].

Kallol Jana та її індійські колеги запропонували простий, надійний та чутливий метод хроматографічного елюювання для оцінки, розділення та валідації як препаратів розувастатину кальцію, так і холекальциферолу в таблетованих лікарських формах. Хроматографічне елюювання було досягнуто за допомогою колонки C18 thermo, 250 * 4.6 мм, з розміром частинок 5 мкм і швидкістю потоку 1.5 мл за хвилину з використанням рухомої фази метанол:ацетонітрил:триетаноламін (55:45:0.4 %). Виявлення обох препаратів контролювали при 265 нм. Час утримання розувастатину кальцію та холекальциферолу становив 1.336 та 6.031 хвилини відповідно, а загальний час хроматографії становив приблизно 20 хвилин. Встановлення лінійності проводилося в концентраціях 70–130 мкг/мл (r^2 = 0,995) і 7–13 МО (r^2 = 0,983) відповідно для розувастатину кальцію та холекальциферолу. Межа виявлення 0.88 і 0.11, а межа кількісного визначення становила 2.66 і 0.34 для розувастатину кальцію та холекальциферолу відповідно. Точність (відновлення) становила від 94.34 до 103.51% і від 100.82 до 102.46% для розувастатину кальцію та холекальциферолу відповідно. Розроблений і валідований хроматографічний метод був у прийнятних межах для обох препаратів з точністю, міцністю та стабільністю розчину, а відносне стандартне відхилення було менше 2.

Запропонований хроматографічний метод є точним, швидким, ефективним у часі, простий, відтворюваний для рутинної кількісної оцінки як препаратів розувастатину кальцію, так і холекальциферолу в твердих фармацевтичних таблетованих лікарських формах [23].

Досить неважкий метод високоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою був розроблений вченою Bala R Prabhakar для швидкого визначення розувастатину за допомогою колонки Kromasil C-18, 4.6 * 250 мм, 5 мкм HPLC. Час виконання дослідження становив 8 хв з часом утримання розувастатину 4.72 хв. Метод RP-HPLC був валідований згідно з рекомендаціями ICH щодо лінійності, точності, прецизійності та стійкості. МВ та МКВ становили 0.17 та 0.7 мкг/мл відповідно. Розроблений метод виявився лінійним в діапазоні концентрацій від 1.56 до 50 мкг/мл з коефіцієнтом регресії 0.9998. Крім того, було встановлено, що запропонований метод є відтворюваним і зручним для аналізу показників стабільності розувастатину в поданій лікарській формі [24].

Maya Sharma розробила методику, мета якої полягала в розширенні та розвитку методу ВЕРХ із зворотною фазою для оцінки аспірину, клопідогрелю та розувастатину. Метод був кращим з різними колонками, такими як: колонка C18, коромасил, Hypersil BDS. Серед них C18 було визнано ідеальним, оскільки він має гарну форму піку зі швидкістю потоку 1 мл/хв. Також була розроблена відповідна рухома фаза для отримання ідеальних і різких піків з оптимальною роздільною здатністю. Параметри придатності системи оцінювали за стандартною хроматограмою та порівнювали з хроматограмою зразка аспірину, клопідогрелю та розувастатину. Також спостерігали площі піків і час утримування для отримання якісного піку. Було проведено кілька випробувань на мобільних пристроях, і в 14-му випробуванні була створена належна хроматограма з задовільним піком, отриманим для всіх трьох проб, подібним до стандартного. Висновки показали, що час утримування для аспірину, клопідогрелю та розувастатину становив 8.933, 4.953 та 6.783 відповідно, і було отримано чисті піки [25].

В наступному дослідженні R. N. Jalkote та його співавторами було розроблено простий, відтворюваний та ефективний метод високоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою для оцінки розувастатину та клопідогрелю в його таблетованих лікарських формах за допомогою колонки С18, розмір колонки 250*4.6 мм, розмір частинок 5 мкм, рухома фаза – метанол: вода (80:20 об./об.), швидкість потоку 1 мл/хв. Довжина хвилі вимірювання 231 нм. Час утримання становили 3.45 і 4.98 хв. для розувастатину та клопідогрелю бісульфату відповідно. Калібрувальні графіки були лінійними (r^2>0.998) в діапазоні концентрацій 1-5 мкг/мл для розувастатину та 7.5-37.5 мкг/мл для клопідогрелю бісульфату. Було продемонстровано, що метод є точним, конкретним і надійним. Запропонована методика була успішно використана для кількісного аналізу капсул. Жодного впливу будь-якого компонента фармацевтичної лікарської форми не спостерігалося [26].

Точний, чутливий, надійний, високоефективний метод тонкошарової рідинної хроматографії був розроблений Devansh Kansara та його колегами на основі рекомендацій ICH Q2 (R1) для оцінки нової комбінації амлодипіну безилату, розувастатину кальцію та фімасартану калію в масі та їх синтетичної суміші. Алюмінієва пластина з попередньо покритим силікагелем 60 F254 була обрана нерухомою фазою, а н-гексан, н-бутанол, метанол і крижана оцтова кислота (5.7:2:2.3:0.1) – рухома фаза. Для кількісного визначення амлодипіну безилату, розувастатину кальцію та фімасартану калію було обрано всі три препарати, що демонструють значне поглинання при загальній довжині хвилі 242 нм. Метод перевірено на лінійність, прецизійність, точність і надійність, межу виявлення та межу кількісного визначення відповідно до параметрів ICH. Було встановлено, що коефіцієнти регресії (r^2) становили 0.9986, 0.9975 і 0.9988 для амлодипіну безилату, розувастатину кальцію та фімасартану калію відповідно. Середній відсоток вилучення амлодипіну безилату, розувастатину кальцію та фімасартану калію становив 99.38-100-60 %, 99.75-100.63 %, 99.39-100 % відповідно. Метод тонкошарової хроматографії має перспективне як якісне, так і кількісне застосування для одночасної оцінки амлодипіну безилату,

розувастатину кальцію та фімасартану калію в масі та фармацевтичній лікарській формі [27].

Neelanchal Trivedi та його співавтори змогли розробити та перевірити точну, просту, швидку, надійну, а також найменш трудомістку техніку високоефективної рідинної хроматографії для одночасної та окремої оцінки аторвастатину, розувастатину та симвастатину в цілому та окремо. Це розділення було досягнуто хроматографічним шляхом з використанням суміші метанолу та трифтороцтової кислоти (0.1 %) у воді (60:25) як рухомої фази з використанням колонки Hypersil ODS C18 (250 мм * 4.6 мм, внутрішній діаметр 2.5 мкм) зі швидкістю потоку 1.0 мл/хв, а елюенти контролювали при 235 нм. Значний результат у формі лінійності продемонстрували всі три препарати, тобто аторвастатин у діапазоні концентрацій від 0.14 до 0.24 мг/мл, тоді як симвастатин від 0.1 до 0.14 мг/мл, а розувастатин показав те саме в діапазоні концентрацій від 0.12 до 0.24 мг/мл. Було встановлено, що точність була задовільною зі значеннями відновлення в діапазоні від 99.21 до 100.40 %, від 99.87 до 100.39 % і від 98.84 до 100.66 % відповідно для аторвастатину, симвастатину та розувастатину. Таким чином, метод визнаний простим, лінійним, селективним, отже, може бути успішно використаний для регулярного визначення контролю якості для рецептур, що охоплюють наведені препарати у фармацевтичній промисловості [28].

Sarif Niroush Konari та Jane T. Jacob у своїй роботі представили простий, швидкий і точний метод високоефективної тонкошарової хроматографії для багатокомпонентного аналізу розувастатину (RSC) і фенофібрату (Fen), RSC і езетимібу (Eze) і RSC і аспірину (Asp) у трьох різних фармацевтичних комбінаціях, призначених для лікування дисліпідемії. Методи виконували на алюмінієвих пластинах, попередньо покритих силікагелем 60 F254 TLC, з простою комбінацією рухомої фази толуол—ацетон—оцтова кислота у співвідношенні 6:2:0.2 об’єм/об’єм і створювали добре розділену компактну пляму для всіх названих препаратів. Статистика лінійної регресії показала хороший лінійний зв’язок у діапазоні концентрацій 500–4000 нг/пляма для всіх

цитованих препаратів із хорошим коефіцієнтом кореляції 0.9999, а денситометричне виявлення проводилося в режимі поглинання при 254 нм. Чутливість розробленої методики оцінювали за межею кількісного визначення та межею виявлення. Дослідження стабільності показало, що всі чотири препарати були стабільними при кімнатній температурі до 12 годин. Наведені препарати були валідовані згідно з рекомендаціями ICH. Методика виявилася специфічною та вибірковою, оскільки не було зафіксовано додаткового піку разом із основним піком. Дослідження міцності, відновлення та відсоток аналізу складів були виявлені в межах ліміту (ICH). Таблетки, що продаються, також були проаналізовані для п'яти різних брендів за розробленою методологією, при цьому не було виявлено ніякого впливу допоміжних речовин у композиціях. Економічна ефективність, чутливість і вибірковість запропонованої методики рекомендує її застосування для рутинного аналізу контролю якості будь-якого з названих субстанцій у їх фармацевтичних препаратах [29].

Paladugu Venkata Naveen та його колеги розробили новий валідований метод надшвидкої рідинної хроматографії з оберненою фазою для визначення розувастатину у фармацевтичних композиціях (таблетках). Для аналізу розувастатину використовували рухому фазу, що складається із суміші ацетат натрію: ацетонітрил (28:72, об'єм/об'єм) зі швидкістю потоку 1.2 мл/хв та УФ-детектором при 254 нм. Розувастатин піддавався впливу різних стресових умов, таких як кислотна, лужна, окислювальна та термічна деградація. Лінійність спостерігалася в діапазоні концентрацій 0.5-200 мкг/мл з рівнянням лінійної регресії y = 32548x - 16862 (r^2 = 0.9999). Було встановлено, що МВ становить 0.04291 мкг/мл, а МКВ — 0.01502 мкг/мл. Даний метод може бути застосований для аналізу фармацевтичних композицій, вивчення фармакокінетики та біоаналітичних оцінок [30].

Колегами з Індії було розроблено лінійний і надійний аналітичний метод для оцінки технологічних і деградаційних домішок розувастатину кальцію (RSC) у таблетках розувастатину кальцію. Колонка довжиною 150 мм, діаметром 4.6 мм і розміром частинок 3.5 мкм зі стаціонарною фазою C18 і фосфатним буфером

pH=3,0 як рухомою фазою. Колонку підтримували при 30 °C. Усі домішки контролювали при 248 нм. Домішки відокремлювали в режимі градієнтного елюювання. Усі деградаційні домішки (антиізомер, 5-кетокислота, лактон і аддукт меглюміну), технологічні домішки добре відокремлені. Невідому домішку (адукт меглюміну), що утворюється під час досліджень стабільності, виділили за допомогою препаративної ВЕРХ, а структуру характеризували за допомогою досліджень ядерного магнітного резонансу та мас-спектрометрії. Метод здатний відокремити та оцінити всі деградаційні та технологічні домішки [31].

Для енантіомерного розділення розувастатину авторами з Індії розроблено новий і точний енантіоселективний високоефективний метод рідинної хроматографії з нормальною фазою. Енантіомер розувастатину та лактонні домішки розувастатину були розділені на колонці CHIRALPAK IB (250 * 4.6 мм, 5 мкм) за допомогою простої системи рухомої фази, що містить н-гептан, 2-пропанол і трифтороцтову кислоту (85:15:01 об./об.). Розділення між розувастатином і енантіомером, розувастатином і лактонною домішкою було хорошим з коефіцієнтами розрізнення більше 2.0 і 4.0 відповідно. Вплив органічного модифікатора, а саме 2-пропанолу в рухомій фазі, було оптимізовано для отримання найкращого розділення. Було встановлено, що межа виявлення та межа кількісного визначення енантіомеру становлять 0.07 мкг/мл та 0.2 мкг/мл відповідно, для об'єму ін'єкції 10мл. Розчин зразка та рухома фаза були стабільними щонайменше 48 годин. Запропонований відтворюваний і точний метод може бути корисним для кількісного визначення енантіомеру розувастатину в основній лікарській речовині [32].

Турецькими вченими було вперше розроблено методи вольтамперометрії та рідинної хроматографії для одночасного визначення амлодипіну безилату (AML) і розувастатину кальцію (RSC). Детальна електрохімічна поведінка та одночасне вольтамперометричне визначення AML та RSC були детально досліджені за допомогою скловугільного електрода. Для порівняння також були розроблені високоефективна рідинна хроматографія і ультраефективна рідинна хроматографія. Вольтамперометричний метод продемонстрував лінійну

динамічну відповідь для одночасного аналізу AML та RSC в діапазоні концентрацій від 0.006 до 2.85 мкг/мл та від 0.01 до 5.00 мкг/мл, з межами виявлення 0.001 та 0.003 мкг/мл відповідно. З іншого боку, методи РХ демонструють ширший діапазон лінійності, ніж метод вольтамперометрії, від 0.5 до 100 мкг/мл з межами виявлення 0.011 і 0.027 мкг/мл для AML і 0.034 і 0.042 мкг/мл для розувастатину за допомогою ультраефективної рідинної хроматографії та методу ВЕРХ відповідно [33].

Іншим індійським вченим вдалось зосередитись розробці та валідації методу RP-HPLC, який був простим, швидким, точним, чутливим, економічним і стабільним, що вказує на кількісне визначення розувастатину кальцію у субстанції та в таблетках. Розділення було досягнуто на колонці Waters Symmetry C18 з розмірами 150 * 4.6 мм, розміром частинок 5 мм з використанням 0.1 % буфера ортофосфорної кислоти: ацетонітрилу у співвідношенні 55:45 % об./об. як рухомої фази, швидкість для якої становила 1.0 мл/хв і реєструвалася за довжини хвилі 241 нм. Лінійність методу була продемонстрована в діапазоні концентрацій 2–12 мкг/мл для кальцію розувастатину з коефіцієнтом кореляції (r^2) 0.999, відсоток відновлення препарату становив 100.22–101.16 %, а відносне стандартне відхилення у відсотках <2. Значення межі виявлення та межі кількісного визначення становили 0.013 мкг/мл та 0.042 мкг/мл відповідно, а результати аналізу лікарської форми таблеток, що продаються, становили 99.76 %. Було встановлено, що розроблений метод RP-HPLC є простим, специфічним, чутливим, швидким, лінійним, і його можна використовувати для регулярного контролю якості розувастатину кальцію в масі та таблетованій формі [34].

Doaa H. Alshora та її співавтори провели дослідження, мета якого полягала в тому, б сформулювати та підтвердити новий метод зеленої високоефективної рідинної хроматографії з УФ-спектром для швидкого кількісного визначення кальцію розувастатину (RSC) у стандартних препаратах. Результати показали, що комбінація етанол: метанол: етилацетат (6:3:1) зі швидкістю 1.0 мл/хв є найкращою для ідентифікації RSC і її відділення від продуктів розпаду. Ідентифікація RSC проводилася в колонці NUCLEODUR 150 мм * 4.6 мм RP C8,

наповненої 5 мкм наповнювачем як нерухомою фазою, і виявлення проводилося при 254 нм. Розроблену техніку було перевірено на лінійність, вибірковість, точність, надійність і чутливість, а також специфічність. Корисність запропонованого процесу була підтверджена аналізом RSC у готовій самонаноемульгуючій системі доставки ліків (SNEDDS) і безрецептурних продуктах. Кількість RSC в SNEDDS виявилася 98.38 %. Розроблена нами система ВЕРХ-УФ ефективно визначала пік RSC разом із продуктами його розпаду, що підтвердило властивість індикатора стабільності запроєктованої системи. Систему також можна використовувати для порівняння розчинності наночастинок розувастатину в стандартних ліках. Ці результати свідчать про те, що розроблену ВЕРХ можна ефективно використовувати для регулярного дослідження RSC у стандартних лікарських засобах, різних фармацевтичних композиціях і зразках вивільнення ліків [35].

Dipak R Supe та його співвавтори своїй роботі описали розробку та валідацію простого та точного методу високоефективної тонкошарової хроматографії, що вказує на стабільність для оцінки розувастатину кальцію як у масі, так і в таблетованій лікарській формі. Найкраще хроматографічне розділення було досягнуто з використанням алюмінієвих пластин із силікагелем 60 F254 із попереднім покриттям як нерухомої фази та суміші толуол: етилацетат: метанол (5: 3: 2, об'єм/об'єм/об'єм) як рухома фаза. Денситометричне детектування проводили при 242 нм. Препарат був підданий стресовим умовам деградації, і метод був валідований згідно з рекомендаціями ICH. Розроблений метод демонструє лінійність в діапазоні концентрацій 500-2500 нг/смуга. Виявлено, що препарат більш чутливий до кислотних і термічних умов стресу порівняно з іншими стресовими умовами. Запропонований метод може бути ефективно застосований для проведення довготривалих і прискорених досліджень стабільності для визначення розувастатину кальцію у фармацевтичних препаратах [36].

Girendra Gautam та її колеги змогли розробити простий та чутливий УФ-спектрофотометричного метод для оцінки розувастатину кальцію в масі та у

фармацевтичній лікарській формі. Розувастатин кальцію демонструє максимальне поглинання при 244 нм з уявним молярним поглинанням 7.1862 * 10 в 4 л/моль*см. метанол був в якості розчинника. Було встановлено, що закон Бера виконується в діапазоні концентрацій 2-18 мкг/мл для розувастатину кальцію. Результати дослідження показали, що розроблена процедура була точною та економічно вигідною. У цьому методі не було виявлено ніяких перешкод з боку будь-яких фармацевтичних добавок і розріджувачів. Перевірку аналізу проводили статистичними дослідженнями [37].

Інші індійські вчені запропонували та описали визначення розувастатину кальцію методом високоефективної тонкошарової хроматографії, що вказує на стабільність для оцінки розувастатину кальцію як у масі, так і в таблетованій лікарській формі. Найкраще хроматографічне розділення було досягнуто з використанням алюмінієвих пластин із силікагелем 60F254 із попереднім покриттям як нерухомої фази та суміші толуолу: етилацетату: метанолу (5:3:2, об'єм/об'єм) як рухомої фази. Денситометричне детектування проводили при 242 нм. Препарат був підданий стресовим умовам деградації, і метод був валідований згідно з рекомендаціями ICH. Розроблений метод показує лінійність в діапазоні концентрацій 500-2500 нг/діапазон . Встановлено, що препарат більш чутливий до кислотних і термічних умов порівняно з іншими стресовими умовами. Запропонований метод може бути ефективно застосований для виконання тривалих і прискорених досліджень стабільності для визначення розувастатину кальцію у фармацевтичних формах [38].

Hafsa Omar Salem та його колеги розробили непрямий метод визначення розувастатину кальцію (RSC) у чистому вигляді та в таблетованих формах. Це залежить від окисної деструкції RSC методом кисневих колб або спалюванням у муфельній печі. Отриманий кальцій оксид після згоряння розчиняють у 0.1N азотній кислоті та визначають методом атомної абсорбції полум'я після відповідного розведення при 422.7 нм. Цей метод був успішним у визначенні RSC у його чистому вигляді, де було отримано відновлення в діапазоні 99.2-101.6, але невдалий у визначенні композицій таблеток через вплив інших

металів, що містяться в неактивних інгредієнтах і наповнювачах. Були введені модифікації класичного методу Шенігера щодо взятої ваги, об'єму колби для спалювання, об'єму абсорбційного розчину і час промивання, який уможливив спалювання набагато більшої ваги. Розробляються подальші дослідження, щоб розширити застосування методу для визначення складів таблеток [39].

Amr M. Badawey та інші його колеги розробили два селективних спектрофотометричних підходи для виявлення концентрацій розувастатину та фенофібрату у таблетованих формах, перший – це однофакторна маніпуляція спектрофотометричними даними, де вчені застосували метод точки ізопоглинання та метод подвійної довжини хвилі. Загальну концентрацію розувастатину кальцію та фенофібрату можна було визначено при $\lambda = 253.2$ нм, у той час як розувастатин кальцію визначали з подвійною довжиною хвилі ($\lambda = 243.5$ та 307.9 нм), де лінійність була досягнута в діапазоні 2.00–22.00 мкг/мл із середньою точністю 100.29 ± 0.568, тоді за різницею фенофібрат визначали в діапазоні 2.00–22.00 мкг/мл із середньою точністю 100.23 ± 0.578. Другий підхід — це багатовимірне моделювання, що вказує на стабільність, а саме регресія головних компонентів і часткові найменші квадрати, де два препарати визначали за наявності продуктів їх розпаду. Було підготовлено 17 зразків відповідно до плану калібрування п'яти рівнів за чотирма факторами. Розроблені моделі були описані 4-ма латентними змінними, і хороший прогноз був підтверджений низькою середньою квадратичною помилкою прогнозу. Запропоновані методи виявилися швидкими та простими та не вимагали попереднього розділення. Розувастатин кальцій і фенофібрат були проаналізовані із середніми значеннями 99.54 ± 0.903, 99.88 ± 0.548 і 99.50 ± 0.712, 99.30 ± 0.802 відповідно. Два препарати були успішно визначені в таблетках розробленими методами, а результати порівняні з методами ВЕРХ, де вони були статистично незначними [40].

Іншими єгипетськими вченими було описано одночасне визначення розувастатину кальцію та пропранололу гідрохлориду за допомогою першої похідної синхронної спектрофлуориметрії. Цей метод передбачає вимірювання синхронної флуоресценції обох препаратів в етанолі з використанням $\Delta \lambda$=60 нм,

потім реєструють першу похідну та вимірюють пікові амплітуди при 350 і 374 нм для розувастатину кальцію та пропранололу гідрохлориду відповідно. За оптимальних умов лінійні діапазони розувастатину кальцію та пропранололу гідрохлориду становили 0.2–2 мкг/мл та 0.1–1 мкг/мл відповідно. Метод використано для кількісного аналізу лікарських засобів у сировині та лікарській формі. Достовірність запропонованого методу оцінювали згідно з рекомендаціями міжнародної конференції з гармонізації (ICH) [41].

Poojamani Sai Kurre та його колегами розробили методику визначення активних речовин розувастатину за допомогою хемометричного методу визначення. Для хроматографічного розділення автори використали симетричну колонку C18 (150 мм x 4.6, 3.5 мкм). Рухома фаза була у співвідношенні 40:60 об./об. 1 мл TEA в 1000 мл води та ацетонітрилу. Швидкість потоку була встановлена на 1 мл/хв при температурі навколишнього середовища з довжиною хвилі детектування 247 нм. Лінійність спостерігалася в діапазоні концентрацій 10-200 мкг/мл для розувастатину. Коефіцієнт кореляції для препарату Розувастатин склав 0.999. Значення відсотка відновлення чистого лікарського засобу становили 100.1% для розувастатину. У висновку було визначено, що ВЕРХ у поєднанні з хемометричним калібруванням зменшує помилки хроматографічного аналізу та відповідає обмеженням рекомендацій ICH [42].

Бразильськими колегами було розроблено фотокаталітичну деградацію розувастатину, як каталізатор в цій роботі виступив ZnO. Експерименти проводилися в реакторі періодичної дії з контрольованою температурою, який опромінювався ультрафіолетовим світлом. Попередньо вчені оцінювали вплив завантаження фотокаталізатора, початкову концентрацію та початковий pH розувастатину. Експериментальні результати показали, що розкладання розувастатину є переважно фотокаталітичним процесом з кінетикою псевдопершого порядку. Усі побічні продукти, які утворилися у процесі окиснення, були ідентифіковані за допомогою нано-ультраефективної рідинної хроматографії та тандемної мас-спектрометрії, також були проведені тести на

гостру токсичність з використанням Daphnia magna, щоб оцінити токсичність необробленого розчину розувастатину та стоки реактора [43].

Українськими вченими було розроблено спектрофотометричний метод визначення розувастатину кальцію за реакцією з бромфеноловим синім у розчині ацетонітрилу. Максимум поглинання фіксували за довжини хвилі 595 нм. Дослідження проводили на спектрофотометрі Shimadzu model -UV 1800. Стехіометричні співвідношення компонентів становили 1:1. Метод був провалідований згідно вимог ДФУ. Діапазон лінійності був у межах концентрації 7.99 – 23.97 мкмоль/л. Розраховані значення МВ та МКВ становили 0.77 мкмоль/л і 2.36 мкмоль/л. Піктограма AGREE для розробленого методу склала 0.77. Отже, запропонований метод визначення розувастатину кальцію було розроблено з дотриманням принципів «зеленої» хімії [44].

1.3. Огляд аналітичних методів визначення езетимібу.

Езетиміб – це представник з класу нових ліпідознижувальних препаратів, який пригнічує адсорбцію ХС у кишечнику. На відміну від статинів, він є перорально активним і має інший механізм дії: гальмує всмоктування ХС без впливу на адсорбцію жирних та жовчних кислот, прогестерону та жиророзчинних вітамінів.

Для цього лікарського засобу, на сьогоднішній день, існує чимала кількість методів ідентифікації та кількісного визначення, а саме: інструментальні та титриметричні методи. Найчастіше використовують інструментальні методи, зокрема, високоефективну рідинну хроматографію.

Китайські вчені у своїй роботі розробили та підтвердили чутливий та відтворювальний метод високоефективної рідинної хроматографії із зворотно-фазовим градієнтом для визначення споріднених речовин езетимібу. Близько одинадцяти потенційних домішок вони виявили в досліджуваній субстанції. Для всіх домішок приблизні структури були визначені на основі порівняння їх часу утримування та мас-спектрометричних даних. Розділення сполук відбувалось на аналітичній колонці Phenomenex Luna Phenul-Hexyl (100 мм * 4.6 мм, 5мкм).

Рухома фаза – А складалась з ацетонітрилу- води (pH доведений до 4.0 за допомогою фосфорної кислоти) – метанолу у співвідношенні 15:75:10 (об./об./об.), а рухома фаза – В містила ацетонітрил. Елюйовані сполуки контролювали при 210 нм. Езетиміб піддали кислотним, лужним, фотолітичним, термічним та гідролітичним умовам відповідно до ICH. Препарат показав, що є стабільним у фотолітичній деградації, в той час інтенсивно розпадався в умовах кислотного, основного, окисного та гідролітичного стресу. Продукт розпаду, що відповідає (2R,3R,6S)-N.6-біс(4-фторфеніл)-2-(4-гідроксифеніл)-оксан-3-карбоксамід (домішка тетрагідропропану езетимібу), характеризували аналізом LC-MS/MS. Продукти розпаду добре відділялись від основного піку та домішок, що дає змогу підтвердити, що метод є ефективним і стабільним. Метод валідований відповідно до рекомендацій ICH, а саме; специфічності, лінійності, межі виявлення, межі кількісного визначення, точності, прецизійності та стійкості [45].

Galal Magdy, Amira A. Al-enna та їхні колеги запропонували селективний та досить простий метод ОФ-ВЕРХ. Для визначення одночасно двох протидіабетичних препаратів (метформіну та омаригліптину) з антигіперліпідемічним препаратом езетимібом у найоптимальнішому співвідношені 2.5:50:1. Вчені застосували дворівневий повний фактор дизайну(25), з метою оптимізації впливу різних факторів на процес хроматографії. Точні результати були отримані за допомогою колонки Hypersil BDS C18 при 45C, а рухома фаза, яка була закачана ізократично, складалась з буфера метанол: дигідрофосфат калію (6.6мМ, pH=7; 67:33 % об./об.), швидкість потоку становила 0.814мл/хв, довжина хвилі була 235 нм. Час розділення становив менш ніж 8 хв. Лінійність була запропонована у діапазонах 0.2-2.0, 0.5-25.0 і 0.1-2.0 мкг/мл, кількісні межі становили 0.06, 0.50 та 0.06 мкг/мл відповідно. Метод був успішно застосований для визначення препаратів з високим відсотком виходів (96.8-102.92%) і низькими відсотковими значеннями RSD (менше 2%). Метод є надійним, чутливим та валідованим відповідно до стандартів ICH [46].

Індійськими колегами було розроблено та оптимізовано валідовану ізократичну зворотно-фазову ВЕРХ - розділення телмісарту, аторвастатину, езетимібу та розувастатину. Дослідження проводилось на колонці phenomenex C18(внутрішній діаметр 15 см *4.6 мм, розмір частинок 5 мкм), довжина хвилі на УФ-детекторі становила 239 нм. Буферним розчином був ацетонітрил 33-38 % у концентрації 10-20мМ і швидкість потоку становила 1-2 мл/хв. Вченими було досліджено вплив незалежних змінних на вихідний результат, а саме: коефіцієнт потужності першого піку(k1), роздільна здатність 2-го та 3-го піків (Rs2,3) та коефіцієнт потужності 5-го піку (k5). Виходячи з цих результатів, дослідники отримали дані щодо поверхні поділу. Результати були отримані за допомогою функції бажаності Деррінгера. Висновки показали, що оптимальними є MeCN, MeOH, 20мМ, розчин K_2HPO_4 (pH 3.0±0.2) у співвідношенні (34.27:20:45.73 об./об./об.), швидкість потоку становила 2 мл/хв. Приблизний час, який йшов на один зразок, становив 10 хв. Метод був валідований, простий, селективний та досить чутливий [47].

Турецькі науковці під час розробки синтезу езетимібу виявили домішку в кінцевому продукті в кількості від 0.05 % до 0.15 % методом високоефективної рідинної хроматографії з градієнтом оберненої фази, а її молекулярну масу було визначено за допомогою РХ-МС. Домішка була ідентифікована як (3R,4S)-3-((S)-3-(4-фторфеніл)-3-гідроксипропіл)-4-(4-гідроксифеніл)-1-фенілазетидин-2-он, який назвали десфтор. Синтезовано та охарактеризовано також езетимібну (лактамну) домішку. Після всіх процедур стандартизації її використовували як еталонний стандарт під час валідації методу ВЕРХ та рутинних аналізів [48].

Hossein Danafar у своєму дослідженні визначив езетиміб у таблетках методом високоефективної рідинної хроматографії з ультрафіолетовим детектуванням. Метод був простим, селективним та чутливим. Рухома фаза складалася з ацетонітрил-ацетату амонію (10 мМ, pH 3.0), 75:25 (об./об.), швидкість потоку становила 1 мл\хв. За допомогою УФ-детектора були встановлені піки на довжину хвилі 240 нм. Стандартні криві були лінійними (r^2 = 0.996) у широкому діапазоні концентрацій езетимібу 10-60.0 мкг мл-1 з

прийнятною точністю. Межі виявлення і кількісного визначення методу становили 5 і 10 мкг/мл відповідно. Середній вміст препарату становив 95.3 % у всьому діапазоні лінійних концентрацій. Метод був валідований, тому може бути використаний для рутинного аналізу контролю якості [49].

Індійськими вченими було розроблено та валідовано методи ВЕРХ і ГХ, для одночасного визначення статинів і езетимібу. Для дослідження було використано колонку Symmetry C18 250 мм * 4.6 мм, 5 мкм, а рухома фаза: ацетонітрил:вода (70:30, об./об), pH=2.5, для отримання результатів використовували спектрофотометричний детектор. Для методу ГХ колонка -HP-1, 30м*0.25мм*0.25 мкм і детектор FID. Результати і статистичні дані показали точність та високу чутливість [50].

Іншими індійськими вченими було досліджено вимірювання кількості залишкових розчинників (метанол, ацетон, ізопропіловий спирт, дихлорметан, н-гексан, етилацетат, тетрагідрофуран, толуол і диметилформамід.) у субстанції езетимібу з метою перевірки якості лікарського засобу. Для аналізу використали газохроматографічний метод з використанням детекції в режимі полум'яної іонізації. Було використано колонку ZB-624 (довжина 30 м * ідентифікація 0.53 мм, товщина плівки 3.0 мкм). Час температурного потоку складав 11 хвилин при 40 ºC, потім підвищили температуру до 240ºC, швидкість складала 20 ºC/хв протягом 4 хвилин. Полум'яно-іонізаційний детектор і порт інжектора працювали при 260 і 200 ºC відповідно. Результати після валідації методу газової хроматографії показали задовільну лінійність, чутливість, стійкість, точність, селективність і прецизійність для випробуваних органічних розчинників. Отже, цей ГХ-метод може бути використаний для оцінки досліджуваних залишкових хімічних розчинників, для періодичного аналізу зразків езетимібу [51].

Mallika Sanyal та її колеги розробили та валідували методику для визначення розувастатину та езетимібу методом рідинної хроматографії в поєднанні з методом тандемної мас-спектрометрії. Рідинно-рідинну екстракцію проводили за допомогою метил-трет-бутилового ефіру після попереднього підкислення з 300 мкл плазми людини. Відновлення аналітів становило від 95.7

до 99.8 %. Розділення відбувалось на колонці Symmetry C18 з використанням рухомої фази ацетонітрилу та амоній-форміатного буфера, pH=3.5 (30:70, об'єм/об'єм). Коефіцієнт роздільної здатності становив 3.8. Діапазон концентрацій було встановлено в межах 0.05-50.0 нг/мл та 0.01-10.0 нг/мл для розувастатину і езетимібу відповідно, з коефіцієнтом кореляції $r^2 \geq 0.9991$. Матричні коефіцієнти для аналітів коливались від 0.963 до 1.023. Метод є простим, точним та відтворюваним і може використовуватись для досліджень в подальшому [52].

1.4. «Зелена хімія» у розробці аналітичних методик.

Впродовж декількох років багато хіміків змінили свій підхід до синтезу органічних молекул як в лабораторії, так і в промисловості. Дослідники закликають вибирати «зеленіші» реагенти, методики, розчинники, щоб сприяти вирішенню проблем навколишнього середовища, а саме: забруднення води, ґрунту та повітря [53]. Це є вигідним підходом для вирішення екологічних проблем і створенням нових вимог промислової конкурентоспроможності [53].

«Зелена хімія» розглядає процедури синтезу відповідно до своїх класичних 12-ти принципів, сприяючи стабільності хімічних процесів, економії енергії, меншій токсичності реагентів і кінцевих продуктів, наносить меншу шкоду для довкілля та здоров'ю людини, знижує ризик глобального потепління, впроваджує раціональне використання природних ресурсів і відходів сільського господарства [54].

Ввели це поняття у науку Пол Анастас і Джон С. Ворнер, коли у 1998 році випустили новаторську книгу «Зелена хімія: теорія і практика» [55]. Саме ця книга стала початком нововведень у роботі багатьох вчених світу та змінила їхні принципи у наукових дослідженнях. Хоча до 1998 року неодноразово вчені писали про недоброякісний вплив деяких реактивів на організм людини, на навколишній світ, це було тривожним дзвінком для розробки методик, які мали зменшити негативний вплив розчинників та покращити якість досліджень вчених [56].

На сьогоднішній день питання екологічності досі постає гостро, адже більшість хімікатів виробляється з нафти і несе негативний вплив на природу, але тисячі науковців розробляють методики, синтези, біоаналітичні дослідження згідно з принципами «зеленої хімії» [57].

Висновок до розділу 1.

1. Розувастатин – це один з найпотужніших статинів на ринку, розвиток побічних дій якого зведений до мінімуму через особливості його будови. Для лікування використовують у комбінації з езетимібом, цим самим підвищують якість терапії атеросклерозу.

2. Після вивчення достатньої кількості наукової літератури, можна прийти до висновку, що для розувастатину і езетимібу найчастішими методами дослідження були ВЕРХ, ТШХ, спектрофотометрія в УФ-області.

3. Після аналізу аналітичних методик, було виявлено, що більшість є простими у використанні, чутливими та селективними і відповідають вимогам ІСН. Проте були чинники, які спонукали до розробки нових методик. Цими чинниками виявились: дороговартісне обладнання, довготривалість процесу, неможливість дотримання принципів «зеленої хімії», висока токсичність та неточні валідаційні результати.

4. Саме тому розробка та валідація нових аналітичних методик для високоточних фармацевтичних досліджень розувастатину кальцію та езетимібу на сьогодні є актуальною та затребуваною.

РОЗДІЛ 2
ХАРАКТЕРИСТИКА ОБ'ЄКТІВ ТА МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для точного визначення розувастатину кальцію і езетимібу було обрано спектрофотометричний метод в УФ-області спектру через його ефективність та надійність. Щоб впровадити цей метод у практику було створено детальний план дослідження, який включає аналіз літературних джерел, вибір оптимальних умов проведення експерименту та підтвердження їх ефективності через валідацію. Такий підхід дозволяє не лише отримати достовірні результати, але й забезпечити відповідність методу принципам «зеленою хімії», що є важливим аспектом в сучасній науковій дослідницькій діяльності. На рис. 2.1 наведені всі вище перераховані аспекти.

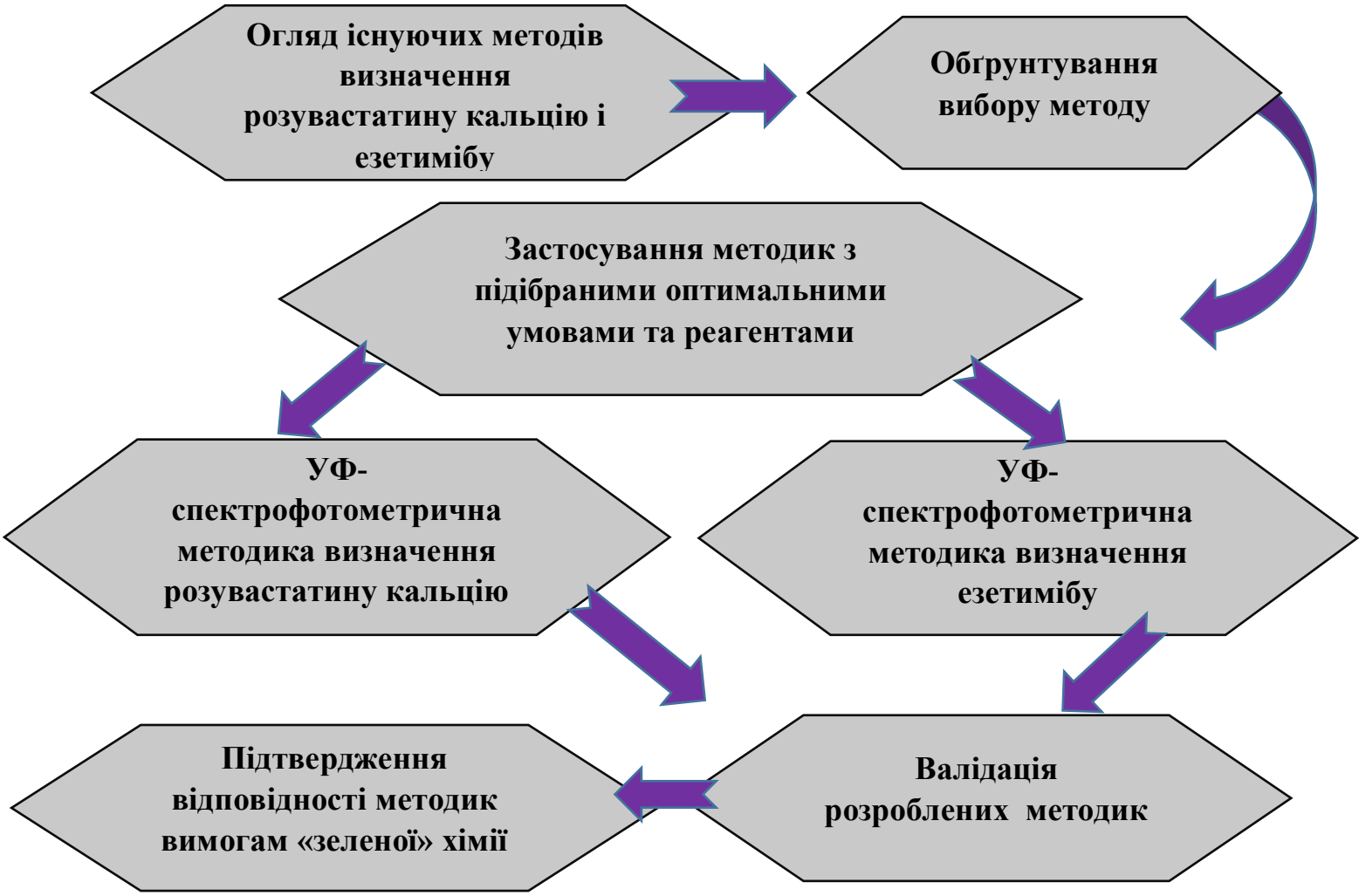

Рисунок 2.1 – Дизайн дослідження.

2.1.Фізико-хімічні властивості об’єктів дослідження

У Європейській фармакопеї є монографія на розувастатин кальцію. Хімічна назва розувастатину кальцію - кальцію біс-(E,3R,5S)-7-[4-(4-фторфеніл)-2-[метил(метилсульфоніл)аміно]-6-пропан-2-ілпіримідин-5-іл]-3,5-дигідрокси-гепт-6-еноат (рис. 2.2).

У структурі він містить карбоксильний фрагмент, сульфаніламідну групу, фенільний радикал, дві вторинні гідрокси групи, піримідиновий цикл, органічно зв’язаний атом фтору та іон кальцію. Стехіометричне співвідношення катіону кальцію та аніонів розувастатину в субстанції становить 1:2 [17]. Це статин другого покоління, суть дії якого полягає в конкурентному пригнічені ферменту гідроксиметилглутарил – коензим А(ГМК-КоА) редуктазу, що пришвидшує перетворення ГМК- КоА в мевалонову кислоту, що в результаті призводить до зменшення у крові ліпопротеїнів низької щільності.

Фізико-хімічні властивості розувастатину кальцію: білий або майже білий кристалічний порошок, гігроскопічний. У воді та метанолі розчинний помірно, малорозчинний у етанолі. Температура плавлення становить 122°.

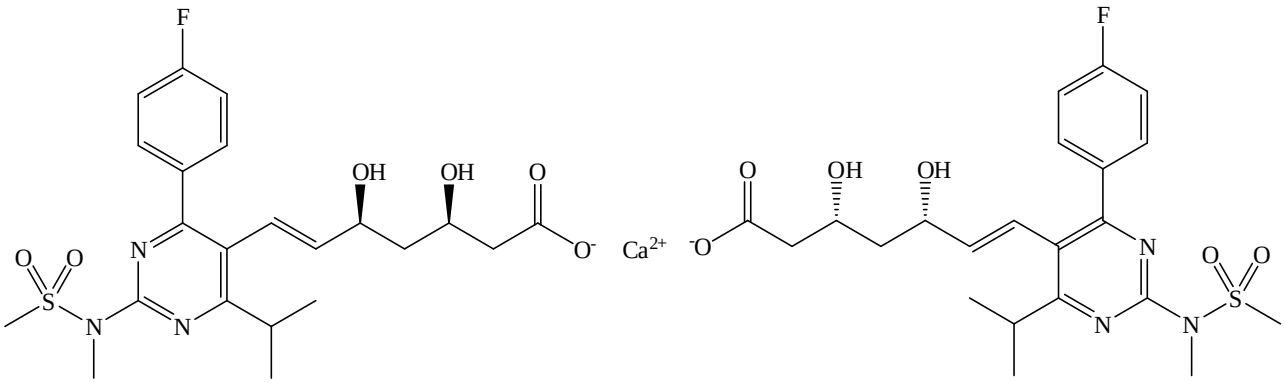

Рисунок 2.2 – Структурна формула розувастатину кальцію

$(C_{22}H_{27}FN_3O_6\ S)_2Ca$, Mr=1001.14, pKa-4.6, LogP-4.3

За хімічною будовою езетиміб – (3R,4S)-1-(4-фторфеніл)-3-[(3S)-3-(4-фторфеніл)-3-гідроксипропіл]-4-(4-гідроксифеніл)азетидин-2-он (рис. 2.3).

Фізико – хімічні властивості: Біла тверда речовина, практично не розчинна у воді, помірно розчина в метанолі та етанолі. Питоме оптичне обертання становить -33,9 °. Температура плавлення – 164-166 °С [58].

Структура молекули езетимібу складається з азетидинового циклу, трьох фенільних радикалів, двох органічно зв'язаних атомів фтору, фенольного гідроксилу та вторинного спиртового гідроксилу і кетогрупи. Механізм дії езетимібу полягає в пригнічені всмоктування холестерину в тонкому кишечнику та печінці, що в кінцевому результаті зменшує кількість ЛПНЩ у крові.

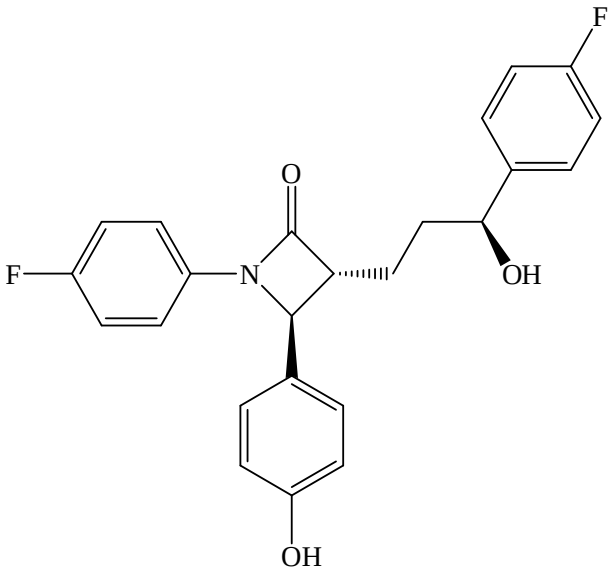

Рисунок 2.3 – Структурна формула езетимібу

($C_{24}H_{21}F_2NO_3$), Mr = 409.4, pKa-9.72, LogP- 4.5

2.2. Характеристика методик дослідження

Згідно аналізованих джерел наукової літератури та проведених вже раніше досліджень на рахунок відбору задовільних аналітичних методів ідентифікації та кількісного визначення розувастатину кальцію та езетимібу в капсулах вибрано спектрофотометричний метод в УФ-області.

Для проведення представлених методик визначення досліджуваних речовин використано наступні реактиви та обладнання:

- Фармакопейні стандартні зразки (ФСЗ) розувастанину кальцію та езетимібу – отримані від «Sigma– Aldrich» (≥ 98%, HPLC), метанол Р від («Honeywell Riedel-de Haen TM », 99, 9%);

- спектрофотометр двопроменевий " Shimadzu UV-1800";

- ваги електронні лабораторні "RAD WAG AS 200/C";

- для аналізу спектрів поглинання - програмне забезпечення UV-Probe 2.62;

- мірний посуд класу А;

- кварцові кювети із товщиною 1 см;

Застосовані при аналізі реактиви належать до класу аналітичних реагентів. Обробка статистичних даних та розрахунок валідаційних характеристик проводились згідно з вимогами ДФУ [59].

2.3. Спектрофотометрична методика одночасного кількісного визначення розувастатину кальцію та езетимібу в капсулах Розуліп Плюс

Приготування випробовуваного розчину для кількісного визначення розувастатину кальцію та езетимібу: точну наважку капсульної маси еквівалентну 12.3 мг розувастатину кальцію і 12.5 мг езетимібу поміщають у мірну колбу місткістю 500.00 мл та розчиняють у 250 мл метанолу Р і доводять до мітки даним розчинником, інтенсивно перемішують і фільтрують. У мірну колбу на 10.00 мл відбирають аліквоту 1.5 мл та 2.5 мл для розувастатину кальцію та езетимібу відповідно, доводять до мітки метанолом Р і перемішують.

Приготування випробовуваного розчину субстанції розувастатину кальцію: точну наважку субстанції розувастатину кальцію 12.3 мг зважують, поміщають у мірну колбу на 500.00 мл та розчиняють у 250 мл метанолу Р і доводять до мітки метанолом Р, інтенсивно перемішують і фільтрують. У мірну колбу на 10.00 мл відбирають аліквоту 1.5 мл, доводять до мітки метанолом Р і перемішують.

Приготування випробовуваного розчину субстанції езетимібу: точну наважку субстанції езетимібу 12.5 мг зважують, поміщають у мірну колбу на 500.00 мл та розчиняють у 250 мл метанолу Р і доводять до мітки метанолом Р, інтенсивно перемішують і фільтрують. У мірну колбу на 10.00 мл відбирають аліквоту 2.5 мл, доводять до мітки метанолом Р та перемішують.

Вимірюють оптичну густину отриманих розчинів, застосовуючи компенсаційний розчин, за довжини хвилі 200 нм – для езетимібу і 238 нм – для розувастатину кальцію. Компенсаційний розчин – метанол Р

РОЗДІЛ 3
РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ ОДНОЧАСНОГО КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ РОЗУВАСТАТИНУ КАЛЬЦІЮ ТА ЕЗЕТИМІБУ В КОМБІНОВАНОМУ ЛІКАРСЬКОМУ ЗАСОБІ

3.1. УФ-спектрофотометрична методика одночасного визначення розувастатину кальцію та езетимібу в капсулах Розуліп Плюс

Було розроблено УФ-спектрофотометричну методику для одночасного кількісного визначення розувастатину кальцію та езетимібу в комбінованому препараті. Суть методики полягала у використанні капсул Розуліп Плюс, ФСЗ розувастатину кальцію та езетимібу та метанолу Р як компенсаційного розчину. При вивченні методики було отримано УФ-спектр поглинання випробовуваного розчину капсул Розуліп Плюс ($C_{розувастатину}$ =3.69 мкг/мл, $C_{езетимібу}$ = 6.25 мкг/мл). Максимум поглинання ФСЗ езетимібу (200 нм) та ФСЗ розувастатину кальцію (238 нм) разом з випробовуваними розчинами, зображені на рис 3.1 і 3.2, відповідно.

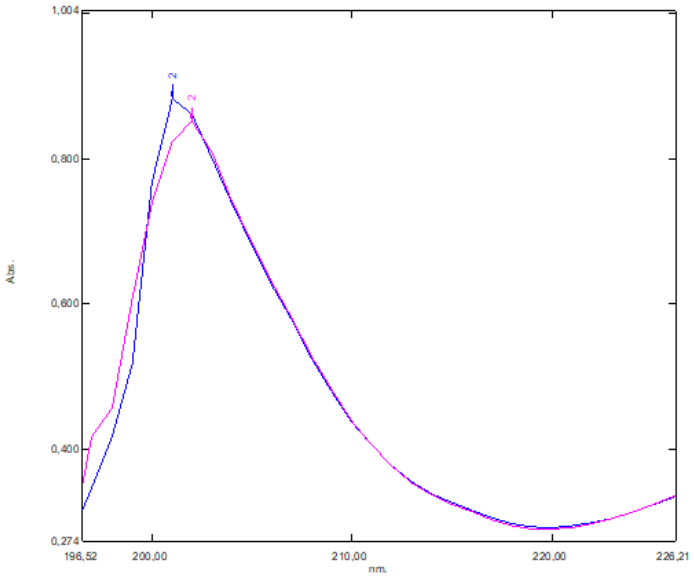

Рисунок 3.1 – Спектри поглинання ФСЗ езетимібу (синій) та випробуваного розчину таблеток Розуліп Плюс, що відповідає езетимібу (фіолетовий).

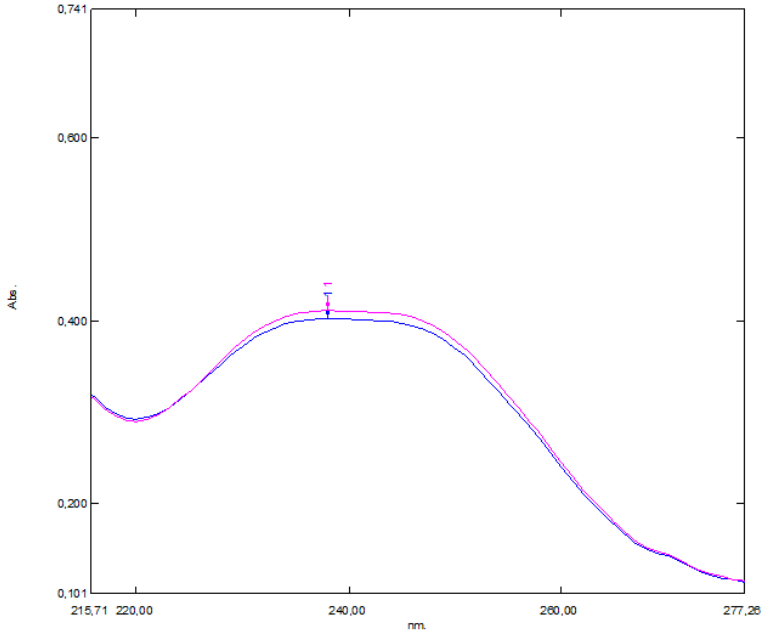

Рисунок 3.2 – Спектри поглинання ФСЗ розувастатину кальцію (фіолетовий) та випробуваного розчину капсул Розуліп Плюс, що відповідає розувастатину кальцію (синій).

Дослідження показало, що стійкість розчинів є ключовим чинником у спектрофотометричних методиках. Це важливо для забезпечення надійності досліджень на тривалий час. Якщо розчини нестабільні, розробка методики ускладнюється, але можливо зробити їх стабільними за допомогою додаткових стабілізуючих речовин. В даному випадку дослідженні розчини виявили стабільність протягом 45 хв, як показано для розувастатину кальцію і езетимібу на рисунках 3.3 та 3.4 відповідно.

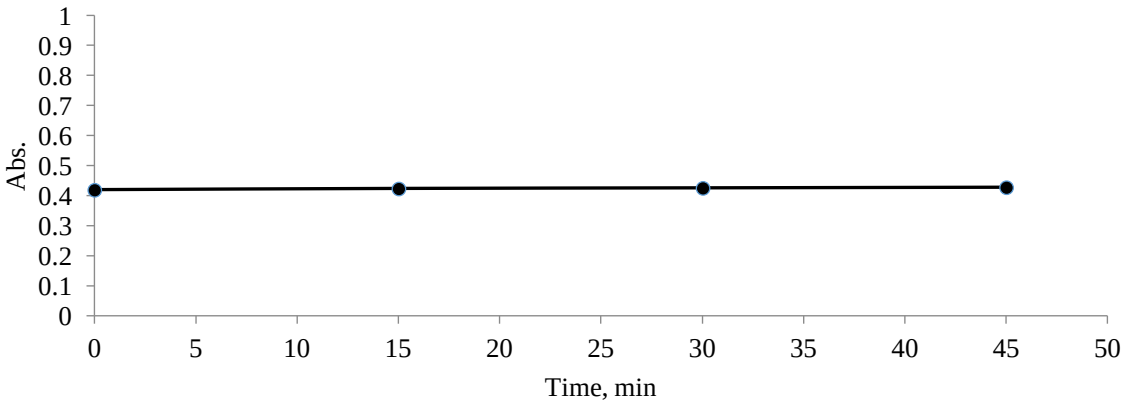

Рисунок 3.3 – Графік залежності поглинання від часу для розувастатину кальцію

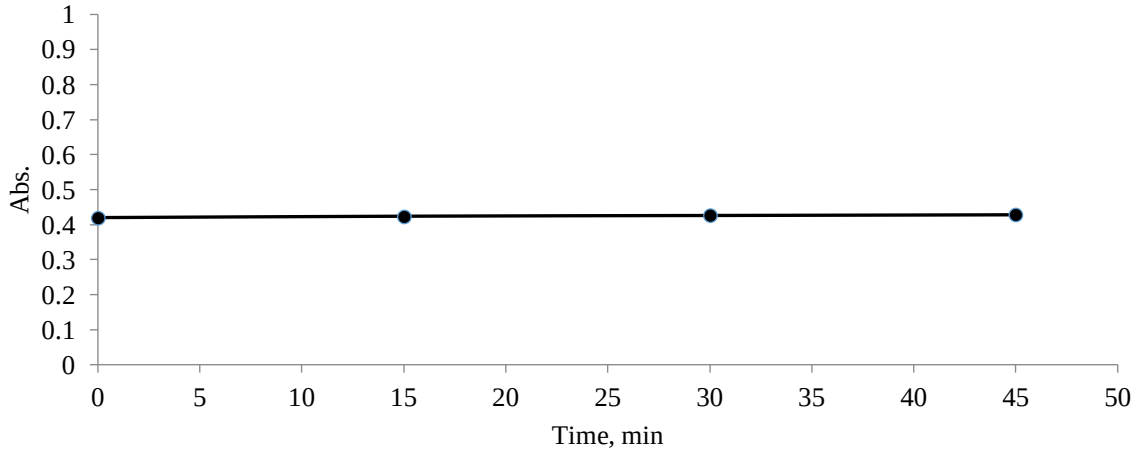

Рисунок 3.4 – Графік залежності поглинання від часу для езетимібу

Отримані результати свідчать про те що, дана аналітична методика може бути використана для одночасного кількісного визначення досліджуваних речовин в аналізованій лікарській формі, завдяки своїй безпечності, швидкості та економічній доступності.

3.2. Обчислення повної невизначеності методики

Обчислення невизначеності пробопідготовки проводиться з метою підтвердження коректності аналізу.

Розрахунок невизначеності пробопідготовки проводять для підтвердження коректності аналізу. Показник невизначеності кінцевої аналітичної методики ΔFAO= 0.7 %. Повна невизначеність аналітичної методики становила 2.9 %, що входить в межі невизначеності.

Найбільша невизначеність спостерігається в операціях 1 та 5, в яких проводиться взяття аліквоти. Одержані результати представлено у таблиці 3.1.
Як висновок, повна прогнозована невизначеність розробленої методики не перевищує значення встановлених критеріїв: ΔAs= 2.86 % ≤ maxΔAs = 3.2 %. Отже, запропонована спектрофотометрична методика є коректна.

Таблиця 3.1

Розрахунок «невизначеності пробопідготовки» для кількісного визначення розувастатину кальцію і езетимібу у капсулах Розуліп Плюс

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
Розчин порівняння езетимібу		
1) взяття наважки ФСЗ езетимібу	m_0	0.2 мг/12.5 мг * 100 % = 1.62
2) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 500.0 мл	500	0.07
3) взяття аліквоти піпеткою 2.5 мл	5.0	0.69
4) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 10.0 мл	10.0	0.5
Розчин порівняння розувастатину кальцію		
5) взяття наважки ФСЗ розувастатину кальцію	m_1	0.2 мг/12.3 мг * 100 % = 1.6
6) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 500.0 мл	500	0.07
7) взяття аліквоти піпеткою 1.5 мл	2.0	0.57
8) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 10.0 мл	10.0	0.5
Випробовуваний розчин препарату Розуліп Плюс		
9) взяття наважки ФСЗ препарату Розуліп Плюс	m_2	0.2 мг/25.0 мг * 100 % = 0.8
10) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 500 мл	500	0.07
11) взяття аліквоти піпеткою 5.0 мл	5.0	0.69
12) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 10.0 мл	10.0	0.5

3.3. Валідація розробленої методики одночасного кількісного визначення розувастатину кальцію та езетимібу в капсулах Розуліп Плюс

Розроблена аналітична методика була валідована відповідно з вимогами ДФУ [59] та ICH Q2 [60] за такими валідаційними характеристиками як специфічність, правильність та прецизійність, лінійність та діапазон застосування, робасність.

3.3.1. Валідаційний параметр «специфічність»

Для дослідження такого валідаційного параметру як специфічність спектрофотометричної методики одночасного визначення розувастатину кальцію та езетимібу в комбінованій ЛФ використали метод «плацебо» (розчин допоміжних речовин). Відповідно до отриманих результатів, значення δnoise дорівнює 0.22 % і 0.47 % відповідно, а критерії прийнятності не перевищують допустиму норму (не більше 0.5 %) (табл. 3.2). Отже, абсорбція допоміжних речовин має незначний вплив на кількісне визначення капсул Розуліп Плюс та свідчить про специфічність даної методики.

Таблиця 3.2

Результати вивчення валідаційного параметра «специфічність» спектрофотометричної методики одночасного визначення розувастатину кальцію та езетимібу в комбінованому ЛЗ

АФІ	Абсорбція плацебо (А плацебо)	Абсорбція розчину домішок ЛФ (А домішок)	Абсорбція розчину порівняння (Ast)	Знайдене значення δnoise, %	Критерій прийнятності
Розувастатин кальцію	0.002	-	0.440	0.22	не більше 0.5%
Езетиміб	0.002	-	0.420	0.47	не більше 0.5%

3.3.2. Валідаційні параметри «правильність та прецизійність»

Для підтвердження таких параметрів як правильність та прецизійність методики для спектрофотометричного визначення розувастатину кальцію і езетимібу в капсулах Розуліп Плюс приготували модельні розчини, які мають точно відому концентрацію та вміст АФІ – 70-130 %. Для перевірки правильності визначали систематичну похибку (δ)%, а для прецизійності – відносний довірчий інтервал (Δz) окремо для кожного АФІ.

Отримані результати правильності та прецизійності аналітичної методики визначення розувастатину кальцію і езетимібу в капсулах Розуліп Плюс наведено в табл. 3.3. і 3.4 відповідно.

Таблиця 3.3

Результати аналізу модельних сумішей і їх статистична обробка для кількісного визначення розувастатину кальцію в таблетках Розуліп Плюс

Модельні розчини	Вміст розувастатину кальцію, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100\%$
	введено, $X_i=(C_i /C_{rs}) 100\ \%$	знайдено, $Y_i =(A_i/A_{rs}) 100\ \%$	
M_1	69.94	69.98	100.05
M_2	80.34	80.27	99.91
M_3	90.35	90.15	99.77
M_4	95.10	95.30	100.21
M_5	100.06	100.10	100.03
M_6	104.50	105.06	100.53
M_7	110.21	110.33	100.10
M_8	120.15	120.35	100.16
M_9	129.82	130.06	100.18
Середнє значення, *Z, %*			100.1
Стандартне відхилення, S_z, *%*			0.21

Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\ \%, 8) \cdot S_z = 2.3060\ S_z, \%$	0.62
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \le \max\Delta_{As} = 3.2\ \%$	Виконується (0.62 < 3.2)
Систематична похибка $\delta = \lvert Z - 100 \rvert, \%$	0.1
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \le \max\delta\%$	Виконується (0.1< 0.51)
Загальний висновок про методику	Коректна

Таблиця 3.4

Результати аналізу модельних сумішей і їх статистична обробка для кількісного визначення езетимібу в таблетках Розуліп Плюс

Модельні розчини	Вміст езетиміб, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100\%$
	введено, $X_i=(C_i /C_{rs}) 100\ \%$	знайдено, $Y_i =(A_i/A_{rs}) 100\ \%$	
M_1	69.95	69.99	100.05
M_2	80.40	80.30	99.87
M_3	90.30	90.19	99.87
M_4	95.11	96.40	101.35
M_5	100.09	100.18	100.08
M_6	100.60	105.75	100.14
M_7	115.25	115.50	100.21
M_8	125.20	125.25	100.03
M_9	130.01	130.10	100.06
Середнє значення, *Z, %*			100.18
Стандартне відхилення, $S_z, \%$			0.07
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\ \%, 8) \cdot S_z = 2.3060\ S_z, \%$			0.16

Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max\Delta_{As} = 3.2\ \%$	Виконується (0.16 < 3.2)
Систематична похибка $\delta = \lvert Z - 100 \rvert$, %	0.18
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max\delta\%$	Виконується (0.18< 0.51)
Загальний висновок про методику	Коректна

Згідно результатів аналізу для розувастатину кальцію стандартне відхилення (S_z,) дорівнює 0.21 %, а середня похибка (δ) методу становить 0.01 %, а для езетимібу – 0.07 % і 0.18 % відповідно.

З метою підтвердження прецизійності розувастатину кальцію і езетимібу проводили дослідження на шести зразках однієї серії препарату, у різні дні, використовуючи різний мірний посуд. При цьому значення відносного довірчого інтервалу повинно бути меншим максимальної припустимої невизначеності результатів аналізу: $\Delta z \leq 3.2$ (табл. 3.5 і 3.6).

Таблиця 3.5

Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності для розувастатину кальцію

№ розчину	Величина Z_i , %		
	1 дослід	2 дослід	3 дослід
1	100.10	99.96	100.05
2	100.02	100.14	100.19
3	99.94	99.88	100.10
4	100.12	100.03	99.85
5	99.86	100.10	100.11
6	100.15	100.01	100.04
Середнє Z (%)	100.03	100.02	100.06
RSD_X, %	0.11	0.09	0.11
Відносне стандартне відхилення, RSD_Z (%)	0.1		
Відносний довірчий інтервал, Δ_Z	0.10≤3.2		
Критичне значення збіжності результатів Δ_{As}, %	3.2		

Таблиця 3.6

Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності для езетимібу

№ розчину	Величина Z_i , %		
	1 дослід	2 дослід	3 дослід
1	100.08	99.92	100.07
2	100.05	100.10	100.16
3	99.96	99.99	100.08
4	100.06	100.06	99.90
5	99.89	100.15	100.14
6	100.11	100.08	100.02
Середнє Z (%)	100.02	100.05	100.06
RSD_X, %	0.08	0.08	0.09
Відносне стандартне відхилення, RSD_Z (%)	0.08		
Відносний довірчий інтервал, Δ_Z	0.08≤3.2		
Критичне значення збіжності результатів Δ_{As}, %	3.2		

Отже, одержані результати свідчать про відповідність спектрофотометричної методики одночасного кількісного визначення розувастатину кальцію і езетимібу валідаційним параметрам – правильності та прецизійності.

3.3.3. Валідаційні параметри «лінійність та діапазон застосування»

Щоб провести дослідження лінійності препарату Розуліп Плюс, було застосовано метод модельних розчинів. В ході проведення аналізу лінійність спостерігалась в діапазоні концентрацій 2.45-4.90 мкг/мл для розувастатину кальцію та 4.90-7.36 мкг/мл для езетимібу. На рис. 3.5 зображено спектри адсорбції розчинів капсул Розуліп Плюс в метанолі і наведено лінійну залежність при відібраному об'ємі аліквоти від 1.0 до 2.0 мл.

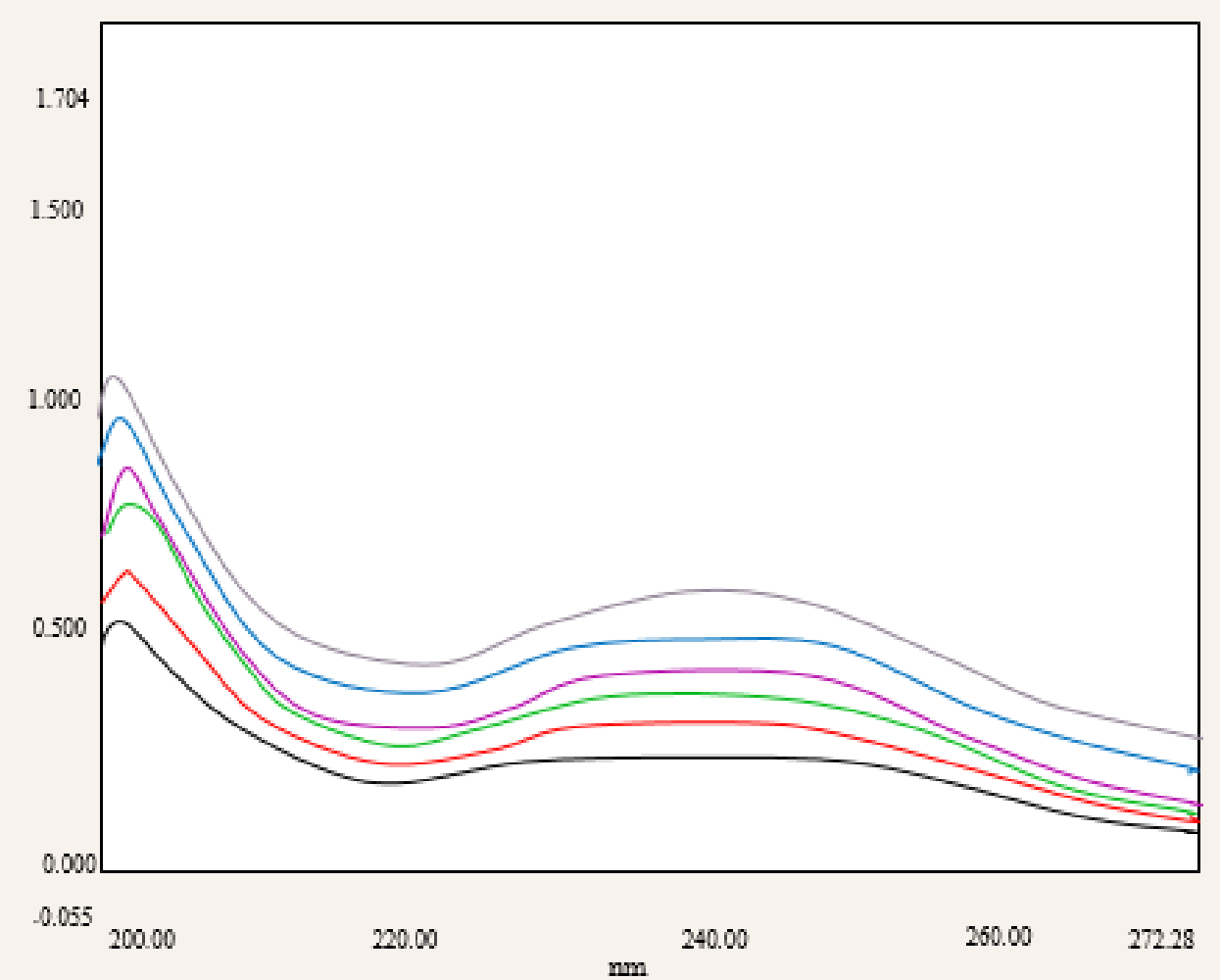

Рисунок 3.5 – Спектри поглинання розчинів капсул Розуліп Плюс в метанолі при вивченні лінійності спектрофотометричної методики. Об'єм аліквоти 1.0 мл (чорний), 1.2 мл (червоний), 1.4 мл (зелений), 1.6 мл (фіолетовий), 1.8 мл (блакитний), 2.0 мл (сірий).

На рис. 3.6 зображено графік лінійності розувастатину кальцію і спостерігається залежність поглинання від концентрації даної сполуки з 2.45 мкг/мл до 4.90 мкг/мл. Відповідно до цього дослідження показників МВ та МКВ проводили з використанням параметрів стандартного відхилення аналітичного сигналу (σ) та тангенсу нахилу регресійної прямої (b). Відтак, МВ становила 0,19 мкг/мл, а МКВ – 0,58 мкг/мл. Рівняння лінійної регресії виглядає:

$y = 0.1494x – 0.0002$, а коефіцієнт кореляції (R^2) становить 0.9990.

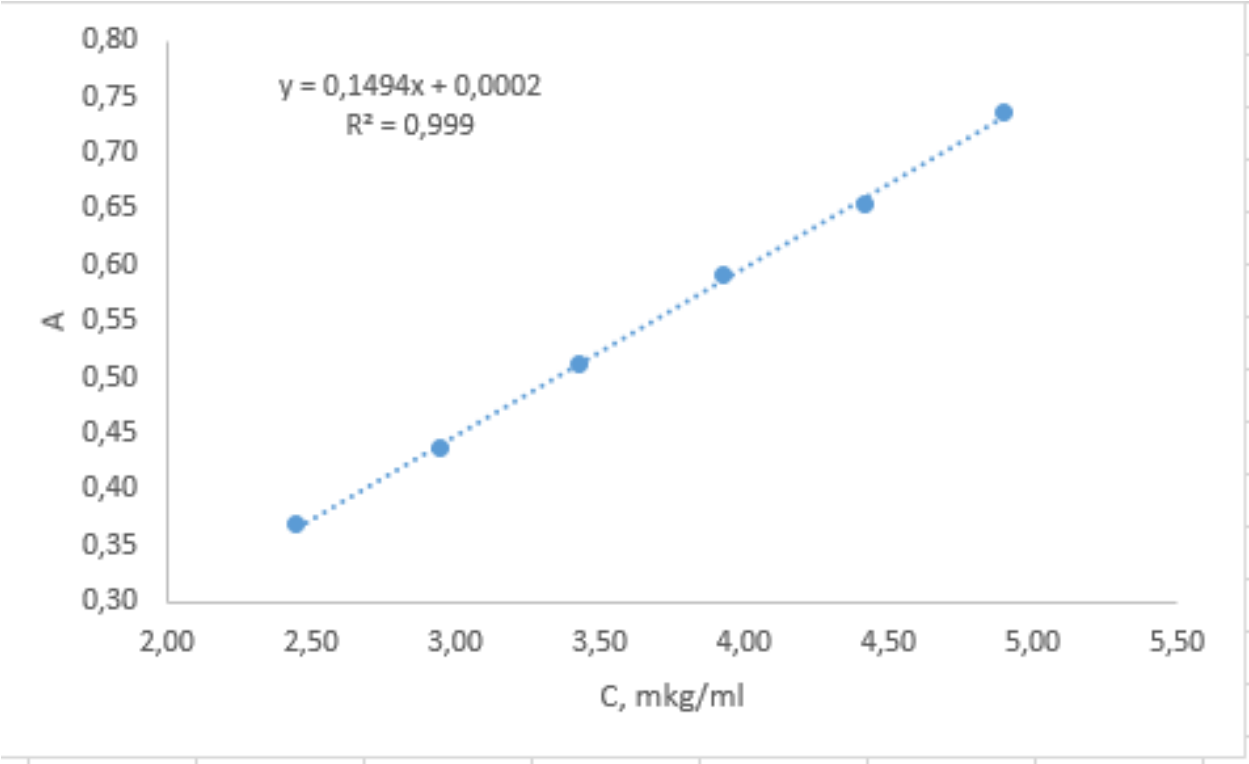

Рисунок 3.6 – Графік лінійності розувастатину кальцію

У таблиці 3.7 відображені отримані показники та розрахунки рівнянь лінійної регресії розувастатину кальцію.

Таблиця 3.7

Метрологічні характеристики лінійної залежності розувастатину кальцію

Величина	Значення	Критерій	Висновок (відповідає або не відповідає)
$b \pm (S_b)$	0.0002 ± (0.0087)	–	
$a \pm (S_a)$	0.1494 ± (0.0023)	$\|a\| \leq 2.6$	Відповідає
R^2	0,9990	> 0.9980	Відповідає
МВ (мкг/мл)	0.1932	–	
МКВ (мкг/мл)	0.5858	–	
Підпорядкування закону Бера в діапазоні концентрацій (мкг/мл)	2.45-4.90	–	

На рисунку 3.7 зображено графік лінійності езетимібу та спостерігається залежність поглинання від концентрації сполуки з 4.90 мкг/мл до 7.36 мкг/мл. Відповідно до цього, показники МВ та МКВ досліджували з використанням параметрів стандартного відхилення аналітичного сигналу (σ) та тангенсу нахилу регресійної прямої (b). Відтак, МВ становила 0,26 мкг/мл, а МКВ – 0,81 мкг/мл. При цьому рівняння лінійної регресії виглядає: y = 0.2159x – 0.9546, а коефіцієнт кореляції (R^2) становить 0.9993.

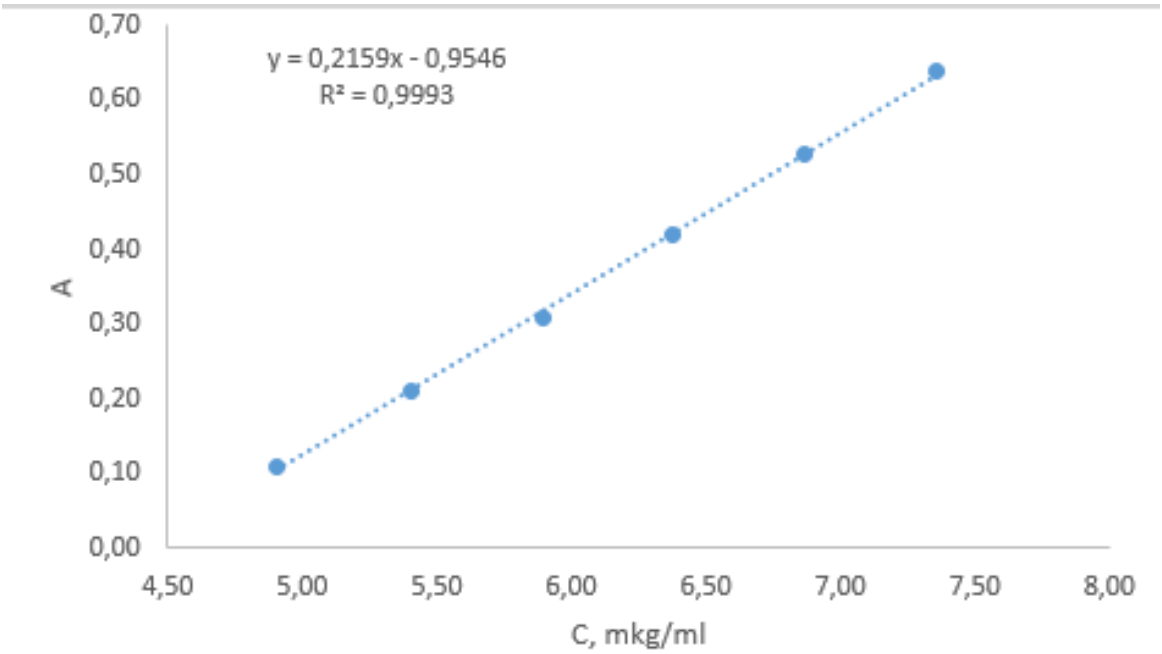

Рисунок 3.7 – Графік лінійності езетимібу

У таблиці 3.8 відображені отримані показники та розрахунки рівнянь лінійної регресії езетимібу

Таблиця 3.8

Метрологічні характеристики лінійної залежності езетимібу

Величина	Значення	Критерій	Висновок (відповідає або не відповідає)
1	*2*	*3*	*4*
$b \pm (S_b)$	0.9546 ±(0.0175)	–	

Продовження табл. 3.8

1	*2*	*3*	*4*
$a \pm (S_a)$	0.2159 ± (0.0028)	|a| ≤ 2.6	Відповідає
R^2	0.9993	> 0.9980	Відповідає
МВ (мкг/мл)	0.2679	–	
МКВ (мкг/мл)	0.8119	–	
Підпорядкування закону Бера в діапазоні концентрацій (мкг/мл)	4.90-7.36	–	

Після аналізу отриманих значень та результатів можна стверджувати, що спектрофотометрична методика кількісного визначення розувастатину кальцію та езетимібу в капсулах Розуліп Плюс відповідає параметрам лінійності.

3.3.4. Валідаційний параметр «робасність»

Для того, щоб підтвердити такий валідаційний параметр, як робастність для УФ-спектрофотометричної методики одночасного визначення розувастатину кальцію та езетимібу, було проведено дослідження стабільності в часі, аналіз розчинів проводився протягом 120-ти хв. Результати показали, що стабільність була збережена за вказаний час, це свідчить про робастність даної методики.

Результати аналізу стабільності вказані в таблиці 3.9 і 3.10.

Таблиця 3.9

Результати вивчення стабільності випробовуваного розчину розувастатину кальцію(1) та розчину ФСЗ розувастатину (2)

№	t, хв						A сер	RSD_t, %
	0	20	40	60	90	120		
1	0.440	0.446	0.448	0.449	0.450	0.449	0.447	0.83
2	0.435	0.441	0.446	0.450	0.440	0.442	0.442	1.17

Таблиця 3.10

Результати вивчення стабільності випробовуваного розчину езетимібу(1) та розчину ФСЗ езетимібу (2)

№	t, хв						A сер	RSD_t, %
	0	20	40	60	90	120		
1	0.420	0.425	0.426	0.430	0.425	0.426	0.425	0.75
2	0.415	0.417	0.421	0.425	0.430	0.418	0.421	1.34

3.4. Кількісний вміст розувастатину кальцію та езетимібу в капсулах Розуліп Плюс

Кількісний вміст розувастатину кальцію та езетимібу в капсулах Розуліп Плюс визначали за довжин хвиль 238 нм і 200 нм відповідно та із застосуванням як компенсаційного розчину метанолу Р. Одержані результати відображено в табл. 3.11.

Таблиця 3.11

Результати кількісного визначення розувастатину кальцію та езетимібу в капсулах Розуліп Плюс

Лікарський засіб	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
Таблетки «Розуліп Плюс» (EGIS) 10/10 мг, серія № T004A0823 розувастатин кальцію	0.0101 0.0103 0.0104 0.0101 0.0096 0.0102	$\underline{m}$ = 0.0101 г S = 2.79 x 10^{-4} t = 2.57 Δx = 1.17 x 10^{-4} RSD = 2.75 % ε = 2.89 %
Таблетки «Розуліп Плюс» (EGIS) 10\10 мг, серія № T004A0823 езетиміб	0.0101 0.0102 0.0105 0.0098 0.0104 0.0100	$\underline{m}$ = 0.0101 г S = 2.58 x 10^{-4} t = 2.57 Δx = 1.67 x 10^{-4} RSD = 2.54 % ε = 2.67 %

3.5. Визначення «зеленості» розробленої методики

При розробці спектрофотометричної методики для кількісного визначення субстанцій розувастатину кальцію та езетимібу було здійснено оцінку впливу аналітичного методу на довкілля. Це визначають за допомогою відповідності принципам «зеленої» хімії», а саме чи методика є безпечною та не несе шкоди для навколишнього середовища, та екологічні показники обраних розчинників. Для підтвердження екологічності методики використовували піктограму «зеленості» за методом AGREE.

Відповідно до методу AGREE на рисунку 3.8 зображено піктограму «зеленості».

Для аналізу найбільш суттєвим показником методу AGREE є 7 аналітична процедура, яка вказує на втрати розчинника. В процесі розробки методики було збільшено масу наважки через надто малий вміст діючих речовин у препараті, як наслідок через збільшення кількості розчинника 7 процедура виявила негативний результат, всі інші екологічні параметри в межах норми.

Рисунок 3.8 – Піктограма зеленості аналітичної методики згідно методу AGREE

Тому, згідно отриманих результатів аналітичної піктограми, УФ – спектрофотометрична методика одночасного кількісного визначення розувастатину кальцію та езетимібу у твердій ЛФ відповідає принципам «зеленої» хімії.

Висновки до розділу 3

1. Успішно розроблено метод УФ-спектрофотометрії для паралельного визначення розувастатину кальцію та езетимібу у препараті Розуліп Плюс.

2. Методика пройшла валідацію згідно з основними параметрами, включаючи специфічність, лінійність, діапазон застосування, точність, прецинзійність та стабільність.

3. Екологічність перевірено за допомогою методу AGREE, і результати підтверджують відповідність принципам «зеленої хімії».

4. Узагальнюючи, розроблена методика є простою, швидкою, доступною та екологічно чистою, і не потребує значних витрат на реактиви і обладнання.

ВИСНОВКИ

1. Було опрацьовано значну кількість наукових статей та публікацій, що дозволило в подальшому сформувати основну мету, цілі та завдання кваліфікаційної роботи з розробки УФ-спектрофотометричної методики одночасного кількісного визначення розувастатину кальцію та езетимібу в капсулах Розуліп Плюс.

2. Валідовано УФ-спектрофотометричну методику одночасного кількісного визначення розувастатину кальцію та езетимібу в комбінованому лікарському препараті Розуліп Плюс з використанням розчинника метанолу та максимумів поглинання за довжин хвиль 238 нм та 200 нм відповідно. Лінійність методики спостерігається в діапазоні концентрацій 2.45 - 4.90 мкг/мл для розувастатину кальцію (МВ становила 0.19 мкг/мл, а МКВ – 0,58 мкг/мл) і 4.90 - 7.36 мкг/мл для езетимібу (МВ становила 0,26 мкг/мл, а МКВ – 0,81 мкг/мл).

3. Досліджена методика кількісного визначення розувастатину кальцію та езетимібу в капсулах Розуліп Плюс в ході експерименту була відтворюваною, специфічною, економічно вигідною та відповідала усім валідаційним параметрам. Тому в майбутньому методика може бути використаною для подальших досліджень науковцями.

4. Розроблена УФ-спектрофотометрична методика кільікісного визначення розувастатину кальцію та езетимібу в комбінованому лікарському препараті Розуліп Плюс відповідає принципам «зеленої хімії» та є гарантом безпеки.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. McCallum, R. K., Kramer, A. I., Marchand, M., Akioyamen, L. E., Genest, J., & Brunham, L. R. (2023). Estimating the prevalence of hypercholesterolemia in Indigenous populations: a systematic review and meta-analysis. JACC: Advances, 2(3), 100315. URL: https://www.researchgate.net/publication/371099951_Estimating_the_Prevalence_of_Hypercholesterolemia_in_Indigenous_Populations
2. Boutari, C., Karagiannis, A., & Athyros, V. G. (2021). Rosuvastatin and ezetimibe for the treatment of dyslipidemia and hypercholesterolemia. Expert Review of Cardiovascular Therapy, 19(7), 575-580. URL: https://www.researchgate.net/publication/352252561_Rosuvastatin_and_ezetimibe_for_the_treatment_of_dyslipidemia_and_hypercholesterolemia
3. Chilbert, M. R., VanDuyn, D., Salah, S., Clark, C. M., & Ma, Q. (2022). Combination Therapy of Ezetimibe and Rosuvastatin for Dyslipidemia: Current Insights. Drug Design, Development and Therapy, 2177-2186. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35832642
4. Rached, F., & Santos, R. D. (2020). The role of statins in current guidelines. Current atherosclerosis reports, 22, 1-11. URL: https://www.goodrx.com/conditions/high-cholesterol/statin-guide
5. Cortese, F., Gesualdo, M., Cortese, A., Carbonara, S., Devito, F., Zito, A., ... & Ciccone, M. M. (2016). Rosuvastatin: Beyond the cholesterol-lowering effect. Pharmacological research, 107, 1-18. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26930419
6. Cardiovascular diseases. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9912858/
7. Rosuvastatin is an HMG-CoA reductase inhibitor. URL: https://go.drugbank.com/drugs/DB01098
8. Entry, D. I. L. (2019). Rosuvastatin (Crestor). Drug Discovery in Japan: Investigating the Sources of Innovation, 51. URL: https://www.researchgate.net/publication/336800341_Rosuvastatin_Crestor

9. Rosuvastatin. URL: https://www.statista.com/statistics/266552/astrazenecas-crestor-revenue/
10. Kurioka, T., Furuki, S., Sano, H., & Yamashita, T. (2023). Effect of statins on hearing outcome in patients with idiopathic sudden sensorineural hearing loss. Laryngoscope Investigative Otolaryngology, 8(6), 1631-1636. URL: https://www.rxhealthmed.ca/medication_search/sandoz-rosuvastatin/
11. Lee, Y. J., Hong, S. J., Kang, W. C., Hong, B. K., Lee, J. Y., Lee, J. B., ... & Hong, M. K. (2023). Rosuvastatin versus atorvastatin treatment in adults with coronary artery disease: secondary analysis of the randomised LODESTAR trial. bmj, 383. URL: https://bpac.org.nz/2022/rosuvastatin.aspx
12. Moon, J. S., Park, I. R., Kim, S. S., Kim, H. S., Kim, N. H., Kim, S. G., ... & Won, K. C. (2023). The Efficacy and Safety of Moderate-Intensity Rosuvastatin with Ezetimibe versus High-Intensity Rosuvastatin in High Atherosclerotic Cardiovascular Disease Risk Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized, Multicenter, Open, Parallel, Phase 4 Study. Diabetes & Metabolism Journal, 47(6), 818. URL: https://www.medicoverhospitals.in/medicine/rosuvastatin
13. Satheesh, Deekonda, et al. Synthesis and characterization of potential impurities of ezetimibe. Journal of Heterocyclic Chemistry, 2023, 60.2: 318-326. URL: https://www.researchgate.net/publication/364286319_Synthesis_and_Characterisation_of_Potential_Impurities_of_Ezetimibe
14. Sizar, O., Nassereddin, A., & Talati, R. (2018). Ezetimibe. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532879/
15. Merck and Schering-Plough Pharmaceuticals. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2213854/
16. Park, J. I., Lee, S. J., Hong, B. K., Cho, Y. H., Shin, W. Y., Lim, S. W., ... & Choi, Y. J. (2023). Efficacy and safety of moderate-intensity statin with ezetimibe combination therapy in patients after percutaneous coronary intervention: a post-hoc analysis of the racing trial. Eclinicalmedicine, 58. URL: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589537023001104

17. European Pharmacopoeia (2023). European Pharmacopoeia ed 11. – Access mode.URL: https://file.wuxuwang.com/yaopinbz/EP9/EP9.0_03__514.pdf
18. U.S. Pharmacopeia (2023). USP Monographs, Rosuvastatin Calcium Tablets. URL:https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/revisions/rosuvastatin-tabs-rb-notice.pdf
19. Mammone, F. R., Rotundo, P., Ferretti, R., Puxeddu, M., Silvestri, R., & Cirilli, R. (2023). Chemo-and enantio-selective reversed-phase HPLC analysis of rosuvastatin using a cellulose-based chiral stationary phase in gradient elution mode. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 225, 115239. URL: https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115239
20. Dikmen, G. Ö. K. H. A. N., & Uslu, O. (2021). The application of qNMR for the determination of rosuvastatin in tablet form. Turkish Journal of Chemistry, 45(1), 132-142. URL: https://www.researchgate.net/publication/349423542_The_application_of_qNMR_for_the_determination_of_rosuvastatin_in_tablet_form
21. Machairas, G., Panderi, I., Geballa-Koukoula, A., Rozou, S., Antonopoulos, N., Charitos, C., & Vonaparti, A. (2018). Development and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography method for the quantitation of impurities in fixed-dose combination tablets containing rosuvastatin and metformin. Talanta, 183, 131-141. URL: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.068
22. Dhoru, M. M., Parikh, M. P., Detholia, K. K., & Patel, P. J. (2023). development and validation of rp-hplc method for simultaneous estimation of rosuvastatin and teneligliptin in their synthetic mixture. Indian Drugs, 60(2). URL: https://www.researchgate.net/publication/369164236_ .
23. Soundarya, K., Kumar, H. T., & Manjunath, S. Y. (2022). New RP-HPLC method for the estimation of atazanavir sulphate in pharmaceutical dosage form. Research Journal of Pharmacy and Technology, 15(7), 2928-2932 URL: https://www.researchgate.net/publication/368861235_
24. Suares, D., & Prabhakar, B. (2016). Stability-Indicating assay method for determination of Rosuvastatin in Nano-formulation and pharmaceutical dosage

form by RP-HPLC. Int. J. PharmTech Res, 9, 265. URL: https://www.researchgate.net/publication/306979246_S.

25. Singh, R., & Khan, T. (2017). analytical method development and validation studies for the estimation of aspirin, clopidogrel bisulphate and rosuvastatin calcium in fixed dose combination (capsule) by uv spectroscopy. indian Drugs, 54(6).URL:https://www.researchgate.net/publication/330900035_.
26. Turabi, Z. M., O'hood Atef Khatatbeh, D. N., Al-Abed, M., Samaneh, M., Eshtaya, M. K., Akleek, A. I., & Nasassrah, A. A. A. (2014). RP-HPLC Method Development and Validation for the Determination of Atorvastatin (Calcium Trihydrate) in Pharmaceutical Dosage Forms. World J. Pharm. Res., 3, 1760-1772. URL: https://www.wjpps.com/Wjpps_controller/abstract_id/12869
27. Kansara, D., Chhalotiya, U., Kachhiya, H., & Patel, I. (2020). Development of TLC method fors simultaneous estimation of novel combination of amlodipine besylate, rosuvastatin calcium and fimasartan potassium in synthetic mixture. URL: https://www.acgpubs.org/article/journal-of-chemical-metrology/2020/2-july-december/development-of-tlc-method-for-simultaneous-estimation-of-novel-combination-of-amlodipine-besylate-rosuvastatin-calcium-and-fimasartan-potassium-in-synthetic-mixture
28. Bhardwaj, A., Jha, K. K., Panka, A., Agarwal, A., Singh, B., & Trivedi, N. (2017). Evaluation of standardization parameter of polyherbal digestive "churna". Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research, 5(02), 39-44. URL: https://academicjournals.org/journal/AJPP/article-in-press-abstract/rp_hplc_method_development_and_validation_for_the_simultaneous_estimation_of_atorvastatin_simvastatin_and_rosuvastatin_in_bulk_and_pharmaceutical_dosage_form
29. Konari, S. N., & Jacob, J. T. (2015). Application of analytical validated high-performance thin-layer chromatographic technique for the multicomponent analysis of cardiovascular drug combos in pharmaceutical dosage form. JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC, 28(5), 354-361. URL: https://doi.org/10.1556/1006.2015.28.5.3\

30. Naveen, P. V., & Ganapaty, S. (2021). Development and validation of a new stability indicating ultra-fast liquid chromatographic (RP-UFLC) method for the quantification of Rosuvastatin. Research Journal of Pharmacy and Technology, 14(3), 1673-1679. URL: https://rjptonline.org/AbstractView.aspx?PID=2021-14-3-86
31. Kishore, C. R., & Mohan, G. K. (2017). Structural identification and estimation of Rosuvastatin calcium related impurities in Rosuvastatin calcium tablet dosage form. Analytical chemistry research, 12, 17-27. URL: https://doi.org/10.1016/j.ancr.2016.11.002
32. Moodbidri, P. V., Dhayanithi, V., Pati, H. N., & Vasireddy, P. (2015). Development and Validation of Chiral Hplc Method for Quantitation of Enantiomer in Rosuvastatin Calcium. International Journal of Pharmaceutics and Drug Analysis, 275-281. URL: https://www.neliti.com/publications/409247/development-and-validation-of-chiral-hplc-method-for-quantitation-of-enantiomer
33. Karadas-Bakirhan, N., Gumustas, M., Uslu, B., & Ozkan, S. A. (2016). Simultaneous determination of amlodipine besylate and rosuvastatin calcium in binary mixtures by voltammetric and chromatographic techniques. Ionics, 22, 277-288. URL: https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.springer-doi-10_1007-S11581-015-1534-8
34. Pimpale, A., & Kakde, R. (2020). Stability-indicating method development and validation for the simultaneous estimation of rosuvastatin calcium and clopidogrel bisulfate in pharmaceutical dosage form by reverse-phase high-performance liquid chromatography. Asian J Pharm Clin Res, 13(9), 84-90. URL: https://journals.innovareacademics.in/index.php/ajpcr/article/view/33735
35. Haq, N., Shakeel, F., Alanazi, F., Alshora, D. H., & Ibrahim, M. A. (2018). Development and validation of a green RP-HPLC method for the analysis of rosuvastatin: a step towards making liquid chromatography environmentally benign. Green Processing and Synthesis, 7(2), 160-169. URL: https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/gps-2017-0023/html

36. Supe, D. R., Deshpande, P. B., Jadhav, S., & Swami, S. (2021). Stability indicating high performance thin layer chromatography method development and validation for estimation of rosuvastatin calcium as bulk drug and in tablet dosage form. European Journal of Biomedical, 8(9), 664-671. URL: https://www.ejbps.com/ejbps/abstract_id/8226
37. Singh, H., Gupta, R. D., & Gautam, G. (2018). Determination of Rosuvastatin Calcium in bulk and Pharmaceutical dosage forms by using UV-Spectrophotometric method. Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology, 4(1), 45-48. URL: https://www.academia.edu/38363989/Determination_of_Rosuvastatin_Calcium_in_bulk_and_Pharmaceutical_dosage_forms_by_using_UV_Spectrophotometric_method
38. Supe, D. R., Deshpande, P. B., Jadhav, S., & Swami, S. (2021). Stability indicating high performance thin layer chromatography method development and validation for estimation of rosuvastatin calcium as bulk drug and in tablet dosage form. European Journal of Biomedical, 8(9), 664-671. URL: https://www.academia.edu/66941619/Stability_Indicating_High_Performance_Thin_Layer_Chromatography_Method_Development_and_Validation_for_Estimation_of_Rosuvastatin_Calcium_as_Bulk_Drug_and_in_Tablet_Dosage_Form
39. Hassouna, M. K. M., Abdel-Mageed, A. I., & Salem, H. O. (2017). Indirect oxygen flask-atomic absorption spectrometric determination of Rosuvastatin calcium. Biomedical Journal of Scientific & Technical Research, 1(2), 248-253. URL: https://www.academia.edu/88022952
40. Hegazy, M. A., Bakr, M. A., Badawey, A. M., & Abbas, S. S. (2021). Univariate and multivariate assisted spectrophotometric methods for determination of rosuvastatin calcium and fenofibrate in bulk powders and tablets along with their degradation products. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 248, 119163. URL: https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119163
41. El-Abasawi, N. M., Attia, K. A., Abo-Serie, A. A., Morshedy, S., & Abdel-Fattah, A. (2018). Simultaneous determination of rosuvastatin and propranolol in their

binary mixture by synchronous spectrofluorimetry. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 198, 322-330. URL: https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.03.032

42. Rajput, G., Patel, P., Gupta, G. D., & Kurmi, B. D. (2022). A mini-review on simultaneous quantification of active pharmaceutical ingredients by UV and quality by design assisted HPLC method. Current Analytical Chemistry, 18(9), 939-955. URL: https://www.researchgate.net/publication/358939774_chemometric_assisted_method_development_and_validation_of_rosuvastatin_using_rp-hplc
43. Machado, T. C., Pizzolato, T. M., Arenzon, A., Segalin, J., & Lansarin, M. A. (2015). Photocatalytic degradation of rosuvastatin: Analytical studies and toxicity evaluations. Science of the Total Environment, 502, 571-577. URL: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.076
44. Halka L., Kucher T., Kryskiw L., Piponski M., Furdela I., Uglyar T., Poliak O., Logoyda L. Development of the spectrophotometric method for the determination of rosuvastatin in tablets by using bromophenol blue // ScienceRise: Pharmaceutical Science. - 2023. - Vol. 2 (42). – P. 11–19. URL: https://journals.uran.ua/sr_pharm/article/view/277461
45. Luo, Z., Deng, Z., Liu, Y., Wang, G., Yang, W., Hou, C., & Zhou, H. (2015). Development and validation of a novel stability-indicating HPLC method for the quantitative determination of eleven related substances in ezetimibe drug substance and drug product. Talanta, 139, 67-74. URL: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039914015001216
46. Magdy, G., Al-Enna, A. A., Belal, F., El-Domany, R. A., & Abdel-Megied, A. M. (2023). Analytical quality-by-design approach for development and validation of HPLC method for the simultaneous estimation of omarigliptin, metformin, and ezetimibe: application to human plasma and dosage forms. BMC chemistry, 17(1), 1-10. URL: https://www.researchgate.net/publication/370553553_Analytical_quality-by design_approach_for_development_and_validation_of_HPLC_method_for_the_s

imultaneous_estimation_of_omarigliptin_metformin_and_ezetimibe_application_to_human_plasma_and_dosage_forms

47. Janardhanan, V. S., Manavalan, R., & Valliappan, K. (2016). Chemometric technique for the optimization of chromatographic system: Simultaneous HPLC determination of Rosuvastatin, Telmisartan, Ezetimibe and Atorvastatin used in combined cardiovascular therapy. Arabian journal of chemistry, 9, S1378-S1387. URL: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535212000470
48. Atici, E. B., & Karlığa, B. (2015). Identification, synthesis and characterization of process related desfluoro impurity of ezetimibe and HPLC method validations. Journal of Pharmaceutical Analysis, 5(6), 356-370. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29403950/
49. Danafar, H. (2016). High performance liquid chromatographic method for determination of ezetimibe in pharmaceutical formulation tablets. Pharmaceutical and Biomedical Research, 2(3), 38-46. URL: https://pbr.mazums.ac.ir/article-1-121-en.html
50. Kublin, E., Malanowicz, E., Kaczmarska-Graczyk, B., Czerwińska, K., Wyszomirska, E., & Mazurek, A. P. (2015). development of chromatographic method for determination of drugs reducing cholesterol level--statins and ezetimibe. Acta Poloniae Pharmaceutica, 72(3), 429-437 URL: https://europepmc.org/article/med/26642651
51. Rapeti, D., Narayanarao, K. M. V., Shyamala, P., & Krishna, R. M. (2021). Identification of the organic volatile impurities in ezitamibe using GC-HS technique. Asian Journal of Chemistry, 33, 605-610. URL: https://hero.epa.gov/hero/index.cfm/reference/details/reference_id/8426125
52. Bhadoriya, A., Sanyal, M., Shah, P. A., & Shrivastav, P. S. (2018). Simultaneous quantitation of rosuvastatin and ezetimibe in human plasma by LC–MS/MS: Pharmacokinetic study of fixed-dose formulation and separate tablets. Biomedical Chromatography, 32(10), e4291. URL: https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bmc.4291

53. Zuin, V. G., Eilks, I., Elschami, M., & Kümmerer, K. (2021). Education in green chemistry and in sustainable chemistry: perspectives towards sustainability. Green Chemistry, 23(4), 1594-1608. URL: https://www.researchgate.net/publication/348691270_Education_in_Green_Chemistry_and_in_Sustainable_Chemistry_perspectives_towards_sustainability
54. Donato, L., Nasser, I. I., Majdoub, M., & Drioli, E. (2022). Green chemistry and molecularly imprinted membranes. Membranes, 12(5), 472. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35629798
55. P.T. Anastas, J.C Warner, Green Chemistry Theory and Practice, Oxford Unsversity Press, New York, 1998
56. Kharissova, O. V., Kharisov, B. I., Oliva González, C. M., Méndez, Y. P., & López, I. (2019). Greener synthesis of chemical compounds and materials. Royal Society open science, 6(11), 191378. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31827868
57. de Marco, B. A., Rechelo, B. S., Tótoli, E. G., Kogawa, A. C., & Salgado, H. R. N. (2019). Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. Saudi pharmaceutical journal, 27(1), 1-8. URL: https://www.acs.org/greenchemistry/what-is-green-chemistry/history-of-green-chemistry.html
58. Ezetimibe (compound) URL: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ezetimibe#section=Color-Form
59. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство „Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів". 2-е вид. Харків: Державне підприємство „Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів", 2015. Т. 1. 1128 с.
60. ICH [International Council of Harmonisation], Expert Working Group. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). 2005. Available from: https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/Q2(R1).pdf

ДОДАТКИ

Список публікацій за темою

Поліщук О.Р. Розробка УФ-спектрофотометричної методики одночасного кількісного визначення розувастатину кальцію та езетимібу в капсулах « Розуліп Плюс». Тез. доп. *XXVIII Конгрес студентів та молодих учених «Майбутнє за наукою»*.- Тернопіль, 8-10 квітня 2024р. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2024. – С. 202.