

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

Фармацевтичний факультет
Кафедра фармацевтичної хімії

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

проф. Логойда Л.С.

«20» травня 2024 р.

УДК 615.073/.73:543.48:615.218.2:615.453.6:54-438

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

На тему:

**Розробка методики спектрофотометричного визначення
левоцетиризину в таблетках з використанням етанольного
розчину бромфенолового синього**

Виконала здобувачка вищої освіти V курсу
очної форми навчання
спеціальності 226 Фармація, промислова фармація
Мовчан Тетяна Віталіївна

Науковий керівник:

к.біол.н, доцент, Михалків М.М.

ТЕРНОПІЛЬ 2024

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1 АНАЛІЗ ІСНУЮЧИХ ПІДХОДІВ ДО РОЗРОБКИ ТА ВАЛІДАЦІЇ МЕТОДІВ АНАЛІЗУ ЛЕВОЦЕТИРИЗИНУ ДИГІДРОХЛОРИДУ В ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	8
1.1 Загальна характеристика левоцетиризину.....	8
1.2 Огляд аналітичних методик аналізу левоцетиризину.....	11
1.3 Використання барвників, в тому числі й бромфенолового синього в аналізі субстанцій та лікарських засобів.....	19
1.4 Застосування принципів «зеленої» хімії під час розробки аналітичних методик визначення левоцетиризину в субстанціях та ЛЗ	21
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	24
2.1 Методологія дослідження.....	24
2.2 Фізико-хімічні властивості левоцетиризину дигідрохлориду.....	25
2.3 УФ-спектрофотометрична методика кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду в лікарських засобах	26
2.4 Методи вивчення «зеленості» аналітичної методики.....	27
РОЗДІЛ 3 РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ЛЕВОЦЕТИРИЗИНУ В ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ	28
3.1 Вибір умов спектрофотометричного визначення левоцетиризину дигідрохлориду з бром феноловим синім.....	28
3.2 Специфічність аналітичної методики	31
3.3 Визначення лінійності та діапазону застосування розробленої методики	32
3.4 Правильність та прецизійність аналітичної методики	33

3.5 Прогноз повної невизначеності розробленої методики.....	36
3.6 Визначення валідаційного параметра «робасність»	37
3.7 Визначення «зеленості» методики та оцінювання її впливу на навколишнє середовище та виконавців	40
ВИСНОВКИ.....	44
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	45
ДОДАТКИ.....	51

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- ЛЗ – лікарський засіб
- AGREE – Analytical GREEnness
- ГКС – глюкокортикостероїди
- ШКТ – шлунково-кишковий тракт
- ДФУ – Державна Фармакопея України
- РХ – рідинна хроматографія
- РФ – рухома фаза
- ВЕРХ-УФ – високоефективна рідинна хроматографія з УФ-детектуванням
- США – Сполучені штати Америки
- ЛП – лікарський препарат
- ЛФ – лікарська форма
- ICH – Міжнародна конференція з гармонізації технічних вимог до реєстрації лікарських препаратів для людини (International Conferense on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)
- УФ – ультрафіолетовий
- ОФ–ВЕРХ – оберненофазова високоефективна рідинна хроматографія
- БТС – бромтимоловий синій
- БФС – бромфеноловий синій
- БКЗ – Бромкрезоловий зелений
- LCD – левоцетиризину дигідрохлорид
- LC⁺ – катіон левоцетиризину
- АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт
- МВ – межа виявлення
- МКВ – межа кількісного визначення
- RSD – відносне стандартне відхилення (Relative Standart Deviation)

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Алергія – це аномальна реакція імунної системи, яка виникає через підвищену чутливість організму до алергенів. Упродовж останніх десяти років у країнах з високим рівнем промислового розвитку та урбанізації значний приріст випадків алергічних захворювань (поліноз, кропив'янка, набряк Квінке, алергічний риніт, atopічний дерматит і астма) став глобальною медико-соціальною проблемою, оскільки обумовив стрімке підвищення рівня захворюваності, інвалідизації, що вимагає значних витрат на лікування та профілактику. Найефективнішим методом в боротьбі з алергією є уникнення контакту з алергеном, проте в сучасному світі не завжди вдається реалізувати це, тому препаратами вибору для купірування патофізіологічних порушень, що виникають під час розвитку реакції гіперсенсibiliзації, є антигістамінні лікарські засоби. Одним із представників даної фармакологічної групи, що відзначився високою клінічною ефективністю є левоцетиризину дигідрохлорид. Дана лікарська речовина входить до складу монопрепаратів, а також може використовуватися в комбінованій терапії. Існує кілька методів кількісного визначення антигістамінних препаратів, зокрема левоцетиризину дигідрохлориду, за допомогою хроматографічних, спектрофотометричних, потенціометричних методів, проте актуальною все ще залишається проблема з модифікації уже існуючих методів або створення нових, які були б простими у виконанні й водночас вигідніші в економічному та безпечні в екологічному аспектах. Отже, розробка експресної, простої і доступної методики кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду з використанням безпечних для навколишнього середовища і недороговартісних реактивів є надзвичайно важливою.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Кваліфікаційна робота була виконана відповідно до плану науково-дослідної роботи кафедри фармацевтичної хімії Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України «Розробка і

валідація аналітичних та біоаналітичних методик визначення лікарських засобів; ідентифікація оригінальних функціональних похідних теофіліну з антирадикальними властивостями » (номер державної реєстрації 0124U000057).

Мета дослідження: розробка та валідація методики спектрофотометричного визначення левоцетиризину дигідрохлориду в таблетках за реакцією з етанольним розчином бромфенолового синього.

Завдання дослідження:

- здійснити аналіз наукових праць, Державної Фармакопеї України та фармакопейних видань інших держав, а також відповідної літератури, щоб розробити стратегію дослідження;
- вивчити та дослідити оптимальні умови для проведення експерименту, які є критичними для розробки УФ-спектрофотометричної методики кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду;
- валідувати розроблену методику згідно з параметрами валідації, встановленими Державною Фармакопеєю України, включаючи лінійність, діапазон застосування, межу виявлення, межу кількісного визначення, точність, робасність та правильність;
- оцінити екологічну безпеку та «зеленість» розробленої методики за допомогою методів еко-шкали та AGREE.

Об'єкт дослідження – обґрунтування підходів та розробка методики УФ-спектрофотометричного визначення левоцетиризину дигідрохлориду в таблетках з використанням етанольного розчину бромфенолового синього.

Предмет дослідження – таблетки левоцетиризину дигідрохлориду.

Методи дослідження: спектрофотометрія в УФ – області, валідація методики відповідно до параметрів ДФУ, регресійний аналіз, методи вивчення «зеленості» розробленої методики (AGREE (Analytical GREENess) й еко-шкали).

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше розроблено і валідовано УФ-спектрофотометричну методику кількісного визначення

левецетиризину дигідрохлориду за реакцією з етанольним розчином бромфенолового синього. Оцінено екологічну безпеку та «зеленість» запропонованої методики за допомогою AGREE – методу та аналітичної еко-шкали.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено оригінальну УФ-спектрофотометричну методику кількісного визначення левецетиризину дигідрохлориду з використанням етанольного розчину бромфенолового синього, яка є експресною, доступною та простою у виконанні, що дозволяє ефективно застосовувати її в рутинному аналізі акредитованими лабораторіями та науковцями в ході проведення експериментальних робіт.

Публікації. За темою кваліфікаційної роботи опубліковано 1 тези (Міжнародна Internet-конференція Modern Chemistry of Medicine) та 1 тези (Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку»).

Обсяг та структура кваліфікаційної роботи. Кваліфікаційна робота викладена на 44 сторінках, складається з вступу, трьох розділів, висновків, списку використаних джерел (всього 47 найменувань). Кваліфікаційна робота містить 9 рисунків та 8 таблиць.

РОЗДІЛ 1

АНАЛІЗ ІСНУЮЧИХ ПІДХОДІВ ЩОДО РОЗРОБКИ ТА ВАЛІДАЦІЇ МЕТОДІВ АНАЛІЗУ ЛЕВОЦЕТИРИЗИНУ В СУБСТАНЦІЯХ ТА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Загальна характеристика левоцетиризину

Алергічні захворювання посідають одну з лідируючих позицій у суспільстві та становлять небезпечну медико-соціальну проблему. Патофізіологічні порушення, що виникають, включають різноманітні проблеми, такі як: загрозову для життя анафілаксію, харчові алергії, різні форми астми, риніт, кон'юнктивіт, ангіоневротичний набряк, кропив'янку, екзему, еозинофільні розлади, а також алергію на ліки та чужорідні тілу речовини. За статистикою, близько 300 мільйонів людей у всьому світі страждають від астми, а приблизно від 200 до 250 мільйонів людей мають харчову алергію. Що стосується медикаментозних алергій, то вони вражають одну десяту частину населення, а риніт турбує близько 400 мільйонів людей [1]. Патогенез даної групи захворювань являє собою процес, що включає в себе взаємодію між антигеном та імунною системою організму. При виникненні алергічної реакції імунна система продукує надмірну кількість антитіл (зазвичай IgE), що призводить до вироблення клітинами медіаторів (наприклад, гістаміну), які викликають наступні симптоми: свербіж, набряк, кашель та інші [2,3].

Сьогодні виділяють різні категорії медикаментів для корекції алергічних порушень, які можна розподілити на дві групи залежно від типу алергічної реакції. До першої групи належать препарати, що є засобами вибору при реакціях негайного типу. Сюди належать: стабілізатори мембрани базофілів, антагоністи лейкотрієнових рецепторів, глюкокортикоїди та антигістамінні ЛЗ. Друга група включає ліки, які призначені для купірування реакцій сповільненого типу, іншими словами – імунодепресанти (ГКС, цитостатики) [4].

Найбільшою популярністю серед населення та поширеністю за застосуванням користуються антигістамінні ЛЗ, які за своїм механізмом дії мають здатність блокувати гістамінові рецептори (H1) і, таким чином, нівелюють деструктивну дію медіатора на клітини та перешкоджають розвитку патофізіологічних порушень, що супроводжують алергічну реакцію [5,6]. Представниками даної фармакологічної групи є дипразин, димедрол, діазолін, супрастин, фенкарол, тавегіл (I покоління); лоратадин, астемізол, цетиризин (II покоління); фексофенадин, біластин, левоцетиризин (III покоління) [7].

Великою популярністю серед населення в Україні користуються ЛЗ на основі левоцетиризину, тому що вони володіють високою клінічною ефективністю та є доступними за ціною політикою для всіх верств суспільства [8]. За хімічною будовою левоцетиризин являє собою лівообертаючий ізомер цетиризину, що є метаболітом гідроксизину – I покоління антигістамінних ЛЗ (похідні піперидину). За своїм механізмом дії левоцетиризин є антагоністом гістамінових H1-рецепторів, після взаємодії із якими медіатор гістамін втрачає здатність до активації даного виду рецепторів й, таким чином, унеможливорює виникнення таких ефектів, як: спазм гладеньких м'язів, підвищення проникності капілярів із їх подальшим розширенням, свербіж та еритему слизових оболонок й шкіри, ангіоневротичний набряк, тощо. У пацієнтів, що страждають на алергічний риніт, ЛЗ пригнічує чхання, зменшує сльозотечу та знижує частоту виділень із носової порожнини. Перевагою використання левоцетиризину дигідрохлориду є той факт, що він не здійснює токсичний вплив на міокард та, в порівнянні із препаратами I покоління, не проникає крізь гематоенцефалічний бар'єр й, таким чином, не проявляє седативну дію на організм, що дозволяє сміливо використовувати препарат особам, чия професійна діяльність потребує підвищеної концентрації уваги. При пероральному прийомі левоцетиризин досить швидко всмоктується в ШКТ, при цьому біодоступність сягає $\approx 100\%$. Починає діяти препарат вже через 12 хвилин, а протягом 54 хвилин досягає максимальної концентрації в крові. Одночасний прийом препарату разом із

їжею не впливає на ступінь всмоктування, проте зменшує швидкість адсорпції. Метаболізм 14,2 % від пероральної дози левоцетирину відбувається в печінці шляхом ароматичного окислення, О- та N-дезалкілювання або ж кон'югації з утворенням неактивних метаболітів таких, як: дигідродіол, N-оксид, гідроксиметокси похідне, гідрокси похідне, О-дезалкільоване похідне, тауриновий кон'югат, N-дезалкільоване та ароматичне гідроксильоване похідні. 85,8 % дози елімінується часто разом з сечею та рідше із калом в незміненому вигляді, частково у вигляді неактивних метаболітів. В середньому період напіввидення ЛЗ становить 7-10 годин, однак при порушенні функції нирок та печінки цей час може продовжуватися, що необхідно враховувати лікарям при підборі коректної дози даного ЛЗ пацієнтам із вищезгаданими патологіями. Рекомендована доза для дорослих та дітей від 12 років становить 5 мг, частота прийому – 1 раз на добу. Враховуючи той факт, що левоцетиризин практично не взаємодіє із ферментними системами цитохрому й іншими лікарськими засобами, ця властивість дозволяє застосовувати даний препарат разом із іншими фармакологічними групами препаратів, наприклад, із антибіотиками, антигельмінтними чи протигрибковими ЛЗ [9,12].

Відповідно до інформації, що представлена в Державному реєстрі лікарських засобів України, левоцетиризину дигідрохлорид входить до складу таких лікарських форм, як: порошки, таблетки, сиропи, оральні краплі та розчини. ЛП на основі левоцетиризину дигідрохлориду реалізуються в Україні під торговими назвами «L-ЦЕТ», «ЦЕТРИН», «ЦЕТРИЛЕВ НЕО», «КОНТРАХІСТ АЛЕРДЖІ®», «АЛЛЕРВЕЙ», «ЦЕТЛО®», «ЦЕТЛО® ПЛЮС», «АЛЛЕРСЕТ», «ЕРГОЦЕТАЛ», «СЕЗОНІЯ», «АЛЕРЗИН», «ЦЕЗЕРА®» «АЛЕРГОЛІК», «ЛАЗИН» та інші [10, 11].

На фармацевтичному ринку часто можна побачити комбіновані препарати левоцетиризину із фенілефрином, ібупрофеном та декстрометорфаном, котрі застосовуються для лікування простудних захворювань. Поєднання левоцетиризину разом із псевдоефедрином дозволяє усунути закладеність носа, а комбінація з монтелукастом є ефективною в

боротьбі з алергічним ринітом. Широке застосування в медичній практиці мають комбіновані оральні порошки «ХЕЛПЕКС® АНТИКОЛД НЕО МАКС» (в 1 саше (4 г) міститься парацетамол 650 мг, фенілефрин гідрохлорид 10 мг, левоцетиризин дигідрохлорид 1,25 мг), «ХЕЛПЕКС® АНТИКОЛД НЕО» (в 1 саше (4 г) міститься парацетамол 500 мг, левоцетиризин дигідрохлорид 1,25 мг, фенілефрин гідрохлорид 10 мг) та «ХЕЛПЕКС® АНТИКОЛД НЕО ДЛЯ ДІТЕЙ» (у 1 саше (2,5 г) входить 320 мг парацетамолу, 1,25 мг левоцетиризину дигідрохлориду) [11, 12].

1.2 Огляд аналітичних методик аналізу левоцетиризину

Оскільки левоцетиризин у фармацевтичній індустрії вважається золотим стандартом серед антигістамінних препаратів для профілактики і симптоматичного лікування алергічних хвороб, прийнято використовувати різні методи з метою ідентифікації, а також кількісного визначення даного лікарського засобу.

На субстанцію левоцетиризину дигідрохлориду в ДФУ не міститься монографії. У Європейській Фармакопеї запропоновано метод інфрачервоної абсорбційної спектрофотометрії, виявлення іонів хлоридів, а також дослідження енантімерної чистоти для ідентифікації субстанції. За допомогою методу рідинної хроматографії визначають енантімерну чистоту, як розчинник використовують *2-пропанол*, колонку обрано розміром: 0,25м × 4,6 мм. Як нерухому фазу застосовують целюлозне похідне силікагелю для хірального розділення R(5 μ m), а як рухому фазу – комбінацію з *діетиламіну P*, *кислоти трифтороцтової P*, *етанолу безводного P* та *гептану P* (0,1:0,3:10:90 об/об/об/об). РХ проводять при температурі 40 °С із швидкістю потоку РФ 1,0 мл/хв. Виявлення здійснюють спектрофотометрично при $\lambda = 230$ нм. Європейською Фармакопесєю кількісний аналіз левоцетиризину дигідрохлориду регламентовано проводити також за допомогою методу рідинної хроматографії [13].

Окрім Європейської Фармакопеї, монографія на левоцетиризину дигідрохлорид міститься також і в Фармакопеї США. Левоцетиризин ідентифікують за допомогою методу ІЧ-спектроскопії, енантімерної чистоти й визначаючи іони хлору. Визначаючи методом рідинної хроматографії енантімерну чистоту, варто уникати попадання прямих сонячних променів на розчин. Метод вимагає буферного розчину, який готують розчиняючи 1,5 г/л ацетату амонію у воді. Льодяною оцтовою кислотою створюють рН 4,8. Як рухому фазу використовують ацетонітрил і буфер у співвідношенні 30:70. Розміри колонки становлять 4,6 мм × 25 см. Рідинну хроматографію проводять зі швидкістю потоку 0,5 мл/хв при температурі колонки 30 °С. Детектування здійснюється при довжині хвилі 230 нм. Кількісний аналіз проводять за допомогою методу ВЕРХ-УФ. Розміри хроматографічної колонки, застосовуваної в методиці становлять 0.25 м × 4.6 мм. Рухому фазу складають *ацетонітрил, вода й 1 М розчин сірчаної кислоти Р (93: 6,6: 0,4)*. Довжина хвилі за якої проводять визначення: $\lambda = 230$ нм. Що стосується швидкості рухомої фази, то це значення сягає 1 мл/хв. Температурний режим: 30 °С [14].

Після детального аналізу наукових літературних джерел було виявлено, що значна частина методик, за якими проводять кількісне визначення левоцетиризину дигідрохлориду в таблетках та субстанціях, базується на використанні хроматографічних і спектрофотометричних методів аналізу. Зокрема, застосування спектрофотометричних методик характерне для дослідження монокомпонентних ЛП, тоді як хроматографічні методики актуальні для визначення комбінованих ЛФ, оскільки є більш селективними та специфічними.

Науковець Mane та співнауковці з метою кількісного визначення вмісту левоцетиризину дигідрохлориду запропонував простий, точний, специфічний УФ-спектрофотометричний метод. За розробленою методикою, левоцетиризину дигідрохлорид розчиняли у 0,1 М розчині хлоридної кислоти та вимірювали оптичну густину. Максимум абсорбції був при довжині хвилі 231 нм. Закон Бера був дотриманий в діапазоні 7,5 - 22,5 мкг/мл. Дослідження валідаційних

параметрів мали задовільний результат і підтвердили, що розроблений метод ефективний для рутинного аналізу левоцетиризину дигідрохлориду, адже є простим, специфічним, швидким, відтворюваним, точним, і до того ж недороговартісним [15].

Спектрофотометричну методику визначення левоцетиризину в лікарських формах було запропоновано вченими Mali, A. D., Bathe, R., Patil, M., & Tamboli, A. Розчини стандарту та зразка готувались в метанолі. Кількісне визначення препарату проводилось при довжині хвилі 230 нм, і значення площі під кривою, виміряні при 227-234 нм ($n=2$). Лінійність спостерігалась в діапазоні концентрацій від 5 до 25 мкг/мл ($r^2=0,998$ і $r^2=0,999$) для нульового порядку та площі під кривою. Перевірка методики здійснювалась згідно з рекомендаціями ІСН. Розроблена спектрофотометрична методика є простою, точною і чутливою, тому може застосовуватися для кількісного визначення левоцетиризину в таблетках [16].

Лірі разом із співавторами розробив УФ-спектрофотометричний методику, яка передбачала розчинення левоцетиризину дигідрохлориду в 0,1 М соляної кислоти, після чого отриманий розчин піддавався УФ-спектроскопічному аналізу. Виявлено було, що максимум поглинання знаходився при 231 нм, тому подальші дослідження проводили за даної довжини хвилі. Підкорення закону Бера спостерігалось в діапазоні концентрацій від 7,5 до 22,5 мкг/мл. Лінійність, була досліджена використовуючи рівняння регресії, що мало вигляд: $y = 0,0377x - 0,0043$, а коефіцієнт кореляції (R^2) набув значення 0,9992. Значення RSD становило менше 2 %. Дослідження валідаційних параметрів підтвердило простоту, специфічність, швидкість, відтворюваність, точність та економічну вигоду розробленої методики для рутинного аналізу левоцетиризину дигідрохлориду [17].

Єгипетські вчені пропонують визначати левоцетиризину дигідрохлорид спектрофотометрично з використанням 4 барвників сульфоталеїнового ряду: бромфенолового синього (БФС), бромкрезолового зеленого (БКЗ),

бромтимолового синього (БТС) і ксиленолового оранжевого. Рідинно-рідинна екстракція використовувалося для усунення впливу допоміжних речовин у випадку БКЗ і БТС, у випадку БФС використовували метод β -корекції. Підпорядкування закону Бера виконувалось в діапазонах концентрацій 0-38.88 мкг/мл, 4.62-41.56 мкг/мл, 0-46.66 мкг/мл і 0-46.66 мкг/мл для БФС, БКЗ, БТС і ксиленового оранжевого відповідно. Точність методики підкріплена значеннями RSD% (0.1-1.0 %). Значення екстракції становили 96.7-107.5 %. Статистичне порівняння результатів з еталонним методами при використанні t- і F-тестів вказало на відсутність істотної різниці в точності. Методи було перевірено та порівняно з попередніми спектрофотометричними методами [18].

Швидким, високоселективним, точним та чутливим методом є оберненофазова високоефективна рідинна хроматографія (ОФ-ВЕРХ), що успішно застосовується для кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду у плазмі крові людини та різноматних лікарських формах. Даний метод був представлений Jain, N. та іншими співавторами. Вилучення АФІ здійснювали шляхом рідинно-рідинної екстракції. Рухомою фазою була суміш із *ацетонітрилу, метанолу, та амонійно-ацетатного буферного розчину* (25:55:20). Розділення здійснювалось із використанням колонки Prontosil C-18 (4,6 x 250 мм, 5 мкм) як нерухомої фази, використовуючи ізократичне елюювання (швидкість потоку 1 мл/хв). Детектування здійснювалось за допомогою УФ-спектрометра, при довжині хвилі 232 нм. Час утримування аналіту в колонці становив 8 хвилин. Лінійність методики спостерігалась в діапазоні концентрацій 2-10 мкг/мл. Коефіцієнт кореляції (r^2) мав значення 0,9998. Межа виявлення (МВ) і межа кількісного визначення (МКВ) становили 0,0057 і 0,174 мкг/мл відповідно. Таким чином, розроблений метод придатний для кількісного аналізу левоцетиризину як у лікарських формах, так і в плазмі крові людини [19].

Ще один простий, експресний і точний ОФ-ВЕРХ метод був розроблений науковцем Pataskar, P та його співавторами для кількісного визначення левоцетиризину в таблетованій лікарській формі. Хроматографічне розділення

проводилось із використанням колонки Atlantis C 18 (4,6 x 100 мм, 3 мкм). РХ являла собою суміш з метанолу та води (70:30 об./об.). Швидкість потоку сягала 1000 мл/хв. Детектування проводилось при довжині хвилі 230 нм. Відповідно до рекомендацій ІСН було валідовано методику. Час утримання левоцетиризину дигідрохлориду становив 1,34 хвилини. Лінійності методики зберігалась в діапазоні концентрацій 50 - 150 мкг/мл. Показник відсоткової середньої відтворюваності становив 100 %. Коефіцієнти кореляції для обох компонент близькі до 1. Запропонований метод був валідований і успішно застосований для кількісного визначення левоцетиризину в таблетованих ЛФ [20].

Науковці KHORSHID, A. F., FOUAD, M., разом із співавторами створили потенціометричний метод для кількісного визначення катіону левоцетеризину (LC^+). Сенсори побудовані на основі іон-асоціацій (LC^+) із силікомолібденовою кислотою $H_4Mo_{12}O_{40}$ (сенсор 1) та з фосфомолібденовою кислотою $H_3Mo_{12}O_{40}$ (сенсор 2) із розчинником-медіатором трикрезилфаталатом. За допомогою даною методу можна проводити вивчення складу, часу утримування, рН, виявляти неорганічні катіони, органічні та білкові домішки температури. Потенціометричний метод має високу стабільність, низьку межу виявлення, високу відтворюваність, володіє вибірковістю, точністю та є недороговартісним. Запропонований метод показує задовільні результати відповідно до результатів фармакопейного методу [21].

Враховуючи потребу у простих, точних та недорогих методах для рутинного аналізу ЛЗ, що містять левоцетирезин, українськими вченими було розроблено методику, що базувалась на застосуванні редокс-титриметричних методів. Титрантом виступав гідрогенпероксомоносульфат калію ($KHSO_5$) у формі оксону (потрійна сіль $2KHSO_5 \cdot KHSO_4 \cdot K_2SO_4$). Суть методу полягала в тому, що додався відомий надлишок будь-якого з реагентів, і протягом визначеного часу залишковий реагент визначався йодометрично [22].

Науковцями Kannappan, V., Kanthiah, S. було розроблено та оптимізовано метод стереоселективної ВЕРХ для визначення енантіомерів цетиризину.

Хроматографічне розділення проводилось із використанням колонки Chiralpak AS-3R (150 × 4,6 мм, 3 мкм). Як розчинник застосовувалась суміш із ацетонітрилу (75–85%, об/об), метанолу (5–15%, об/об) та води (5–15%, об/об). Швидкість потоку рухомої фази – 1.0 мл/хв., довжина хвилі, при якій проводилось детектування, мала значення 235 нм. РФ являла собою суміш ацетонітрил–метанол–вода–оцтова кислота–діетиламін (85 : 10 : 5 : 0,1 : 0,1, об./об.). Представлений метод валідований відповідно до рекомендацій ІСН та успішно застосований з метою кількісного визначення енантіомерів цетиризину у ЛФ [23].

Оскільки левоцетиризин входить до складу комбінованих ЛФ, завдання розробки високоселективних, експресних, точних методів та модернізації існуючих методик не втрачає своєї актуальності. Даному дослідженню було приділено увагу вченим Patel, D. K та його співавторами. Ними було запропоновано метод ОФ - ВЕРХ для одночасного визначення амброксолу гідрохлориду, левоцетиризину гідрохлориду, фенілефрину гідрохлориду та парацетамолу в таблетках та порошках. Для дослідження використано колонку Nucleosil C18 (250 мм х 4,6 мм х 5 мкм). РФ складалась з метанолу та двоосновного безводного буфера фосфату натрію (65:35 об/об). Швидкість потоку - 1,0 мл/хв., а детектування здійснювалось за довжини хвилі 230 нм. Час утримування парацетамолу, левоцетиризину гідрохлориду, фенілефрину гідрохлориду та амброксолу гідрохлориду становив 3.117, 4.925, 6.217 та 12.308 хв. відповідно. Даний метод було валідовано і рекомендовано з метою кількісного визначення парацетамолу, левоцетиризину гідрохлориду, фенілефрину гідрохлориду та амброксолу гідрохлориду в комбінованій ЛФ [24].

Ще одну методику одночасного визначення вмісту парацетамолу, амброксолу гідрохлориду, левоцетиризину дигідрохлориду та фенілефрину гідрохлориду в таблетованій формі методом спектрофотометрії представили Anandakumar, K. та Veerasundari, P. Довжина хвилі спектрофотометричного детектування зразка становила 305,5 нм для парацетамолу, 321 нм для

амброксолу гідрохлориду, 244 нм для левоцетиризину дигідрохлориду та 280 нм для фенілефрину гідрохлориду в спектрофотометрії похідних першого порядку. У даному методі лінійність спостерігалася в діапазоні 20–140 мкг/мл для парацетамолу, 10–70 мкг/мл для амброксолу гідрохлориду, левоцетиризину дигідрохлориду та фенілефрину гідрохлориду. Відсоток відтворюваності знаходився в діапазоні від 98 до 102 %, а відсоток відносного стандартного відхилення для прецизійності та точності методу виявився менше 2 %. Метод валідований відповідно до рекомендацій ІСН та рекомендований для одночасного аналізу вищенаведених АФІ у комбінованих ЛП [25].

Спектрофотометричний метод для одночасного кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду та фенілефрину гідрохлориду в таблетках було представлено в наукових працях Dyade, G. K. Згідно з даними дослідження фенілефрину гідрохлорид максимально поглинався при 273 нм, а левоцетиризин дигідрохлорид - при 231 нм. Лінійність спостерігалась в діапазоні концентрацій 0–40 мкг/мл і 0 - 30 мкг/мл відповідно. Придатність методики була доведена валідацією [26].

Науковцем Manoharan, G. разом із його співавторами було розроблено метод визначення левоцетиризину та псевдоефедрину в таблетованій ЛФ за допомогою методу ОФ – ВЕРХ. Хроматографічне розділення проводили на колонці Thermo hypersil – Keystone C18 (250 x 4,6 мм, 0,5 мкм) в ізократичному режимі з використанням РФ: ацетонітрилу та 0,5 мМ фосфатного буфера 50:50 (% об./об.). Дослідження проводили використовуючи УФ-детектор при 257 нм. Лінійність для левоцетиризину та псевдоефедрину спостерігалась в діапазоні 5–25 мкг/мл та 120–600 мкг/мл відповідно. Відсоток відтворюваності становив 100.11 % і 110.04 % для левоцетиризину і псевдоефедрину відповідно [27].

Метод ОФ-ВЕРХ та УФ – спектрофотометрії для одночасного визначення доксофіліну, монтелукасту та левоцетиризину дигідрохлориду в ЛФ був запропонований Kumar, N. та його колегами. Розроблена і валідована методика, що базується на використанні спектрофотометричних і хроматографічних методів для одночасної оцінки доксофіліну, монтелукасту і левоцетиризину

дигідрохлориду у порошках та інших ЛФ володіє високою специфічністю, вибірковістю та надійністю [28].

У наступному дослідженні вченим Patel, N. K. Разом із співавторами запропоновано спектрофотометричну методику для одночасного визначення монтелукасту натрію і левоцетиризину дигідрохлориду у порошках та таблетованих ЛФ. Під час дослідження лінійність спостерігалась для обох речовин в діапазоні концентрацій 3-30 мкг/мл. Коефіцієнт кореляції становив 0,999. Відсоткове відтворення становило від 98.4 % - 100.5 % для монтелукасту натрію та 99.3 % - 101.25 % для левоцетиризину дигідрохлориду. RSD % становило менше 2 %, що є прийнятним. Значення МВ становило 0.993 мкг/мл і 0.361 мкг/мл, а МКВ 3.0 мкг/мл і 1.09 мкг/мл для монтелукасту натрію і левоцетиризину дигідрохлориду відповідно. Тож даний валідований метод можна використовувати для одночасного кількісного визначення вищенаведених компонентів в комбінованих ЛФ [29].

Окрім того, потенціометричний метод теж використовується для кількісного визначення фексофенадину, дезлоратадину та левоцетиризину. Дану методику представили у своїх наукових працях Sakur, A. A., Nashed, D., & Noureldin, I. Дослідження антигістамінних ЛЗ проводилось з використанням сконструйованих електродів із вугільної пасти. Лінійність спостерігалась в діапазоні концентрацій (5×10^{-6} – 1×10^{-2}) М для фексофенадину і дезлоратадину, (1×10^{-5} – 1×10^{-2}) М для левоцетиризину. МКВ становили ($2,17 \times 10^{-8}$ - $6,31 \times 10^{-8}$ - $3,3 \times 10^{-8}$) М відповідно. Варто зазначити, що дослідження з електродами продемонструвало високу селективність та відтворюваність (RSD < 2 %), стабільність і швидкість. Методику було валідовано та запропоновано як екологічну, швидку, просту та чутливу процедуру для кількісного визначення фексофенадину, дезлоратадину та левоцетиризину у їх чистому вигляді та в складі комбінованих ЛФ [30].

Грецькими науковцями було розроблено метод газової хромато-мас-спектрометрії для одночасного визначення 11 антигістамінних ЛЗ (дифенгідраміну, орфенадрину, хлорфеніраміну, диметиндену, меклозину,

гідроксизину, лоратадину, дезлоратадину, цетиризину, рупатадину та ебастину) у крові. Цей метод передбачає осадження білка з подальшою твердофазною екстракцією та двома стадіями елюювання з наступною дериватизацією. Відсоток відтворюваності перевищував 80 % для всіх досліджуваних антигістамінних препаратів. Лінійність для кожного антигістамінного ЛЗ знаходилась в діапазоні концентрацій між 5.00 і 1000.0 нг/мл з коефіцієнтом кореляції (R^2) вище 0,990. МВ та МКВ для кожного аналіту становили 1.50 та 5,00 нг/мл. Точність і прецизійність також були визначені та були менш ніж 6.5 і 11 % відповідно. Практичне значення даної методики полягає в успішному застосуванні під час розслідування клінічних та судово-медичних справ [31].

1.3 Використання барвників, в тому числі й бромфенолового синього в аналізі субстанцій та лікарських засобів

Сульфонфталеїнові барвники – лідери серед рН-індикаторів за поширеністю та використанням в аналітичній хімії, оскільки є стабільними, недорогими, мають хорошу реакційну здатність. Вони синтезуються шляхом реакції конденсації фенолів з ангітридами або хлорангітридами ортосульфобензойної кислоти. До найбільш відомих представників даної групи відносяться феноловий червоний, бромфеноловий синій, бромтимоловий синій, бромкрезоловий зелений, а також бромкрезоловий пурпурний, тимоловий синій, м-крезоловий пурпурний та о-крезоловий пурпурний [32].

На прикладі бромфенолового синього розглянемо детальніше сфери його застосування. Даний барвник змінює забарвлення залежно від рН розчину завдяки прототропної таутомерії, а також завдяки здатності двостадійно дисоціювати. Таутомерні форми БФС наведено на рис. 1.1. Крім цього, БФС поглинає світло в діапазоні 400-770 нм. та взаємодіє з різними хімічними речовинами, утворюючи йонні асоціати, що мають забарвлення. Здатність БФС взаємодіяти з ЛЗ основного характеру можлива через наявність рухомих протонів. З метою кількісного визначення за допомогою спектрофотометра

вимірюють оптичну густину продукту БФС з визначаючим компонентом, що в подальшому дозволяє точно встановити концентрацію аналізованої речовини. Більшість методик спектрофотометричного визначення ЛР та БФС базується на явищі екстракції забарвлених комплексів із використанням органічних розчинників [33]

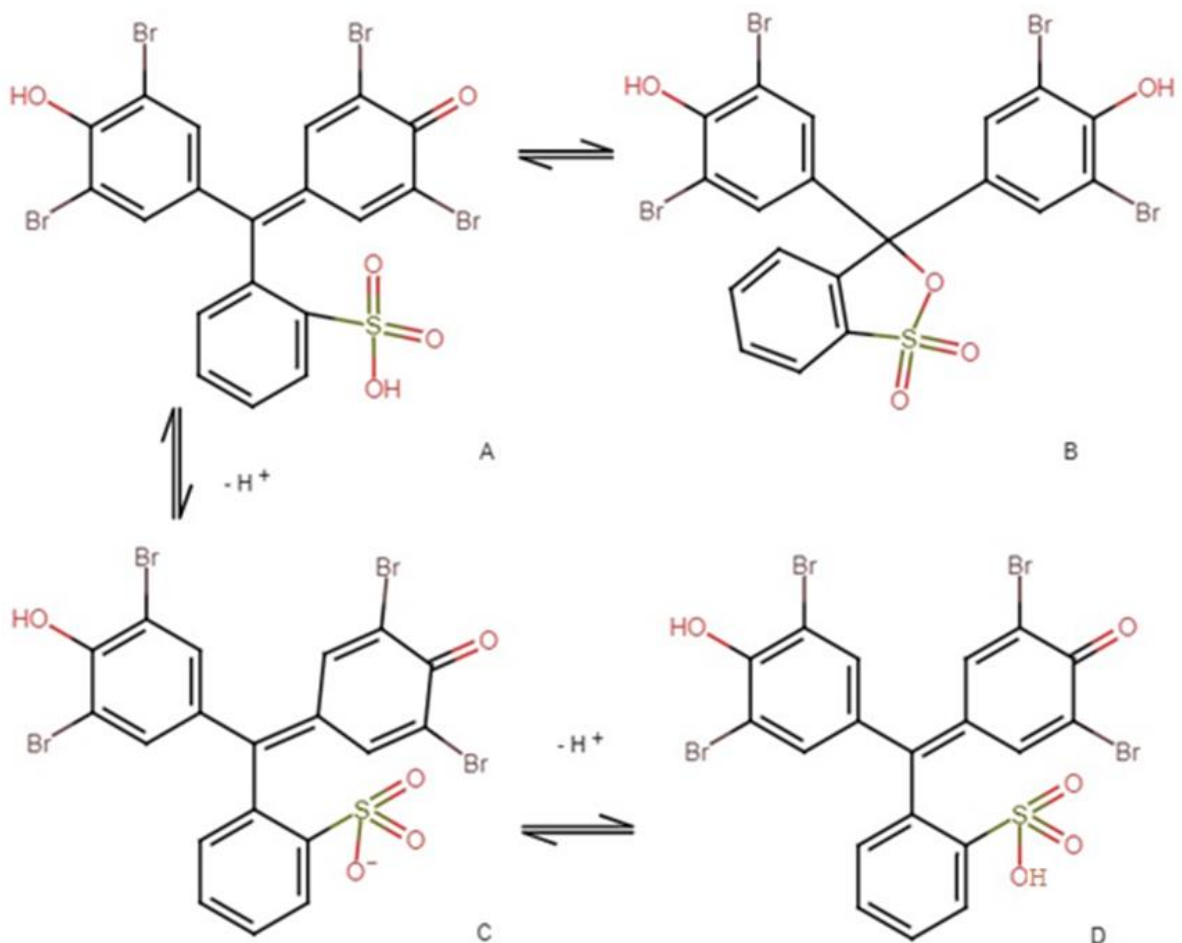


Рис. 1.1 – Таутомерні форми барвника сульфопталейнів БФС: А – хіноїдна форма, В – сульфонова форма, С і D – це хіноїдні форми БФС, які продисоціювали.

Реакції утворення іонних асоціатів з БФС закладені в спектрофотометричних методиках кількісного визначення таких речовин, як:

норфлоксацин, фостемсавір, серталін, пароксетину гідрохлорид, тадалафіл та інші [34 – 38].

1.4 Застосування принципів «зеленої» хімії під час розробки аналітичних методик визначення левоцетиризину в субстанція та ЛЗ

Під час розробки аналітичних методик чи синтезу нових речовин, одним із пріоритетних завдань, що постає перед аналітиком, є дотримання екологічної відповідальності. Усі етапи дослідження повинні відповідати принципам «зеленої хімії», оскільки їх ігнорування може призвести до небезпечних екологічних ризиків, включаючи як загрози для дослідників і забруднення довкілля, так і синтез продуктів, які можуть мати канцерогенну дію та бути шкідливими для споживачів. Оцінювання «зеленості» розроблених методик виконується за допомогою різних методів, таких як: Analytical Eco-Scale, GAPI, AGREE й інших, з метою оптимізації процесів та забезпечення екологічності [39, 40].

Зокрема, метод еко-шкали являє собою рейтингову шкалу з числовими значеннями від 1 до 100. На початку аналізу вважається, що методика має 100 балів, кожен пенальті-бал, віднімається за умови використання токсичних реагентів, великої кількості відходів, значного споживання енергії та ризиків для персоналу. Висновок робиться на основі загальної кількості штрафних балів після дослідження та вважається відмінним, коли методика набрала ≥ 75 балів. Використання Eco-Scale допомагає вдосконалити та розробити ефективні методики, враховуючи екологічну безпеку для виконавців експерименту та навколишнього середовища [41]

Зелена хімія — це концепція синтезу речовин і розробки нових методів та модернізації уже існуючих з мінімальних використанням та утворенням небезпечних речовин, зменшенням відходів та збереженням енергетичних ресурсів. Концепцію «зеленої хімії» вперше представив Анастас у 1991 році. В методі AGREE передбачено дотримання 12 принципів: 1 – запобігання

утворенню відходів, 2 – атомна економія, 3 – менш небезпечний синтез, 4 – розробка безпечних хімічних речовин, 5 – використання безпечних реагентів, 6 – енергоефективність, 7 – використання відновлюваної сировини, 8 – зменшення кількості дериватів, 9 – каталіз, 10 – деградація продуктів, 11 – аналіз у реальному часі для запобігання забрудненню та 12 – запобігання нещасним випадкам [42 – 43]

Оскільки сьогодні спостерігається тенденція до розвитку та застосування нових екологічних принципів, «біла хімія» інтегрує три основні аспекти: екологічність (зелене забарвлення), аналітичні характеристики (червоне забарвлення) та практичність (синє). Екологічність оцінюється за такими параметрами, як токсичність реагентів, енергоспоживання, кількість відходів та інші впливи на довкілля. Оцінка аналітичних характеристик здійснюється за точністю та відтворюваністю результатів, а практичність зосереджується на оцінці вартості, хронологічній ефективності та простоті використання. Ця концепція поєднує ці елементи для забезпечення високої якості та безпеки [44].

Таким чином, дотримання “зелених” та “білих” принципів у розробці нових та модернізації чинних методик допомагають дослідникам вирішити екологічні виклики, які стоять перед ними.

Висновки до розділу I

1. Левоцетиризину дигідрохлорид є високоефективним за клінічною ефективністю препаратом вибору при алергічних захворюваннях, що характеризується фінансовою доступністю та займає значну частку на фармацевтичному ринку за обсягом реалізації.

2. Згідно з даними наукових джерел, дослідження левоцетиризину дигідрохлориду найчастіше здійснюється із використанням методу ВЕРХ, УФ – спектрофотометрії. Ці методи мають низку переваг в аналізі, проте часто потребують застосування дорогавартісного обладнання і стандартних зразків, використання токсичних розчинників та реагентів. Усе значно впливає на хід дослідження.

3. Актуальним є завдання, що полягає в розробці простих та швидких, екологічних аналітичних методик, які дозволять одночасного досліджувати різні ЛЗ, відповідно до стандартів якості.

4. Аналіз наукових джерел вказав на переваги розробки експресної, простої у виконанні, доступної та «зеленої» методики спектрофотометричного визначення левоцетиризину дигідрохлориду.

5. Завдання, що полягає в розробці та валідації ефективної аналітичної методики для кількісного дослідження левоцетиризину дигідрохлориду, не втрачає актуальність та спонукає до пошуку і реалізації нових ідей.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Методологія дослідження

Для виконання експериментальної роботи, що базувалась на теоретичних аспектах, було створено дизайн дослідження, який складався етапів зображених на рисунку 2.1.

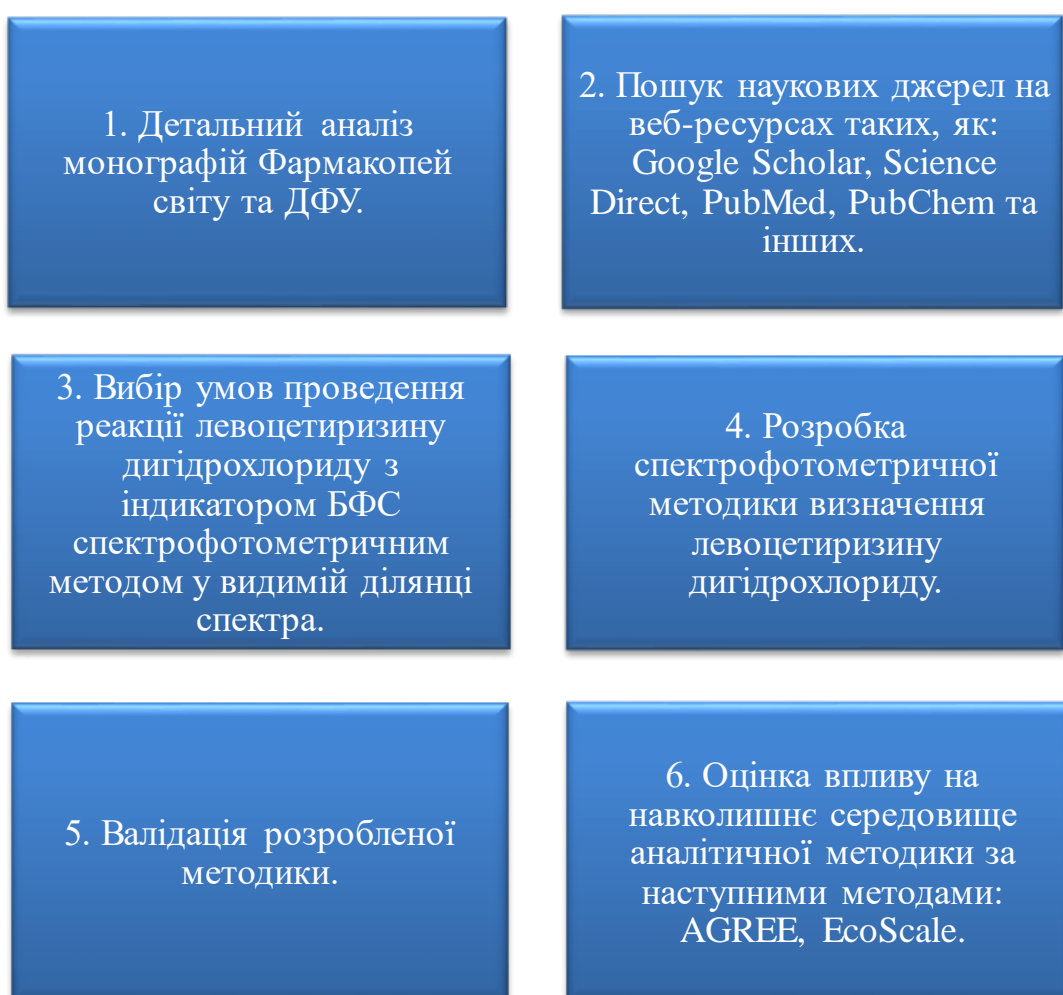


Рисунок 2.1 – Дизайн експерименту

2.2 Фізико-хімічні властивості об'єктів дослідження

Левоцетиризину дигідрохлорид

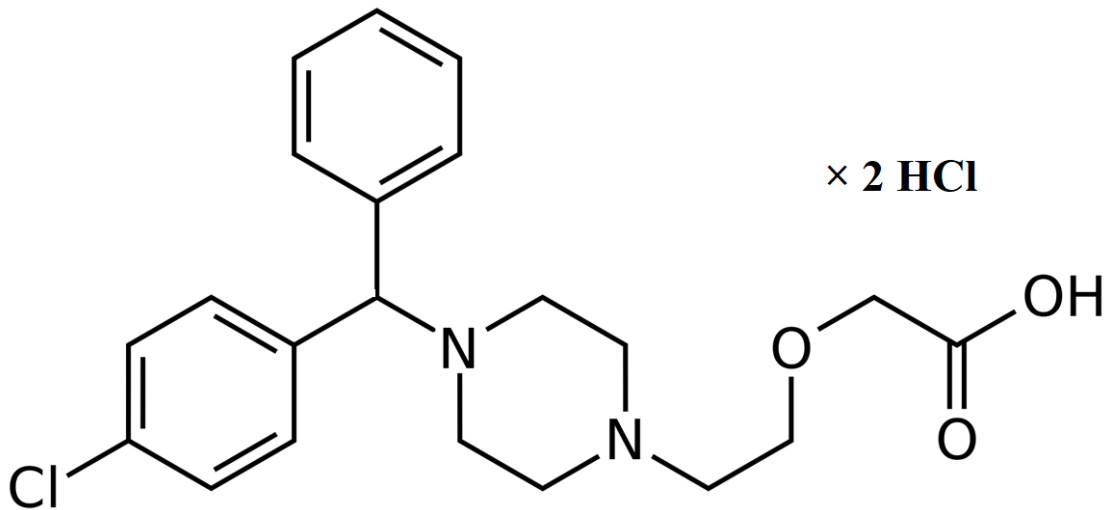


Рисунок 2.2 – Структурна формула 2-(2-{4-[(R)-(4-хлорофеніл)(феніл)метил]піперазин-1-іл} етокси)оцтової кислоти у вигляді солі дигідрохлориду (левоцетиризину дигідрохлориду)

Загальна формула левоцетиризину дигідрохлориду: $C_{21}H_{27}Cl_3N_2O_3$, молекулярна маса: 461.81 г/моль.

Левоцетиризин являє собою R-енантіомер цетиризину, що володіє більшою спорідненістю з рецептором гістаміну (H₁). За фізико-хімічними властивостями властивостями це білий чи майже білий кристалічний порошок, який є легкорозчинним у воді та практично нерозчинний у дихлорметані й ацетоні. Температура плавлення становить 225 °С. Значення показників констант кислотності та основності становлять 3.59 та 7.42 відповідно [45].

У різних країнах світу левоцетиризин реалізовується під різними торговими назвами. Найвідоміші з них: Xyzal, Levocetirizine, Lecetiriz, Glencet, Alcetirizine, Zodac Express, Allerway.

Під час роботи було використані таблетки Alerzin (5 мг), виробником яких являється угорська компанія Egis серії 3161C0722.

Використані у роботі реактиви та розчинники: БФС (№ Н0830“Honeywell Fluka”), етанол (“Honeywell Riedelde Haen”), етилацетат (“Honeywell Riedelde Haen”), хлороформ (“Honeywell Riedelde Haen”), ацетонітрил (“Honeywell Riedelde Haen”).

2.3 Спектрофотометрична методика визначення левоцетиризину в лікарських засобах за реакцією з етанольним розчином бромфенолового синього

Приготування випробовуваного розчину таблеток левоцетиризину дигідрохлориду: таблетки Alerzin 5 мг розтирали за допомогою ступки й товкачика, відважували на аналітичних вагах точну наважку еквівалентну 18.5 мг левоцетиризину дигідрохлориду й переносили в мірну колбу об'ємом 50.00 мл, далі розчиняли в 20 мл *етанолу Р* та доводили *етанолом Р* до позначки. Після вищевказаних дій проводили фільтрування приготованого розчину через паперовий фільтр, при цьому перші порції фільтрату відкидали. З наступних порцій фільтрату відбирали 0.50 мл розчину та переносили до мірної колби на мл, далі проводили додавання 1.00 мл 1.0×10^{-3} М розчину бромфенолового синього в *етанолі Р* та доводили *етанолом Р* до позначки, після чого добре перемішували.

Приготування розчину порівняння левоцетиризину дигідрохлориду: 37.00 мг ФСЗ левоцетиризину дигідрохлориду поміщали у мірну колбу ємністю 100.00 мл, проводили розчинення у *етанолі Р* та доводили тим самим розчинником до позначки, після чого перемішували. 0.50 мл розчину переносили до мірної колби об'ємом 10.00 мл, додавали 1.0 мл 1.0×10^{-3} М розчину БФС в *етанолі Р*, доводили *етанолом Р* до позначки та перемішували.

Приготування компенсаційного (1.0×10^{-4} М) розчину БФС: 33.60 мг БФС поміщали у мірну колбу місткістю 50.00 мл, розчиняли в 20 мл *етанолу Р* та доводили *етанолом Р* до позначки, перемішуючи.

Вимірювали абсорбцію випробовуваних розчинів та розчину порівняння за аналітичної довжини хвилі 426 нм проти компенсаційного розчину

2.4 Методи вивчення «зеленості» аналітичних методик

Екологічну безпеку розробленої УФ – спектрофотометричної методики на довілля та виконавців експерименту оцінювали використовуючи метод еко-шкали [41] та AGREE – метод [40].

РОЗДІЛ 3

ПРОЦЕДУРА РОЗРОБКИ ТА ВАЛІДАЦІЇ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ЛЕВОЦЕТИРИЗИНУ ДИГІДРОХЛОРИДУ В ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ ТА СУБСТАНЦІЯХ

3.1 Вибір умов спектрофотометричного визначення левоцетиризину дигідрохлориду з бромфеноловим синім

Для того, аби дослідити реакцію взаємодії левоцетиризину дигідрохлориду із БФС, необхідно було підібрати певні умови, щоб розроблений метод давав задовільні результати. Перебіг реакції суттєво залежить від такого параметру, як вибір розчинника, оскільки він забезпечує отримання забарвленого комплексу, сприяючи взаємодії між левоцетиризином дигідрохлоридом та барвником – бромфеноловим синім.

В ході експерименту були апробовані такі органічні розчинники, як ацетонітрил, етанол, етилацетат та хлороформ. На рис. 3.1 зображена кореляція величини абсорбції комплексу левоцетиризину дигідрохлориду з БФС у вищезгаданих розчинниках. Зважаючи на принципи «зеленої хімії» й максимум поглинання, було встановлено, що найбільш оптимальним органічним розчинником, придатним для використання в ході розробки методики, виявився етанол.

Як було вже зазначено, визначити левоцетиризину дигідрохлорид в субстанціях і ЛЗ можливо за допомогою барвника сульфоталеїнового ряду – бромфенолового синього, оскільки при їхній взаємодії утворюється малорозчинний у воді забарвлений комплекс. Згідно з спектром поглинання комплексу левоцетиризину дигідрохлориду із БФС (рис. 3.2), найбільш інтенсивно адсорбція продукту відбувається за аналітичної довжини хвилі 426 нм, що і є максимумом поглинання.

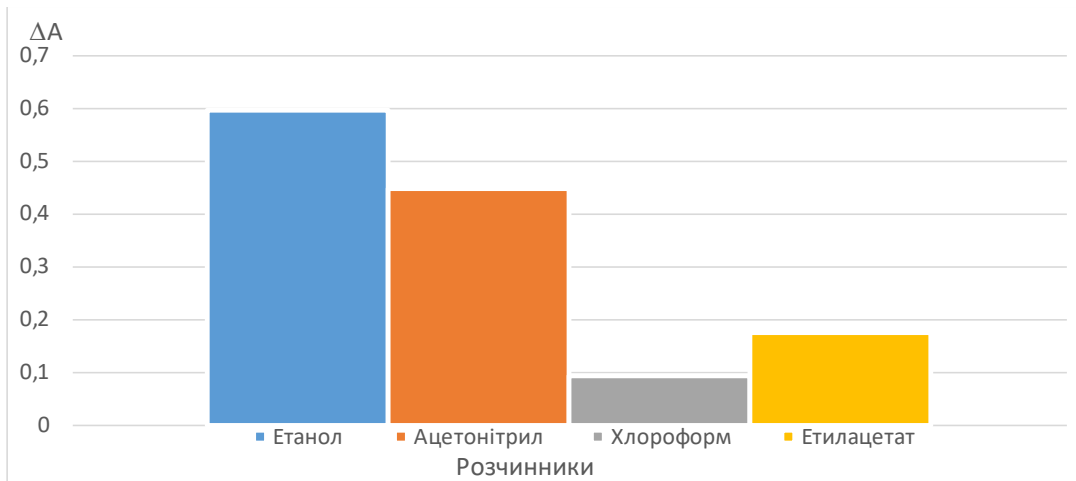


Рис. 3.1 – Абсолютні значення поглинання левоцетиризину дигідрохлориду з БФС у зазначених розчинниках

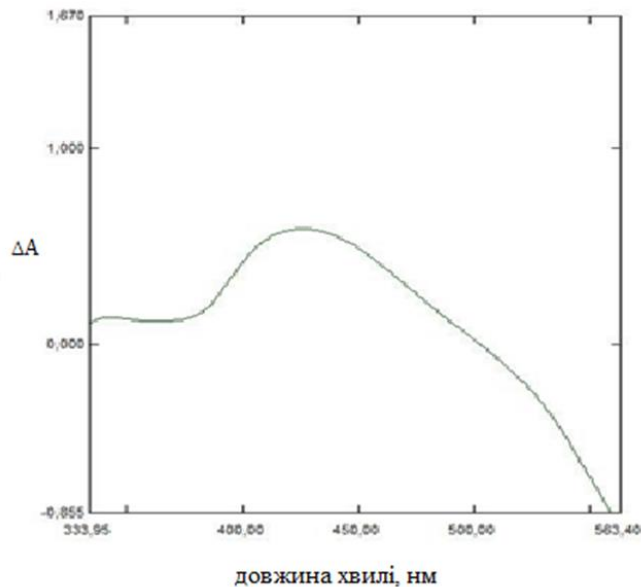


Рис. 3.2 – Спектр поглинання продукту реакції левоцетиризину дигідрохлориду з етанольним розчином БФС

Важливою умовою, від якої залежала розробка методики, було знаходження концентрації БФС відносно концентрації левоцетиризину дигідрохлориду при довжині хвилі 426 нм за умови, що між ними буде спостерігатись рівність. Експериментально було встановлено, що задовільною для аналізу є концентрація 1.00×10^{-4} моль/л.

Застосовуючи метод Жоба (ізомольярних серій) і метод молярних співвідношень (насичення) проводилось дослідження оптимального

стехіометричного співвідношення, за якого утворюється комплекс між левоцетиризином дигідрохлоридом та БФС. Відповідно до методу ізомолярних серій були приготовані модельні розчини левоцетиризину дигідрохлориду та БФС, молярна концентрація яких становила 1.00×10^{-4} М. Далі проводили перемішування розчинів дотримуючись співвідношення від 1/5 до 5/1 так, щоб загальний об'єм залишився незмінний. Одержані розчини спектрофотометрували за довжини хвилі 426 нм. Графік залежності абсорбції досліджуваних розчинів від їх ізомолярного складу наведено на рис 3.3.

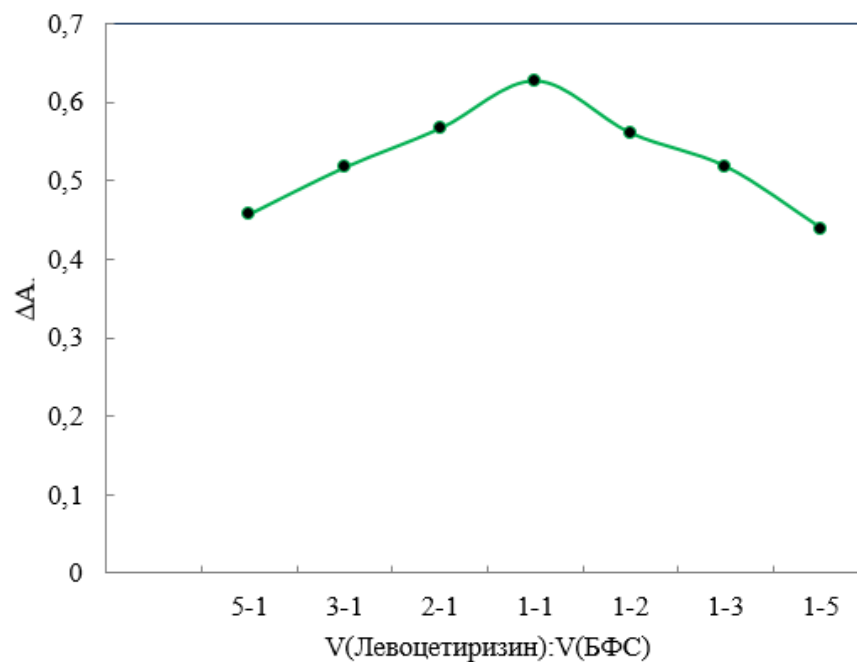


Рис. 3.3 – Графік залежності абсорбції від складу ізомолярного розчину (за методом Жоба) за довжини хвилі 426 нм

За допомогою методу насичення (методу молярних співвідношень) було проведено дослідження кореляції між абсорбцією та концентрацією аналіту (левоцетиризину дигідрохлориду) відносно незмінної концентрації БФС. Аналогічно проводилось визначення залежності поглинання світла від концентрації бромфенолового синього відносно постійної концентрації АФІ. Криві насичення, які були отримані в ході дослідження за методом молярних співвідношень зображено на рисунку 3.4.

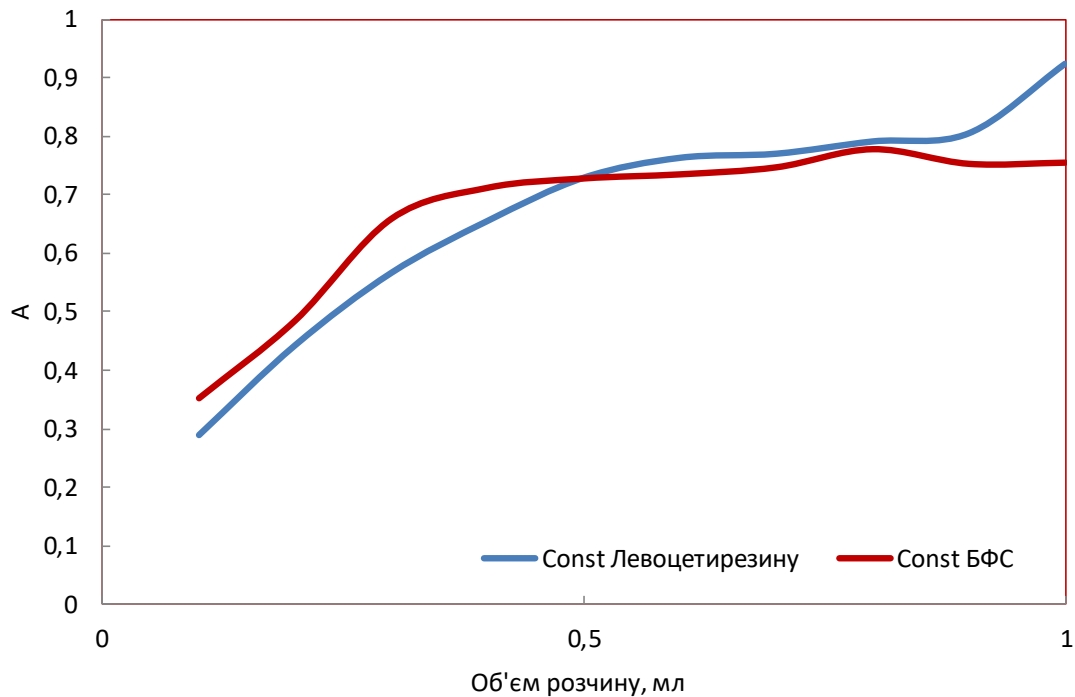


Рис. 3.4 – Криві насичення (крива синього кольору - розчин левоцетирезину дигідрохлориду при постійній концентрації БФС ($1,00 \times 10^{-4}$ М розчину)); крива червоного кольору - розчин БФС при незмінній концентрації левоцетирезину дигідрохлориду ($1,00 \times 10^{-4}$ М розчину)

Згідно із результатами дослідження, що наведені на рисунках 3.3 та 3.4 з'ясовано, що компоненти левоцетирезин та БФС реагують стехіометрично у співвідношенні 1:1.

Валідація розробленої спектрофотометричної методики визначення левоцетирезину за реакцією з етанольним розчином БФС проводилась за наступними параметрами: специфічність, лінійність, діапазон застосування, правильність і прецизійність, робастність відповідно до ДФУ [46] та ІСН [47].

3.2 Специфічність аналітичної методики

Для того, аби підтвердити валідаційний параметр «специфічність» для спектрофотометричної методики кількісного визначення левоцетирезину дигідрохлориду за реакцією з етанольним розчином БФС, проводилось вимірювання оптичної густини приготованого розчину, що містили лише

допоміжні речовини, тобто «плацебо». У таблиці 3.1 представлено дані, які були одержані в ході дослідження.

Таблиця 3.1 – Результати вивчення специфічності для спектрофотометричної методики визначення левоцетиризину дигідрохлориду в таблетках за допомогою використання етанольного розчину БФС

Абсорбція плацебо (А плацебо)	Абсорбція розчину порівняння (Ast)	Знайдене значення δ_{noise} , %	Критерій прийнятності
0.001	0.627	0.16	не більше 0.5 %

Згідно з результатами вивчення специфічності, було встановлено незначний вплив допоміжних речовин при кількісному визначенні АФІ, оскільки поглинання «плацебо» входить в діапазон встановленого критерію прийнятності ($\delta_{\text{noise}} = 0.16$ % при максимально допустимому значенні 0.5%)

3.3 Визначення лінійності та діапазону застосування розробленої методики

Валідаційний параметр «лінійність» вивчався протягом діапазону, в якому концентрація приготованих модельних розчинів варіювала від значення 4.62 до 32.35 мкг/мл, за допомогою методу найменших квадратів. Відповідно до цього, рівняння лінійної регресії набуло вигляду $y = 0.0354x - 0.019$. Після проведення обчислень був визначений коефіцієнт кореляції (R^2), значення якого становило 0.999. Межа виявлення (МВ) левоцетиризину дигідрохлориду сягає значення 0.95 мкг/мл, а межа кількісного визначення (МКВ) – 2.87 мкг/мл. На рис. 3.5 зображено графік лінійності левоцетиризину дигідрохлориду.

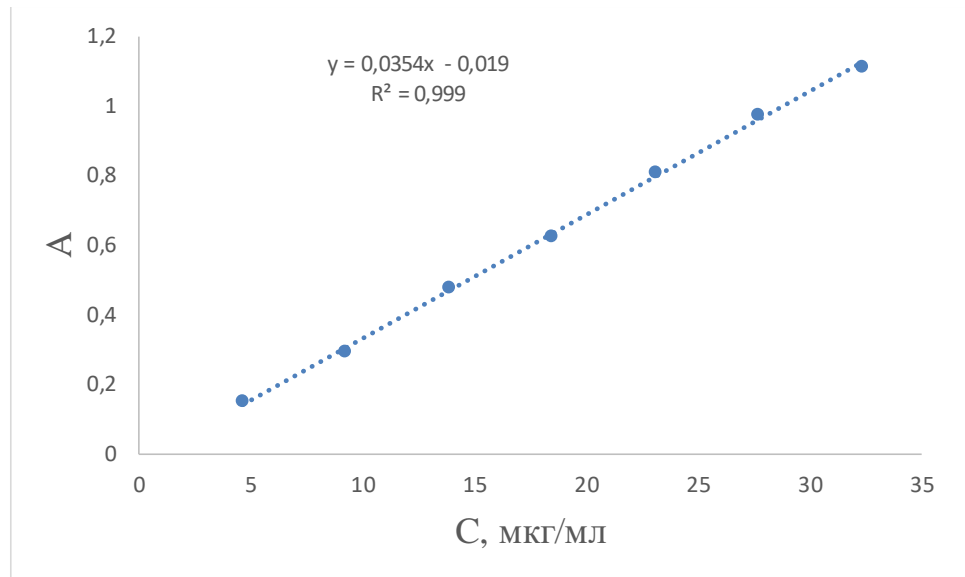


Рис. 3.5 – Лінійність спектрофотометричної методики кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду за реакцією з етанольним розчином БФС

У таблиці 3.2 наведено показники, а також розрахунки рівнянь лінійної регресії.

Відповідно до показників і результатів, що отримані в ході дослідження, параметри лінійності розробленої аналітичної методики протягом всього діапазону застосування відповідають вимогам ДФУ.

3.4 Правильність та прецизійність аналітичної методики

Під час вивчення валідаційних параметрів «правильність та прецизійність» розробленої методики в ході експерименту були приготовлені модельні розчини з точним вмістом активного фармацевтичного інгредієнта та концентраціями 80 – 120 % від номінального. Дослідження проводились шляхом визначення систематичної похибки (δ) %, що дозволило підтвердити «правильність» розробленої методики, а параметр «прецизійність» було підкріплено значенням відносного довірчого інтервалу (Δz). Ознайомитись із результатами визначення, а також критеріями прийнятності вищезгаданих валідаційних параметрів можна в таблиці 3.3.

Таблиця 3.2 – Метрологічні характеристики лінійної залежності

Величина	Значення	Критерій	Висновок (відповідає або не відповідає)
$b \pm (S_b)$	$0.0354 \pm (0.0013)$	–	–
$a \pm (S_a)$	$ -0.019 \pm (0.0260)$	$ a > 2.6$	Відповідає
R^2	0.999	> 0.9980	Відповідає
МВ (мкг/мл)	0.95	–	–
МКВ (мкг/мл)	2.87	–	–
Підпорядкування закону Бера в діапазоні концентрацій (мкг/мл)	4.62-32.35	–	

Проаналізувавши результати встановили, що значення середньої похибки (δ) становить 0.07 %, а значення стандартного відхилення (S_z) = 0.15 %. Тому розроблена методика визначення левоцетиризину дигідрохлориду з використанням етанольного розчину БФС є придатною для практичного застосування.

Для оцінки валідаційного параметра «внутрішньолабораторна прецизійність» було проведено аналіз шести зразків ЛП конкретної серії. Дослідження полягало в тому, що різні аналітики працювали в різні дні здійснювали експериментальну діяльність, використовуючи різний мірний посуд. Результати, що представлено в табл. 3.4 були оцінені з урахуванням відносного довірчого інтервалу, що має перебувати в межах допустимої похибки (Δz): $\Delta z \leq 2.4$ (при $V = 7.5$ %).

Таблиця 3.3 – Результати вивчення правильності та прецизійності методики

Модельні розчини	Вміст левоцетиризину дигідрохлориду, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100\%$
	Введено, $X_i = (m_i / m_{rs}) \cdot 100\%$	Знайдено, $Y_i = (A_i/A_{rs}) \cdot 100\%$	
M ₁	80.08	80.31	100.29
M ₂	85.23	85.09	99.84
M ₃	90.02	90.11	100.10
M ₄	94.97	95.06	100.09
M ₅	100.03	100.11	100.08
M ₆	104.98	105.03	100.05
M ₇	110.12	109.97	99.86
M ₈	114.97	115.11	100.12
M ₉	119.73	119.99	100.21
Середнє значення, Z, %			100.07
Стандартне відхилення, S _z , %			0.15
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 8) \cdot S_z = 2.3060 \cdot S_z, \%$			0.35
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta_{As} = 2.4\%$			виконується (< 2.4)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 , \%$			0.07
Критерій незначущості систематичної похибки: Статистична незначущість: $\delta \% \leq \max \delta \% = \frac{\Delta z}{\sqrt{n}} = \frac{0.35}{\sqrt{9}} = 0.12$ Практична незначущість: $\delta \% \leq 0.32 \cdot \Delta_{As} = 0.77\%$			виконується (0.07 < 0.12) виконується (0.07 < 0.77)
Загальний висновок про методику			Коректна

Таблиця 3.4 – Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності

№ розчину	Величина Z_i , %		
	1 дослід	2 дослід	3 дослід
1	99.88	100.23	99.99
2	99.86	99.81	100.16
3	100.09	99.98	99.86
4	100.12	100.28	99.92
5	100.11	100.14	100.14
6	99.95	99.87	100.09
Середнє Z (%)	100.00	100.05	100.03
RSD_x , %	0.12	0.19	0.12
Відносне стандартне відхилення, RSD_Z (%)	0.14		
Відносний довірчий інтервал, $\Delta_{\bar{z}}$	$0.10 \leq 2.4$		
Критичне значення збіжності результатів Δ_{As} , %	2.4		

Отже, дослідивши внутрішньолабораторну прецизійність результатів, поданих у таблиці 3.4, можна зробити висновок, що відносний довірчий інтервал для 6 незалежних визначень ЛП однієї серії не перевищує встановлені межі критерію прийнятності (≤ 1.6 %).

3.5 Прогноз повної невизначеності розробленої методики

З метою підтвердження коректності спектрофотометричної методики визначення левоцетиризину дигідрохлориду за реакцією з етанольним

розчином БФС проводили прогноз повної невизначеності, згідно з яким розрахована невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) для кількісного визначення АФІ в таблетках склала 1.79 %. Максимальний внесок у невизначеність пробопідготовки внесли 11 – взяття наважки БФС та операції під номерами 3, 4, 8, 9 (взяття аліквоти піпеткою (градуваною) 1.00 мл й розчину БФС піпеткою (градуваною) 1.00 мл). Повна невизначеність аналітичної методики (Δ_{As}) при аналізі препарату склала 1.92 %.

$$\Delta_{As} = 1.92 \% \leq \max \Delta_{As} = 2.40 \%$$

Наведено розрахунки невизначеності й усі аналітичні параметри в таблиці 3.5.

Дані, отриманні в ході прогнозування повної невизначеності, свідчать про те, що розроблена методика кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду з використанням етанольного розчину БФС спектрофотометричним методом є коректною.

Визначення кількісного вмісту левоцетиризину дигідрохлориду в таблетках за реакцією з бромфеноловим синім проводилось спектрофотометрично при $\lambda = 426$ нм, етанольний розчин барвника був використаний як компенсаційний розчин в ході експерименту. У таблиці 3.6 наведено отримані результати.

3.6 Визначення валідаційного параметра «робасність»

Робасність розробленої спектрофотометричної методики було досліджено шляхом вивчення стабільності аналізованих розчинів в часі. Під час експерименту вимірювали оптичні густини в зазначених часових параметрах приготованих розчинів левоцетиризину і відповідного йому ФСЗ, до яких додавали розчин БФС, від моменту початку їх приготування протягом 2 годин. Було підтверджено стабільність аналізованих розчинів упродовж 120 хвилин. Отже, розроблена методика є робасною і придатною для довготривалих аналізів.

Таблиця 3.5 – Результати розрахунку невизначеності пробопідготовки для розробленої методики кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду за реакцією з етанольним розчином БФС

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
1	2	3
Розчин порівняння		
1) взяття наважки ФСЗ левоцетиризину дигідрохлориду	m_0	$0.2 \text{ мг}/37 \text{ мг} \times 100 \% = 0.54$
2) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 100 мл	100	0.12
3) взяття аліквоти піпеткою (градуйованою) 1.00 мл	1.0	0.74
4) взяття 1.0×10^{-4} М розчину БФС піпеткою (градуйованою) 1.00 мл	1.0	0.74
5) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 10.00 мл	10	0.50
Випробовуваний розчин		
6) взяття наважки порошку розтертих таблеток	m_1	$0.2 \text{ мг}/370 \text{ мг} \times 100 \% = 0.05$
7) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 50.00 мл	50	0.17
8) взяття аліквоти піпеткою (градуйованою) 1.00 мл	1.0	0.74
9) взяття 1.0×10^{-4} М розчину БФС піпеткою (градуйованою) 1.00 мл	1.0	0.74
10) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 50 мл	50	0.17

<i>Продовження таблиці 3.6</i>		
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
Компенсаційний розчин		
11) взяття наважки БФС	m_2	$0.2 \text{ мг}/33.60 \text{ мг} \times 100$ % = 0.60
12) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 50.0 мл	50	0.17

Таблиця 3.6 - Результати кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду в таблетках за реакцією з етанольним розчином БФС (n=6, p=0,95).

Лікарський засіб	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
Таблетки левоцетиризину дигідрохлориду (5 мг)	0.0051	$\bar{m} = 0.0050 \text{ г}$ $S = 4.94 \times 10^{-5}$ $t_\alpha = 2.57$ $\Delta x = 1.27 \times 10^{-4}$ RSD = 2.41 % $\varepsilon = 0.67 \%$
	0.0050	
	0.0049	
	0.0052	
	0.0049	
	0.0051	

Результати вивчення стабільності представлено у таблиці 3.7. Відповідно до них, розроблена методика є придатною для здійснення довготривалих експериментальних досліджень.

Таблиця 3.7 – Дослідження стабільності аналізованих розчинів аналітів з етанольним розчином БФС, де 1 – випробовуваний розчин левоцетиризину дигідрохлориду, 2 – ФСЗ левоцетиризину дигідрохлориду

№	t, хв						A сер	RSD _t , %
	0	15	30	45	90	120		
1.	0.628	0.638	0.640	0.643	0.649	0.654	0.642	1.41
2.	0.621	0.627	0.639	0.642	0.644	0.648	0.637	1.65

3.7 Визначення «зеленості» методики та оцінювання її впливу на навколишнє середовище та виконавців

Одним із пріоритетних завдань під час розробки методики кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду за реакцією з етанольним розчином БФС спектрофотометричним методом було врахування основних вимог «зеленої хімії». Ключовими проблемами, які постали під час аналізу, були: нетоксичність реактивів, які застосовувались під час дослідження, а також безпечність. Екологічність розробленої спектрофотометричної методики було оцінено згідно з піктограмою «зеленості» методу AGREE (Analytical GREENss), результати якої зображені на рисунку 3.6, а також аналітичною еко-шкалою. Дослідивши «зеленість» методом еко-шкали, аналітична методика набрала 91 бал (таблиця 3.8).



Рис. 3.6 – Піктограма «зеленості» розробленої аналітичної методики згідно AGREE методу

Таблиця 3.8 – Результати вивчення аналітичної еко-шкали для оцінки «зеленості» розробленої спектрофотометричної методики визначення левоцетиризину дигідрохлориду в таблетках за реакцією з етанольним розчином БФС

Параметр	Пенальті бали
Розчинник: етанол	4
Споживання енергії	0
Професійні шкідливості	0
Відходи	5
Загальна кількість пенальті балів	9
Бал аналітичної еко-шкали	91
Висновок	Відмінний «зелений» аналіз

Проаналізувавши дані, одержані в піктограмі методу AGREE й еко-шкалі, основними завданнями, що стосуються вдосконалення методики відповідно до принципів «зеленої хімії», є проблеми зменшення й утилізації відходів (5 пенальті-балів в еко-шкалі, оранжеве забарвлення сектора піктограми AGREE

під номером 7) та підбору розчинника (4 пенальті-бали еко-шкали). Задовільними виявилися параметри споживання енергії та професійних шкідливостей (0 пенальті-балів еко-шкали).

Резюмуючи вищенаведені дані, можна зробити висновок, що спектрофотометрична методика визначення левоцетиризину дигідрохлориду за допомогою етанольного розчину БФС задовольняє основні вимоги «зеленої хімії».

Висновки до розділу 3

1. Розроблена методика спектрофотометричного визначення левоцетиризину дигідрохлориду за реакцією з етанольним розчином БФС у видимій ділянці спектру може бути застосована для аналізу АФІ як в монопрепаратах, так і в субстанціях.

2. Для представленої аналітичної методики розроблено та підібрано оптимальні умови, які забезпечують перебіг реакції та утворення комплексу між левоцетиризином та БФС, тобто було обрано аналітичну довжину хвилі (436 нм), найбільш придатного для аналізу органічного розчинника, вибрано концентрації реагентів та встановлено стехіометричні коефіцієнти співвідношень «левоцетиризин–БФС» (1:1) за методами Жоба й насичення, були досліджені стабільність та чутливість реакції.

3. Наведена спектрофотометрична методика кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду за реакцією з етанольним розчином БФС валідована відповідно до основних параметрів, а саме: специфічність, лінійність, діапазон застосування, правильність і прецизійність, робасність.

4. Розроблена аналітична методика визначення левоцетиризину дигідрохлориду продемонструвала відмінний результат згідно з принципами «зеленої хімії», що було підтверджено застосувавши методи AGREE й еко-шкали.

5. Резюмуючи вищезазначене можна прийти до висновку, що запропонована спектрофотометрична методика кількісного визначення

левоцетиризину дигідрохлориду з етанольним розчином БФС є експресною, простою у виконанні, доступною в економічному аспекті, екологічною і задовільною відповідно до принципів «зеленої хімії» та придатною для аналізу в різноманітних формах ЛП монопрепаратів і субстанціях.

ВИСНОВКИ

1. Здійснено аналіз оригінальних публікацій наукових літературних джерел та аналітично-нормативних документів, що дозволило визначити основну мету, завдання та цілі розробки спектрофотометричної методики кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду в лікарських засобах.

2. Встановлено оптимальні умови для проведення кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду з БФС спектрофотометричною методикою: як органічний розчинник був обраний *етанол Р*, концентрація реагенту становила 1.00×10^{-4} М, аналітична довжина хвилі, при якій спостерігався максимум поглинання, мала значення 426 нм, стехіометричне співвідношення в реакції між левоцетиризином та БФС 1:1.

3. Розроблена та валідована відповідно до вимог ДФУ спектрофотометрична методика кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду за реакцією з бромфеноловим синім в ЛП з використанням *етанолу Р* як розчинника при довжині хвилі 246 нм. Лінійність спостерігалась в діапазоні концентрацій від 4.62 до 32.35 мкг/мл, коефіцієнт кореляції становив 0.999 при вигляді рівняння лінійної регресії $y = 0.0354x - 0.019$. Значення межі виявлення та межі кількісного виявлення становили 0.95 мкг/мл та 2.87 мкг/мл відповідно, а значення повної невизначеності аналітичної методики набуло 1.92 %.

4. Дана методика оцінена згідно з принципами «зеленої хімії» та є екологічно безпечною для навколишнього середовища та аналітиків.

5. Запропонована спектрофотометрична методика кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду за реакцією з БФС є простою у виконанні, експресною, недороговартісною та «зеленою», що дозволяє використовувати її для рутинного аналізу науковцями та аналітиками акредитованих лабораторій.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Pawankar, R. (2014). Allergic diseases and asthma: a global public health concern and a call to action. *World Allergy Organization Journal*, 7, 1-3.
2. Rivas, M. N., & Chatila, T. A. (2016). Regulatory T cells in allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(3), 639-652.
3. Potaczek, D. P., Harb, H., Michel, S., Alhamwe, B. A., Renz, H., & Tost, J. (2017). Epigenetics and allergy: from basic mechanisms to clinical applications. *Epigenomics*, 9(4), 539-571.
4. Antihistamine Toxicity URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482318/>
5. Stojković, N., Cekić, S., Ristov, M., Ristić, M., Đukić, D., Binić, M., & Virijević, D. (2015). Histamine and antihistamines. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*, 32(1), 7-22.
6. Mandola, A., Nozawa, A., & Eiwegger, T. (2019). Histamine, histamine receptors, and anti-histamines in the context of allergic responses. *LymphoSign Journal*, 6(2), 35-51.
7. Kawauchi, H., Yanai, K., Wang, D. Y., Itahashi, K., & Okubo, K. (2019). Antihistamines for allergic rhinitis treatment from the viewpoint of nonsedative properties. *International journal of molecular sciences*, 20(1), 213.
8. Andryushayev, O. V., Ruban, O. A., Masliy, Y. S., & Iakovlieva, L. V. (2020). The current state and the development prospects of the Ukrainian market of antihistamines.
9. ЛЕВОЦЕТИРИЗИН URL: <https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%9B%D0%B5%D0%B2%D0%BE%D1%86%D0%B5%D1%82%D0%B8%D1%80%D0%B8%D0%B7%D0%B8%D0%BD>
10. ЛЕВОЦЕТИРИЗИН URL: <https://compendium.com.ua/uk/akt/76/93202/levocetirizinum/>
11. Державний реєстр лікарських засобів URL: <http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&lpage=1&sklad=%E>

[B%E5%E2%EE%F6%E5%F2%E8%F0%E8%E7%E8%ED%F3%20%E4%E8%E3%
%B3%E4%F0%EE%F5%EB%EE%F0%E8%E4%F3](https://www.drugbank.com/drugs/DB06282)

12. Levocetirizine. URL: <https://go.drugbank.com/drugs/DB06282>
13. European Pharmacopoeia. 11 edn. 2022. URL: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph.-eur.-11th-edition>
14. United States Pharmacopeia (USP), 2023 URL: <https://www.usp.org>
15. Mane, P. Estimation of Levocetirizine in Bulk and Formulation by First Order Derivative Area under Curve UV-Spectrophotometric Methods.
16. Mali, A. D., Bathe, R., Patil, M., & Tamboli, A. (2015). Zero order and area under curve spectrophotometric methods for determination of Levocetirizine in pharmaceutical formulation. *International Journal of Advances in Scientific Research*, 1(06), 270-275.
17. Lipi, F. A., Parvin, S., & Islam, M. R. (2016). UV Spectrophotometric Method Development and Validation for Determination of Levocetirizine Dihydrochloride. *Am. J. Pharm. Res*, 6(2).
18. Sherif, O. E. S., Issa, Y. M., & Abo-Dena, A. S. (2014). β -Correction and extraction to overcome spectral overlap in spectrophotometric determination of levocetirizine dihydrochloride. *IJRPC*, 4, 181-191.
19. Jain, N., Jain, D. K., Jain, R., Patel, V. K., Patel, P., & Jain, S. K. (2016). Bioanalytical Method Development and Validation for the Determination of Levocetirizine in Pharmaceutical Dosage Form and Human Plasma by RP-HPLC. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(10), 063-067.
20. Pataskar, P., Barabde, G., Ambadekar, S., & Tamhanekar, J. (2022). RP-HPLC METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION: PRACTICAL ASPECTS OF INCREASING ANALYSIS SPEED BY MINIMIZING RUN TIME AND RETENTION TIME USING LEVOCETIRIZINE AND ITS APPLICATION TO COMMERCIAL PRODUCT
21. KHORSHID, A. F., FOUAD, M., ELKADY, E., SALEM, M. A. M., & MORSI, A. (2021). New analysis with a comparative study for antihistaminic Levocetirizine di-HCl in Levcet dosage form, human fluids plasma/urine with

modified carbon paste sensor. *International Journal of Pharmaceutical Research (09752366)*, 13(2).

22. Blazheyevskiy, M. Y., Moroz, V. P., Kryskiv, O. S., & Ed-daoudi, M. (2021). Titrimetric micro-determination of levocetirizine dihydrochloride using oxone.

23. Kannappan, V., & Kanthiah, S. (2020). Development and Optimization of Stereoselective Liquid Chromatographic Method for Chiral Separation of (\pm)-cetirizine and Enantiopurity Assessment of R-levocetirizine. *Journal of analytical chemistry*, 75, 349-357.

24. Patel, D. K., Vyas, A. J., Noolvi, M., Patel, A. B., & Patel, N. K. (2018). Estimation of four drugs: Ambroxol hydrochloride, levocetirizine hydrochloride, phenylephrine hydrochloride and paracetamol by RP-HPLC in tablet dosage form. *Int. J. Pharmaceut. Chem. Anal*, 5(1), 8-31.

25. Anandakumar, K., & Veerasundari, P. (2014). Simultaneous estimation of paracetamol, ambroxol hydrochloride, levocetirizine dihydrochloride, and phenylephrine hydrochloride in combined tablet formulation by first-order derivative spectrophotometry. *International Scholarly Research Notices*, 2014

26. Dyade, G. K. (2019). Validated Derivative Spectrophotometric method for simultaneous estimation of Levocetirizine Dihydrochloride and Phenylephrine Hydrochloride from tablet formulations. *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*, 9(1), 1-4.

27. Manoharan, G., Al Bratty, M., & Abdulhaq, A. A. M. Reverse Phase-High-performance liquid chromatography method for simultaneous estimation of levocetirizine and pseudoephedrine in raw and tablet formulation

28. Kumar, N., Anghore, D., Rawal, R. K., & Pandey, A. (2018). RP-HPLC and UV method development for simultaneous estimation of doxofylline, montelukast and levocetirizine dihydrochloride in pharmaceutical dosages form. *Analytical Chemistry Letters*, 8(2), 195-204.

29. Patel, N. K., Chouhan, P., Paswan, S. K., & Soni, P. K. (2014). Development and validation of a UV spectrophotometric method for simultaneous

estimation of combination of Montelukast sodium in presence of Levocetirizine Dihydrochloride. *Der Pharmacia Lettre*, 6(3), 313-21.

30. Sakur, A. A., Nashed, D., & Noureldin, I. (2022). Green potentiometric determination of some of the third-generation antihistamines: Fexofenadine, Desloratadine, and Levocetirizine by using new carbon paste electrodes. *Talanta Open*, 5, 100116.

31. Katselou, M., Athanaselis, S., Nikolaou, P., Qammaz, S., Stefanidou, M., Spiliopoulou, C., & Papoutsis, I. (2018). Development and validation of an EI-GC-MS method for the determination of 11 antihistamines in whole blood. Applications in clinical and forensic toxicology. *Analytical methods*, 10(40), 4926-4934.

32. Magnaghi, L. R., Zanoni, C., Alberti, G., & Biesuz, R. (2023). The colorful world of sulfonephthaleins: Current applications in analytical chemistry for “old but gold” molecules. *Analytica Chimica Acta*, 341807.

33. Галка, Л. М., Кучер, Т. В., Криський, Л. С., Піронск, М., Фурдела, І. І., Угляр, Т. Ю., Поляк, О. Б., & Логойда, Л. С. (2023). Розробка спектрофотометричної методики визначення розувастатину в таблетках з використанням бромфенолового синього. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, (2(42), 11–19.

34. Al-Tamrah, S. A., Abdalla, M. A., & Al-Otibi, A. A. (2019). Spectrophotometric determination of norfloxacin using bromophenol blue. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 3993-3997.

35. Batubara, A. S., Ainousah, B. E., Gamal, M., Almrasy, A. A., Ramzy, S., Ghoneim, M. M., & Abdelazim, A. H. (2023). Green-adapted spectrophotometric determination of fostemsavir based on selective bromophenol blue extraction; reduction of hazardous consumption using computational calculations. *Scientific Reports*, 13(1), 10049.

36. Spectrophotometric determination of certain antidepressants in pharmaceutical preparations / A. Onal, S. E. Kepeksi, S. M. Cetin, S. Erturk // J. AOAC Int. – 2006. – Vol. 89, № 4. – P. 966–971.

37. Onal A. Spectrophotometric methods for the determination of the antidepressant drug paroxetine hydrochloride in tablets / A. Onal, S. E. Kepeksi, A. Oztunc // *J. AOAC Int.* – 2005. – Vol. 88, № 2. – P. 490–495.
38. Gouda A. A. Spectrophotometric determination of tadalafil in pure and dosage forms / A. A. Gouda, A. Al Kaf // *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* – 2011. – Vol. 17, № 2. – P. 125–132.
39. Kowtharapu, L. P., Katari, N. K., Muchakayala, S. K., & Mariseti, V. M. (2023). Green metric tools for analytical methods assessment critical review, case studies and crucify. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 166, 117196.
40. Semysim, F. A., Hussain, B. K., Hussien, M. A., Azooz, E. A., & Snigur, D. (2024). Assessing the Greenness and Environmental Friendliness of Analytical Methods: Modern Approaches and Recent Computational Programs. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 1-14.
41. Płotka-Wasyłka, J. (2018). A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. *Talanta*, 181, 204-209.
42. Das, A., Sadhukhan, A., Chakraborty, S., Bhattacharya, S., Roy, A., & Bhattacharjee, A. (2022). Role of Green Chemistry in Organic Synthesis and Protection of Environment. *chemistry*, 1, 3-4.
43. Yahaya, N., Mohamed, A. H., Miskam, M., Keyon, A. S. A., Loh, S. H., Zain, N. N. M., & Sajid, M. (2024). Green analytical chemistry metrics for evaluation of microextraction methods: Fascinating or essential tools in real-world applications?. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 117587
44. Nowak, P. M., Wietecha-Posłuszny, R., & Pawliszyn, J. (2021). White Analytical Chemistry: An approach to reconcile the principles of Green Analytical Chemistry and functionality. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 138, 116223
45. Levocetirizine URL:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1549000>
46. Державна фармакопея України друге видання / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Доповнення 4. 2020. С. 123–236. (валідація)

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

ДОДАТКИ

Додаток А

Список публікацій

1. Михалків М.М., Івануса І.Б., Мовчан Т.В., Рушак А.М., Яцюк Я.В., Фурка О.Б. Використання хімічних реакцій в хіміко-токсикологічному аналізі левоцетиризину / *Modern Chemistry of Medicine* 2023. 194-195
2. Мовчан Т. В., Михалків М. М., Яцюк Я. В. Розробка методики спектрофотометричного визначення левоцетиризину в таблетках з використанням етанольного розчину бромфенолового синього / Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку», 9–12 квітня 2024, Одеса. С. 243-245.