

**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 метанольного розчину
бромфенолового синього*

Виконала здобувачка вищої освіти V курсу
денної форми навчання
спеціальності 226 Фармація, промислова фармація
Рушак Андріана Михайлівна

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 Алергія. Загальна характеристика левоцетиризину.....	8
1.2. Огляд наукових досліджень та аналітичних методик аналізу левоцетиризину.....	12
1.3 Використання сульффталеїнових барвників, в тому числі й бромфенолового синього в аналізі субстанцій та лікарських засобів	16
1.4. Застосування принципів «зеленої» та «білої» хімії в розробці в розробці аналітичних методик кількісного визначення	18
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	22
2.1 Методологія дослідження.....	22
2.2 Фізико-хімічні властивості левоцетиризину дигідрохлориду.....	24
2.3 Спектрофотометрична методика визначення левоцетиризину в лікарських засобах за реакцією з метанольним розчином бромфенолового синього	25
2.4 Методи вивчення «зеленості» аналітичної методики.....	26
РОЗДІЛ 3 РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ЛЕВОЦЕТИРИЗИНУ В ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ ЗА РЕАКЦІЄЮ З МЕТАНОЛЬНИМ РОЗЧИНОМ БРОМФЕНОЛОВОГО СИНЬОГО.....	27
3.1 Вибір умов спектрофотометричного визначення левоцетиризину дигідрохлориду з бромфеноловим синім у	

видимій ділянці спектра.....	27
3.2 Специфічність методики	31
3.3 Лінійність, діапазон застосування методики	32
3.4 Прогноз повної невизначеності методики	34
3.5 Правильність та прецизійність методики	37
3.6 Робастність аналітичної методики.....	40
3.7 Оцінка озеленіння аналітичної методики.....	42
ВИСНОВКИ.....	45
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	46
ДОДАТКИ.....	51

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я
- АР – алергічний риніт
- ДФУ – Державна Фармакопея України
- УФ – ультрафіолет
- ТШХ – тонкошарова хроматографія
- ВЕРХ – вискоефективна рідинна хроматографія
- AGREE – analytical GREENness metric
- ARIA – Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma
- САР – сезонний алергічний риніт
- ХАР – хронічний алергічний риніт
- АП – антигістамінні препарати
- ГЕБ – гематоенцефалічний бар'єр
- IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry
- NEMI – National environmental method index
- ESA – Eco-scale assessment
- ІЧ – інфрачервоний
- ICH – Міжнародна конференція з гармонізації технічних вимог до реєстрації лікарських препаратів для людини (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)
- GAC – Green analytical chemistry
- ЄФ – Європейська Фармакопея
- АФ – Фармакопея США
- ФСЗ – фармакопейний стандартний зразок
- АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт
- RSD – відносне стандартне відхилення (Relative Standard Deviation)
- x, y – поточні координати в рівнянні лінійної залежності.

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Алергічні захворювання – це системні порушення, які спричинюються дисфункцією імунної системи. Алергічні захворювання увійшли до переліку розладів, які ВООЗ визнає як пріоритетні для запобігання та контролю у 21 столітті. У випадку алергічного риніту, після впливу алергенів, таких як повітряно-пилові кліщі, шерсть тварин, плісняву та пилок, різні клітини запалення, такі як тучні клітини, CD4 + Т-клітини, В-клітини, макрофаги та еозинофіли, проникають у слизову оболонку порожнини носа, утворюючи інфільтрат в цій ділянці. Велика кількість людей по всьому світу стикається з алергічними захворюваннями, які приносять їм значні незручності. Оцінка свідчить, що майже 500 мільйонів осіб страждають від АР [1]. Обговорення актуальності левоцетиризину дигідрохлориду для лікування алергічного риніту базується на його відомих протизапальних та антигістамінних властивостях, що робить його ефективним і безпечним засобом для зменшення симптомів алергії. Зокрема, його широкий спектр дії та мінімальна вірогідність побічних ефектів роблять левоцетирин важливим інструментом у лікуванні алергічних реакцій.

Левоцетирин - це лівообертальний ізомер антигістамінного препарату другого покоління, відомого як цетирин. Його афінитет до H₁-рецепторів удвічі вищий, ніж у цетирину [2].

У ДФУ відсутні дані щодо монографії левоцетиризину дигідрохлориду та готових лікарських засобів, що містять цю субстанцію. У наукових дослідженнях левоцетирин, який зустрічається в складі численних інших препаратів у формі таблеток, став об'єктом досліджень, які проводилися за допомогою різних методів, таких як УФ-спектрофотометрія, спектрофотометрія похідних відношень, ТШХ та ВЕРХ. Ці методи для кількісного аналізу є трудомісткими і вимагають дорогавартісного обладнання. Тому, розробка

нових більш експресних, менш дорогавартісних, «зелених» методик є перспективним напрямком в фармацевтичній науці.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Кваліфікаційна робота була виконана відповідно до науково-дослідної програми, затвердженої кафедрою фармацевтичної хімії Тернопільського національного медичного університет 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 методики спектрофотометричного визначення левоцетиризину дигідрохлориду в таблетках використовуючи метанольний розчин бромфенолового синього.

Завдання дослідження:

- проаналізувати монографії, включаючи Державну фармакопею України та інші фармакопеї, а також наукову літературу, для розробки плану дослідження;
- дослідити найоптимальніші параметри експерименту, які є важливими для розробки спектрофотометричного методу визначення левоцетиризину дигідрохлориду;
- здійснити перевірку розробленої методики за валідаційними параметрами згідно з вимогами ДФУ, що включають лінійність, діапазон застосування, а також прецизійність, робастність та правильність;
- проаналізувати екологічні аспекти розробленої спектрофотометричної методики за допомогою методів еко-шкали та AGREE.

Об'єкт дослідження – обґрунтування підходів та розробка спектрофотометричної методики кількісного визначення левоцетиризину

дигідрохлориду в таблетках використовуючи метанольний розчин бромфенолового синього.

Предмет дослідження – левоцетиризину дигідрохлорид, який міститься у таблетках промислового виробництва.

Методи дослідження: спектрофотометрія у видимій області спектру, методи валідації, регресійний аналіз, методи оцінки екологічної безпеки методики (методи еко-шкали та AGREE).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше розроблено методику спектрофотометричного визначення левоцетиризину дигідрохлориду в таблетках використовуючи метанольний розчин бромфенолового синього. Проведено валідацію розробленої методики і вивчено її вплив на навколишнє середовище.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено методику УФ-спектрофотометричного кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду, яка може бути використана акредитованими хімічними лабораторіями, а також науковцями при проведенні експериментальних досліджень.

Публікації. За темою кваліфікаційної роботи опубліковано 2 тез (Міжнародна Internet-конференція Modern Chemistry of Medicine 2023 р., Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку» 2024 р.).

Обсяг та структура кваліфікаційної роботи. Кваліфікаційна робота викладена на 45 сторінках, складається з вступу, трьох розділів, висновків, списку використаних джерел (всього 43 найменувань, з них 41 закордонних видань). Кваліфікаційна робота містить 8 рисунків та 8 таблиць.

РОЗДІЛ 1

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

1.1 Алергія. Загальна характеристика левоцетиризину

Алергічний риніт – це хронічне запалення носоглотки, спричинене імуноглобуліном E, що виникає внаслідок вдихання алергенів навколишнього середовища. Це дуже поширене захворювання дихальних шляхів, яке впливає на 20–30 % дорослих і 40 % дітей. Симптоми алергічного риніту включають свербіж у носі, чхання, ринорею та відчуття закладеності носа. Також можуть спостерігатися додаткові симптоми, які включають очні прояви, такі як сльозотеча, почервоніння, опухлість, свербіж у очах, свербіж піднебіння та свербіж у вухах [3]. За розрахунками, понад 500 мільйонів пацієнтів у всьому світі та 150 мільйонів в регіоні Азіатсько-Тихоокеанського регіону страждають на алергічний риніт [4]. Через підвищене забруднення повітря та непередбачувані сезони пилку симптоми алергічного риніту присутні протягом усього року. Пацієнти, які страждають на алергічний риніт, часто потребують постійного лікування, що варто враховувати при розробці методики лікування. Лікування включає стратегії, такі як уникнення алергенів, використання препаратів для полегшення симптомів, протизапальну терапію та імунотерапію алергії [3].

У 1999 році було започатковано ініціативу "ARIA" під час семінару ВООЗ. Перша доказова настанова з питань хронічних респіраторних захворювань була опублікована у 2010 році і переглянута у 2016 році. Настанова містить умовні рекомендації стосовно використання інтраназальних або пероральних препаратів H1-антигістамінного класу (зокрема, новіших, менш седативних антигістамінних засобів, таких як левоцетиризин, цетиризин і

лоратадин) або їх комбінації з інтраназальними кортикостероїдами у пацієнтів із САР і ХАР [5].

АП являють собою широко застосовуваний клас лікарських засобів по всій Європі [6]. Зазвичай призначають при короткочасному лікуванні симптомів застуди, сезонного алергічного риніту (сінної лихоманки), заколисування, нудоти, запаморочення, кашлю, кропив'янки, свербіжу та анафілаксії [7].

Антигістамінні препарати можуть бути введені різними способами (орально, трансдермально, внутрішньовенно) і часто призначаються лікарями, але їх також можна придбати без рецепта, особливо якщо це препарати з низькою силою дії [6].

Дані препарати належать до групи лікарських засобів, що блокують рецептори гістаміну типу 1 (H1). Важливо зазначити, що антигістамінні препарати не призводять до блокування або зменшення вивільнення гістаміну; натомість вони поліпшують його місцеву дію. Лікарські засоби, спеціально призначені для блокування інших H2-рецепторів, зазвичай називають блокаторами H2, а не антигістамінними препаратами [7].

H1-антигістамінні препарати можна класифікувати за поколінням або за наявністю седативного ефекту. Препарати першого покоління зазвичай мають седативний ефект, тоді як антигістамінні препарати другого та третього поколінь не мають седативного впливу. Можливо, це пов'язано з тим, що антигістамінні препарати першого покоління мають здатність розчинятися у жирах, що дозволяє їм проникати через гематоенцефалічний бар'єр, у той час як антигістамінні препарати другого та третього поколінь не мають такої властивості [8] завдяки наявності функціональних груп (наприклад, -COOH і -NH₂). Варіації проникності через ГЕБ обумовлені різними чинниками, такими як іонізація, ліпофільність, молекулярний розмір препарату та вплив транспортера [9]. Неседативні антигістамінні препарати в значній мірі витіснили седативні засоби у лікуванні алергічних розладів [10].

Цетиризин – це антигістамінний препарат другого покоління, що є карбоксильованим метаболітом гідроксизину. Його розроблено з метою зменшення побічних ефектів, таких як сонливість, кардіотоксичність та антихолінергічних ефектів. Цетиризин має два енантіомери, оскільки включає один хіральний центр у своїй хімічній структурі, і ці енантіомери відрізняються за фармакологічними ефектами. Левоцетиризин (R-форма) – це активний енантіомер, який відзначається сильною антигістамінною дією. Він проявляє вдвічі вищу спорідненість до H₁-рецепторів, ніж у рацемічній суміші, і в 30 разів вищий афінитет до H₁-рецепторів, ніж у декстроцетиризину [11].

Левоцетиризину дигідрохлорид має назву IUPAC: [2-[4-[(R)-(4-хлорфеніл) фенілметил]-1-піперазиніл]етокси] оцтової кислоти дигідрохлорид. Це неседативний антигістамінний засіб третього покоління. Він перешкоджає зв'язуванню молекул гістаміну з гістаміновими рецепторами для запобігання запалення. Цей ефект сприяє полегшенню симптомів алергії, таких як висипання, почервоніння та подразнення [12,13].

Цей препарат єдиний у світі, який показав покращення якості життя у всіх аспектах (згідно з глобальним статусом здоров'я SF-36; P < 0,001 за всіма шкалами) та зниження загальних витрат на охорону здоров'я. Це було підтверджено в серії з 421 пацієнта з алергією/астмою, які отримували лікування протягом шести місяців. Цей препарат є більш потужним і безпечним, ніж астемізол, який є антигістамінним препаратом другого покоління з противірусною активністю. Астемізол був активний як проти SARS-CoV, так і проти MERS-CoV. Однак, астемізол був відкликаний з ринку США в 1999 році через серцеву токсичність, зокрема через подовження інтервалу QTc [14].

Левоцетиризин швидко та ефективно всмоктується після перорального прийому, з піком концентрації в плазмі, який досягається протягом 0,9-1 години. Левоцетиризин має низький рівень метаболізму під час першого проходження через печінку; він метаболізується в обмеженій мірі шляхом окислювального деалкілювання до метаболіту, кількість якого є незначною.

Приблизно 93 % левоцетиризину зв'язується з білками плазми, і його період напіввиведення з плазми становить 8-9 годин, що залишається стабільним при багаторазовому прийомі [15]. Для отримання результатів біоеквівалентності левоцетиризину (з контрольної композиції) були проведені експерименти на здорових чоловіках і жінках з Кореї. Порівняння результатів показало, що у жінок спостерігалася вища максимальна концентрація та швидша втрата лікарського засобу з плазми порівняно з чоловіками. Це призвело до швидшого відновлення антигістамінного ефекту до початкового рівня. Однак абсолютні відмінності між статями у середніх значеннях не були великими, не перевищуючи 10 нг/мл (для концентрації в плазмі) або відсоткових показників (змін розміру пухирів і спалахів) [16].

Левоцетиризину дигідрохлорид відзначається гірким та кислуватим смаком через наявність у його складі іонів хлору та водню [17].

У 2008 році Левоцетиризин отримав затвердження від Управління з контролю за продуктами та ліками США для полегшення симптомів, пов'язаних з алергічними захворюваннями у дорослих і дітей. При лікуванні алергічних захворювань, пацієнтам віком до 15 років рекомендується поділити таблетку левоцетиризину 5 мг на дві частини для перорального застосування. Левоцетиризин розглядається як ефективний і безпечний засіб для лікування алергічних захворювань [18, 19].

Фармакологи розглядають левоцетиризин як найбільш потужний серед п'яти сучасних антигістамінних препаратів (левоцетиризину, цетиризину, фексофенадину, лоратадину і дезлоратадину) на основі даних щодо гістамінових реакцій та загострень [14].

Левоцетиризин виявляє пригнічувальну дію на свербіж, який супроводжується кропив'янкою та псоріазом. Встановлено, що подвійна доза сприяє більш швидкому та стійкому пригніченню гістамін-індукованого спалаху, а також сильніше пригнічує свербіж і висипання, порівняно зі звичайною дозою [20,21].

З державного реєстру лікарських засобів України відомо про такі препарати, які містять левоцетиризину дигідрохлорид як діючу речовину:

«L-май», «Алерон», «Цетло», «Цетрилев ОДТ», «Лазин», «Левосетил», «Цетрин», «Цетримак», «L-цет», «Алерголік», «Алерзин», «Алергінол плюс», «Левосетил», «Гленцет», «Аллергофрі», «Зилола», «Аллервей», «Контрахіст алерджі», «Левзірін», «Сезонія», «Аллерсет», «Цетрилев НЕО», «Ергоцетал», «Гленцет едванс», «Цезера».

1.2. Огляд наукових досліджень та аналітичних методик аналізу левоцетиризину дигідрохлориду

Державна фармакопея України не містить монографії на субстанцію левоцетиризину дигідрохлориду, тоді як Європейська та Американська фармакопеї регламентують проводити ідентифікацію наступними методами:

А. Інфрачервона абсорбційна спектрофотометрія.

Порівняння: левоцетиризину дигідрохлорид CRS (Certificate of Reference Standard).

В. Реакція на хлориди.

Рідинну хроматографію застосовують для визначення енантімерної чистоти та кількісного вмісту [22].

Спектрофотометричні методи аналізу і надалі залишаються предметом інтересу для дослідників завдяки їх простоті та доступності. Ці методи надають швидкий і селективний інструмент для рутинного аналізу фармацевтичних препаратів, роблячи їх ідеальними для ефективного скринінгу сировини. Додатково, вони не вимагають складних приладів та/або досвідченого лабораторного персоналу в порівнянні з витратними і технічно вимогливими методами хроматографії. З цього погляду, дослідники віддають перевагу спектрофотометричним методам для фармацевтичного аналізу в лабораторіях контролю якості [23].

Для кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду науковці головним чином використовують ВЕРХ, електрохімічні методи та різноманітні види спектрофотометрії (пряму диференціальну, тощо). Мамата П., Лакшмі П. В. та Прасунамба П. Л. описали простий, чутливий, точний, прецизійний та економічний спектрофотометричний метод для визначення левоцетиризину в нерозфасованій та таблетованій формі. УФ-аналіз левоцетиризину проводився з реєстрацією спектра від 200 нм до 400 нм. Кількісний аналіз здійснювався при 232 нм. Метод був валідований та успішно використовувався для визначення левоцетиризину у таблетованій лікарській формі. Препарат був протестований на чистоту шляхом вимірювання температури плавлення та ІЧ-спектрів, і не було виявлено жодних домішок. Максимум поглинання для левоцетеризину дигідрохлориду спостерігається при 232 нм, і підпорядковується закону Бера в діапазоні концентрацій від 4 до 20 мкг/мл. Запропонований метод для визначення левоцетеризину дигідрохлориду демонструє лінійну регресію $y=0,0371x-0,0119$ з високим коефіцієнтом кореляції 0,9998. Відносне стандартне відхилення становило 0,1649 %, 0,1995 %, 0,1668 % та 0,1683 % при аналізі п'яти повторних зразків для чотирьох марок А, В, С і D відповідно [24].

Індійські вчені розробили спектрофотометричну методику визначення левоцетиризину дигідрохлориду у субстанції та лікарській формі за реакцією утворення кольорових продуктів з різними реагентами. Вони ґрунтуються на утворенні комплексів з перенесенням заряду, де левоцетиризин виступає як донор *n*-електронів, і взаємодіє з 2,4-динітрофенолом (ДНФ), пікриною кислотою (ПК) як *p*-акцепторами та йодом як *r*-акцептором, що призводить до утворення забарвлених радикальних аніонних форм. Забарвлені продукти кількісно визначали методом спектрофотометрії при 420 нм для обох реагентів ДНФ (метод А) і ПК (метод В), утворювався комплекс яскравого жовтого кольору, а з йодом (метод С) також спостерігали утворення жовтого продукту проте з максимумом поглинання світла при 375 нм. При оптимізованих умовах експерименту закон Бера застосовується в діапазоні концентрацій 1,2-24; 1,6-32 та 2,4-48 мкг/мл для методу А, методу В та методу С, відповідно [25].

В науковій літературі існує низка публікацій про кількісне визначення левоцетиризину дигідрохлориду при одночасній присутності інших аналітів. Так, Пармар К., Балданія С., Шах Д., Чхалотія У. та Пармар Н. свої наукові дослідження присвятили розробці спектрофотометричного методу одночасного визначення левоцетиризину дигідрохлориду та фенілефрину гідрохлориду в комбінованих лікарських формах. Вибір оптимальної аналітичної довжини хвилі проводили на основі робочого стандарту, який містив розчини левоцетиризину дигідрохлориду та фенілефрину гідрохлориду з концентраціями від 4 до 24 мкг/мл та від 8 до 48 мкг/мл відповідно. Їх спектри фіксували в діапазоні від 200 до 400 нм. Усі спектри нульового порядку (D_0) піддавались перетворенню в першу похідну (D_1) за допомогою дельта-лямбда 2 і масштабного коефіцієнта 7. Для оцінки левоцетиризину дигідрохлориду та фенілефрину гідрохлориду були обрані довжини хвиль 283,2 нм та 240 нм відповідно. Оцінку лінійності проводили будуючи калібрувальні криві, які відображають залежність поглинання D_1 від концентрації в межах 4-24 мкг/мл та 8-48 мкг/мл відповідно. Коефіцієнти кореляції (r^2) для левоцетиризину дигідрохлориду та фенілефрину гідрохлориду склали 0,9964 та 0,9972 відповідно і були отримані наступні лінійні рівняння:

лінійне рівняння для левоцетиризину: $y = 0,0152x + 0,0457$,

лінійне рівняння для фенілефрину: $y = 0,0045x + 0,0443$

Встановлено, що кількісний вміст становить від 99,14 % до 100,43 % для левоцетиризину дигідрохлориду та від 98,73 % до 100,83 % для фенілефрину гідрохлориду [26].

Щодо методів визначення за допомогою ВЕРХ індійськими вченими було розглянуто простий метод ізократичної ВЕРХ з оберненою фазою для одночасного визначення декстрометорфану гідроброміду та левоцетиризину дигідрохлориду в сиропі від кашлю. Розділення цих речовин було здійснено протягом 10 хвилин на аналітичній колонці Phenomenex (США) типу C(18) 250 × 4,0 мм. Для цього використовувалася рухома фаза, яка складалася з калій дигідрофосфатного буфера з рН 2,5, ацетонітрилу та тетрагідрофурану у

відношенні (70:25:5 в/в/в). Аналіз проводився при швидкості потоку 1,2 мл/хв. і за довжини хвилі детектування 232 нм. Відсоток кількісного вмісту та RSD становили 100,36 % і 0,05 % для левоцетиризину дигідрохлориду, та 100,35 % і 0,27 % для декстрометорфану гідроброміду відповідно [27].

Абдалла, НА, Фаті, М.Е., Толба, представили екологічний, простий, швидкий, прямий та чутливий метод ВЕРХ для аналізу комбінації лікарських засобів, яка включає парацетамол, левоцетиризину дигідрохлорид, фенілефрину гідрохлорид та амброксолу гідрохлорид, які зазвичай використовуються для полегшення симптомів застуди. В методиці використовується ізократичне елюювання рухомої фази зі складом 20:5:75 (об'єм/об'єм) етанолу: ацетонітрилу: 2,5 мМ натрієвої солі гептан-1-сульфонової кислоти при рН 6,5. Хроматографічне розділення здійснювалось за допомогою колонки Hypersil BDS Cyano LC (250 × 4,6 мм, 5 мкм) з використанням УФ-детектора при довжині хвилі 230 нм та швидкості потоку 1,0 мл/хв. Усі чотири АФІ були успішно розділені та кількісно визначені протягом короткого часу (9 хв.) при цьому час утримування парацетамолу, левоцетиризину дигідрохлориду, фенілефрину гідрохлориду та амброксолу гідрохлориду становив 2.2, 3.8, 6.6 та 8.8 хвилин відповідно. Запропонований метод отримав визнання як екологічно чистий згідно з найбільш поширеними інструментами для оцінки екологічності: NEMI, GAPI, Analytical Eco-Scale та AGREE. Його переваги дозволяють використовувати його для рутинного аналізу досліджуваних лікарських засобів як у випадку однокомпонентних, так і комбінованих лікарських форм у лабораторіях контролю якості [28].

Наз, Н., Алі, С.Н., Каюм, А розробили високочутливий метод рідинної хроматографії з УФ-детектором (довжина хвилі 230 нм) для одночасного визначення циталопраму, левоцетиризину та лоратадину в препараті та крові людини. Для цього застосовували розчин метанолу з водою у співвідношенні 80:20 як рухому фазу з рН 3,5, при швидкості потоку 1,0 мл/хв. Розділення було здійснено за допомогою колонки Shimadzu Shim-pack CLC-ODS (M) 25M у лінійному діапазоні концентрацій від 0,4 до 12,5, від 0,8 до 25 та від 0,8 до 25

мкг/мл, з коефіцієнтами детермінації R^2 більше 0,998 та межею виявлення відповідно 7,75, 3,35 і 10,26 нг/мл. Валідація методу відповідає вимогам Міжнародної конференції з гармонізації технічних вимог для реєстрації лікарських засобів (ICH), з відсотковими відхиленнями від середнього значення (% RSD) в межах від 0,22 до 1,76, від 0,06 до 1,83 і від 0,22 до 2,11. Дослідження показало, що метод ефективно визначає аналіти у таблетках та сироватці крові людини [29].

Отже, як відомо з вище наведених методів, визначення вмісту левоцетиризину часто проводять із використанням методів високоефективної рідинної хроматографії та спектрофотометрії. Проте Ванг, Я., Лю, І.Г., запропонували для кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду в таблетках метод ближньої інфрачервоної спектроскопії. Спектральний аналіз проводили шляхом розміщення зразка у чашці інтегруючого сферичного детектора дифузного відбиття та сканування в діапазоні від 12000 до 4000 cm^{-1} з роздільною здатністю 16 cm^{-1} та проведенням 32 сканувань. З кожної партії відбирали п'ять зразків, а кожен зразок сканували з лицьової та зворотної сторін по одному разу. Спостерігали виражені піки поглинання при 5265, 4765 та 4457-4019 cm^{-1} , що свідчить про наявність різноманітних основних компонентів у зразку. Спектральні піки являли собою складну структуру, яка перекривається, тому проведення кількісного аналізу левоцетиризину дигідрохлориду на основі оригінальних ближніх ІЧ-спектрів стає неможливим. Для цілісного аналізу необхідно використовувати метод стехіометрії та відповідне програмне забезпечення для обробки спектральних даних. Розроблений метод можна використовувати для ефективного швидкого кількісного аналізу таблеток левоцетиризину дигідрохлориду від різних виробників [30].

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

Дослідження ліків за допомогою спектрофотометрії, що базується на перевірці їхніх структурних властивостей, залишається привабливим методом в аналізі ліків. Лікарські засоби, що містять у своїй структурі атоми нітрогену та мають позитивно заряджені протоновані групи, можуть взаємодіяти з аніонними кислотними барвниками у кислому буферному розчині. Це призводить до утворення жовтих комплексів – іонних пар, які можуть бути екстраговані за допомогою відповідних розчинників [31].

Відомо шість сульфоталеїнових барвників: бромкрезоловий зелений (БКЗ), бромфеноловий синій (БФС), бромтимоловий синій (БТС), бромкрезоловий фіолетовий (БКФ), бромхлорфеноловий синій (БХФС) та бромксиленоловий синій (ВХВ).

Сульфоталеїни відносяться до категорії органічних сполук, відомих як арилсульфонові кислоти, і мають загальну формулу, яка включає три ароматичні кільця та центральний атом карбону, який їх об'єднує (трифенілметан). Всі вони характеризуються присутністю трьох кислотних груп: сульфонової, гідроксидної та фенольної груп [23].

Принцип взаємодії між барвниками та іонами в розчині базується на утворенні хіноїдної групи, коли барвник втрачає один протон. Отримані йонні пари або йон-асоціати можуть бути використані для кількісного визначення фармацевтичних сполук у розчині за допомогою різних аналітичних методів, таких як спектрофотометрія [32]. Ознайомившись з науковою літературою відомо про спектрофотометричне визначення левоцетиризину дигідрохлориду, яке проводилось за допомогою чотирьох барвників сульфоталеїнової кислоти: БФС, БКЗ, БТС і КСО. Це дослідження представляє підходи, які використовуються для розв'язання одного з найпоширеніших завдань у спектрофотометричних методах аналізу - спектрального перекриття, що виникає внаслідок фонові інтерференції. Для подолання фонові інтерференції у випадку БКЗ та БТС було використано метод екстракції розчинник-розчинник, тоді як для випадку БФС була застосована методика β -корекції. Закон Бера спостерігається в різних діапазонах концентрацій: від 0 до 38,88

мкг/мл для БФС, від 4,62 до 41,56 мкг/мл для БКЗ, від 0 до 46,66 мкг/мл для БТС і КСО відповідно. Були отримані значення кількісного визначення, які були в діапазоні від 96,7 % до 107,5 %. Порівняння результатів з референтним методом за допомогою t- та F-тестів підтвердило їхню відповідність і не виявило значних розбіжностей у точності та прецизійності. Методика пройшла валідацію та була порівняна з попередніми спектрофотометричними методами [33].

1.4 Застосування принципів «зеленої» та «білої» хімії в розробці в розробці аналітичних методик кількісного визначення

Застосування аналітичних процедур може призвести до негативних наслідків, які потенційно шкодять навколишньому середовищу і створюють серйозні ризики для операторів. З цих причин надзвичайно важливо ретельно розглядати та усвідомлювати можливі наслідки дій дослідників, які використовують аналітичні методи. З повагою до точки зору тих, хто турбується про навколишнє середовище, а також з урахуванням економічних аспектів аналітичних методик, особлива увага повинна бути приділена ризикам, які властиві певним типам зразків, обсягам використаних аліквот реагентів та розчинників, енергоспоживанню, пов'язаному із сучасними приладами, і, безумовно, управлінню лабораторними відходами та викидами, що виникають на різних етапах аналітичних методологій. Така відповідальність серед спільноти хіміків-аналітиків існувала задовго до введення терміну "зелена аналітична хімія". Кілька інноваційних досягнень у підготовці зразків, а також у вимірюванні та обробці даних, були впроваджені ще в середині 1970-х років.

В 1995 році був опублікований рукопис під назвою "На шляху до екологічно свідомої аналітичної хімії через мініатюризацію, локалізацію і заміну реагентів". Цей рукопис вважається першою декларацією принципів того, що зараз відомо як "зелена" аналітична хімія [34].

У 1998 році Анастас і Ворнер сформулювали 12 принципів зеленої хімії. Розроблені для задоволення потреб синтетичної хімії, лише окремі з цих принципів можуть бути безпосередньо застосовані в аналітичній хімії. У зв'язку з цим Галушка та Мігашевський З. вважали за доцільне переглянути ці 12 принципів зеленої хімії для їх повноцінного застосування в аналітичній хімії. У їхньому підході використовувалось чотири принципи, запропоновані Анастасом і Ворнером, та вісім нових принципів, які мають важливе застосування в рамках зеленої аналітичної хімії [35].

Для оцінки екологічності методу в багатьох останніх дослідженнях використовуються чотири інструменти оцінки, включаючи NEMI, ESA, GAPI і AGREE.

NEMI – це база даних аналітичних процедур для навколишнього середовища, яка була введена Радою з порівняння методів і даних (MDCB). Цей інструмент поділений на чотири квадранти (стійкий, біоаккумулятивний і токсичний, небезпечний, корозійний і відходи), кожен з яких має кольоровий код, що вказує на екологічність методів. Кожен параметр відображено у вигляді квадрата з порожнім або зеленим кольором, що вказує на відповідність методу його конкретній нормі. В подальшому будь-який аналітик може легко скористатися оцінкою екологічності, пропонуючи візуальну порівняльну діаграму "зеленості" для багатьох аналітичних методів [36].

GAPI розроблений компанією Płotka-Wasyłka в 2018 році, вперше використовується для оцінки біогенних амінів у різних зразках вина, а також ароматичних вуглеводнів та поліциклічних ароматичних вуглеводнів у стічних водах в Польщі. GAPI є надійним інструментом, спроможним забезпечити комплексну екологічну оцінку всієї аналітичної процедури, включаючи відбір проб і закінчуючи остаточним аналізом. Вищезгаданий інструмент оцінки не лише надає первинну загальну інформацію, але також включає певну напівкількісну інформацію. Кожна частина піктограми може мати зелений, жовтий або червоний колір, аналогічно світлофору, де зелений колір вказує на безпечну процедуру, а червоний - на неекологічні операції. Основні п'ять

параметрів розділів піктограми GAPI: підготовки зразків, розчинників та реагентів, приладів та додаткова кількісна позначка (коло посередині позначає кількісний метод аналізу).

Інструмент аналітичної еко-оцінки (ESA) був розроблений Галушкою у 2012 році. Цей інструмент ґрунтується на обчисленні загального числового балу і класифікує рівень екологічності вивченого аналітичного методу. Ідеальна "зелена" процедура має загальну оцінку 100 балів без жодних штрафних балів. Штрафні бали, що відображають негативний вплив методу на навколишнє середовище, віднімаються від загальної оцінки у 100 балів. Фактори, що призводять до негативного впливу на навколишнє середовище, включають в себе використання небезпечних розчинників, велике споживання енергії та велику кількість утворених відходів. Згідно з цим інструментом оцінки існують три класифікації: "зелений метод", який отримав підсумкову оцінку більше 75 балів; "задовільний зелений метод", який отримав від 50 до 75 балів; і "неналежний зелений" метод, якщо підсумкова оцінка становить менше 50 балів [37].

Критерії AGREE відносяться до 12 принципів "зеленості". Кожна з вхідних змінних конвертується в загальну шкалу від 0 до 1. Загальний результат оцінки визначається як добуток результатів оцінки за кожним з принципів, який можна представити у вигляді графіка, що асоціюється з годинником, де центральний колір і загальний бал відображаються у середині. Ступінь ефективності процедури можна легко зрозуміти за допомогою кольорової шкали від червоного до жовтого і зеленого кольорів, тоді як значення кожного принципу відображається шириною відповідного сегмента. Виконати оцінку легко за допомогою зручного програмного забезпечення, яке автоматично створює графік та звіт про оцінку [38].

Концепція «білої» аналітичної хімії розглядається як розширення «зеленої» аналітичної хімії, і пропонується 12 принципів «білої» як альтернатива відомим 12 принципам «зеленої». «Біла» аналітична хімія враховує не тільки екологічні аспекти (зелений), але й інші ключові критерії,

які впливають на якість методу, такі як аналітичний (червоний) і практичний (синій) аспекти. Використовуючи колірну модель RGB, де змішування червоного, зеленого і синього світла формує враження білого кольору.

Для сформулювання 12 принципів «білої» аналітичної хімії, запропонували зібрати 12 відомих принципів «зеленої» аналітичної хімії у 4 загальні "зелені" правила, що охоплюють найбільш важливі та взаємодіючі аспекти. До цих 4 принципів додаються 4 "червоні" принципи (R1-R4) та 4 "сині" принципи (B1-B4), які враховують аналітичну ефективність та практичні/економічні критерії, відповідно, створюючи загалом 12 принципів [39].

Висновки до розділу 1

1. Літературний пошук наукових праць показали, що левоцетиризину дигідрохлорид є ефективним засобом для контролю алергічних реакцій. Його висока ефективність, добра переносимість та можливість застосування у різних вікових групах роблять його привабливим вибором для лікування алергійних захворювань

2. Відповідно до опрацьованих літературних джерел кількісне визначення левоцетиризину дигідрохлориду проводять за допомогою різних аналітичних методів, таких як ВЕРХ, електрохімічні методи та спектрофотометрія, інколи вони вимагають додаткових складних обрахунків, не завжди відповідають критеріям «зеленості» та є дорогавартісними.

3. Розробка швидких, дешевих, ефективних та зелених методик для аналізу має ключове значення через їхній внесок у збереження довкілля, надійність результатів та економічну вигідність. Такі методи допомагають забезпечити точність та стабільність процесу визначення складу речовин у зразках, що важливо для фармацевтичної науково-дослідної сфери.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Методологія дослідження

Планування процесу розробки аналітичної методики включає 6 кроків, які зображені на рисунку 2.1 для кращого усвідомлення теоретичних концепцій.

Мета дизайну експерименту полягає в систематичному та структурованому підході до проведення спектрофотометричного дослідження з метою досягнення конкретних наукових та практичних цілей.

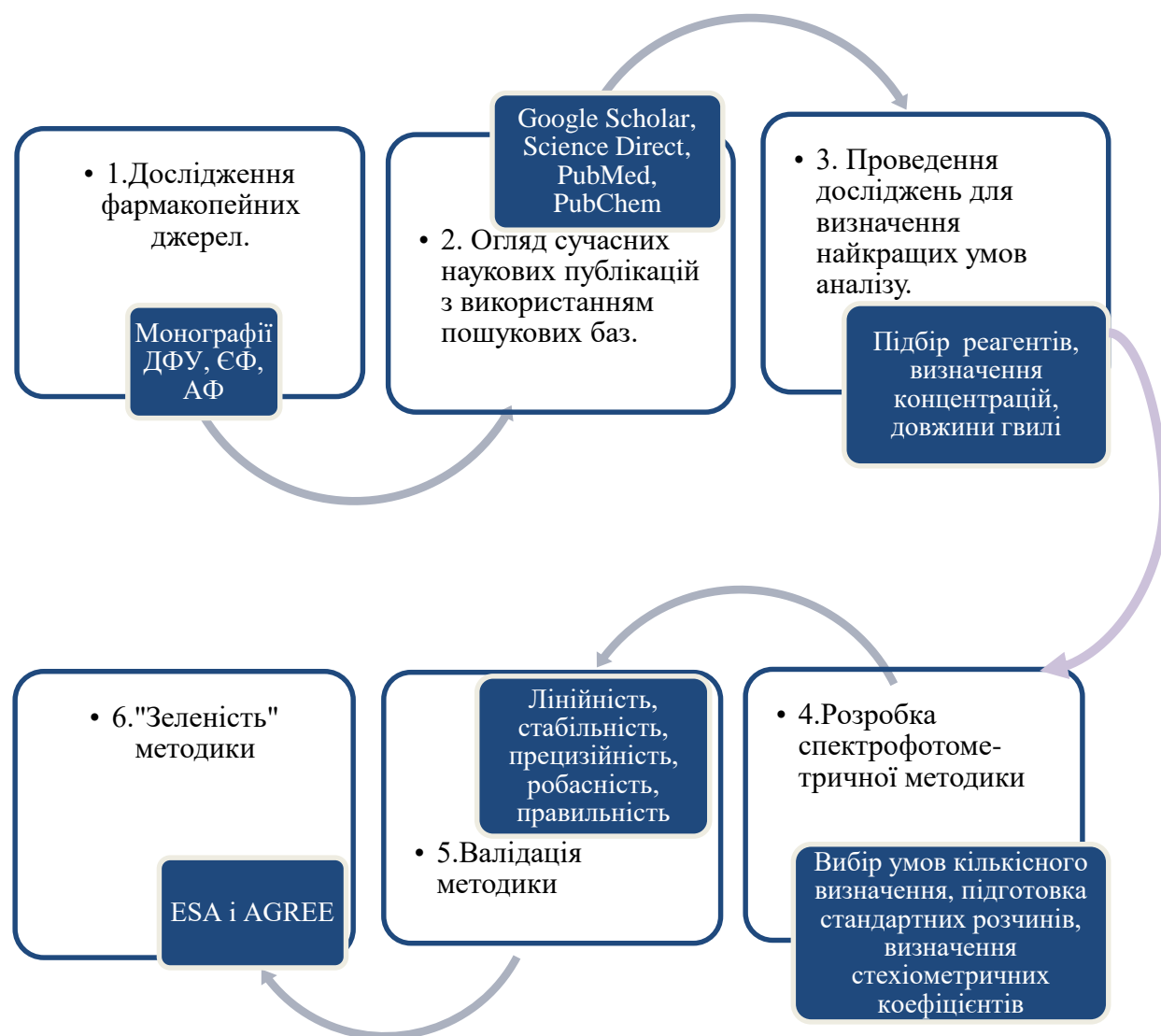


Рисунок 2.1 – Дизайн експерименту

Розробка аналітичної методики є складним процесом, який передбачає крок за кроком визначення параметрів, оптимізацію умов та валідацію результатів.

Основні етапи роботи:

1. Дослідження фармакопейних джерел: для пошуку монографій використовували офіційні джерела, такі ДФУ, ЄФ, АФ, електронні бази даних, які містять інформацію про обрану субстанцію.

Проаналізували структурну формулу, фізико-хімічні властивості, ідентифікацію, вимоги до якості та стандарти, яким має відповідати субстанція.

2. Огляд сучасних наукових публікацій за допомогою пошукових баз.

Аналіз наукових статей проводили за допомогою таких наукометричних баз даних: Google Scholar, Science Direct, PubMed, PubChem. Наукометричні бази даних надають широкий спектр інформації та інструменти для досліджень у галузі фармацевтики, а також допомагають оцінити якість та актуальність наукових публікацій і досліджень.

3. Проведення досліджень для визначення найкращих умов аналізу.

Для проведення аналізу необхідні хімічні речовини та розчинники, які відповідають об'єкту дослідження, а також відповідне лабораторне обладнання. Перший етап дослідження: підбір оптимального органічного розчинника. У наступному етапі експерименту визначається оптимальна концентрація для аналізу та розчину ФСЗ. Також такі параметри як температура, довжина хвилі для аналізу, визначення молекулярних співвідношень та стабільності, є важливими аспектами при проведенні спектрофотометричного аналізу.

4. Розробка спектрофотометричної методики.

З урахуванням хімічної структури та фізико-хімічних властивостей левоцетиризину, зробили висновок, що для аналізу цього зразка можна успішно використовувати спектрофотометрію.

5. Валідація методики допомагає забезпечити надійність, точність та відповідність аналітичного методу для використання у практиці. Ось кілька

основних етапів та параметрів, які враховувались під час валідації методики: лінійність, стабільність, прецизійність, робасність, правильність.

6. "Зеленість" методики. Включає в себе використання екологічно безпечних розчинників та хімікатів, раціональне використання ресурсів, мінімізацію відходів та викидів, а також вдосконалення процесів для зменшення споживання енергії та води. Екологічну оцінку проводили за допомогою ESA та AGREE.

2.2 Фізико-хімічні властивості левоцетиризину дигідрохлориду

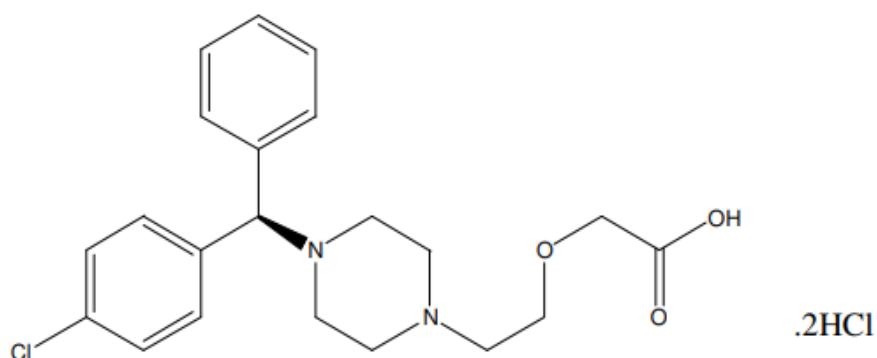


Рисунок 2.2 – Структурна формула левоцетиризину дигідрохлориду

Левоцетиризин, хімічно відомий як 2-[2-[4-[(R)-(4-хлорфеніл)-фенілметил]піперазин-1-іл]етокси]оцтова кислота; дигідрохлорид.

Має наступні фізико-хімічні властивості:

1. Молекулярна формула: $C_{21}H_{27}Cl_3N_2O_3$
2. Молекулярна маса: 461,8 г/моль.
3. Зовнішній вигляд: білий або майже білий порошок.
4. Розчинність: легко розчинний у воді, дуже слабо розчинний у етанолі (96 відсотків), практично нерозчинний в метиленхлориді.
5. Температура плавання: 212-217 °C.
6. Дисоціація: левоцетиризин є стабільним у кислому середовищі, але може піддаватися дисоціації в лужному середовищі та при високих температурах. Константа дисоціації $pK_a=3.59$, $pK_b=7.42$.

7. Ліпофільність: є достатньо ліпофільним, що дозволяє йому швидко проникати через клітинні мембрани та досягати місця дії.

8. Кислотність: є слабкою кислотою, яка може утворювати солі з лужними сполуками.

9. Оптична активність: має оптичну активність і існує у вигляді (R)-енантіомера [22,40]

Левоцетиризин дигідрохлорид, як правило, представлений у вигляді таблеток або капсул для перорального застосування, також може бути доступний у вигляді сиропу для дітей або розчину для ін'єкцій [18].

Під час проведення спектрофотометричного дослідження використовували таблетки «Алерзин» (ЗАТ Фармацевтичний завод ЕГІС, Угорщина.) 5 мг, серії № 3161C0722, ФСЗ левоцетиризину дигідрохлориду (реєстраційний номер CAS 130018-77-8), бромфеноловий синій (№ Н0830“Honeywell Fluka”) різні розчинники метанол, етилацетат, хлороформ, ацетонітрил.

Для реалізації проведення нижче наведених методик кількісного визначення левоцетиризину було використано наступне обладнання та реактиви: спектрофотометр від Shimadzu, модель UV-1800 (виробництва Японії), електронні лабораторні ваги RAD WAG AS 200/С. Для вимірювання використовувався мірний посуд класу А.

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

Приготування досліджуваного розчину таблеток левоцетиризину: точну наважку порошку розтертих таблеток, еквівалентну 23 мг левоцетиризину дигідрохлориду, перенесли до мірної колби на 50.00 мл, розчиняли в метанолі Р, доводили даним розчинником до мітки і перемішували. Після цього розчин фільтрували через паперовий фільтр («Синя стрічка»),

відкидаючи перші порції фільтрату. З наступних порцій фільтрату брали 1.00 мл розчину, переносили до мірної колби на 10.00 мл, додавали 1.00 мл 1.0×10^{-4} моль/л розчину БФС в метанолі *P*, доводили метанолом *P* до позначки та перемішували.

*Приготування розчину порівняння левоцетиризину дигідрохлориду: 23 мг ФСЗ левоцетиризину дигідрохлориду поміщали у мірну колбу місткістю 100.00 мл, розчиняли у метанолі *P* та доводили метанолом до позначки, перемішували. 0.50 мл розчину, переносили до мірної колби об'ємом 10.00 мл, додавали 1.00 мл 1.0×10^{-4} моль/л розчину БФС в метанолі *P*, доводили метанолом *P* до позначки та перемішували.*

*Приготування компенсаційного (1.0×10^{-4} M) розчину БФС: 33.8 мг БФС вміщували до мірної колби місткістю 50.00 мл, розчиняли у метанолі *P* та доводили метанолом до позначки, перемішували.*

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

2.4 Методи вивчення «зеленості» аналітичної методики

Зелена аналітична хімія — це методологія виконання аналітичних процедур, спрямована на мінімізацію впливу на навколишнє середовище та здоров'я людини. У цьому дослідженні було використано інструмент аналітичної еко-оцінки (ESA) та інструмент AGREE [37, 38].

РОЗДІЛ 3

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ЛЕВОЦЕТИРИЗИНУ В ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ ЗА РЕАКЦІЮ З МЕТАНОЛЬНИМ РОЗЧИНОМ БРОМФЕНОЛОВОГО СИНЬОГО

У наукових публікаціях левоцетиризин, який був включений до складу численних інших препаратів у таблетованій формі, виступав об'єктом досліджень, проведених за допомогою різних методів, таких як УФ-спектрофотометрія, електрохімічні методи, ТШХ та ВЕРХ [30,24].

Хімічна будова левоцетиризину дигідрохлориду дозволяє використовувати спектрофотометрію для його кількісного визначення. Це можливо за рахунок того, що атоми та молекули поглинають енергію відповідно до своєї певної структури та обмежень [41].

Для медико-фармацевтичних потреб важливо визначати малі кількості левоцетиризину у фармацевтичних препаратах. Тому слід акцентувати увагу на розробці простих, селективних та економічно ефективних методів визначення цієї речовини, що відповідають вимогам специфікацій (кількість зразків, однорідність зразків, однорідність вмісту в таблетках під час проведення досліджень) [32].

3.1 Вибір умов спектрофотометричного визначення левоцетиризину дигідрохлориду з бромфеноловим синім у видимій ділянці спектра

Ключовим елементом дослідження є правильний вибір органічного розчинника, який сприятиме реакції між левоцетиризином та БФС, а також забезпечить утворення відповідного кольорового продукту.

Визначення оптимального розчинника для спектрофотометрії залежить від декількох факторів, таких як характеристики аналіту, його розчинність у різних розчинниках, стабільність розчину, можливість уникнення внутрішньої

фонові абсорбції, а також характеристики самого розчинника (наприклад, прозорість, відсутність абсорбції у потрібному спектральному діапазоні). Часто в якості розчинників для спектрофотометрії використовують воду, органічні розчинники, такі як метанол, ацетонітрил, етилацетат тощо, або їх комбінації з додаванням різних модифікуючих речовин для оптимізації умов аналізу.

Як показано на рисунку 3.1, серед апробованих розчинників метанол проявляє найвище значення оптичної густини, тому його можна вважати найбільш оптимальним розчинником для розробки спектрофотометричної методики кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду з бромфеноловим синім.

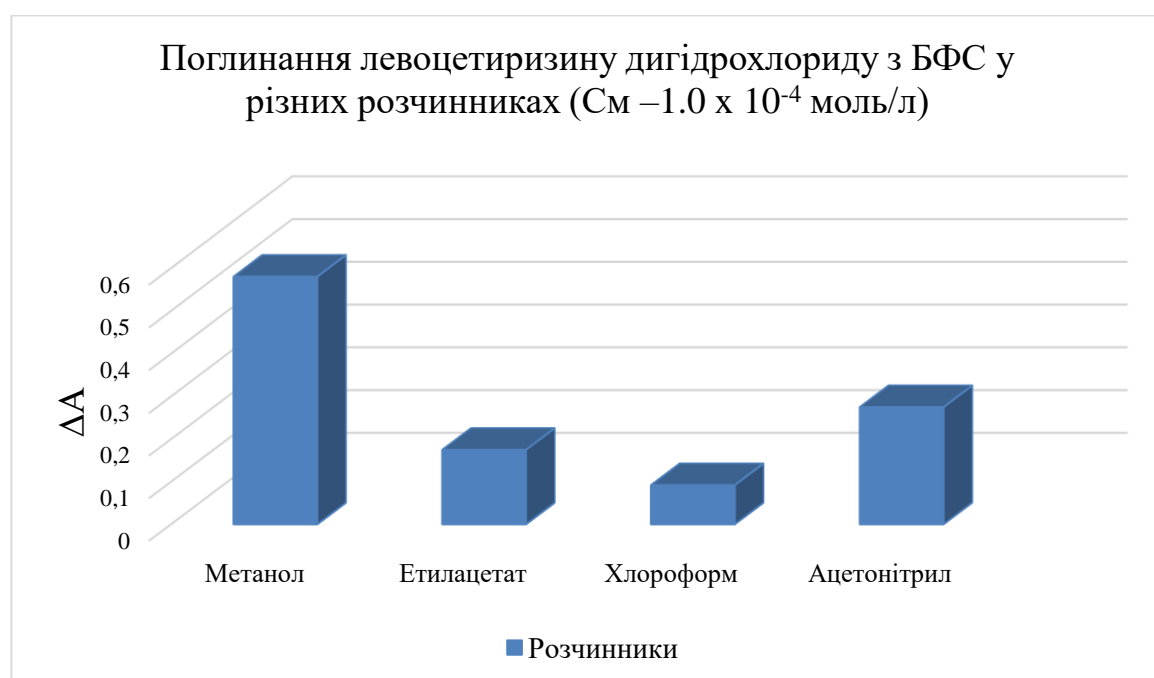


Рисунок 3.1 – Залежність значення оптичної густини комплексу левоцетиризину дигідрохлориду з БФС у різних розчинниках

Спектрофотометричне визначення левоцетиризину дигідрохлориду в комплексі із бромфеноловим синім полягає у вимірюванні поглинання світла у певному діапазоні довжин хвиль. У цьому випадку, бромфеноловий синій взаємодіючи з левоцетиризином дигідрохлоридом, утворює комплекс, який має свої унікальні характеристики поглинання світла.

Детальне вивчення цих характеристик дозволяє розробити метод аналізу, який може бути використаний для кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду.

Експериментально встановлено, що максимальне поглинання комплексу левоцетиризину дигідрохлориду у метанольному розчині бромфенолового синього спостерігається при довжині хвилі 426 нм, як це представлено на рисунку 3.2.

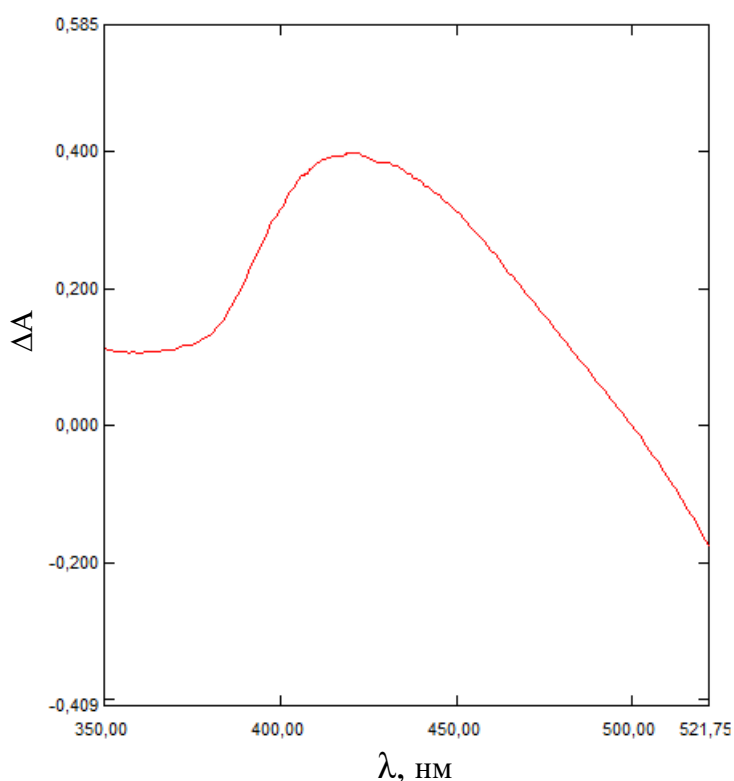


Рисунок 3.2 – Спектр поглинання продукту реакції левоцетиризину дигідрохлориду з метанольним розчином БФС ($C_M=1.0 \times 10^{-4}$ моль/л)

Під час експерименту проводилося дослідження концентрації розчину БФС, яка складає 1.0×10^{-4} М. Встановлено, що ця концентрація є оптимальною і застосовується в методиці проведення досліджень.

Для вивчення молекулярного співвідношення між левоцетиризином та БФС були використані методи ізомолярних серій (відомий як метод Жоба) та молярних співвідношень (відомий як метод насичення).

Метод ізомолярних серій передбачає створення послідовності розчинів змінної концентрації левоцетиризину та БФС, при цьому їх сумарна концентрація у розчині залишається постійною, тобто $V(\text{ЛЦ}) + V(\text{БФС}) = \text{const}$.

Для експериментальних цілей готували розчини левоцетиризину дигідрохлориду та БФС з однаковою молярною концентрацією, що дорівнює 1.0×10^{-4} М. Потім проводять стехіометричне змішування відношень від 1/5 до 5/1, зберігаючи при цьому однакову суму об'ємів. Графік, що представлений на рисунку 3.3, відображає залежність поглинання від складу ізомолярного розчину при довжині хвилі 426 нм.

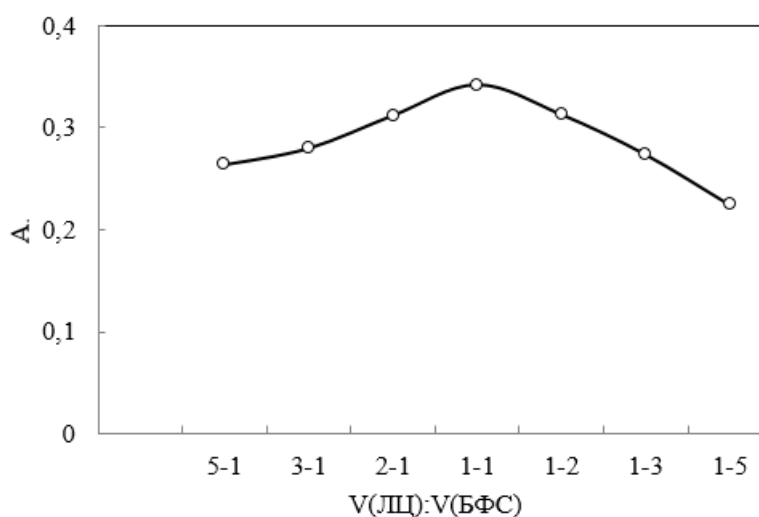


Рисунок 3.3 – Графік відношення абсорбції до складу ізомолярного розчину (за методом Жоба): $V(\text{ЛЦ}) - 1.0 \times 10^{-4}$ М ; $V(\text{БФС}) - 1.0 \times 10^{-4}$ М при 426 нм

У методі молярних співвідношень готували послідовність розчинів з фіксованим вмістом одного з компонентів і змінною концентрацією іншого.

Після вимірювання поглинання підготовлених розчинів будували графік, де абсорбція залежить від молярного співвідношення компонентів у розчині. Цей графік відомий як крива насичення. Згідно з рисунком 3.4, на точці перетину кривої насичення знаходиться значення коефіцієнта компонента, концентрація якого змінювалася.

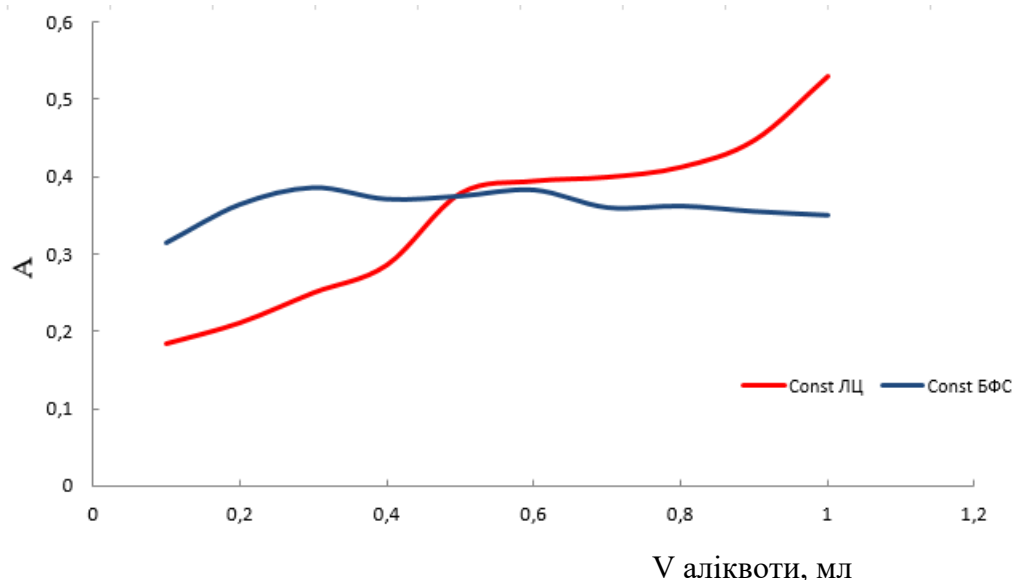


Рисунок 3.4 – Криві насичення: розчин левоцетиризину дигідрохлориду при const БФС (1.00 мл 1.0×10^{-4} М розчину) – синя крива; розчин БФС при const ЛЦ (1.00 мл 1.0×10^{-4} М розчину) – червона крива

За результатами, які представлені на рисунках 3.3 і 3.4, можна зробити висновок, що абсциса точки, де перетинаються дві дотичні, відображає молярне співвідношення між левоцетиризином дигідрохлоридом та БФС, яке дорівнює 1:1. Згідно з вимогами ДФУ [42] та ІСН [43], були оцінені такі характеристики валідації: специфічність, лінійність, діапазон застосування, прогнозована повна невизначеність, правильність та прецизійність, а також робастність методики.

3.2 Специфічність методики

Специфічність полягає у здатності чітко ідентифікувати аналіт у присутності інших очікуваних компонентів, таких як домішки, матриця тощо.

У вимогах ДФУ зазначено, що специфічність розробленої методики повинна бути підтверджена шляхом демонстрації відсутності впливу фонового поглинання, тобто відсутності впливу додаткових речовин («плацебо»).

В таблиці 3.1 представлені результати перевірки на специфічність розробленої спектрофотометричної методики.

Таблиця 3.1 – Результати перевірки специфічності спектрофотометричної методики левоцетиризину дигідрохлориду в таблетках.

Абсорбція плацебо(А плацебо)	Абсорбція розчину порівняння (Ast)	Знайдене значення δ_{noise} , %	Критерій прийнятності
0.001	0.380	0.26	не більше 0.5 %

Низьке значення відносної систематичної похибки ($\delta_{noise} = 0,26$ %) свідчить про відсутність впливу розчину "плацебо" на поглинання аналіту в метанольному розчині при довжині хвилі 426 нм, і не перевищує критерій прийнятності (не більше 0,5%).

3.3 Лінійність, діапазон застосування методики

Один із важливих показників правильності аналітичної методики є лінійність, яка описується законом Бера. Згідно з цим законом, коли розчин поглинає світло певної довжини хвилі, він відображає пік поглинання на цій довжині хвилі, а інтенсивність цього поглинання лінійно змінюється разом зі зростанням концентрації розчину.

Лінійність визначали шляхом аналізу модельних сумішей, в яких концентрація левоцетиризину дигідрохлориду систематично змінювалася в діапазоні від 4,66 до 18,66 мкг/мл. Графік цієї залежності представлений на рисунку 3.5.

Параметри лінійної залежності були статистично обраховані за допомогою методу найменших квадратів. Згідно цього методу рівняння має такий вигляд: $y = a + b \times x$, де величина y представляє оптичну щільність, a є вільним членом лінійної залежності, який використовується для розрахунку регресійної прямої, b - кутовим коефіцієнтом для цієї прямої, а x -

концентрацією аналіту. Рівняння лінійної регресії формулюється таким чином: $y=0,0126x+0,2315$. Коефіцієнт кореляції (R^2) дорівнює 0.999.

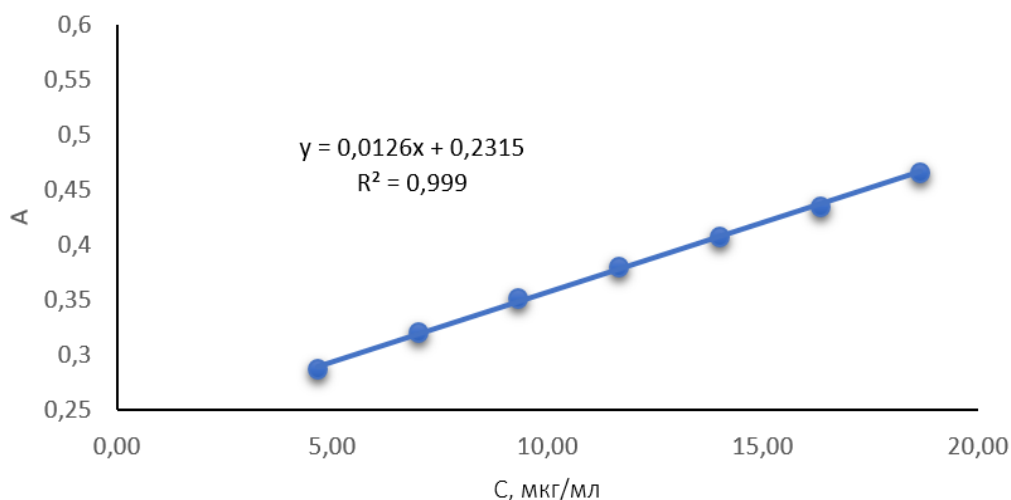


Рисунок 3.5 – Відношення оптичної густини до концентрації розчину ЛЦ

Як можна спостерігати на рисунку 3.5, аналітичний метод кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду, розроблений за допомогою спектрофотометрії, демонструє лінійну залежність по всьому діапазону застосування методики (від 4,66 до 18,66 мкг/мл).

Таблиця 3.2 містить метрологічні параметри регресійної моделі, які використовуються для кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду.

Межа виявлення (МВ) складає 0.58 мкг/мл, а межа кількісного виявлення (МКВ) – 1.76 мкг/мл.

Таблиця 3.2 – Метрологічні характеристики лінійної залежності

Величина	Значення	Критерії	Висновок (відповідає або невідповідає)
$b \pm (S_b)$	$0.0126 \pm (0.005)$	–	–
$a \pm (S_a)$	$ 0,2315 \pm (0.0057)$	$ a \leq 2.6$	Відповідає
R^2	0.9990	> 0.9980	Відповідає
МВ, мкг/мл	0.58	–	–

МКВ,мкг/мл	1.76	–	–
Підпорядкування закону Бера в діапазоні концентрацій (мкг/мл)	4.66 – 18.66	–	–

Згідно з усіма отриманими даними та показниками, спектрофотометричний метод для кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду у таблетках відповідає параметрам лінійності.

3.4 Прогноз повної невизначеності методики

Щоб перевірити, наскільки правильно буде відтворюватись розроблена методика в інших лабораторіях, провели розрахунок загальної невизначеності результатів застосування цієї методики для кількісного визначення.

Процес обчислення повної невизначеності аналітичної методики включає в себе оцінку невизначеності пробопідготовки (Δ_{SP}) та кінцевої аналітичної (Δ_{FAO}).

Таблиця 3.3 містить розрахунки невизначеності пробопідготовки для даної методики кількісного визначення.

Таблиця 3.3 – Обчислення невизначеності пробопідготовки методики для кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду в таблетках «Алерзин» 5 мг за реакцією з метанольним розчином БФС

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
Розчин порівняння левоцетиризину дигідрохлориду		
1) взяття наважки ФСЗ левоцетиризину дигідрохлориду	m_0	$0.2 \text{ мг}/23 \text{ мг} \times 100 \% = 0.87$
2) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 100.00 мл	100	0.12
3) взяття аліквоти піпеткою (градуйованою) 1.00 мл	1.00	0.74
4) взяття аліквоти $1 \cdot 10^{-3}$ М розчину БФС піпеткою (градуйованою) 1.00 мл	-	0.74
5) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 10.00 мл	10	0.5
Випробовуваний розчин		
6) взяття наважки таблеток	m_1	$0.2 \text{ мг}/230 \text{ мг} \times 100\% = 0.087$
7) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 50.00 мл	50	0.17
8) взяття аліквоти піпеткою (градуйованою) 1.00 мл	1.00	0.74
9) взяття аліквоти $1 \cdot 10^{-4}$ М розчину БФС піпеткою (градуйованою) 1.00 мл	-	0.74

<i>Продовження таблиці 3.3</i>		
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
10) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 10.00 мл	10	0.5
Компенсаційний розчин		
12) взяття наважки БФС	m_2	0.2 мг/33,8 мг × 100 % = 0.59
13) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 50.00 мл	50	0.17

Прогноз повної невизначеності розраховували за формулою:

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2}$$

де Δ_{SP} – невизначеність пробопідготовки;

Δ_{FAO} – прогнозована невизначеність кінцевої аналітичної операції, яка для даної спектрофотометричної методики становить 0.70 %.

Значення цієї невизначеності має бути меншими за максимально допустиму невизначеність ($\max \Delta_{As} = 2.4$ %).

На основі вимог до максимально припустимої невизначеності зважування, мірних колб і піпеток було виконано розрахунок загальної невизначеності процесу пробопідготовки. Результат показав, що сумарна невизначеність Δ_{SP} склала 1.97 %, а Δ_{As} згідно формули становить 2.09 % $\leq \max \Delta_{As} = 2.4$ %.

Важливо підкреслити, що операції пов'язані з взяттям наважки левоцетиризину дигідрохлориду, та ті, що стосуються взяття аліквоти піпеткою (градуйованою) об'ємом 1.00 мл, мають найбільшу невизначеність.

Отже, методика визначення кількісного вмісту левоцетиризину дигідрохлориду з метанольним розчином БФС за допомогою спектрофотометрії забезпечить точні результати з необхідною достовірністю в інших аналітичних лабораторіях, оскільки передбачувана повна невизначеність аналізу не перевищує критичних значень ($\max \Delta_{As}$).

Згідно з даною методикою були проведені обчислення щодо визначення вмісту левоцетиризину дигідрохлориду в таблетках. Результати експериментальних досліджень наведено в таблиці 3.4.

Таблиця 3.4 – Результати кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду в таблетках за реакцією з метанольним розчином БФС (n=6, p=0,95).

Лікарський засіб	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
Таблетки левоцетиризину дигідрохлориду 5 мг	0.0051	$\bar{m} = 0.0050$ г
	0.0049	$S = 8.16 \times 10^{-5}$
	0.0050	$t_{\alpha} = 2.57$
	0.0050	$\Delta x = 8.57 \times 10^{-5}$
	0.0051	RSD = 1.62 %
	0.0051	$\varepsilon = 0.67\%$

Згідно з даними відомостями таблиці 3.4 дана методика кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду є точною і достовірною.

3.5 Правильність та прецизійність методики

Правильність та прецизійність методики є ключовими аспектами у фармацевтичних дослідженнях. Правильність або точність визначає, наскільки середнє значення, отримане шляхом проведення серії паралельних вимірювань, відповідає відомому (або опорному) значенню вимірюваної величини.

Кількісним показником правильності є значення систематичної похибки. Якщо результати мають високу правильність, це означає, що систематична похибка є незначною.

Як відомо з ДФУ оцінка правильності проводиться на основі двох критеріїв, а саме статистичної незначущості та практичної незначущості.

Систематичну складову невизначеності (δ) можна описати як відмінність середнього значення (Z) від 100% у відношенні "знайдено/введено" (Z_i). При оцінці критерію практичної незначущості застосовується порівняння систематичної похибки з максимально допустимою невизначеністю аналізу ($\max \Delta_{As}$).

Прецизійність – це міра того, наскільки близькі один до одного окремі результати вимірювань, отримані на тому ж самому об'єкті за умови заданих параметрів. Кількісно прецизійність характеризується стандартним відхиленням (менші значення стандартного відхилення вказують на кращу прецизійність), оцінює рівень випадкових відхилень і допомагає визначити, наскільки точно вимірювання можуть бути відтворені при однакових умовах.

Щоб отримати інформацію щодо правильності та прецизійності використовували модельні розчини з різними концентраціями левоцетиризину дигідрохлориду, що становили від 80 до 120 % від номінальної концентрації охоплюючи весь діапазон застосування методу. Результати обчислень представлені в таблиці 3.5.

Отже, щоб зробити висновок про таку валідаційну характеристику, як правильність розраховали систематичну похибку δ % і для розробленої аналітичної методики кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду вона становить 0.02 %. Для оцінки прецизійності обчислювали стандартне відхилення (S_z), відносний довірчий інтервал (Δz). З таблиці 3.5 можна зробити висновок, що розроблена методика є достатньо прецизійною, оскільки значення відносного довірчого інтервалу Δz (0.44%) є меншим критичного значення для збіжності результатів (2.4%), а стандартне відхилення становить 0.19 %.

Отримані дані свідчать, що критерій незначущості систематичної похибки методики, як статистичної, так і практичної, виконаний. Таким чином, розроблена спектрофотометрична методика є достатньо правильною для всього діапазону концентрацій від 80 до 120%.

Таблиця 3.5 – Результати вивчення правильності та прецизійності методики

Модельні розчини	Вміст левоцетиризину дигідрохлориду, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100\%$
	Введено, $X_i = (m_i / m_{rs}) 100 \%$	Знайдено, $Y_i = (A_i / A_{rs}) 100 \%$	
M ₁	80.09	79.93	99.80
M ₂	85.23	85.05	99.79
M ₃	89.81	89.99	100.20
M ₄	94.77	94.84	100.07
M ₅	100.11	100.26	100.15
M ₆	106.01	106.12	100.10
M ₇	110.23	110.42	100.17
M ₈	115.33	115.01	99.72
M ₉	119.87	120.10	100.19
Середнє значення, Z, %			100.02
Стандартне відхилення, S _z , %			0.19
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 8) S_z = 2.3060 S_z, \%$			0.44
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta_{As} = 2.4 \%$			виконується (< 2.4)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 , \%$			0.02
Критерій незначущості систематичної похибки: Статистична незначущість: $\delta \% \leq \max \delta \% = \frac{\Delta z}{\sqrt{n}} = \frac{0.44}{\sqrt{9}} = 0,15$ Практична незначущість: $\delta \% \leq 0,32 \cdot \Delta_{As} = 0,77 \%$			виконується (0.02 < 0.15) виконується (0.02 < 0.77)
Загальний висновок про методику			Коректна

Внутрішньолабораторна відтворюваність – це ступінь прецизійності, коли вимірювання проводяться за однією і тією ж методикою всередині тієї ж самої лабораторії на одному об'єкті досліджень, за участі різних операторів та на різних комплектах обладнання, але з врахуванням значних інтервалів часу.

Дослідження було проведено на шести пробах з однієї серії препарату. Ці експерименти проводились різними хіміками-аналітиками, протягом різних днів, з використанням різного обладнання для вимірювань. Кількісні показники прецизійності включають в себе міри розкиду, такі як стандартне відхилення та відносне стандартне відхилення.

Результати аналізу внутрішньолабораторної прецизійності подані у таблиці 3.6 і показують, що значення відносного довірчого інтервалу для вісімнадцяти проб однієї серії (що включає шість паралельних вимірювань) $\Delta_{\bar{z}} = 0.11$ відповідає критерію прийнятності з урахуванням допустимої межі $\pm 7.5\%$ ($\leq 2,4\%$).

3.6 Робастність аналітичної методики

Робастність - це властивість аналітичної методики не реагувати на незначні контрольовані зміни в умовах її виконання, встановлені аналітиком. Робастність вказує на надійність методики при її застосуванні у визначених умовах. Одним з типових параметрів, який досліджується під час оцінки робастності, є стійкість у часі розчинів, що підлягають аналізу. Одним з типових параметрів, який досліджується під час оцінки робастності, є стійкість у часі розчинів, що підлягають аналізу.

Робастність даної спектрофотометричної методики для кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду з метанольним розчином БФС перевіряли шляхом аналізу стабільності тестового та контрольного розчинів протягом двох годин. Проводили вимірювання абсорбції при довжині хвилі 426 нм. Результати оцінки робастності наведені у таблиці 3.7.

Таблиця 3.6 – Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності

№ розчину	Величина Z_i , %		
	1 дослід	2 дослід	3 дослід
1	99.95	99.99	100.08
2	99.78	100.24	99.90
3	100.01	99.89	100.15
4	100.21	100.22	99.88
5	100.17	100.07	99.82
6	99.89	99.97	100.20
Середнє Z (%)	100.00	100.06	100.01
RSD_x , %	0.16	0.14	0.16
Відносне стандартне відхилення, RSD_Z (%)	0.15		
Відносний довірчий інтервал, $\Delta_{\bar{z}}$	$0.11 \leq 2.4$		
Критичне значення збіжності результатів Δ_{As} , %	2.4		

Таблиця 3.7 – Результати вивчення стабільності випробовуваного розчину левоцетиризину дигідрохлориду (1) та розчину порівняння левоцетиризину дигідрохлориду (2) за реакцією з метанольним розчином БФС

	t, хв						Асер	RSD_t , %
	0	5	45	60	95	120		
	0.344	0.346	0.348	0.351	0.350	0.348	0.348	0.74
	0.347	0.347	0.350	0.351	0.351	0.349	0.349	0.53

Можемо зазначити, що відсоток відносної стандартної похибки (RSD_t) не перевищує 2%, що свідчить про стабільність та достовірність методики.

3.7 Оцінка озеленіння аналітичної методики

Для оцінки екологічності спектрофотометричного кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду використовували "Еко-шкалу" та метод AGREE.

У таблиці 3.8 подано висновки за еко-шкалою, де сумарний бал склав 92. Проте проблема виникає у зв'язку з вибором розчинника, за що нараховується 3 пенальті бали. Інші аспекти екологічної оцінки є задовільними.

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

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

На рисунку 3.6 представлена піктограма, що ілюструє рівень "зеленості" за методом AGREE. У центрі піктограми знаходиться середній обчислений бал, який складає 0,84. Це свідчить про те, що розроблений метод є досить екологічно орієнтованим. Проте, операція 7, яка стосується запобігання утворенню аналітичних відходів, позначена оранжевим кольором, що свідчить про необхідність зменшення кількості відходів, наприклад, шляхом зменшення обсягу розчинника чи маси реагентів, під час розробки аналітичної методики. Проте, не завжди можливо це здійснити.

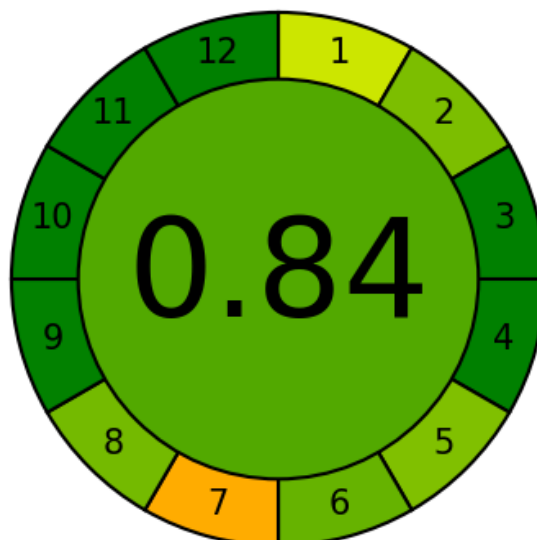


Рисунок 3.6 – Піктограма, що відображає ступінь "зеленості" аналітичного методу відповідно до методу AGREE

Загалом, враховуючи наведені вище факти, можна зробити висновок, що розроблена методика спектрофотометричного визначення левоцетиризину дигідрохлориду за реакцією з метанольним розчином БФС може вважатися достатньо "зеленою".

Висновки до розділу 3

1. Розроблено спектрофотометричну методику кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду з метанольним розчином з БФС.
2. Були розроблені та визначені найоптимальніші умови для даної аналітичної методики, які сприяли успішному протіканню реакції та утворенню комплексів між левоцетиризином та БФС. Аналітична довжина хвилі проведення кількісного визначення 426 нм.
3. Методами Жоба та насичення визначено, що стехіометричне співвідношення аналіту та барвника 1:1
4. Була проведена валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення левоцетиризину з використанням БФС, яка включала оцінку таких

основних валідаційних характеристик, як специфічність, лінійність, діапазон застосування, правильність, прецизійність та робастність.

5. Екологічність аналітичного методу, що був досліджений, оцінювалась з використанням методу AGREE та еко-шкали. За результатами оцінки можна впевнено заявити, що розроблений спектрофотометричний метод відповідає принципам "зеленої хімії".

6. Загальний висновок полягає в тому, що спектрофотометрична методика для кількісного визначення левоцетиризину дигідрохлориду з використанням БФС є простою у виконанні, доступною, швидкою, не потребує використання дорогого обладнання та шкідливих реагентів.

ВИСНОВКИ

У даній кваліфікаційній роботі було вирішено актуальне наукове завдання, що полягає у створенні швидкого, простого у виконанні, доступного та перевіреного спектрофотометричного методу для визначення левоцетиризину дигідрохлориду із використанням метанольного розчину БФС.

1. Було здійснено аналіз фармакопейних джерел, таких як ДФУ, ЄФ, АФ, а також електронні бази даних, що містять відомості про обрану субстанцію.

2. Провели дослідження для визначення найкращих умов аналізу, підбір оптимального органічного розчинника, оптимальну концентрацію для аналізу та розчину ФСЗ, визначення молекулярних співвідношень та стабільності.

3. Розробили та підтвердили за допомогою валідації спектрофотометричну методику визначення левоцетиризину дигідрохлориду з використанням метанольного розчину БФС, де максимум поглинання спостерігався за довжини хвилі 426нм. Методика буда лінійною в діапазоні концентрацій від 4,66 до 18,66 мкг/мл, коефіцієнт регресії становить 0,9990. МВ становила 0.58 мкг/мл, а МКВ – 1.76 мкг/мл. Також оцінювали такі валідаційні характеристики, як прецизійність, робасність, правильність.

4. Екологічну оцінку методики проводили за допомогою ESA та AGREE. Отримані дані підтверджують екологічність методу, оскільки в процесі дослідження використовувалися безпечні для довкілля розчинники, а також раціонально використовували ресурси. Отже, дана методика може бути використана у кількісному визначенні левоцетиризину дигідрохлориду

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Wang, J., Zhou, Y., Zhang, H., Hu, L., Liu, J., Wang, L., ... & Wang, Q. (2023). Pathogenesis of allergic diseases and implications for therapeutic interventions. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 138.
2. Кривоустов, С. П. (2017). Оптимізація лікування дітей з інфекцією дихальних шляхів, які мають алергічний риніт. *Здоров'я дитини*, (12, № 5), 585-589.
3. D'Amato, G., Murrieta-Aguttes, M., D'Amato, M., & Ansotegui, I. J. (2023). Pollen respiratory allergy: Is it really seasonal?. *World Allergy Organization Journal*, 16(7), 100799.
4. 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.
5. Charoo, N. A., Abdallah, D. B., Ahmed, D. T., Abrahamsson, B., Cristofolletti, R., Langguth, P., ... & Dressman, J. (2023). Biowaiver Monograph for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms: Levocetirizine Dihydrochloride. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 112(4), 893-903.
6. Poluzzi, E., Diemberger, I., De Ridder, M., Koci, A., Clo, M., Oteri, A., ... & Trifirò, G. (2017). Use of antihistamines and risk of ventricular tachyarrhythmia: a nested case-control study in five European countries from the ARITMO project. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 73, 1499-1510.
7. Hoofnagle, J. H. (2013). LiverTox: a website on drug-induced liver injury. In *Drug-induced liver disease* (pp. 725-732). Academic Press.
8. Karrim, N., Byrne, R., Magula, N., & Saman, Y. (2022). Antihistamines for motion sickness. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (10).
9. Hiraoka, K., Tashiro, M., Grobosch, T., Maurer, M., Oda, K., Toyohara, J., ... & Yanai, K. (2015). Brain histamine H1 receptor occupancy measured by PET after oral administration of levocetirizine, a non-sedating antihistamine. *Expert Opinion on Drug Safety*, 14(2), 199-206.

10. Thomas, S. H. (2012). Antihistamine poisoning. *Medicine*, 40(3), 109-110.
11. Eom, H. Y., Kang, M., Kang, S. W., Kim, U., Suh, J. H., Kim, J., ... & Han, S. B. (2016). Rapid chiral separation of racemic cetirizine in human plasma using subcritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 117, 380-389.
12. Dena, A. S. A., & Hassan, W. M. (2016). Experimental and quantum mechanical studies on the ion-pair of levocetirizine and bromocresol green in aqueous solutions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 163, 108-114.
13. Parisi, G. F., Licari, A., Papale, M., Manti, S., Salpietro, C., Marseglia, G. L., & Leonardi, S. (2020). Antihistamines: ABC for the pediatricians. *Pediatric Allergy and Immunology*, 31, 34-36.
14. May, B. C., & Gallivan, K. H. (2022). Levocetirizine and montelukast in the COVID-19 treatment paradigm. *International Immunopharmacology*, 103, 108412.
15. Kirimlioğlu, G. Y., & Öztürk, A. A. (2020). Levocetirizine dihydrochloride-loaded chitosan nanoparticles: formulation and in vitro evaluation. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(1), 27.
16. Jeong, S. H., Jang, J. H., & Lee, Y. B. (2024). Is Gender an Important Factor in the Precision Medicine Approach to Levocetirizine?. *Pharmaceutics*, 16(1), 146.
17. Labib, G. S. (2015). Novel levocetirizine HCl tablets with enhanced palatability: synergistic effect of combining taste modifiers and effervescence technique. *Drug design, development and therapy*, 5135-5146.
18. Ino, H., Hara, K., Honma, G., Doi, Y., & Fukase, H. (2014). Comparison of levocetirizine pharmacokinetics after single doses of levocetirizine oral solution and cetirizine dry syrup in healthy Japanese male subjects. *Journal of Drug Assessment*, 3(1), 38-42.

19. Jung, M. C., Kim, J. K., Cho, J. Y., Song, J. W., Lee, B., Park, J. W., ... & Kim, S. E. (2016). A case of levocetirizine-induced liver injury. *Clinical and Molecular Hepatology*, 22(4), 495.
20. Tanizaki, H., Nakamizo, S., Nakahigashi, K., Miyachi, Y., & Kabashima, K. (2013). A double dose of levocetirizine leads to better control of histamine-induced flare, wheal and itch in healthy donors. *Pharmacology*, 92(1-2), 71-74.
21. Domagała, A., Szepietowski, J., & Reich, A. (2017). Antihistamines in the treatment of pruritus in psoriasis. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*, 34(5), 457-463.
22. European Pharmacopoeia. 11 edn. 2022. URL:<https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph.-eur.-11th-edition22>. United States Pharmacopeia (USP), 2023 URL: <https://www.usp.org>
23. Mohamed, S. H., Issa, Y. M., & Elfeky, S. A. (2019). Extraction-free spectrophotometric assay of the antitussive drug pentoxyverine citrate using sulfonephthalein dyes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 222, 117186.
24. Mamatha, P., Lakshmi, P. V., & Prasunamba, P. L. (2010). UV Spectrophotometric Estimation of Levoceterizine Dihydrochloride in Bulk and Dosage Form. *Journal of Chemistry*, 7, S414-S418.
25. Raghu, M. S., & Basavaiah, K. (2012). Optimized and validated spectrophotometric methods for the determination of levocetirizine in pharmaceuticals based on charge transfer reaction. *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences*, 12(1), 33-41
26. Parmar, K., Baldania, S., Shah, D., Chhalotiya, U., & Parmar, N. (2013). Development and validation of first-order derivative spectrophotometry for simultaneous determination of levocetirizine dihydrochloride and phenylephrine hydrochloride in pharmaceutical dosage form. *International Journal of Spectroscopy*, 2013.

27. Joshi, S., Bhatia, C., Bal, C. S., & Rawat, M. S. M. (2012). Quantization of dextromethorphan and levocetirizine in combined dosage form using a novel validated RP-HPLC method. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74(1), 83.

28. Abdallah, N. A., Fathy, M. E., Tolba, M. M., El-Brashy, A. M., & Ibrahim, F. A. (2023). A quality-by-design eco-friendly UV-HPLC method for the determination of four drugs used to treat symptoms of common cold and COVID-19. *Scientific Reports*, 13(1), 1616.

29. Naz, N., Ali, S. N., Qayoom, A., Iqbal, S., & Akram, S. (2021). Rapid and sensitive method for simultaneous determination of citalopram with antihistamines by liquid chromatography. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34(3), 835-841.

30. Wang, Q., Liu, Y. H., Gao, M. G., & Zhao, M. J. (2016). Quantitative Analysis for Levocetirizine Hydrochloride Tablets Based on NIR Spectroscopy. *Guang pu xue yu Guang pu fen xi= Guang pu*, 36(12), 3941-3944.

31. 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.

32. Basavaiah, K., Raghu, M. S., & Vinay, K. B. (2012). Simple and rapid spectrophotometric assay of levocetirizine in pharmaceuticals through charge-transfer complexation using chloranilic acid and 2, 3-dichloro-5, 6-dicyanoquinone as π -acceptors. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, 26(3), 319-328.

33. 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.

34. Kurowska-Susdorf, A., Zwierzdzyński, M., Bevanda, A. M., Talić, S., Ivanković, A., & Płotka-Wasyłka, J. (2019). Green analytical chemistry: Social dimension and teaching. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 111, 185-196.

35. Gałuszka, A., Migaszewski, Z., & Namieśnik, J. (2013). The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 50, 78-84.

36. Ahmed, A. B., Gamal, M., Naguib, I. A., Ali, H. M., & Abdallah, F. F. (2022). Environmental impact of the reported chromatographic methods for the determination of the first FDA-Approved therapy for COVID-19 Patients, Remdesivir: A comparative study. *Microchemical Journal*, 176, 107242.

37. Gamal, M., Naguib, I. A., Panda, D. S., & Abdallah, F. F. (2021). Comparative study of four greenness assessment tools for selection of greenest analytical method for assay of hyoscine N-butyl bromide. *Analytical Methods*, 13(3), 369-380.

38. Pena-Pereira, F., Wojnowski, W., & Tobiszewski, M. (2020). AGREE—Analytical GREENness metric approach and software. *Analytical chemistry*, 92(14), 10076-10082.

39. 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.

40. National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 9955977, Levocetirizine Dihydrochloride. Retrieved June 2, 2024 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Levocetirizine-Dihydrochloride>.

41. Chouhan, V. S. (2011). *Development of Validated Analytical Methods for the Estimation of Some New Antipsychotic Drugs in Pharmaceutical Dosage Forms* (Doctoral dissertation, Rajiv Gandhi University of Health Sciences (India)).

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

43. 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\(R1\)](https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/Q2(R1)).

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. Рушак А. М., Михалків М. М. Розробка методики спектрофотометричного визначення левоцетиризину в таблетках з використанням метанольного розчину бромфенолового синього / Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку», 9–12 квітня 2024, Одеса. С. 241-243.