

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

Фармацевтичний факультет
Кафедра фармацевтичної хімії

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри _____
Лілія Логойда

«20» травня 2024 р.

УДК 615.-03/074:543.422.3:615.225:615.453.6

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

На тему:
РОЗРОБКА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ
ЕНАЛАПРИЛУ МАЛЕАТУ В ТАБЛЕТКАХ ЗА РЕАКЦІЄЮ З
БРОМФЕНОЛОВИМ СИНІМ

Виконав здобувач вищої освіти V курсу
денної форми навчання
спеціальності 226 «Фармація, промислова фармація»

_____ Артем Самолюк

Науковий керівник:

к. фарм. н., доцент, доцент кафедри фармацевтичної хімії

_____ Любомир Криських

ТЕРНОПІЛЬ 2024

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	4
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1 АНАЛІЗ ІСНУЮЧИХ ПІДХОДІВ ДО РОЗРОБКИ ТА МЕТОДІВ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ЕНАЛАПРИЛУ МАЛЕАТУ В СУБСТАНЦІЇ ТА ЙОГО ЛІКАРСЬКИХ ФОРМАХ (огляд літератури)	9
1.1 Загальна характеристика еналаприлу малеату.....	9
1.2 Сучасні підходи щодо кількісного визначення еналаприлу малеату.....	9
Висновки до розділу 1.....	22
РОЗДІЛ 2 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ОБ’ЄКТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА МОДЕЛЮВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ.....	24
2.1 Фізико-хімічні властивості об’єктів дослідження.....	24
2.2 Спектрофотометрична методика визначення еналаприлу малеату в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромфеноловим синім.....	25
РОЗДІЛ 3 РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИХ МЕТОДИК ВИЗНАЧЕННЯ ЕНАЛАПРИЛУ МАЛЕАТУ В СУБСТАНЦІЇ ТА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ.....	28
3.1 Розробка та валідація спектрофотометричної методики визначення еналаприлу малеату в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромофеноловим синім.....	28
3.1.1 Лінійність, діапазон застосування методики.....	31
3.1.2 Правильність та прецизійність методики.....	33
3.1.3 Робастність методики.....	35
3.1.4 Специфічність методики.....	35
3.1.5 Застосування методики для аналізу комерційних фармацевтичних препаратів.....	36
3.1.6 Прогноз повної невизначеності методики.....	37

3.1.7 Оцінка екологічності новоопрацьованої методики визначення еналаприлу малетау за реакцією з БФС.....	39
Висновки до розділу 3.....	41
ВИСНОВКИ.....	43
Список використаних джерел.....	45

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт
- ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія
- АТХ – анатомо-терапевтична-хімічна класифікація
- АПФ – ангіотензинперетворюючий фермент
- УФ – ультрафіолет
- ДФУ – державна фармакопея України
- 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)
- МВ (LOD) – межа виявлення
- МКВ (LOQ) – межа кількісного визначення
- РХ-МС/МС – рідинна хроматографія - мас-спектрокопії
- РХ – рідинна хроматографія
- ВЕРХ-МС/МС – високоефективна рідинна хроматографія-мас-спектрометрія
- ФСЗ – фармакопейний стандартний зразок
- ДМД – діодно-матричний детектор
- RSD – відносне стандартне відхилення (Relative Standard Deviation)
- t – критерій Стьюдента

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження.

Підвищення тиску є основним фактором ризику розвитку серцево-судинних захворювань. На даний момент кожна третя людина має не діагностовану гіпертонію, а в тих, що діагностовано – половина не приймають засоби для зниження артеріального тиску. Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) підбила підсумки про те, що кожного року від високого артеріального тиску помирає близько дев'яти мільйонів людей по всьому світу [1]. Для лікування гіпертонічної хвороби використовують різні лікарські засоби, що мають різний механізм зниження артеріального тиску. У наш час набули популярність препарати, що діють на ренін-ангіотензивну систему, а саме інгібітори АПФ ферменту. Одним із основних препаратів цієї групи, який використовуються при гіпертонії це еналаприл малеат, який згідно АТХ класифікації належить до групи C09A A02 - монокомпонентні препарати блокатори АПФ [2]. Еналаприл малеату, а саме його метаболіт еналаприлат АПФ, який утворює судинозвужуючу сполуку ангіотензин II з ангіотензину I та інактивує вазодилатуючу речовину брадикінін. Огляд-дослідження довели, що еналаприл малеат знижує артеріальний тиск, а отже розвиток серцево-судинних захворювань і смертності людей від хвороб пов'язаних з нею.[3]. З моменту синтезу в 1980 році, він досі широко використовується для лікування гіпертензивної хвороби завдяки своїй результативності [4]. Одна з умов забезпечення системи якості лікарського препарату є методики ефективного і точного визначення активного фармацевтичного інгредієнта (АФІ) еналаприлу в субстанції, модельних сумішах і у лікарських препаратах. На теперішній час відомо багато методик визначення еналаприлу за допомогою спектрофотометричного, спектрофлуориметричного, титриметричного, електрохімічного, мас-спектроскопічного та інших методів. Але їм характерна низка загальних недоліків, таких як: необхідність застосування шкідливих речовин для аналізу, високовартісне обладнання, довготривалість аналізу, а отже

є потреба в створенні нових методик для покращення аналізу, це є актуальним завданням і несе практичне значення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Кваліфікаційна робота виконана згідно з планом 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: Метою роботи є розробити та валідувати просту, швидку і доступну спектрофотометричну методику визначення еналаприлу малеату в таблетках за допомогою утворення комплексів з барвниками з дотриманням підходів «зеленої хімії».

Завдання дослідження:

- обробити інформацію стосовно цілей, завдань та ускладнення, які виникають при розробці та валідації методик визначення еналаприлу малеату;
- дослідити наявні підходи до створення і валідації методик кількісного визначення та оцінки їх екологічності;
- створити спектрофотометричну методику визначення еналаприлу в таблетках за реакцією з бромфеноловим синім, зважаючи на принципи «зеленої хімії»;
- покращити експериментальні умови спектрофотометричного визначення еналаприлу за реакцією з бромфеноловим синім;
- дійснити валідацію іноваційної спектрофотометричної методики для кількісного визначення еналаприлу в його комерційно доступних препаратах;

- провести оцінку екологічності запропонованої методики визначення еналаприлу малеату методом спектрофотометрії згідно принципів «зеленої хімії»;

Об'єкт дослідження. Теоретичне обґрунтування та експериментальне підтвердження опрацювання спектрофотометричних методик кількісного визначення еналаприлу за реакцією з барвинками та їх застосування у фармацевтичному аналізі

Предмет дослідження – еналаприл малеат: таблетки промислового виробництва

Методи дослідження

При розв'язанні задач поставлених у роботі використовували спектрофотометричний метод аналізу в УФ та видимій області спектра. Планування експериментів та обробка отриманих результатів здійснювалися шляхом використання моделювання, аналізу та візуалізації даних, із використанням методів валідації, регресійного та кореляційного аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів.

Вперше запропоновано покращену спектрофотометричну методику кількісного визначення еналаприлу малеату за утворенням комплексу бромфеноловим синім.

Вперше зроблена оптимізація умов інноваційних методик для вдосконалення аналітичних характеристик, вибрані реагенти, розчинники, підібрані оптимальні співвідношення та досліджено стабільність отриманих комплексів у часі.

Вперше зроблено оцінку екологічності запропонованих спектрофотометричних методик визначення еналаприлу малеату з урахуванням принципів «зеленої хімії» за допомогою аналітичної еко-шкали та інструмента AGREE

Практичне значення одержаних результатів.

У практиці фармацевтичного аналізу розглядається використання нових спектрофотометричних методів для кількісного визначення еналаприлу через

утворення комплексів з бромфеноловим синім як у субстанції, так і в таблетках, які є доступні на ринку. Досліджено, що наявність допоміжних речовин не впливає на аналіз діючої речовини. Проаналізовано та підтверджено ефективність нових методів визначення еналаприлу малеату у формі таблеток.

Публікації. За матеріалами кваліфікаційної роботи опубліковано одні тези доповідей.

Обсяг та структура кваліфікаційної роботи. Кваліфікаційна робота викладена на 52 сторінках, складається з вступу, трьох розділів, висновків, списку використаних джерел, що містить 54 найменувань, 1 додаток. Робота ілюстрована 7 таблицями та 7 рисунках.

РОЗДІЛ 1. АНАЛІЗ ІСНУЮЧИХ ПІДХОДІВ ДО РОЗРОБКИ ТА МЕТОДІВ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ЕНАЛАПРИЛУ МАЛЕАТУ В СУБСТАНЦІЇ ТА ЙОГО ЛІКАРСЬКИХ ФОРМАХ

1.1 Загальна характеристика еналаприлу

Еналаприл малеат – антигіпертензивний засіб синтетичного походження, що відноситься до групи інгібіторів АПФ. Механізм дії проявляється після метаболізму до еналаприлату, який здатний пригнічувати АПФ, що призводить до зниження в крові ангіотензину II, як наслідок збільшується рівень реніну і зменшення секреції альдостерону. Основним фармакологічним ефектом є зниження артеріального тиску в крові [5]. Ефект зниження артеріального тиску триває 24 години, при цьому не впливає на частоту серцевих скорочень і серцево-судинних рефлексів, відсутній негативний вплив на ліпідний профіль плазми крові. Всмоктування не залежить від їжі, початок дії повільніший, тому менш схильний викликати артеріальну гіпотензію при застосуванні першої дози. Довготривала терапія має потенціал для зниження ризику виникнення цукрового діабету II типу, в схильних осіб [6].

В Україні еналаприл присутній на фармацевтичному ринку, як оригінальний препарат: Ренітек так і дженериками: Еналаприл, Еналаприл KRKA, Еналаприл ТЕВА, ЕНАП, Берліприл, ЕНАМ, Еналаприл Здоров'я, Еналаприл червона зірка, Еналаприл-Дарниця, Еналаприл-АСТРАФАРМ, Еналозид Моно, Еналаприл Лекхім, та багато комбінацій з іншими фармацевтичними сполуками, Приблизно 100 зареєстрованих позицій у С09В комбінованих препаратів інгібіторів АПФ [7].

1.2 Сучасні підходи щодо кількісного визначення еналаприлу малеату

Обширний огляд наукових журналів з аналітичної хімії та інших видань, щодо методів визначення еналаприлу малеату в субстанції та у моно або комбінованих лікарських формах, показав, що для його визначення достатньо широкий діапазон аналітичних методів, серед яких: вольтаметрія,

високоєфективна рідинна хроматографія, рідинна хроматографія-мас-спектроскопія, капілярний електрофорез, кондуктометрія, УФ-спектрофотометрія, мас-спектроскопія та ін. [8].

Методики визначення еналаприлу малеату, які наведені в монографіях ДФУ та Європейської Фармакопеї.

В ДФУ відсутня монографія на субстанцію еналаприлу, натомість є на таблетки еналаприлу малеату. Ідентифікацію пропонують проводити за допомогою методу тонкошарової хроматографії. Для кількісного визначення еналаприлу малеату в таблетках пропонують використання методу рідинної хроматографії. В монографії наведені умови визначення еналаприлу у таблетках, де застосовується хроматографічна колонка 0.25 м x 4.0 мм, рухома фаза складається з двох компонентів ацетонітрил Р – розчинник (40:60), як розчинник використовують 0.136 г калію дигідрофосфату Р розчиненого у 800 мл води Р, рН встановлюють 2.0 за допомогою фосфорної кислоти Р і доводять до 1000.0 мл з швидкістю рухомої фази 1.0 мл/хв, Детектування проводили спектрофотометрично при довжині хвилі 215 нм [9].

Європейська Фармакопея пропонує для ідентифікації еналаприлу малеату інфрачервону абсорбційну спектрофотометрію, питома оптичне обертання висушеної речовини, випробування на супутні домішки проводили за допомогою ВЕРХ з спектрофотометричним детектуванням при 215нм [10].

1.3 Спектрофотометричні методики визначення еналаприлу малеату

Вчені з Єгипту розробили методику визначення еналаприлу малеату та нітрендипіну в таблетках за допомогою методу спектрофотометрії, використовуючи спектри співвідношень, а саме: методику першої похідної максимум вимірювання були 219.2 нм і 233.4 нм для визначення еналаприлу і нітрендипіну відповідно, друга методика заснована на різниці співвідношення в еналаприлу це різниця амплітуд між 213 нм і 225нм, нітрендипіну між 241 і 227нм, наступна це віднімання співвідношень з наступним розширеним відніманням відношень еналаприл так визначався при 210нм з різницею сталих

значень з спектра відношень з наступним множенням на дільник, тобто спектр нітрендипіну. Підтверджена лінійність в концентрації еналаприлу 1-11 мкг/мл та 2-14 мкг/мл для нітрендипіну. Вони можуть бути застосовані в рутинному аналізі даних препаратів в лабораторіях, оскільки були провалідовані і селективними [11].

Вчені з Єгипту Хорія А. Мохамеда, Пакіназ І. Хашбаа, Рім І. Шахін, запропонували методику визначення еналаприлу малеату, лізиноприлу дигідрату, моєксиприлу гідрохлориду та раміприлу гідрохлориду в чистому вигляді або в лікарській формі за допомогою спектрофотометричного методу. Це визначення з використанням реакції окислення калій дихроматом (метод А) або калію перманганатом (методом Б) в середовищі сульфатної кислоти з вимірюванням кольорових продуктів реакції, максимум поглинання був при 610 і 520 нм відповідно. Лінійний діапазон має значення 20-900 мкг/мл-1 і 2-500 мкг/мл-1 відповідно для кожного методу Даний метод може бути використаний для аналізу лікарських речовин [12].

Вчений Амір Алхай Сакур спільно з Байан Балід з університету Алеппо розробили нову методику визначення периндоприлу ербуміну та еналаприлу малеату, дана методика ґрунтувалась на утворенні жовтих забарвлених іон-парних комплексів лікарських препаратів з барвником сульфонаталеїнової кислоти, бромокрезоловим зеленим у хлороформі, визначали спектофотометричним методом при довжині хвилі 414 нм та 415 нм периндоприлу і еналаприлу відповідно. Стехіометричне співвідношення між реагентами становило 1:1. Межа виявлення становить 0.125 мкг/мл та 0.230 мкг/мл для периндоприлу та еналаприлу відповідно, була валідована і може бути застосована для визначення еналаприлу і периндоприлу як в лікарських засобах, так і в субстанції [13].

Вчені з Індії Віна Сингх та Санжай Дахарвал розробили спектрофотометричні методики визначення парацетамолу, еналаприлу малеату та гідрохлортіазиду у таблетованих формах за мультилінійної регресії, трилінійної регресії та класичного методу найменших квадратів. Селективність

досліджувалась на приготуваній потрійній лабораторній суміші. Точність і специфічність доведена в діапазоні $5\text{-}35\text{мкг/мл}^{-1}$, $5\text{-}40\text{мкг/мл}^{-1}$ і $5\text{-}40\text{мкг/мл}^{-1}$ для парацетамолу, гідрохлортіазиду і еналаприлу відповідно. Дані методики успішно провалідовані згідно рекомендації ІСН і є точними і специфічними, тому можуть використовуватися у контролі якості цих препаратів у таблетованих лікарських формах [14].

Вчені з Індії Архіта Патель і Самір Патель разом із Ямілю Патер розробили дві методики одночасного визначення леркандипіну (ЛГ) і еналаприлу малеату методом спектрофотометричного визначення одночасного рівняння, похідної першого порядку і багатовимірного спектрофотометричного аналізу. Для одночасного рівняння визнаєчає еналаприл малеату і леркандипіну гідрохлориду 207 нм та 236 нм межа ідентифікації і кількісного визначення для леркандипіну становила 0.26 мкг/мл та 0.78 мкг/мл відповідно та 0.41 мкг/мл та 1.24 мкг/мл для еналаприлу відповідно, іншим методом використовує нульову точку перетину леркандипіну при 330нм і еналаприлу малеату при 219 нм. Ліміт ідентифікації і кількісного визначення даною методикою становила 0.39 мкг/мл і 1.19 мкг/мл для леркандипіну і 0.31 мкг/мл і 0.97 мкг/мл відповідно. Розроблені методики можуть бути використанні для визначення леркандипіну і еналаприлу малеату. [15]

Індійські вчені Сантош Каражі з Рагхавенда Кулкарном розробили методику дослідження таблеток або субстанції еналаприлу малеату та калію лозартану за допомогою методу УФ-спектрофотометрії, за першою похідною, з використанням методу нульового перетину, в ньому лозартан калію можна визначати при 209 нм, а еналаприлу 245 нм. Методика має такий діапазон лінійності для еналаприлу малеату 4-32 мкг/мл та 4-56 мкг/мл для лозартану. Розроблена методика була застосована для аналізу даних лікарських засобів в комбінації або в субстанціях [16].

Для визначення еналаприлу малеату в субтанції або лікарських формах вчені з Індії Рагаа Ел Шеїх з колегами запропонували методику на основі методу спектрофотометрії. Вони використали реакцію утворення іонних комплексів між

еналаприлом і барвниками бромкрезоловим пурпуровим і бромфеноловим синім при рН 2.8 і 3.0, з подальшою екстрацією хлороформом. Поглинання вимірювали при 408 і 414 нм відповідно. Стехіометричне співвідношення становило 1:1 (препарат : реагент) для кожного реагента. Лінійність в діапазоні 2.0-24мкг/мл для еналаприлу і 2.0-28мкг відповідно для кожного барвника. Методики були валідовані згідно рекомендації ІСН та можуть успішно застосовуватись в фармацевтичному аналізі субстанцій або таблеток еналаприлу [17].

1.4 Хроматографічні методики визначення еналаприлу малеату

У роботі *Piponski* та співавт. було запропоновано швидку методику визначення еналаприлу у комбінації з бісопрололом за допомогою методом ВЕРХ у твердих лікарських формах. Вони використали перхлорат-аніон, який має хаотропні властивості, складові рухомої фази це 55% метанол і 45% хлоридна кислота (0.07% об/об). УФ моніторинг сигналу фіксувався при 214нм. Лінійність була доведена в проміжку 20-200 мкг/мл і 20-200мкг/мл для бісопрололу і еналаприлу відповідно. Перхлоратний іон здатний покращити формування піків та результати хроматографування при аналізі комбінації еналаприлу і бісопрололу [18].

В опублікованій роботі індійських вчених розроблено нову методику для визначення еналаприлу методом градієнтної РХ, використовуючи рухому фазу ацетонітрилу і фосфатний буферний розчин при рН 3.0, і температуру колонок 55 °С. Це забезпечило розділення всіх відомих домішок з роздільною здатністю 3.5, ліміт визначення для еналаприлу було 0.15мкг/мл, ліміт детекції еналаприлу і його домішок 0.0045 мкг/мл. Аналітична методика є чутливою, тому може бути використанна для визначення еналаприлу [19].

Румунські вчені розробили економічну методику ВЕРХ для визначення еналаприлу малеату в таблетках з рухомою фазою ацетонітрил і фосфатний буферний розчин з ультрафіолетовим детектуванням при 210 нм, час виконання 3 хв, час утримання 2-3 хв, що є дуже швидко. Методика була лінійна в діапазоні

10-100 мкг/мл з коефіцієнтом кореляції $r^2 = 0.9998$ та провалідована і може бути використана для рутинного аналізу еналаприлу малеату в таблетках [20].

Вчені з міста Карачі, Пакистан, розробили методику визначення метформіну гідрохлориду та інгібіторів ангіотензинперетворюючого ферменту (каптоприл, лізиноприл та еналаприл), у нерозфасованій лікарській формі, використовуючи метод ВЕРХ. Як рідку фазу застосовували суміш метанол-вода 50:50 (об/об) з рН 3.1 по фосфорній кислоті. Детектували при довжині хвилі 218 нм. Метод провалідований згідно рекомендацій ІСН та лінійність була в діапазоні концентрацій 10-10000 нг/мл-1 для метформіну і 30-10000 нг/мл-1 для каптоприлу, лізиноприлу та еналаприлу, і може бути застосований для фармакокінетичних досліджень даних лікарських засобів [21].

Вчені з університету в Карачі, Пакистан, Найма Султана і Мохаммед Саїд Арайн розробили нову методику визначення лізиноприлу, еналаприлу, каптоприлу та фозиноприлу в крові та лікарських засобах, використовуючи метод ВЕРХ для одночасного визначення досліджуваних речовин в плазмі крові людини. Як рухому фазу використали суміш ацетонітрил:вода (60:40 об/об). Детектували при довжині хвилі 225 нм. Лінійна залежність була задовільна для всіх досліджуваних речовин (r^2 більше 0.995). Дана методика може бути використана для визначення даних фармацевтичних препаратів в крові та лікарських формах [22].

Професорка Лілія Логойда з Тернопільського національного медичного університету, запропонувала нову методику визначення еналаприлу і бісопрололу в комбінованій лікарській формі за допомогою методу ВЕРХ з використанням рухомої фази метанол:фосфатний буферний розчин (65:35 об/об) з подальшим УФ детектуванням при довжині хвилі 225 нм. Метод був лінійним в діапазоні концентрацій 150-250 мкг/мл, коефіцієнт кореляції становить 0.9992. Дана методика була провалідована згідно рекомендації ІСН і може бути використана в рутинному аналізі комбінованих лікарських засобів еналаприлу і бісопрололу [23].

Вчені з Університету Консепсьйон, Чилі, розробили методику визначення еналаприлу малеату та гідрохлортіазиду за допомогою РХ з УФ-детектуванням продуктів окислення при 210нм, як рухому фазу використали метанол – тетрагідрофуран – фосфатний буфер (рН 2.2; 0.01М) (32:5:63, об/об). Лінійність досліджували при концентраціях 40-140 мкг/мл та 100-350 мкг/мл для еналаприлу та гідроїлортіазиду. Продукти деградації досліджуваних субстанцій були розділені за основними піками, що показує селективність даної методики і дозволяє одночасно визначати еналаприл і гідрохлортіазид в субстанціях і комбінованих лікарських формах [24].

Вчена Маніша Масіх запропонувала нову методику кількісного визначення амлодипіну та еналаприлу за допомогою методу ВЕРХ із застосуванням УФ-детектуванням при довжині хвилі 218 нм, як рухому фазу використали суміш метанол: 0.1 Н хлоридна кислота (1:1). Лійність дослідили при концентрації 10-50 мкг/мл для амлодипіну і еналаприлу, коефіцієнт кореляції 0.9992 та 0.9994 відповідно. Дана методика була точною, специфічною, надійною і стабільною і може бути використанна для аналізу еналаприлу малеату і амлодипіну бесилату в субстанції та комбінованих лікарських формах [25].

Команда дослідників з Португалії і Америки розробили методику одночасного визначення гліклазиду та еналаприлу малеату в комбінації за допомогою методу ВЕРХ, використовуючи як рухому фазу фосфатний буферний розчин (рН 4.4), ацетонітрил і метанол (45:40:15), довжина хвилі детектування 217 нм. Методика була валідована згідно рекомендацій ІСН Q2 і була лінійною в діапазоні 40-120 мкг/мл ($r^2 = 0.991$) та 2.5-7.5 мкг/мл ($r^2 = 0.998$) для гліклазиду та еналаприлу малеату відповідно. Розроблена методика може бути використана для рутинного контролю якості комбінованих ЛФ цих речовин. [26].

Науковці з Карфагенського університету, Джарзуна, Туніс, розробили методику визначення еналаприлу малеату в лікарських формах за допомогою методу обернено фазової ВЕРХ. Використали трикутник Снайдера для оптимізації розділення еналаприлу даним методом через наявність п'яти домішок і двох продуктів розкладу. Як рухому фазу використали 20 мМ

фосфатний буферний розчин (рН 2.0) – метанол – тетрагідрофурфурол – триетиламін (66:25:9:0.1 об/об) з подальшою УФ-детекцією при 215 нм. Лінійність для еналаприлу визначили в межах 20-100 мг/мл, еналаприлат і дікетопіперазину 2-20 мг/мл. Ліміт визначення еналаприлу і еналаприлату була 1.5 нг/мл, а дікетопіперазину 0.3 нг/мл, границя виявлення еналаприлу, еналаприлату та дікетопіперазину становила 0.5 нг/мл, 0.25 нг/мл, 0.2 нг/мл відповідно. Методика валідована, специфічна, точна і стабільна, що вказує на можливість застосування для контролю якості в лікарських засобах [27].

Дослідники з Ягеллонського університету, Польща, розробили нову методику багатокомпонентного визначення тринадцяти фармацевтичних інгредієнтів, що використовуються для лікування гіпертонічної хвороби, серед яких еналаприлу малеат, методом ВЕРХ з діодноматричним детектором. Хроматографію проводили, використовуючи як рухому фазу ацетонітрил і фосфатний буферний розчин (рН = 2.50). Детектування проводили при 230 нм. Коефіцієнт кореляції становив більше 0.990. Значення LOD і LOQ були такими: 0.0009 до 0.0923 мг/мл⁻¹ і від 0.0027 до 0.2794 мг/мл⁻¹, відповідно. Дана методика була валідована, показала хорошу лінійність і точність та може бути використана для одночасного визначення активних фармацевтичних інгредієнтів в комбінованих таблетках [28].

Українська науковиця з Тернопільського Національного медичного університету Лілія Логойда розробила нову методику одночасного визначення комбінації верепамілу, еналаприлу та еналаприлату в плазмі крові за допомогою ВЕРХ-МС/МС. Хроматографічне розділення проводили в градієнтному режимі з використанням Елюенту А - складом ацетонітрил-вода-мурашина кислота у співвідношенні 5:95:0.1 та елюентом В ацетонітрил-мурашина кислота, 100:0.1 (об/об). Лінійність була визначена в діапазоні 1-100 нг/мл і 2-200 нг/мл і 1-100 нг/мл для верепамілу, еналаприлу малеату, і еналаприду дегідрату відповідно. Це дозволило швидко, всього за дві хвилини, і точно визначати дану комбінацію в плазмі крові для клінічних досліджень і лікарського моніторингу [29].

Дослідниця з Польщі Сільвія Магієра разом із Ясеком Куса розробили нову методику визначення аліскрену, еналаприлу та їх метаболітів за допомогою мікроекстракції з плазми та сечі людини та подальше дослідження за допомогою ВЕРХ та МС/МС, як рухому фазу використали 0.1% мурашиної кислоти у воді та ацетонітрил. Виявлення проводилось в режимі моніторингу множинних реакцій із застосуванням електророзпилювальної іонізації з використанням позитивних іонів. Лінійність досліджували в діапазоні 0.01-500 нг/мл для аліскрену, еналаприлу та їх активних метаболітів, коефіцієнт кореляції 0.9995 для аліскрену, 0.9997 для еналаприлу та 0.9996 для їх метаболітів. Цей метод дозволяє виявити метаболіти та діючі речовини з сечі та крові [30].

Вчений Шу Женг разом з іншими вченими з Китаю розробили чутливу методику одночасного визначення еналаприлу і ривароксабану за допомогою ВЕРХ МС/МС в плазмі крові. Цей спосіб може бути застосовано для дослідження фармакокінетичної взаємодії. Як рухому фазу використали ацетонітрил і 0.1% мурашину кислоту з градієнтом елюювання. Моніторинг мас-спектрів проводили в режимі множинних реакцій іонних переходів від попередника до продукту. Для ривароксабану 436.1→145, 377.3→234.2 м/z, для еналаприлу та 285.2→193.1 м/z для діазепаму. Лінійність валідовано в межах 1.0-200нг/мл для ривароксабану та 0.5-100 нг/мл для еналаприлу. Відносне стандартне відхилення менше 9.4%. Метод був успішно застосований для визначення в плазмі крові щурів одночасно ривароксабану та еналаприлу та виявленню значної взаємодії цих препаратів [31].

Вчені з Пакистану розробили методику одночасного визначення дилтіазему, лізиноприлу, каптоприлу та еналаприлу в лікарських препаратах та плазмі крові методом РХ, використовуючи як рухому фазу ацетонітрил:метанол:воду (5:45:50 об/об), рН регулювали ортофосфатною кислотою на рівні 2.5. Реєстрували поглинання за довжини хвилі 230 нм. Лінійність встановлена в межах 2.5-25 мкг/мл-1 для дилтіазему, 20-200 мкг/мл-1 для лізиноприлу та еналаприлу, 30-300мкг/мл-1 для каптоприлу, коефіцієнт

кореляції $r^2 \geq 0.999$. Метод був валідований згідно ІСН і може бути застосований для кількісного визначення даних компонентів в сироватці крові [32].

Вчені з Єгипту Мохамед Абдул-Азім Мохамед спільно з колегами розробили методику визначення еналаприлу малеату і нітрендипіну та їх метаболітів еналаприлату, дегідронітрендипіну відповідно разом з гідрохлортіазидом за допомогою методу РХ-МС/МС для їх одночасного визначення в плазмі крові. Хроматографічно розділили осаджені білки в якості рухомої фази використали воду та ацетонітрил (10:90). Детектування проводили в режимі множинних реакцій для еналаприлу 377.1 → 234.1 для еналаприлу і 349.2 → 206.1 і еналаприлату лінійність була в діапазоні 1-200 і 20-500 нг/мл, коефіцієнт кореляції $r^2 \geq 0.999$. Даний метод провалідований та може бути використаний для аналізу даних сумішей в плазмі крові для дослідження біоеквівалентностей та терапевтичного моніторингу [33].

Вчені з Йорданії, розробили методику кількісного визначення і біодоступності еналаприлу малеату і еналаприлату за допомогою методу РХ-МС/МС, вони використовували, як внутрішній стандарт ситагліптин. Рухома фаза складалась з 70% метанолу та 30% суміші мМ ацетату амонію та 0.2 мМ мурашиної кислоти. Лінійність була в межах 1.0-200.0 нг/мл. Ліміт визначення еналаприлу і еналаприлату 0.907 та 0.910 нг/мл відповідно, ліміт кількісне визначення 1нг/мл. Методика була специфічною та провалідована, і успішно може застосовуватись для кількісного визначення еналаприлу малеату і еналаприлату в плазмі крові людей [34].

Вчені з Південної Африки розробили методику визначення в плазмі крові карведилолу, енаприлату та периндоприлату із застосуванням високоефективної РХ-МС/МС. Хроматографічне розділення проводили після осадження білків з використанням двох рухомих фаз, після ідентифікували мас-спектрометричним детектуванням в режимі моніторингу множинних реакцій. Калібрування аналізували в межах 0.2-200 нг/мл для всіх аналітів. Це дозволило визначати карведилол, еналаприлат і периндоприл в крові людей [35].

Вчені з Кореї розробили методику визначення еналаприлу в плазмі крові методом РХ-МС/МС детектуванням. Як біологічний матеріал була кров добровольців, які приймали еналаприл малеат натще. Речовину екстрагували ацетонітрилом з подальшим хроматографічним розділенням з використанням рухомої фази метанол - 10 мМ амоній форміат (80:20, об/об) і детектували тандемною мас-спектрометрією в режимі позитивної електророзпилювальної іонізації. Детектували в режимі множинних реакцій еналаприлу і глібенкламіду m/z 376.447 \rightarrow 234.1 і 494.1 \rightarrow 369.1 відповідно. Межа кількісного визначення для аналітів дорівнювали 1.0 нг/мл, а час хроматографії становив 2 хвилини. Метод точний та був успішно валідований і може бути використаним для фармакокінетичних та біоеквівалентних досліджень [36].

Вчені Таня Гангнус, Бйорн Б. Буркхардт з Німеччини, розробили методику визначення еналаприлу і карведілолу та їх метаболів методом РХ-МС/МС. Для осадження білків використали суміш ацетонітрил/ацетон, як рухому фазу використали 1% мурашину кислоту у воді та метанолі з подальшим визначенням методом мас-спектроскопії. Діапазон калібрувальної лінії становив 0.024/0.049 до 50 000 нг/мл. Лінійність для всіх аналітів дорівнювали $r^2 \geq 0.995$. Даний метод був валідований згідно міжнародних рекомендації, точність, чутливість були додатково валідовані, що вказує на те, що дана методика може бути використана у визначенні еналаприлу і карведілолу та їх метаболітів в плазмі крові людей [37].

Дослідники з Турції розробили дві методики визначення еналаприлу і лерканідипіну в їх бінарних сумішах, для цього метод РХ з діодно-матричним детектуванням та першої похідної спектрів-співвідношень. Як рухому фазу використали суміш метанол-вода(55:45, об/об) з рН 2.7, для регулювання кислотності використали ортофосфорну кислоту 15 мМ. При визначенні ДМД кількісне визначення можна проводити в межах 0.50-20.00 мкг/мл-1 для еналаприлу та лерканідипіну. Друга методика використовувала вимірювання амплітуд співвідношення-спектів при 219.7 нм та 233.0 нм для еналаприлу та лерканідипіну відповідно. При цьому лінійність будували в межах 1-20 мкг/мл-1

еналаприлу та 1-16 мкг/мл-1 лерканідипіну, застосовуючи першу похідну спектрофотометричного методу співвідношення. Дані методики мають низку переваг, завдяки яким можуть бути використані для визначення еналаприлу і лерканідипіну в комбінаціях у лікарських засобах [38].

Українська науковця Наталя Бевз з Національного фармацевтичного університету, Харків, разом з колегами запропонували удосконалену методику визначення еналаприлу в комбінації з гідрохлортіазидом в таблетках методом РХ з діодно-матричним детектором, як рухому фазу використали калію дигідрофосфат, фосфорну кислоту, метанол і ацетонітрил. Лінійність отриманих результатів становила $r^2 = 0.9997$ та $r^2 = 0.9991$ для еналаприлу та гідрохлортіазиду відповідно. Отримані ними валідаційні характеристики відповідали вимогам і дана методика може бути використана для визначення еналаприлу малеату в комбінації з гідрохлортіазидом [39].

Вчені Маріос Спанакіс і Іоанніс Ніопас розробили методику визначення еналаприлу малеату з використанням методу газової хромато-мас-спектрометрії (ГХ-МС) з моніторингом окремих іонів (SIM), який проводиться при m/z 220 та m/z 234 для еналаприлу і еналаприлату відповідно та m/z 172 для внутрішнього стандарту. Дана методика застосовує твердофазу екстракцію та дериватизацію метилйодидом для кількісного визначення еналаприлу та його метаболіту в плазмі крові. Графік був лінійним в межах концентрацій 5-160 нг/мл-1, коефіцієнт кореляції $r^2 \geq 0.999$. Нижньою межею кількісного визначення становила 2 нг/мл-1 для обох аналітів. Методика може бути застосована для визначення еналаприлату у плазмі крові після перорального прийому [40].

1.5 Інші методики визначення еналаприлу малеату

Для визначення суміші ацетилсаліцилвої кислоти, гідрохлортіазид, еналаприл та аторвастатин польська вчена Анна Масланка разом з колегами розробила методику їх кількісного і якісного визначення в поліпіпюлях, методом хроматографічно-денситометричного визначення, як рухому фазу використали *n*-гексан-етилацетат-метанол-вода-оцтова кислота, нерухома фаза - силікагель

60 з флуоресцентним індикатор F254, еналаприл визначали при $\lambda = 265$ нм. Калібрування методу провели в широкому діапазоні. Піки лікарських речовин добре розділяються на хроматограмах, що забезпечує оцінку результатів як якісну так і кількісну. Методика була скоригована в різноманітних концентраційних діапазонах, які дорівнювали від 0.058 до 1.102 мкг/пляма для гідрохлортіазиду, від 0.505 до 6.560 мкг/пляма для еналаприлу та від 0.100 до 1.000 мкг/пляма для аторвастатин. Методика була лінійною, специфічною та чутливою [41].

Науковці-хіміки з державного університету Лондріни розробили методику одночасного визначення амлодипіну і еналаприлу за допомогою прямокутнохвильової вольтамперометрії, використовуючи багатостінний електрод з карбонових нанотрубок в присутності поверхнево-активної речовини катіонного типу цетилтриметиламонію броміду в концентрації 10 мкмоль^{-1} , калібрувальний графік будували в діапазоні $0.58\text{-}5.9 \text{ мкмоль}^{-1}$ для амлодипіну та $2.0\text{-}57 \text{ мкмоль}^{-1}$ для еналаприлу, межа детекції була 0.049 та 0.81 мкмоль^{-1} відповідно, для амлодипіну та еналаприлу. Методика була провалідована і може бути використана для визначення цих речовин в бінарній суміші. [42].

Науковці з Державного університету Лондріни розробили методику одночасного визначення гідрохлортіазиду та енаприлу малеату в комбінованих лікарських препаратах, використовуючи вольтамперометричний метод квадратних хвиль із застосуванням багатостінного електрода з вуглецевих нанотрубок. Для визначення аналітів використовують буферний розчин Бріттона-Робінсона з рН 5.0. Графік лінійності отриманий в межах $4.9 \times 10^{-7}\text{-}4.5 \times 10^{-5} \text{ моль/л}^{-1}$ та $5.0 \times 10^{-6}\text{-}8.3 \times 10^{-5} \text{ моль/л}^{-1}$, гідрохлортіазиду та еналаприлу відповідно. Методика була валідована та придатна для контролю якості препаратів еналаприлу в комбінації з гідрохлортіазидом [43].

Для визначення еналаприлу в таблетках Еда Мехметі разом з своїми колегами запропонували методику з використанням електрохімічного методу із немодифікованого графетного електрода. Еналаприл дає виражений пік окислення при $+1.05$ В (проти Ag/AgCl, 3.0 М KCl), який має форму овалу у

буферному розчині Бріттона-Робінсона при рН 5.0. Лійність при даних умовах дослідження була в межах від 2.5 до 90 мкМ з межею визначення 0.9 мкМ. Методика була відтворювана при десятих повторних вимірюваннях. Вона може бути корисна для швидкого дослідження еналаприлу в таблетованих лікарських формах без наступної його обробки [44].

Вчені з Бразилії Мар'яна Марра, Родріго Муноз та Едуард Ріхтер розробили методику визначення гідрохлортіазиду з дев'ятьма іншими фармацевтичними засобами, серед яких є еналаприл малеат. Вони використали метод субхвилинного капілярного зонного електрофорезу, з єдиним фоновим електролітом, що мав склад: 10 ммоль \times л⁻¹ борної кислоти з рН 9.0 встановленого за натрієм гідроксидом. Методика володіла гарною роздільною здатністю ($r > 1.3$) та з кореляцією > 0.995 . Виконання аналізу всіх інгредієнтів займає одну хвилину, та показує хорошу роздільну здатність, екологічність та лінійність, що свідчить про можливість використання в аналізі [45].

Висновки до розділу 1

1. Еналаприл малеат один з найпопулярніших інгібіторів ангіотензинперетворюючого ферменту для лікування гіпертонічної хвороби завдяки своїй доказовості та ефективності і широко представляється різними фірмами на фармацевтичному ринку України

2. Аналіз літературних наукових джерел стосовно методів визначення еналаприлу з врахуванням переваг та недоліків, з'ясувалось, найбільш поширеними методами, які використовуються - це УФ-видима спектрофотометрія та ВЕРХ, які мають ряд обмежень.

3. УФ-видима спектрофотометрія залишається найвикористовуванішим методом завдяки легкості, швидкості, вартості технічного оснащення і гарними аналітичними характеристиками, особливу увагу приділяють на використання реакції утворення іонних комплексів з барвниками завдяки переміщення аналітичної довжини хвилі у видиму область спектру.

4. Із взятими до уваги всіх недоліків існуючих методик аналізу еналаприлу, досі є актуальним завдання розробки та валідації нових, швидких та простих спектрофотометричних методик його кількісного визначення еналаприлу у субстанції та ЛЗ з дотримання правил «зеленої хімії».

РОЗДІЛ 2 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ОБ'ЄКТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА МОДЕЛЮВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ

2.1 Фізико-хімічні властивості об'єктів дослідження

Еналаприл малеат (INN, USAN), 2S)-1-[(2S)-2-[[[(1S)-1-(Етоксикарбоніл)-3-фенілпропіл]-аміно]пропаноїл]піролідин-2-карбонової кислоти гідроген (Z)-бутендіоат. (Рис. 2.1), білий або майже білий кристалічний порошок, майже без запаху, малорозчинний у воді (0.025 г/мл), добре розчинний у метанолі (0.20 г/мл), розчинний в спирті (0.08 г/мл), Легкорозчинний в диметилформаміді, слабо розчинний у напів полярних органічних розчинниках. Практично не розчинний в метиленхлориді, розчиняється в розбавлених розчинах гідроксидів лугів [46, 47].

Рекомендовано зберігати в герметичних контейнерах при 25°C, допускається відхилення від 15° С до 30° С, в захищеному від світла місці. Молекулярна маса становить 492.5 г/моль [48].

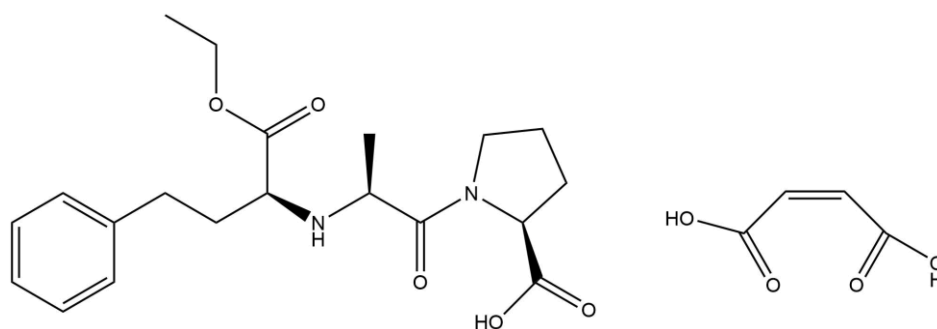


Рис. 2.1. Хімічна будова еналаприлу малеату

Температура плавлення субстанції знаходиться в діапазоні 143°C до 144,5°C. В УФ спектрі водний розчин підкислений кислотою спостерігається λ_{\max} при 257, 268 нм [49].

Еналаприл малеат комерційно доступний у формі таблеток, де АФІ разом з такими допоміжними речовинами як лактози моногідрат, натрію гідрокарбонат, кукурудза, крохмаль, натрію кроскармелоза, прежелатинізований крохмаль, стеарат магнію, оксид заліза червоний E172 [50].

У роботі використовували ФСЗ еналаприлу ($C_{20}H_{28}N_2O_5 \cdot C_4H_4O_4$, CAS - 76095-16-4), «Sigma-Aldrich», ($\geq 98\%$, ТШХ).

ЛЗ еналаприлу малеату: Еналаприл (ПАТ «Київмедпрепарат», Україна) таблетки по 20 мг, серія 121022, Еналаприл-Астрафарм (ТОВ «АСТРАФАРМ» Україна) таблетки по 20 мг серія 0083253, Еналаприл-Тева (Teva, Ізраїль), таблетки по 20 мг серія 16277023.

Реактиви, що застосовувались при розробці методики були кваліфікації «Для аналізу» Застосовували ацетонітрил («Sigma-Aldrich», $\geq 99,9\%$), бромфеноловий синій («Honeywell Fluka», $\geq 98\%$, ВЕРХ).

Спектрофотометричні вимірювання УФ і видимій області спектра виконували у 1 см кварцевих кюветах Spectrosil (Starna Scientific, Велика Британія) із використанням двопроменевого скануючого спектрофотометра Shimadzu UV-1800 (Японія) та оригінального програмного забезпечення UV-Probe 2.62.

В роботі використовували ваги лабораторні електронні RADWAG AS 200/С, ультразвукову ванну УЗМ-002, рН-метр І-160МІ з універсальним скляним електродом, орбітальний шейкер лабораторний універсальний ШО-10 та мірний посуд класу А. Статистичну обробку та визначення валідаційних характеристик проводили відповідно до вимог ДФУ 2.0 [51] та ІСН Q2 [52].

2.2 Спектрофотометрична методика визначення еналаприлу малеату в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромфеноловим синім

Приготування розчину БФС $8,6 \times 10^{-4}$ М

Точну наважку БФС 14.4 мг внесли в мірну колбу об'ємом 25 мл, додавали 10 мл ацетонітрилу, старанно струшували до повного розчинення і доводили до позначки тим самим розчинником.

Приготування розчину ФСЗ еналаприлу в ацетонітрилі $9,7 \times 10^{-5}$ М

Точну наважку ФСЗ еналаприлу малеату 23.9 мг внесли в мірну колбу об'ємом 25.0 мл з додаванням 15 мл ацетонітрилу. Суміш ретельно струсили до

повного розчинення і доводили до позначки тим самим розчинником. Аліквоту 0,5 мл відбирали в мірну колбу 10 мл і доводили до позначки ацетонітрилом.

Методика отримання калібрувального графіка.

В серію мірних колб об'ємом 25.0 мл внесли в порядку збільшення кількості розчин ФСЗ еналаприлу малеату в ацетонітрилі (0, 0.25, 0.5, 1.75, 1, 1.25 мл) додавали 1 мл розчину БФС $8,6 \times 10^{-4}$ М і добавляли ацетонітрил до позначки 25.0 і перемішували. Поглинання отриманого розчину вимірювали одразу ж при 597 нм проти компенсаційного розчину, який приготовлений аналогічно, але без розчинення ФСЗ еналаприлу малеату. Калібрувальну залежність отримали шляхом побудови графіку вимірних значень поглинання проти концентрації еналаприлу малеату в розчині.

Методика визначення еналаприлу малеату з БФС у таблетках.

Двадцять таблеток ЛЗ еналаприлу малеату точно зважили та розтерли в порошок. Кількість порошку розтертих таблеток, яка еквівалентна 23.9 мг еналаприлу малеату, додали в мірну колбу об'ємом 25 мл, змішавши з 15 мл ацетонітрилу, суміш старанно струшували протягом 15 хвилин, доводили до мітки тим самим розчинником, витримували в ультразвуковій бані впродовж 2 хвилин та профільтрували, застосовуючи фільтрувальний папір марки «Синя стрічка», відкидаючи перші порції фільтрату. Аліквоту профільтрованого розчину 0.75 мл внесли в мірну колбу об'ємом 25 мл, додаючи 1.0 мл $8,6 \times 10^{-4}$ М та ацетонітрилу до позначки. Поглинання вимірювали при 598 нм проти компенсаційного розчину, який був приготовлений аналогічно, але без використання розчину ЛЗ. Розрахунок вмісту еналаприлу малеату $C_{20}H_{28}N_2O_5 \cdot C_4H_4O_4$ у лікарській формі у відсотках від заявленого (W, %) розраховували за формулою:

$$W = \frac{A_1 \cdot a_0 \cdot P \cdot G}{A_0 \cdot a_1 \cdot L} \text{ ,де}$$

A_1 - поглинання випробуваного розчину еналаприлу малеату

A_0 - поглинання ацетонітрильного розчину ФСЗ еналаприлу малеату

a_1 – маса наважки порошку розтертих таблеток, мг

a_0 – маса наважки ФСЗ еналаприлу малеату, мг

P – вміст еналаприлу у ФСЗ еналаприлу малеату, %

G – середня маса таблетки ЛЗ, мг

L – заявлений вміст еналаприлу малеату в одній таблетці, мг

РОЗДІЛ 3 РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИХ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ЕНАЛАПРИЛУ В СУБСТАНЦІЇ ТА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ

Літературні джерела повідомляють про важливість опрацювання методик визначення еналаприлу за утворенням комплексу з барвниками. Зважаючи, що багато відомих методик визначення еналаприлу малеату не відповідають принципам «зеленої» аналітичної хімії (GAC), зростає необхідність у розробці методики, яка була б есо-friendly щодо аналітичної процедури визначення еналаприлу малеату, згідно із запитами сучасного фармацевтичного аналізу. Ми пропонуємо здійснювати визначення еналаприлу малеату через утворення бінарного комплексу еналаприлу та бромфеноловим синім на основні асоційнованих іонних пар. Ця взаємодія найімовірніше можлива через електродонорні групи, які мають у своїй структурі еналаприл малеат (амідна група).

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

Лікарські засоби здатні утворювати іонний парний комплекс з барвниками, ці іонні асоціати з аніоном барвника часто малорозчинні у воді, але при оптимізації умов методики їх визначення вони вільно розчиняють у різних розчинниках без потреби додаткового екстрагування неполярним розчином або застосування неіонногенних поверхнево-активних речовин, що є досить суттєво при розробках методик [53, 54]. Для розробки даної методики кількісного визначення еналаприлу малеату з барвником БФС було вирішено застосувати метод диференційної спектрофотометрії, з визначенням аналіту при довжині хвилі, що відповідає максимуму поглинання продукту взаємодії ЛП з барвником, що становить 598 нм.

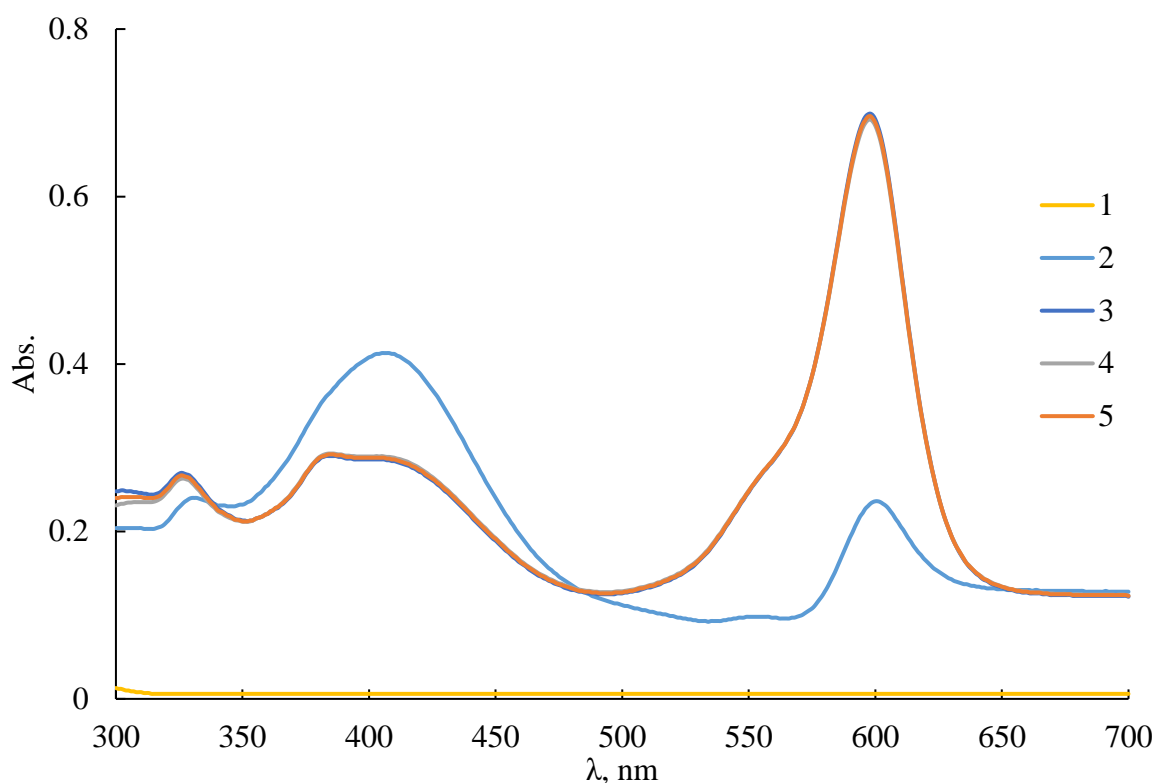


Рис. 3.1. Спектри поглинання еналаприлу малеату з БФС в ацетонітрилі. $c(\text{БФС}) = 3.44 \times 10^{-5} \text{ М}$, $C(\text{ФСЗ еналаприлу}) = 1,44 \text{ мкг/мл}$, 1 – Еналаприл малеат, 2 – БФС + ФСЗ еналаприлу, 3 – Еналаприлу КМП 20 мг, 4 – Еналаприлу-Тева 20 мг, 5 – Еналарпилу-Астрафарм 20 мг.

Для оптимізації умов перебігу індикаторної реакції, що б вона проходила швидко та кількісно з утворенням забарвлених іонних парних комплексів з високою стабільністю та чутливістю необхідна попередня оптимізація умов перебігу цієї реакції.

Абсолютні значення різниці поглинання комбінації БФС і еналаприлу малеату у аналізованих розчинниках із поглинанням барвника в тих самих розчинниках наведені на рис. 3.2. Для подальших досліджень як розчинник був обраний ацетонітрил.

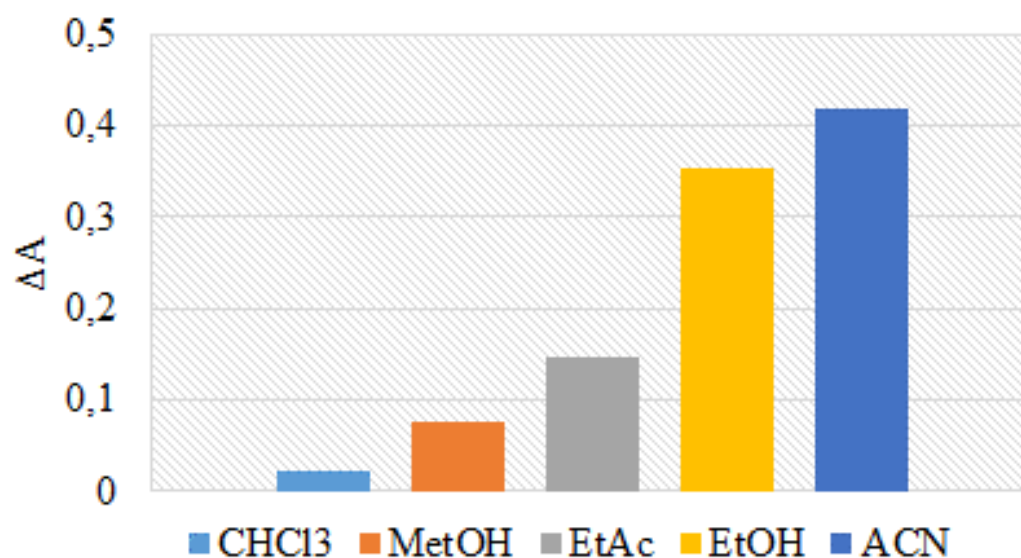


Рис. 3.2 Приріст поглинання в максимумі у розчині еналаприлу малеату-БФС у різних розчинниках. $c(\text{БФС}) = 3,44 \times 10^{-5} \text{ М}$, $C(\text{еналаприлу}) = 25 \text{ мкг/мл}$

Для вивчення стабільності комплексів в часі, що утворились, провели вимірювання поглинання аналізованого розчину за оптимальній умов на протязі 45 хв. Залежність поглинання отриманого продукту внаслідок реакції еналаприлу малеату з БФС від часу наведено на рис. 3.3.

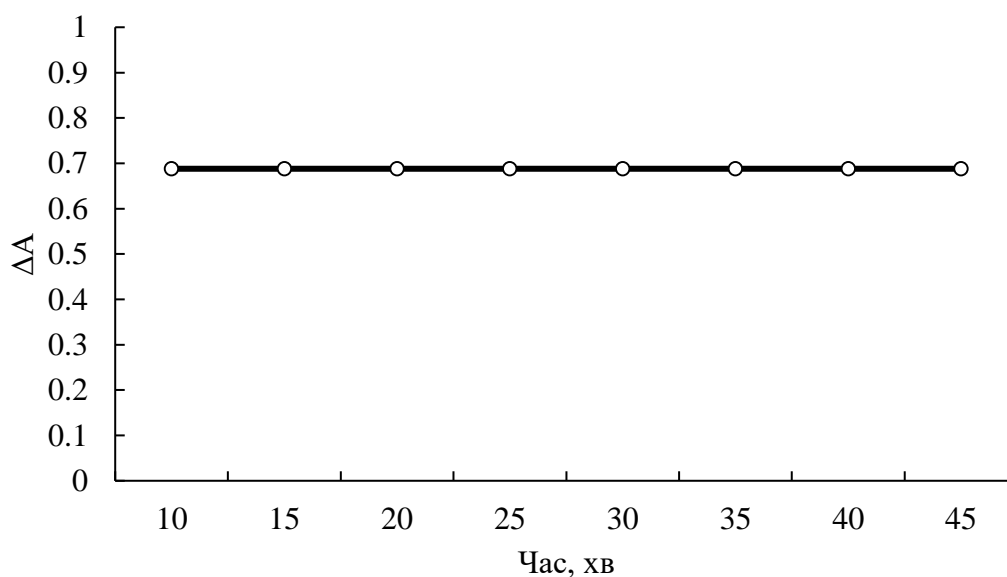


Рис. 3.3 Залежність поглинання продукту взаємодії еналаприлу з БФС у часі. $c(\text{БФС}) = 3,44 \times 10^{-5} \text{ М}$, $C(\text{еналаприлу малеату}) = 25 \text{ мкг/мл}$

Використовуючи метод безперервної варіації (ізомолярних серій) Джоба (Job P. 1936) визначали стехометрію даної реакції. Приготували вихідні еквімолярні розчини $1,1 \times 10^{-4}$ БФС і еналаприлу малеату та перемішали їх в антибатній пропорції, згідно запропонованої методики. Продукт, який був отриманий внаслідок реакції, реєстрували за довжини хвилі 598 нм. На рис. 3.4 бачимо, що комплекс утворюється за співвідношенням об'ємів компонентів ізомолярних серій 1:1 (барвник: еналаприл) відповідно і стехометрія їх взаємодій дорівнює один до одного.

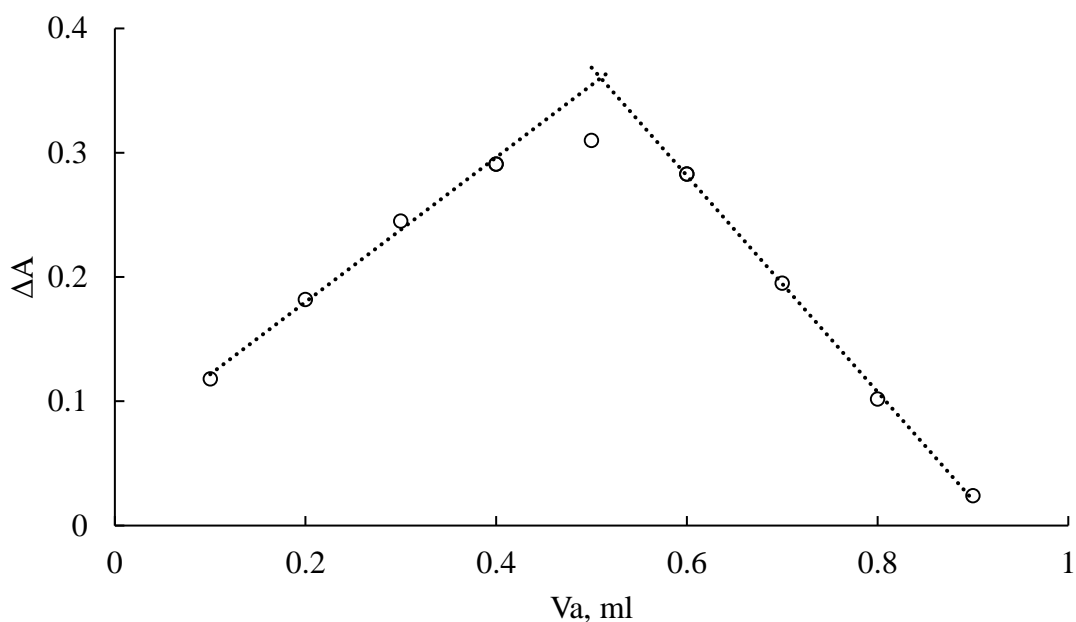


Рисунок 3.4 Графік залежності поглинання еналаприлу-БФС від композиції ізомолярного розчину. V1 – $1,0 \times 10^{-4}$ М БФС, V2 – $1,1 \times 10^{-4}$ М розчин ФСЗ еналаприлу малеату, $\lambda_{\max} = 598$ нм

3.1.1 Лінійність, діапазон застосування методики

Отриманні межі відповідали закону Бера, молярний показник поглинання МВ, рівняння регресії та коефіцієнт кореляції визначили за допомогою методу найменших квадратів [52]. Залежність поглинання від концентрації еналаприлу малеату за взаємодією з БФС наведена на рис 3.5

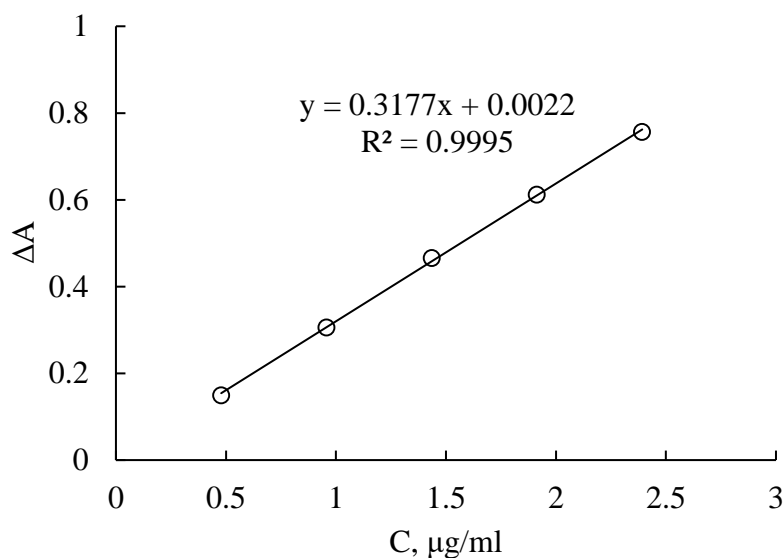


Рис. 3.5 Градувальна залежність для визначення еналаприлу малеату з БФС.
 $c(\text{БФС}) = 3,44 \times 10^{-5} \text{ M}$

Знайдено лінійну залежність між поглинанням у взаємодії БФС при λ_{max} та концентрацією еналаприлу малеату в діапазоні 0.4-2.4 мкг/мл.

За допомогою використання регресійного аналізу градувального графіка при 598 нм знайдено рівняння регресії типу $y = b \cdot x + a$, де y – це поглинання розчину λ_{max} , x – це концентрація еналаприлу, a – це вільний член прорахованої регресійної залежності, b – це тангенс кута нахилу одержаної регресійної залежності. Значення параметрів регресійного аналізу градувальної залежності, з урахуванням стандартних відхилень (S_a і S_b) для нахилу і перетину наведені в таблиці 3.1

Таблиця 3.1

Основні метрологічні характеристики лінійної залежності

Величина	Значення	Критерій	Висновок (відповідає або не відповідає)
$b \pm (S_b)$	$0.0102 \pm (0.0014)$	–	–
$a \pm (S_a)$	$0.1636 \pm (0.1214)$	$ a > 2.6\%$	Відповідає
R^2	0.9988	> 0.9921	Відповідає

Підтверджується лінійність калібрувальної кривої та дотримується закон Бера, оскільки були отримані високі значення коефіцієнта кореляції (r^2) і низькі значення вільного члена лінійної залежності. Також розраховано основні показники аналітичної чутливості спектрофотометричного визначення, та було встановлено, що молярний показник поглинання (ϵ) становить $4,7 \cdot 10^4$, питомий показник світлопоглинання ($A\%_{\text{см}}$) – 3264, коефіцієнт Сендела (S) – $3,10 \cdot 10^{-3}$ мкг/мл. Основні параметри лінійної залежності (рис. 3.5, табл 3.2) збігаються з вимогами ДФУ в усіх межах застосування запропонованої методики (0.4-2.4 мкг/мл)

При визначенні МВ та МКВ додержувались вказівок ІСН [57]. Дані значення розраховували на основі методу, який заснований на стандартному відхиленні відгуку та нахилу градувальної залежності. Для розрахунку МВ та МКВ були застосовані 3.3 та 10-ти кратні значення стандартного відхилення і тангенс нахилу регресійної лінії. Отримані значення МВ та МКВ дорівнювали 0,065 мкг/мл та 0,198 мкг/мл відповідно.

3.1.2 Правильність та прецизійність методики

Для здійснення перевірки правильності і прецизійності методики була приготовлена змодельована суміш з точним відомим вмістом еналаприлу малеату, що включають в себе діапазон методики (з діапазоном концентрацій в межах 70-130 % від номінального вмісту). Розраховали наступні критерії: для оцінки правильності - систематичну похибку $\delta\%$ та відносний довірчий інтервал Δz , для оцінки прецизійності згідно рекомендацій ДФУ. У табл 3.2 наведені результати здійснення розрахунків

Підсумок дослідження правильності та прецизійності методики

Модельні розчини	Вміст еналаприлу, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100\%$
	Введено, $X_i = (m_i/m_{rs}) 100\%$	Знайдено, $Y_i = (A_i/A_{rs}) 100\%$	
1	2	3	4
M ₁	66.46	66.30	99.77
M ₂	66.46	66.74	100.42
M ₃	66.46	66.30	99.77
M ₄	100	101.30	100.30
M ₅	100.70	102.20	101.47
M ₆	100	101.74	101.74
M ₇	132.92	133.04	100.10
M ₈	132.92	133.48	100.42
M ₉	132.92	132.83	99.93
Середнє значення, Z, %			100.55
Стандартне відхилення, S _z , %			0.76
Відносний довірчий інтервал, $\Delta z = t(95\%,8) \times S_z = 1,86 \times S_z$, %			1.42
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta A_s = 3.2\%$			виконується (1.42 < 3.2)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 $, %			0.55
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta\%$			виконується (0.55 < 1.02)
Загальний висновок про методику			Коректна

Дані отримані у ході експерименту щодо вивчення прецизійності мають допустимий розкид стосовно середнього значення та мале стандартне відхилення Sz% у всіх діапазонах досліджуваних концентрацій. Про задовільну близькість середнього значення поглинання досліджуваних розчинів до його реферетних величин свідчить середня похибка (δ) даної методики, складає 0,55 %.

3.1.3 Робасність методики

Проводили робасність методики спектрофотометричного визначення еналаприлу малеату за взаємодією з БФС на стадії її опрацювання, а саме коли встановлювались оптимальні умови перебігу даної аналітичної реакції та дослідження чинників, які ймовірно можуть змінювати показник поглинання досліджуваного розчину (концентрація БФС та стабільність в часі випробуваного розчину). Наведено, що варіація доданого БФС в межах ± 10 % не здійснює вплив на підсумок вимірювань (табл 3.3), а випробовувані розчини не змінюють поглинання протягом не менше 45 хв (рис 3.3).

Таблиця 3.3

Вплив кількості БФС на показник поглинання розчину

Кількість БФС, мл	ΔA
0.9	0.461
1.0	0.462
1.1	0.463

3.1.4 Специфічність методики

Для визначення специфічності розробленої спектрофотометричної методики визначення еналаприлу малеату за реакцією з БФС був приготовлений розчин допоміжних речовин («плацебо»), за допомогою якого оцінювали його специфічність. При вивченні специфічності аналітичної методики визначення еналаприлу малеату в таблетках, яка представлена в таблиці 3.4, можна зробити висновок, що абсорбція допоміжних речовин є незначною (розрахований

показник δ_{noise} становить 0.43 %) та входить в межі критеріїв прийнятності (не більше 1.24 %)

Таблиця. 3.4

**Вивчення специфічності аналітичної методики визначення
еналаприлу малеату**

Абсорбція плацебо	Абсорбція розчину домішок ЛФ	Абсорбція розчину порівняння (deltaAst)	Знайдене значення δ_{noise} , %	Критерій прийнятності
0.002	-	0.470	0.43	Не більше 1.24

3.1.5 Застосування методики для аналізу комерційних фармацевтичних препаратів

Для аналізу комерційних таблетованих препаратів еналаприлу малеату, успішно можна застосувати запропоновану методику (табл 3.5). Методика відповідає нормам відтворюваності і точності ($RSD \leq 2.43\%$, $\varepsilon \leq 2.55\%$).

Таблиця 3.5

**Результати кількісного визначення еналаприлу в комерційних препаратах
в таблетках (n=6, p=0.95)**

Лікарський засіб, вказана кількість АФІ, г	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
Таблетки «Еналаприл КМП», 0.02*	0.0198	$\bar{m} = 0.0203$ г
	0.0202	$S = 3.98 \times 10^{-4}$ г
	0.0206	$t = 2.57$
	0.0198	$\Delta x = 4.18 \times 10^{-4}$ г
	0.0205	$RSD = 1.97\%$
	0.0207	$\varepsilon = 1.33\%$

Таблетки «Еналаприл ТЕВА» 0.02*	0.0199 0.0204 0.0208 0.0196 0.0201 0.0204	$\bar{m} = 0.0202$ г $S = 4.24 \times 10^{-4}$ г $t = 2.57$ $\Delta x = 4.45 \times 10^{-4}$ г $RSD = 2.1$ % $\varepsilon = 2.20$ %
Таблетки «Еналаприл Астрафарм» 0.02*	0.0201 0.0197 0.0204 0.0205 0.0196 0.0205	$\bar{m} = 0.0201$ г $S = 4.03 \times 10^{-4}$ г $t = 2.57$ $\Delta x = 4.23 \times 10^{-4}$ г $RSD = 2.00$ % $\varepsilon = 2.10$ %

* встановлено за еталонним стандартним фармакопейним методом [9]

3.1.6 Прогноз повної невизначеності методики

Важливим етапом в розробці методик є підтвердження її коректності, для цього потрібно здійснити розрахунок прогнозування повної невизначеності аналітичної методики. Повна прогнозована відносна невизначеність включає в себе невизначеність пробопідготовки та невизначеність кінцевої аналітичної операції. Для спектрофотометричного методу визначення ДФУ визначає невизначеність кінцевої аналітичної операції і становить 0.70 %. Невизначеність пробопідготовки складається з взяття наважки, відбирання аліквот доведення до позначки розчинів у мірних колбах та ін. Розрахунки прогнозу повної невизначеності для даної спектрофотометричної методики еналаприлу в таблетках «Еналаприл КМП» 0.02 наведено в табл 3.5.

Розрахунок повної невизначеності пробопідготовки визначення еналаприлу малеату в комерційному препараті в таблетках «Еналаприлу КМП» 0.02г

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
Розчин порівняння		
1) Взяття наважки ФСЗ еналаприлу	m_0	0.2 мг/23.9 мг * 100% = 0.84 %
2) Доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.00 мл	25	0.23 %
3) Відбирання аліквоти піпеткою 0.5 мл	0.5	1.23 %
4) Доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.00 мл	25	0.23 %
Випробовуваний розчин		
5) Взяття наважки таблеток	m_1	0.2 мг/40.5 мг * 100% = 0.49 %
6) Доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.00 мл	25	0.23 %
7) Відбирання аліквоти піпеткою 1 мл	0.75	0.74 %
8) Доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.00 мл	25	0.23 %

Згідно до табл. 3.6 загальна невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) становить 1.79 %. З даних аналітичних операцій найбільші внески в загальну невизначеності в пробопідготовку для спектрофотометричного визначення еналаприлу в таблетках «Еналаприл КМП» 0.02 г вносять аналітичні операції 3 і 1 – це відбір аліквоти піпеткою на 0.5 мл, а також взяття наважок ФСЗ еналаприлу малету.

Прораховано прогноз повної невизначеності запропонованої методики кількісного визначення (Δ_{As}) складає 1.93 %.

$$\Delta_{As} = 1.93 \% \leq \max \Delta_{As} = 3.2 \%$$

Можна зробити висновок, що запропонована спектрофотометрична методика буде давати коректні результати в інших аналітичних лабораторіях, оскільки прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не перевищувала критичного значення ($\max \Delta_{As}$), тому забезпечуватиме правильні результати в інших аналітиків.

3.1.7 Оцінка екологічності запропонованої спектрофотометричної методики визначення еналаприлу за реакцією з БФС

Під час всієї розробки аналітичної спектрофотометричної методики визначення еналаприлу малеату в субстанції та його комерційних препаратах за реакцією з БФС одним з головних завдань було враховувати всі принципи «зеленої» [50-52] хімії та підбирати реагенти та прилади для її забезпечення. Для проведення оцінки впливу на навколишнє середовище використовували аналітику еко-шкалу (табл 3.7) та інструмент AGREE (Analytical GREEenness) (рис. 3.6).

Таблиця 3.7

Результати оцінювання екологічності спектрофотометричного визначення еналаприлу з БФС за аналітичною еко-шкалою

Параметри	Штрафні бали
Реактиви	
Ацетонітрил	4
БФС	1

Обладнання	
Використання енергії	0
Професійна шкідливість	0
Відходи	5
Загальна кількість пенальті балів: 10	
Бал аналітичної еко-шкали: 90	
Висновок	Вілмінний «зелений» аналіз

Для детальної оцінки зеленості спектрофотометричної методики еналаприлу малеату використали метод AGREE, що дозволяє комплексно аналізувати більшість аналітичних процесів з точки зору їх впливу на навколишнє середовище, що допомагає з'ясувати проблемні місця і внести необхідні зміни для підвищення ефективності і зниження шкідливого екологічного впливу реагентів та обладнання. Наведені результати у вигляді піктограми представлені на рис.3.6

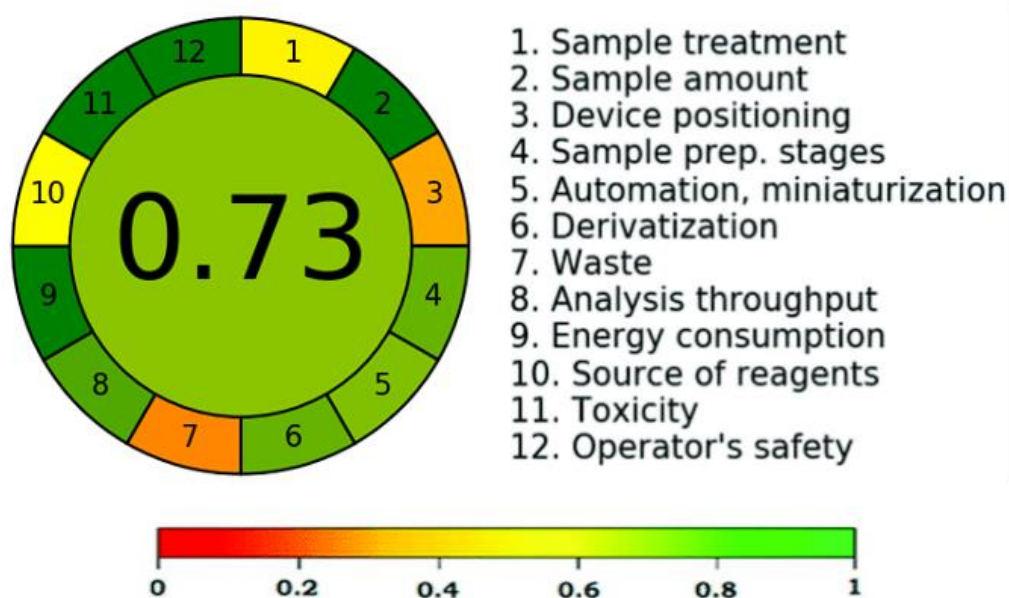


Рис. 3.6 Піктограма оцінки екологічності методики спектрофотометричного визначення еналаприлу малеату з БФС інструментом Analytical GREEnness

Запропонована спектрофотометрична методика визначення набирає 89 балів, що відповідає вимогам відмінного «зеленого» аналізу, згідно з принципами «зеленої» хімії.

Висновки до розділу 3

1. Розроблено методику та доказано її основні переваги для здійснення кількісного визначення еналаприлу малеату на основі використання методу спектрофотометрії у видимій області спектру. Визначення засноване на утворенні іонних асоціатів за реакцією з барвником бромфеноловий синій з λ_{max} при 598 нм.
2. Експериментальні умови визначення еналаприлу були оптимізовані за такими показниками: вибраний розчинник, концентрації, оптимальні умови пробопідготовки, визначено показники чутливості реакції та стехіометричного співвідношення взаємодії еналаприлу та бромфенолового синього, визначено стабільність комплексів в часі.
3. В даних експериментальних умовах, які були нами оптимізовані, ми отримали лінійну залежність між показником поглинання та концентрацією еналаприлу малеату в діапазоні 0.4-2.4 мкг/мл. Отримані значення МВ та МКВ дорівнювали 0,065 мкг/мл та 0,198 мкг/мл відповідно.
4. Валідація запропонованої методики проводилась згідно рекомендації ДФУ та ІСН Q2 за параметрами: лінійність, діапазон застосування, правильністю та прецизійністю, специфічністю та робастністю. Наведені валідаційні показники відповідають критеріям прийнятності.
5. Новоопрацьована метода була успішно використана для кількісного визначення еналапирлу малеату в комерційних лікарських препарат у формі таблеток. Вміст АФІ в таблетках «Еналаприл-КМП» 20 мг становить $101.33 \pm 1.33\%$ (RSD = 1.97%, δ = 1.33%), у таблетках «Еналаприл-Тева» 20 мг – $101.0 \pm 1,00\%$ (RSD=2,10%, δ = 1.00 %), а в

таблетках «Еналаприл-Астрафарм» 20 мг – $100.67 \pm 0.67\%$ (RSD=2.00%, $\delta = 0.67\%$).

6. Проведено оцінку взаємодії розробленої методики на довкілля з допомогою аналітичної еко-шкали та інструменту AGREE, за результатами цих досліджень вони відповідають вимогам відмінного «зеленого аналізу» згідно з критеріями GAC.
7. Запропонована спектрофотометрична методика еналаприлу малеату, що нами запропонована, є проста, швидка, не потребує екстрації, не потребує складної пробопідготовки та дороговартісного обладнання та може застосовуватись для рутинного контролю вмісту АФІ у комерційних препаратах еналаприлу малеату в лабораторіях і відділах контролю якості.

ВИСНОВКИ

У кваліфікаційній роботі розв'язано актуальне завдання фармацевтичного аналізу – опрацьовано прості, швидкі, та доступні спектрофотометричні методики кількісного визначення спектрофотометричного методу за реакцією утворення іонного асоціату з бромфеноловим синім в субстанції та таблетках і проведено їх валідацію згідно вимог ДФУ. Перевагою запропонованої спектрофотометричної методики кількісного визначення енааприлу малеату є простота, швидкість виконання, відсутність екстрагування та складної пробопідготовки, а також вона придатна для рутинного контролю вмісту АФІ у препаратах еналаприлу малеату у лабораторіях контролю якості.

1. Критично оглянуто методики кількісного визначення щодо методів виявлення еналаприлу малеату з врахуванням їх переваг та недоліків. Було встановлено, що спектрофотометрія залишається найпопулярнішим методом завдяки простоті, швидкості, вартості технічного оснащення та розхідних матеріалів і високим аналітичним характеристикам, також особливу увагу викликає застосування реакції утворення комплексів з барвниками, що сприяє зміщенню аналітичної довжини хвилі у видимій області спектру.
2. Запропоновано методику та показано перевагу здійснення кількісного визначення еналаприлу малеату методом спектрофотометрії у видимій області. Визначення базується на утворенні іонних асоціатів еналаприлу з використанням бромфенолового синього при λ_{max} при 598 нм.
3. Оптимізовано експериментальні умови спектрофотометричного визначення еналаприлу малеату за реакцією з БФС, а саме вибрано розчинники, підібрано концентрації реагентів, оптимальні умови пробопідготовки, встановлено показники чутливості аналітичної реакції та стехіометрію взаємодії барвників із еналаприлом, дослідили стабільність комплексів у часі. Лінійну залежність між поглинанням розчину та концентрацією еналаприлу малеату отримано за оптимізованих

експериментальних умов у діапазоні 0.4-2.4 мкг/мл. Отримані значення МВ та МКВ дорівнювали 0,065 мкг/мл та 0,198 мкг/мл відповідно.

4. Запропоновану методику валідували згідно рекомендацій ДФУ та ІСН Q2 за такими параметрами як лінійність, діапазон застосування, правильність, прецизійність, специфічність та робастність. Встановлено, що валідаційні характеристики є в межах критеріїв прийнятності.
5. Запропонована методика була успішно використана для кількісного визначення еналаприлу малеату в комерційних лікарських препарат у формі таблеток. Вміст АФІ в таблетках «Еналаприл-КМП» 20 мг становить $101.33 \pm 1.33\%$ (RSD = 1,97%, $\delta = 1.33\%$), у таблетках «Еналаприл-Тева» 20 мг – $101.0 \pm 1,00\%$ (RSD=2,10%, $\delta = 1.00\%$), а в таблетках «Еналаприл-Астрафарм» 20 мг – $100.67 \pm 0,67\%$ (RSD=2.00%, $\delta = 0.67\%$).
6. Проведена оцінка екологічності запропонованої методики на навколишнє середовище за допомогою аналітичної еко-шкали та інструменту AGREE, встановлено згідно принципів GAC відповідність вимогам відмінного «зеленого» аналізу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. New Approaches in Hypertension Management: a Review of Current and Developing Technologies and Their Potential Impact on Hypertension Care / J. Kit, R. Fox, K. Tucker, R. McManus // *Current Hypertension Reports*. – 2019. – P. 1–6.
2. <https://compendium.com.ua/uk/atc/c09a/>
3. Gomez, H.J., Cirillo, V.J. & Irvin, J.D. Enalapril: A Review of Human Pharmacology. *Drugs* 30 (Suppl 1), 13–24 (1985).
<https://doi.org/10.2165/00003495-198500301-00004>
4. Martindale The Complete drug reference 38-th edition, 2015, 4160 p.
5. Еналаприл (Enalaprilum) Опис активної речовини [Електронний ресурс] // Компендіум – Режим доступу до ресурсу: <https://compendium.com.ua/uk/akt/69/2620/enalaprilum/>
6. Essentials of medical pharmacology 8-th edition, KD Tripathi, Jaypee Brothers Medical Publishers. – New Delhi. – 2019. – 1081 p.
7. <http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument>
8. Firke, S. D., Bhoi, K. R., Patil, K. R., Jayswal, S. D., Tekade, A. R., & Chalikwar, S. S. (2020). A State-of-the-art Review on Applications of Different Analytical Techniques for Some ACE Inhibitors. *Analytical Chemistry Letters*, 10(1), 60–79. doi:10.1080/22297928.2020.1714477
9. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 2-е вид. — Доповнення 1. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2016. — 360 с.
10. European Pharmacopoeia. 11th edn. 2023. URL: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph.-eur.-11th-edition>
11. Gupta, D., Bhardwaj, S., Sethi, S., Pramanik, S., Das, D. K., Kumar, R., ... & Vashistha, V. K. (2022). Simultaneous spectrophotometric determination of drug components from their dosage formulations. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 270, 120819.

12. Mohameda, H. A., Khashabaa, P. Y., & Shahinb, R. Y. (2014). Spectrophotometric Determination of Some Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors By Potassium Dichromate and Potassium Permanganate in Tablet Dosage Form. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 4(39), 16-24. DOI: 10.15272/ajbps.v4i39.642
13. Sakur, A. A., & Balid, B. (2021). Direct spectrophotometric determination of perindopril erbumine and enalapril maleate in pure and pharmaceutical dosage forms using bromocresol green. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 14(6), 3276-3282. DOI:10.52711/0974-360X.2021.00570
14. Singh, V. D., & Daharwal, S. J. (2017). Development and validation of multivariate calibration methods for simultaneous estimation of Paracetamol, Enalapril maleate and hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage form. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 171, 369-375. DOI: 10.1016/j.saa.2016.08.028
15. J. Patel, A., J. Patel, J., & G. Patel, S. . (2023). Development and Validation of Analytical Methods for Simultaneous Estimation of Lercanidipine Hydrochloride and Enalapril Maleate: Pharmaceutical Science-Pharmaceutical Analysis. *International Journal of Life Science and Pharma Research*, 13(2), P99-P112. DOI: 10.22376/ijlpr.2023.13.2.P99-P112
16. Karajgi, Santosh & Kulkarni, Raghavendra. (2015). FIRST DERIVATIVE SIMULTANEOUS DETERMINATION OF LOSARTAN POTASSIUM AND ENALAPRIL MALEATE IN BULK DRUGS AND TABLET FORMULATIONS. *WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES*. 4. 852.
17. ELSheikh, R., Gouda, A. A., & Gouda, N. (2015). Validation of Spectrophotometric Method for the Determination of Enalapril Maleate in Pure and Dosage Form. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(7), 190-197.
18. Piponski, M., Balkanov, T., & Logoyda, L. (2021). Development and validation of a fast and simple HPLC method for the simultaneous determination of

- bisoprolol and enalapril in dosage form. *Pharmacia*, 68(1), 69-77. DOI: 10.3897/pharmacia.68.50919
19. Koppala, S., Ranga Reddy, V., & Anireddy, J. S. (2017). User-friendly HPLC method development and validation for determination of enalapril maleate and its impurities in enalapril tablets. *Journal of chromatographic science*, 55(10), 979-988. DOI:10.1093/chromsci/bmx060
 20. Gherman, S., Zavastin, D., Şpac, A., & Panainte, A. D. (2021). Determination of Enalapril maleate from tablets using a new HPLC method. *Ovidius University Annals of Chemistry*, 32(1), 70-75. DOI:10.2478/auoc-2021-0010
 21. Siddiqui, F. A., Sher, N., Shafi, N., & Bahadur, S. S. (2017). Concurrent determination of Metformin and some ACE inhibitors: its application to pharmacokinetics. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S2979-S2987. DOI: 10.1016/j.arabjc.2013.11.035
 22. Sultana, N., Naveed, S., & Arayne, M. S. (2013). Direct determination of four ACE-inhibitors lisinopril, enalapril, captopril and fosinopril in pharmaceuticals and serum by HPLC. *J Chromat Separation Techniq*, 4(179.5), 1-5. DOI:10.4172/2157-7064.1000179
 23. Logoyda, L. (2019). Efficient validated method of HPLC to determine enalapril in combined dosage form containing enalapril and bisoprolol and in vitro dissolution studies. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 19-24. DOI:10.22159/ijap.2019v11i4.32584
 24. De Diego, M., Mennickent, S., Godoy, G., & Miranda, V. (2011). A validated stability-indicating LC method for simultaneous determination of enalapril and hydrochlorothiazide in pharmaceutical samples. *Current Pharmaceutical Analysis*, 7(4), 248-252. DOI:10.2174/157341211797458005
 25. Gaikwad, N., Bhangale, C., & Bhandare, S. (2024). Simultaneous Estimation of Amlodipine and Enalapril Maleate by Stability Indicating UHPLC Method. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 14(1). DOI:10.18231/j.ijpca.2021.025

26. Al Mahmud, M. A., Bhadra, S., Haque, A., Elias-Al-Mamun, M., & Haider, S. S. (2014). Development and validation of HPLC method for simultaneous determination of Gliclazide and Enalapril maleate in tablet dosage form. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 51-56. DOI:10.3329/dujps.v13i1.21859
27. Bouabdallah, S., Trabelsi, H., Driss, M. R., & Touil, S. (2017). Determination and degradation study of enalapril maleate by high performance liquid chromatography. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 51, 735-741. DOI 10.1007/s11094-017-1684-2
28. Żuromska-Witek B, Stolarczyk M, Szłósarczyk M, Kielar S, Hubicka U. Simple, Accurate and Multianalyte Determination of Thirteen Active Pharmaceutical Ingredients in Polypills by HPLC-DAD. *Chemosensors*. 2023; 11(1):25. DOI:10.3390/chemosensors11010025
29. Logoyda, L. (2018). Bioanalytical method development and validation from the simultaneous determination of verapamil and enalapril in the presence of enalaprilat by HPLC MS/MS. *Int J Appl Pharm*, 10, 19-27. DOI: 10.22159/ijap.2018v10i3.23974
30. Magiera, S., & Kusa, J. (2015). Evaluation of a rapid method for the therapeutic drug monitoring of aliskiren, enalapril and its active metabolite in plasma and urine by UHPLC–MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 980, 79-87. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.12.025
31. Zheng, S., Luo, S. B., Mei, Y. B., Guo, J., Tong, L. J., Zhang, Q., & Ye, X. Y. (2019). Simultaneous determination of rivaroxaban and enalapril in rat plasma by UPLC–MS/MS and its application to a pharmacokinetic interaction study. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 44, 229-236. DOI: 10.1007/s13318-018-0504-8
32. Shafi, N., Siddiqui, F. A., Sultana, N., & Arayne, M. S. (2015). Concurrent determination of diltiazem, lisinopril, captopril, and enalapril in dosage formulations and in human serum by liquid chromatographic technique. *Journal*

- of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38(15), 1466-1473. DOI: 10.1080/10826076.2015.1050503
33. Mohammad, M. A. A., Mahrouse, M. A., Amer, E. A. H., & Elharati, N. S. (2020). Validated LC–MS/MS method for the simultaneous determination of enalapril maleate, nitrendipine, hydrochlorothiazide, and their major metabolites in human plasma. *Biomedical Chromatography*, 34(12), e4955. DOI: 10.1002/bmc.4955
 34. Dayyih, W. A., Hamad, M., Awwad, A. A., Mallah, E., Zakarya, Z., Dayyih, A. A., & Arafat, T. (2017). A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for evaluation of two brands of enalapril 20 mg tablets in healthy human volunteers. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2017. DOI: 10.1155/2017/8489471
 35. Joubert, A., Kellermann, T., Joubert, A., van der Merwe, M., Norman, J., Castel, S., ... & Wiesner, L. (2022). Simultaneous determination of carvedilol, enalaprilat, and Perindoprilat in human plasma using LC–MS/MS and its Application to a pharmacokinetic Pilot study. *Chromatographia*, 85(5), 455-468. DOI: 10.1007/s10337-022-04154-y
 36. Kang, C. N., Kim, H. J., Park, Y. S., Kim, S. H., Park, H. K., Hwang, H. S., & Kang, J. S. (2014). A simple and rapid LC-MS/MS method for the determination of Enalapril in human plasma for pharmacokinetic and bioequivalence studies in korean healthy volunteers under fasting conditions. *Journal of Analytical Chemistry*, 69, 467-473. DOI: 10.7868/S0044450214050041
 37. Gangnus, T., Burckhardt, B. B., & CARS consortium. (2021). Low-volume LC–MS/MS method for the pharmacokinetic investigation of carvedilol, enalapril and their metabolites in whole blood and plasma: Application to a paediatric clinical trial. *Drug Testing and Analysis*, 13(3), 694-708. DOI: 10.1002/dta.2949
 38. Gumustas, M., Şanlı, S., Şanlı, N., & Ozkan, S. A. (2010). Determination of pKa values of some antihypertensive drugs by liquid chromatography and simultaneous assay of lercanidipine and enalapril in their binary mixtures. *Talanta*, 82(4), 1528-1537. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.07.037

39. Bevz, N., Myhal, A., Ivanauskas, L., Gorokhova, O., Grynenko, V., & Zhuravel, I. (2021). The use of liquid chromatography method for quantitative determination of active substances in Enalapril-H tablets. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, (1 (29), 39–50. doi: 10.15587/2519-4852.2021.225569. DOI: 10.15587/2519-4852.2021.225569
40. Spanakis, M., & Niopas, I. (2010). GC–MS Simultaneous determination of enalapril and enalaprilat in human plasma: Application to a clinical pharmacokinetic study. *Chromatographia*, 72, 957-962. DOI:10.1365/s10337-010-1744-1
41. Maślanka, A., Stolarczyk, M., Apola, A., Kwiecień, A., Hubicka, U., & Opoka, W. (2018). Simultaneous determination of acetylsalicylic acid, hydrochlorothiazide, enalapril, and atorvastatin in a polypill-based quaternary mixture by TLC. *Journal of AOAC International*, 101(3), 708-713. DOI: 10.5740/jaoacint.17-0107
42. Valezi, C. F., Duarte, E. H., Mansano, G. R., Dall'Antonia, L. H., Tarley, C. R. T., & Sartori, E. R. (2014). An improved method for simultaneous square-wave voltammetric determination of amlodipine and enalapril at multi-walled carbon nanotubes paste electrode based on effect of cationic surfactant. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 205, 234-243. DOI: 10.1016/j.snb.2014.08.078
43. Salamanca-Neto, C. A. R., Hatumura, P. H., Tarley, C. R. T., & Sartori, E. R. (2015). Electrochemical evaluation and simultaneous determination of binary mixture of antihypertensives hydrochlorothiazide and enalapril in combined dosage forms using carbon nanotubes paste electrode. *Ionics*, 21, 1615-1622. DOI: 10.1007/s11581-014-1349-z
44. Mehmeti, E., Stankoviæ, D.M., Kalcher, K. (2017). Determination of Enalapril in Pharmaceuticals using Electrochemical Sensing with Amperometric Detection. *Anal. Bioanal. Electrochem.* 9:1000-1007
45. Marra, M. C., Munoz, R. A., & Richter, E. M. (2024). SUB-MINUTE CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS METHOD FOR DETERMINATION OF HYDROCHLOROTHIAZIDE IN COMBINATION

WITH OTHER ACTIVE INGREDIENTS IN NINE DIFFERENT PHARMACEUTICAL SAMPLES. *Química Nova*, 47, e-20240011. DOI: 10.21577/0100-4042.20240011

46. European Pharmacopoeia. 11th edn. 2023. URL: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph.-eur.-11th-edition>
47. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5388961>
48. Martindale The Complete drug reference 38-th edition, 2015, 4160 p.
49. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons / A. C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop, J. Watts (Ed.). Fourth edition. London : Pharmaceutical Press, Lambeth High Street, 2011. P. 1327-1328
50. Tchaikapharma High Quality Medicines Inc. 2016. Enalapril-Tchaikapharma (Enalapril maleate) Product Leaflet. <https://tchaikapharma.com/wp-content/uploads/2021/01/enalapril-tch-5mg-en.pdf> [May 2016]
51. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. – Т. 1. – 732 с.
52. ICH Q2 ICH [International Council on 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).
53. Development and validation of spectrophotometric methods for estimation of valsartan in dosage form / K. Peleshok, L. Kryskiw, T. Kucher, O. Poliak, L. Logoyda. «Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи»: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченій 100-річчю Національного фармацевтичного університету, 10 вересня 2021 р. Харків, 2021. С. 275–276.
54. Optimization of reaction variables for non-extractive spectrophotometric determination of valsartan via ion-pair complex formation with bromophenol blue / K. Peleshok, B. Bondar, L. Kryskiw, T. Kucher, O. Poliak, L. Logoyda. «100 РОКІВ УСПІХУ ТА ЯКОСТІ»: матеріали міжнародного науково-

практичного симпозіуму, присвяченому 100-річчю кафедри фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету, 18 жовтня 2021 р. Харків, 2021. С. 71-72.

Додатки

Додаток А

Список публікацій

1. Самолюк А.В. Розробка спектрофотометричної методики визначення еналаприлу за реакцією з бромфеноловим синім // матеріали XXVIII конгресу студентів та молодих вчених «Майбутнє за наукою» (8-10 квітня 2024 р.) – Тернопіль, 2024 – С. 206.



Тернопільський національний медичний
університет імені І. Я. Горбачевського
Міністерства охорони здоров'я України

Наукове товариство студентів ТНМУ
Рада молодих вчених ТНМУ



XXVIII

КОНГРЕС СТУДЕНТІВ ТА МОЛОДИХ
УЧЕНИХ "МАЙБУТНЄ ЗА НАУКОЮ"

ПРОГРАМА КОНГРЕСУ

8-10
КВІТНЯ

Конгрес присвячений
170 - літтю з дня
народження
І. Я. Горбачевського

2024
Тернопіль
Україна

<i>Саковець Артур, Яремшин Тетяна</i>	
ДИНАМІКА ЧАСТОТИ ТА НАСЛІДКІВ НАРКОТИЧНОЇ ЗАЛЕЖНОСТІ У РІЗНИХ РЕГІОНАХ СВІТУ	205
<i>Салдан Катерина</i>	
ЗАСТОСУВАННЯ ПРЕПАРАТІВ НЗКТГ В ПРАКТИЦІ ЛІКАРІВ ПЕРВИННОЇ МЕДИКО-САНІТАРНОЇ ДОПОМОГИ ТА СТАЦІОНАРНИХ ВІДДІЛЕНЬ	206
<i>Самолук Артем</i>	
РОЗРОБКА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ЕНАЛАПРИЛУ ЗА РЕАКЦІЄЮ З БРОМФЕНОЛОВИМ СИНІМ	207
<i>Саюк Юліана, Когут Ілона, Січевська Дарина</i>	
ЕФЕКТИВНІСТЬ АНТИБІОТИКІВ В УМОВАХ ШИРОКОЇ АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТІ	207
<i>Семенюк Валентина</i>	
ФАРМАКОЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ КРАЦЬОЇ СХЕМИ ЕПІОТРОПНОГО ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ГЕПАТИТ В	208
<i>Середня Вікторія, Омельчук Ілля, Драль Вікторія</i>	
ЕТИКА ВИКОРИСТАННЯ ЧАТ-БОТІВ ЗІ ШТУЧНИМ ІНТЕЛЕКТОМ У ОСВІТІ. АНАЛІЗ ВИКОРИСТАННЯ ЧАТ-БОТІВ СТУДЕНТАМИ- МЕДИКАМИ У НАВЧАЛЬНОМУ ПРОЦЕСІ ТЕРНОПІЛЬСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО МЕДИЧНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО	208
<i>Сидор Богданна</i>	
ФІТОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ У ТРАВІ <i>ARTEMISIA LUDOVICIANA NUTT.</i>	209
<i>Січевська Дарина, Саюк Юліана, Когут Ілона</i>	
КРОВООСПИННІ ЗАСОБИ ПРИ ЗОВНІШНІХ КРОВОТЕЧАХ В УМОВАХ ПОВНОМАШТАБНОЇ ВІЙНИ	210
<i>Танасійчук Єлізавета</i>	
ДОСЛІДЖЕННЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ЕКСТРАКЦІЙНИХ ПРЕПАРАТІВ ТА	

Самолук Артем

**РОЗРОБКА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ
ЕНАЛАПРИЛУ ЗА РЕАКЦІЄЮ З БРОМФЕНОЛОВИМ СИНІМ**

Кафедра фармацевтичної хімії

Науковий керівник: канд. фарм. наук, доц. Л. С. Криськів

Тернопільський національний медичний університет

імені І.Я. Горбачевського МОЗ України

м. Тернопіль, Україна

Актуальність. Еналаприлу малеат, 1-[N-[(S)-1-карбокси-3-фенілпропіл]-L-аланіл]-L-проліну 1'-етилового естеру малеат (1:1), перорально активний несультфгідрильний інгібітор ангіотензинперетворюючого ферменту тривалої дії. Він широко використовується для лікування високого артеріального тиску, препарат входить до списку основних лікарських засобів ВООЗ. У науковій літературі описано багато методик для його кількісного визначення, однак притаманні їм недоліки, як-от необхідність застосування високо коштовного обладнання, неекологічних розчинників та реактивів, тривалість обумовлюють актуальність опрацювання простої і безпечної спектрофотометричної методики кількісного визначення еналаприлу.

Мета. Опрацювати спектрофотометричну методику кількісного визначення еналаприлу малеату в субстанції із застосуванням спектрофотометрії у видимій області за реакцією з бромфеноловим синім.

Матеріали та методи. В роботі застосовували субстанцію еналаприлу малеату ($\geq 98\%$, ТШХ). Дослідження проводили із застосуванням двопробеневого

спектрофотометра «Shimadzu UV-1800» із програмним забезпеченням UV-Probe 2.62, аналітичних ваг RAD WAG AS 200/C та мірного посуду класу А.

Основні результати. Еналаприл вибірково утворює іон парні комплекси з аніонним барвником бромфеноловим синім. Поглинання продукту реєстрували у видимій області спектру проти розчину барвника тої ж концентрації. Для вибору оптимального розчинника було досліджено етанол, етилацетат, метанол, хлороформ та ацетонітрил, встановлено що максимальне поглинання суміші спостерігалось в ацетонітрилі ($\lambda_{\max} = 597$ нм), в ньому комплекси стабільні і не потребують екстрагування органічним розчинником чи застосування поверхнево активних речовин. Вивчення стехіометрії реагуючих компонентів здійснювали за методом Джоба та методом насичення, встановлено що найбільший приріст поглинання спостерігається при співвідношенні еналаприл – бромфеноловий синій як 1 до 1. Встановлено оптимальну концентрацію бромфенолового синього, 3,44 моль/л. Лінійність спостерігалася в діапазоні концентрацій еналаприлу 0,48 – 2,39 мкг/мл. За допомогою МНК отримано метрологічні характеристики лінійної залежності, $\Delta A = 0,3218 \times C - 0,0048$, $R^2 = 0,9991$, $Sa = 0,0036$, $Sb = 0,0057$, розраховано $MB = 0,05$ мкг/мл і $MKB = 0,18$ мкг/мл. Правильність запропонованої методики вивчали на 9 модельних розчинах з вмістом еналаприлу 0,31, 0,47 та 0,61 мкг/мл, $RSD \leq 2.0\%$. Встановлено стабільність розчинів протягом 1 год і відсутність значимого впливу на результати від варіювання довжини хвилі детектування в межах ± 2 нм та концентрації барвника у межах $\pm 10 \%$.

Висновки. Розроблено просту, точну та чутливу спектрофотометричну методику кількісного визначення еналаприлу малеату в субстанції за реакцією з бромфеноловим синім при 597 нм. В подальшому планується застосувати методику для контролю якості комерційних препаратів еналаприлу малеату.