

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

Фармацевтичний факультет  
Кафедра фармацевтичної хімії

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

**Завідувач кафедри**  
**фармацевтичної хімії**

\_\_\_\_\_ проф. Логойда Л. С.

«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 р.

Індекс УДК 615.074:543.422.3:615.225:615.453.6]-092.4

**МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА**

На тему:

**РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИХ МЕТОДИК**  
**КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ВАЛСАРТАНУ В ТАБЛЕТКАХ**

Виконала студентка 5 курсу  
денної форми навчання  
спеціальності 226 «Фармація, промислова фармація»  
\_\_\_\_\_ Бондар Богдана Вікторівна

Науковий керівник:  
к. фарм. н., доц,  
\_\_\_\_\_ Криськів Любомир Степанович

**ТЕРНОПІЛЬ 2023**

## ЗМІСТ

|   |    |
|---|----|
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....  | 4  |
| ВСТУП.....  | 5  |
| РОЗДІЛ 1 АНАЛІЗ ІСНУЮЧИХ ПІДХОДІВ ЩОДО РОЗРОБКИ<br>МЕТОДІВ АНАЛІЗУ ВАЛСАРТАНУ В СУБСТАНЦІЯХ, ЛІКАРСЬКИХ<br>ЗАСОБАХ ТА БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)..... | 9  |
| 1.1 Загальна характеристика валсартану.....   | 9  |
| 1.2 Огляд методик аналізу валсартану у субстанціях, лікарських засобах та<br>біологічних рідинах.....   | 9  |
| Висновки до розділу 1.....  | 24 |
| РОЗДІЛ 2 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ОБ’ЄКТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА<br>МОДЕЛЮВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ.....  | 25 |
| 2.1 Фізико-хімічні властивості об’єктів дослідження.....  | 25 |
| 2.2 Спектрофотометрична методика визначення валсартану в субстанції та<br>лікарських засобах за реакцією з бромфеноловим синім.....                               | 26 |
| 2.3 Спектрофотометрична методика визначення валсартану в субстанції та<br>лікарських засобах за реакцією з МЧ.....  | 28 |
| РОЗДІЛ 3 РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИХ<br>МЕТОДИК ВИЗНАЧЕННЯ ВАЛСАРТАНУ В СУБСТАНЦІЇ ТА<br>ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ.....                                   | 30 |
| 3.1 Розробка та валідація спектрофотометричної методики визначення<br>валсартану в субстанції та лікарських засобах за реакцією з<br>бромфеноловим синім.....     | 30 |
| 3.1.1 Лінійність, діапазон застосування методики.....   | 34 |
| 3.1.2 Правильність та прецизійність методики.....   | 36 |
| 3.1.3 Робасність методики.....  | 37 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3.1.4 | Селективність методики.....   | 38 |
| 3.1.5 | Застосування методики для аналізу комерційних фармацевтичних препаратів.....  | 39 |
| 3.1.6 | Прогноз повної невизначеності методики.....   | 40 |
| 3.1.7 | Оцінка екологічності новоопрацьованої методики визначення валсартану за реакцією з БФС.....   | 42 |
| 3.2   | Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення валсартану в субстанції і таблетках за реакцією з метиловим червоним..... | 44 |
| 3.2.1 | Лінійність, діапазон застосування методики.....   | 48 |
| 3.2.2 | Правильність та прецизійність методики.....   | 49 |
| 3.2.3 | Робасність методики.....  | 51 |
| 3.2.4 | Селективність методики.....   | 52 |
| 3.2.5 | Застосування методики для аналізу комерційних фармацевтичних препаратів валсартану.....   | 53 |
| 3.2.6 | Прогноз повної невизначеності методики.....   | 54 |
| 3.2.7 | Оцінка екологічності новоопрацьованої методики визначення валсартану за реакцією з МЧ.....  | 56 |
|       | Висновки до розділу 3.....  | 57 |
|       | <b>ВИСНОВКИ</b> .....   | 59 |
|       | Список використаних джерел.....   | 61 |
|       | Додатки.....  | 69 |

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт

БФС – бромфеноловий синій

МЧ – метиловий червоний

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

ДФУ – Державна Фармакопея України

ЄФ – Європейська Фармакопея

USP – Фармакопея США

ЛЗ – лікарський засіб

ЛФ – лікарська форма

МВ – межа виявлення

МКВ – межа кількісного визначення

МКЯ – методи контролю якості

ТШХ – тонкошарова хроматографія

УФ – ультрафіолетовий

ФСЗ – фармакопейний стандартний зразок

ICH – Міжнародна конференція з гармонізації технічних вимог до реєстрації лікарських препаратів для людини (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)

RSD – відносне стандартне відхилення (Relative Standard Deviation)

$t$  – критерій Стьюдента

$x$ ,  $y$  – поточні координати в рівнянні лінійної залежності

## ВСТУП

### Обґрунтування вибору теми дослідження

Гіпертонія є ключовим фактором ризику серцево-судинних захворювань. В даний час близько третина людей з гіпертонією не діагностована, а з діагностованих — близько половини не приймають антигіпертензивних препаратів. Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) підрахувала, що високий артеріальний тиск прямо чи опосередковано спричиняє смерть щонайменше дев'яти мільйонів людей у всьому світі щороку [1]. Існує низка лікарських засобів різних фармакологічних груп, які застосовуються лікування гіпертонії. У наш час широко застосовуються препарати групи сартанів — інгібітори рецепторів ангіотензину-II. Одним із відносно нових препаратів для лікування артеріальної гіпертензії є валсартан, який згідно АТХ класифікації належить до групи C09CA03 — Прості препарати блокаторів рецепторів ангіотензину II [2].

Валсартан впливає на ренін-ангіотензин-альдостеронову систему, конкуруючи з ангіотензином II за зв'язування з рецептором AT1. Дослідження показали, що валсартан окремо та в поєднанні з іншими препаратами різних класів знижує артеріальну гіпертензію, а відтак серцево-судинні захворюваності і смертність пацієнтів. [3]. З моменту появи в 1996 році він широко використовується для лікування гіпертонії завдяки своїй ефективності та добрій переносимості пацієнтами [4]. Однією з складових системи забезпечення доброякісності ЛЗ є наявність ефективних та надійних методик визначення активного фармацевтичного інгредієнта (АФІ) валсартану в субстанції, модельних сумішах та у лікарських засобах. На сьогоднішній день для аналізу валсартану застосовуються хроматографічні, спектрофотометричні, спектрофлуориметричні, титриметричні, електрохімічні, мас-спектроскопічні та інші методи. Часто їм притаманна низка загальних недоліків, а саме: необхідність використання шкідливих розчинників чи реагентів, висококоштовного обладнання, тривалості аналізу, високих вимог до

кваліфікації аналітика, а відтак опрацювання нових методик з кращими характеристиками є актуальним завданням і має важливе практичне значення.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами**

Магістерська робота виконана згідно з планами науково-дослідних робіт Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України «Розробка оригінальних комбінацій антигіпертензивних засобів, їх аналіз та стандартизація» (номер державної реєстрації 0120U104201, держбюджетна НДР кафедри фармацевтичної хімії, керівник – проф. Логойда Л.С., 2020-2022 р) і «Цілеспрямований пошук біологічно активних речовин в ряду 7,8-дизаміщених теофіліну; розробка та валідація методик контролю якості антигіпертензивних лікарських засобів зі статинами» (номер державної реєстрації 0121U100062, НДР кафедри фармацевтичної хімії, керівник – доц. Коробко Д. Б., 2021-2023 р).

### **Мета і завдання дослідження**

Метою роботи є розробка та валідація простих, швидких і доступних спектрофотометричних методик визначення валсартану в субстанції та у таблетках за утворенням комплексів з барвниками з дотриманням принципів «зеленої хімії».

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

- опрацювати інформацію щодо цілей, завдань, особливостей досліджень, складнощів, які виникають під час розробки та валідації методик визначення валсартану;
- проаналізувати існуючі підходи до розробки і валідації методик кількісного визначення та оцінки їх екологічності;
- розробити спектрофотометричні методики визначення валсартану в субстанції за реакцією з бромфеноловим синім та метиловим червоним з врахуванням підходів «зеленої хімії»;

- оптимізувати експериментальні умови спектрофотометричного визначення валсартану за реакцією із бромфеноловим синім та метиловим червоним;
- провести валідацію новоопрацьованих спектрофотометричних методик кількісного визначення валсартану в його комерційно доступних препаратах;
- здійснити оцінку екологічності запропонованих спектрофотометричних методик визначення валсартану з позицій принципів «зеленої хімії».

*Об'єкт дослідження.* Теоретичне обґрунтування та експериментально підтверджене опрацювання спектрофотометричних методик кількісного визначення валсартану за реакцією з барвниками та їх використання у фармацевтичному аналізі.

*Предмет дослідження.* Валсартан: субстанція і таблетки промислового виробництва.

### **Методи дослідження**

Під час вирішення поставлених у роботі задач було застосовано спектрофотометричний метод аналізу в УФ та видимій області спектра. Планування експериментальних досліджень та обробку отриманих результатів проводили шляхом моделювання, аналізу та візуалізації даних, застосовували валідацію, регресійний та кореляційний аналіз.

### **Наукова новизна отриманих результатів**

Вперше запропоновано удосконалені спектрофотометричні методики кількісного визначення валсартану за утворенням комплексу з бромфеноловим синім та метиловим червоним.

Вперше проведено оптимізацію умов новоопрацьованих методик для досягнення покращення аналітичних характеристик, обрано реагенти, розчинники, встановлено оптимальні співвідношення та вивчено стабільність отриманих комплексів у часі.

Вперше запропоновано схему валідації розроблених спектрофотометричних методик визначення валсартану в його комерційних препаратах.

Вперше здійснено оцінку екологічності запропонованих спектрофотометричних методик визначення валсартану з позицій принципів «зеленої хімії» за допомогою аналітичної еко-шкали та інструмента AGREE.

### **Практичне значення одержаних результатів**

У практиці фармацевтичного аналізу запропоноване застосування нових спектрофотометричних методик кількісного визначення валсартану за утворенням комплексів з бромфеноловим синім та метиловим червоним у субстанції та в комерційно доступних таблетках. Встановлено що присутність ексципієнтів не виявляє заважаючого впливу на аналіз діючої речовини. Проведено валідацію новоопрацьованих методик визначення валсартану у його таблетованих лікарських формах.

### **Апробація результатів магістерської роботи**

Основні результати та положення магістерської роботи доповідалися на міжнародному науково-практичному симпозиумі «100 років успіху та якості», присвяченій 100-річчю кафедри фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету (м. Харків, 18 жовтня 2021 р.) та на всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Запорізький фармацевтичний форум» (м. Запоріжжя, 25-26 листопада 2021 р.).

**Публікації.** Матеріали магістерської роботи опубліковано в науковій статті, у виданні що індексується наукометричною базою *Scopus* та у двох тезах доповідей на міжнародних науково-практичних конференціях.

### **Обсяг та структура магістерської роботи**

Магістерська робота викладена на 71 сторінці машинописного тексту, складається з вступу, трьох розділів, загальних висновків, списку використаних джерел, 2 додатків. Робота ілюстрована 17 рисунками, 12 таблицями в основному тексті та 1 таблицею в додатку, Список використаних джерел містить 62 найменування, з них 3 кирилицею та 59 латиною.



## **РОЗДІЛ 1 АНАЛІЗ ІСНУЮЧИХ ПІДХОДІВ ЩОДО РОЗРОБКИ МЕТОДІВ АНАЛІЗУ ВАЛСАРТАНУ В СУБСТАНЦІЯХ, ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ ТА БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)**

### **1.1 Загальна характеристика валсартану**

Валсартан — антигіпертензивний лікарський засіб синтетичного походження, що відноситься до групи антагоністів рецепторів ангіотензину-II. Механізм дії препарату полягає у тому, що блокується зв'язування ангіотензину-II з рецепторами ангіотензину-I, це викликає вазодилатацію, зниження виділення альдостерону та зниження реабсорбції натрію у нирках. Фармакологічний ефект препарату схожий за дією до інгібіторів ангіотензинперетворюючого ферменту. Як результат, усі ці процеси призводять до зниження артеріального тиску [5]. Ефект зниження АТ при артеріальній гіпертензії триває 24 години, при цьому частота серцевих скорочень і серцево-судинні рефлексі залишаються незмінними. Немає суттєвого впливу на ліпідний профіль плазми, толерантність до вуглеводів або чутливість до інсуліну, відмічено виникнення м'якої пробенецидоподібної урикозуричної дії [6].

В Україні валсартан представлений на фармацевтичному ринку брендовим препаратом: Діован та дженериками: Діокор, Ванатекс, Сакорд, Валсартан КРКА, Вальсарія, Корсар, Валсар, Валсартан ГетероЛабз, Валмісар, Вазар, Аденіз, Тіара Соло, Валсартан Тева, Вальсакор, а також великою кількістю комбінацій, більше 100 зареєстрованих позицій у категорії C09D комбіновані препарати блокаторів рецепторів ангіотензину II [7].

### **1.2 Огляд методик аналізу валсартану у субстанціях, лікарських засобах та біологічних рідинах**

Аналіз наукових публікацій у ScienceDirect, Web of science, NCBI, Researchgate, Google Scholar та інших виданнях щодо методів дослідження

валсартану в субстанції та у фармацевтичних моно та комбінованих препаратах засвідчив, що використовуються широкий діапазон аналітичних методів, як от УФ-спектроскопія, високоефективна рідинна хроматографія, високоефективна тонкошарова хроматографія, вольтамперометрія, спектрофлуориметрія, капілярний електрофорез, мас-спектроскопія та ін. [8].

Методики визначення валсартану, описані в монографіях ДФУ, Європейської Фармакопеї та Сполучених Штатів Америки.

У ДФУ відсутня монографія на субстанцію валсартану, проте описана монографія на таблетки і капсули валсартану. Як метод ідентифікації валсартану у формі таблеток та капсул ДФУ пропонує методику абсорбційної спектрофотометрії в інфрачервоній області та ВЕРХ. Як метод кількісного визначення валсартану в лікарській формі таблетки та капсули пропонується ВЕРХ/УФ. У монографії ДФУ описані хроматографічні умови визначення валсартану у капсулах і таблетках, де використовується хроматографічна колонка 0.125 м x 3.0 мм. Рухома фаза складається з трьох компонентів, а саме: оцтової кислоти льодяної Р, ацетонітрилу Р1 і води Р (1:500:500). Як розчинник використовується рухома фаза, швидкість рухомої фази становить 0.4 мл/хв, а довжина хвилі, при якій здійснюється детектування 225 нм [9].

Європейська Фармакопея рекомендує для ідентифікації валсартану застосовувати інфрачервону абсорбційну спектрофотометрію, визначати питоме оптичне обертання, випробування з енантімерної чистоти та супутніх домішок досліджувати за допомогою ВЕРХ з спектрофотометричним детектуванням при 230 нм та 225 нм, а кількісне визначення валсартану в субстанції проводити методом титриметрії в середовищі 2-пропанолу, в атмосфері нітрогену, титруючи 0,1 М розчином тетрабутиламонію гідроксиду в тому ж розчиннику з потенціометричною фіксацією точки еквівалентності [10].

За Фармакопеєю США ідентифікацію валсартану в субстанції здійснюють методом інфрачервоної спектроскопії та за часом утримування основного піку розчину зразка, який повинен відповідати розчину ФСЗ. Кількісний вміст валсартану у субстанції повинен становити від 98,0% до 102,0% у перерахунку

на безводну речовину. Крім цього, у USP є монографія для таблеток валсартану, де для ідентифікації також пропонується час утримування основного піку розчину зразка, який повинен відповідати розчину ФСЗ. У 2023 році заплановано оновлення монографії USP, де в частині ідентифікації пропонується ще також УФ-спектрофотометричне виявлення. Відповідно до цієї методики, УФ-спектр основного піку зразка розчину повинен відповідати розчину ФСЗ валсартану. Згідно USP кількісне визначення валсартану в субстанції здійснюють методом ВЕРХ, рухома фаза: вода, ацетонітрил, крижана ацетатна кислота (500:500:1), УФ-детектування при 273 нм, а при дослідженні препарату в ЛФ в якості рухомої фази використовують співвідношення компонентів рухомої фази 50:50:0.1, з детектуванням при 230 нм. [11-13].

Одним із методів, що широко використовуються у фармацевтичному аналізі для визначення валсартану у субстанції, в ЛФ і в комбінації з іншими АФІ є спектрофотометрія. У літературі описані методики прямого спектрофотометричного визначення [14-15], багатохвильової [16] та похідної спектрофотометрії [17-23], з додаванням ПАР [24] і використанням нейронних мереж [25]. Поширеним також є підхід із застосуванням комплексоутворюючих реагентів, задля зміщення аналітичної довжини хвилі у видиму область спектра [26-28].

Індійськими вченими запропоновано УФ-спектрофотометричний метод визначення валсартану в субстанції та в препаратах при  $\lambda_{\text{макс}} = 250,8$  нм, в метанолі та воді. Лінійність спостерігалася в діапазоні 5,0-30 мкг/мл,  $R^2 = 0,996$ . Показано, що % уведено-знайдено знаходиться в діапазоні 99,26% - 100,7%. RSD склало менше 2%. Методику було застосовано для визначення АФІ в ЛФ з хорошим узгодженням результатів. Розроблений метод був швидким і економічно ефективним для рутинного аналізу валсартану в чистому вигляді і у фармацевтичній лікарській формі [14]. Метод з успіхом було застосовано для визначення валсартану в суміші з амлодипіном та гідрохлоротіазидом в модельних сумішах та в таблетках. Результати коливалися в діапазоні від  $99,6 \pm 1,52\%$  до  $102 \pm 0,51\%$  [15]. Запропоновано також визначати валсартан та

сакубітрил при їх сумісній присутності за допомогою багатохвильової спектрофотометрії за двох оптимальних довжин хвиль (220 нм і 250 нм) та мультिवаріантного підходу, із застосуванням часткового факторного дизайну в діапазоні від 210-290 нм з інтервалом 1 нм. Статистичне порівняння отриманих результатів з референтним методом із застосуванням t-критерію і F-тесту не показало суттєвих відмінностей між ними [16].

Науковцями з Польщі досліджено можливість застосування похідної спектрофотометрії для кількісного визначення валсартану в присутності речовини з групи статинів у бінарних сумішах. Отримання достовірних результатів було досягнуте шляхом отримання похідних спектрів нульового порядку, використання методу «перетину нуля» та підбору відповідного порядку похідної та довжини хвилі. Запропонована методика була ефективною з використанням відповідних похідних: для валсартану та флувастатину – D1, D2 і D3, для валсартану і правастатину – D1 і D3, для валсартану та аторвастатину – D2 та D3. Метод характеризувався високою чутливістю і точністю. Лінійність для валсартану зберігалася в діапазоні 9,28 – 32,48 мг мл<sup>-1</sup>. Коефіцієнти кореляції, залежно від порядку похідної, був в діапазоні 0,989 – 0,999. Висока точність методу була підтверджена RSD від 0,1 до 2,5 % і відсотком «уведено-знайдено» індивідуальних компонентів у межах 100 ± 5 %. Методика була успішно застосована для визначення валсартану в комбінації з флувастатином, аторвастатином та правастатином в модельних сумішах та у фармацевтичних препаратах. На основі цього автори зробили висновок, що запропоновані методики можуть бути корисною альтернативою дорогим та трудомістким хроматографічним технікам розділення [17].

S. Maya та M. Amal розробили спектрофотометричні методики для одночасного визначення комбінації сакубітрил/валсартан за допомогою двох розрахункових підходів і порівняльного статистичного дослідження в їх бінарній суміші та комбінованій лікарській формі без попереднього розділення. Ці підходи були розроблені й засновані або на виборі двох довжин хвиль у спектрах поглинання нульового порядку, а саме: метод подвійної довжини хвилі (DWL)

при 226 нм і 275 нм для валсартану, та вдосконаленого віднімання поглинання (AAS) на основі точки ізопоглинання при 246 нм і 261 нм. Запропонована методика була лінійною у діапазоні 2,5-25,0 мкг/мл. Розроблені спектрофотометричні методики валідовані відповідно до рекомендацій ІСН. Результати, отримані за допомогою запропонованих методик, були статистично порівняні з чинним методом ВЕРХ з використанням t-критерію Стьюдента, F-критерію, а також було проведено порівняльне дослідження за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу, яке не виявило статистичних відмінностей у точності [18].

Науковці з Болгарії проводили оцінку валідаційних параметрів УФ-спектрофотометричної методики визначення валсартану. Недолік похідної спектрофотометрії полягає у чутливості до змін параметрів при проведенні дослідження. Невеликі відмінності в налаштуваннях довжини хвилі мають великий ефект на результат, особливо в техніці переходу через нуль, де помилки в реєстрації спектра є причиною невідтворюваності методу. Перевагою класичного УФ спектрофотометричного методу, в порівнянні з ВЕРХ, є недороговартісність і простота у виконанні. Вказана методика була перевірена за такими на валідаційними параметрами, як селективність, лінійність, МВ, МКВ, точність. Показано можливість застосування розробленої методики для визначення валсартану у лікарських препаратах [19].

Чотири спектрофотометричні методики були розроблені для одночасного визначення небівололу і валсартану у субстанції та в модельній суміші таблетованої ЛФ. Метод (I) заснований на вимірюванні площі під кривою (AUC) між 246 і 256 нм для валсартану. Метод (II) базується на отриманні похідної першого порядку, амплітуда піку при 253,4 нм була прямо пропорційна концентрації валсартану. У методі (III) визначали різницю співвідношення амплітуд у спектрах співвідношення небівололу і валсартану. Лінійність спостерігалася в діапазоні концентрацій 4,0–80,0 мкг/мл валсартану. Максимальне значення стандартного відхилення становило 1,88%. Метод (IV) включав розрахункові підходи на основі найменших квадратів, регресії головних

компонентів і часткових найменших квадратів у діапазоні 272 – 282 нм з інтервалом 1 нм, лінійність спостерігалася в діапазоні 15,0–80,0 мкг/мл валсартану, стандартне відхилення не перевищувало 1,54% [20].

Розроблено спектрофотометричну методику для одночасного визначення сакубітрилу та валсартану в їхній комбінованій лікарській формі з використанням безперервного вейвлет-перетворення та методів переходу через нуль без використання органічних розчинників. Було виявлено, що найкращі результати для валсартану дає дискретна вейвлет-функція Мейєра із коефіцієнтом масштабування 50 при 272 нм. RSD не перевищувало 1,23%. Результати, отримані із застосуванням розроблених методів, добре узгоджувалися з ВЕРХ [21].

Похідну спектрофотометрію було з успіхом використано для аналізу потрібної суміші валсартану, амлодипіну та гдрохлортіазиду без попереднього розділення. Концентрації компонентів визначалися з одного і того ж спектру, використовуючи віднімання поглинання в поєднанні з методами на основі коефіцієнту поглинання, або з використанням амплітудної модуляції. Проведена валідація згідно з рекомендаціями ІСН, точність, прецизійність і специфічність були в допустимих межах [22].

Було запропоновано проводити кількісне визначення валсартану за допомогою УФ-спектрофотометрії та QNMR. При УФ визначенні застосовували вимірювання поглинання, площу під кривою, похідну спектроскопію та метод Q-поглинання. Підпорядкування закону Бера спостерігалася при концентрації 5-30 мкг/мл, коефіцієнт кореляції становить 0,99. У методі кількісного ЯМР як внутрішній стандарт використовувався 1,2,4,5-тетрахлор-3-нітробензол, а розчинником був  $\text{CDCl}_3$ . Для кількісного визначення застосовували інтегровану інтенсивність резонансу валсартану при 1,73 ppm та 4,9 ppm у порівнянні з такою для ФСЗ. Метод виявився точним і відтворюваним, хоча складним і потребує дорогого приладу [23].

Розроблено спектрофотометричну методику для одночасного визначення небівололу гідрохлориду і валсартану у субстанції і комбінованих таблетованих

ЛФ. Аналіти розчиняли в 67 мМ фосфатному буфері рН 6,8 з 0,5 % додецилсульфату натрію, де валсартан має максимум поглинання при 250 нм. Лінійність спостерігалася при 10-60 мкг/мл, а R2 становить 0,9960 (97,42 % – 101,43 % ). RSD становило 0,188 % - 0,944 % у внутрілабораторних випробуваннях і 0,392 %-1,197 % для міжлабораторних. МВ і МКВ становили 4,348 мкг/мл та 13,178 мкг/мл відповідно. Одночасне калібрування обох препаратів у 67 мМ фосфатному буфері рН 6,8 з 0,5 % ПАР показало, що  $\lambda_{\text{max}}$  одного препарату не впливає на  $\lambda_{\text{max}}$  іншого препарату [24].

D. Atiyeh з колегами запропонували хемометричний спектрофотометричний метод для визначення валсартану і амлодипіну за сумісної присутності без попередньої пробопідготовки. Було використано нейронну мережу прямого зворотного поширення (FFBP-NN) і опорну векторну машину найменших квадратів (LS-SVM) з алгоритмами Левенберга–Марквардта (LM) - градієнтний спуск із зворотним поширенням імпульсу та адаптивну швидкість навчання (GDX). Середньоквадратична помилка при визначенні валсартану становила 0,5598. Отримані результати статистично порівнювали з ВЕРХ, встановлено задовільність результатів визначення АФІ [25].

Індійськими вченими розроблено спектрофотометричну методику що базується на комплексоутворенні валсартану з тропеоліном ооо з наступним екстрагуванням в органічний шар в присутності 0,1 н НСІ, поглинання вимірювали при 483 нм. Метод був оптимізований за вісьмома параметрами. Діапазон лінійності склав 0,5 – 3,0 мкг/мл; МВ = 400 мкг/мл [26].

Визначення валсартану запропоновано проводити за реакцією з 4-хлор-7-нітробензофуразаном у лужному середовищі за утворенням продукту коричневого забарвлення при рН 11,9 з  $\lambda_{\text{max}} = 470$  нм. Закон Бера виконувався в діапазоні концентрацій 0,4-14,8 мкг/мл, молярний коефіцієнт поглинання становив  $1,05 \times 10^4$  л/моль\*см і коефіцієнтом кореляції 0,9827. МВ = 0,557 мкг/мл. Запропонований метод було застосовано для визначення валсартану у чистому вигляді та в таблетках [27].

Єгипетським вченим з Університету Мініа було запропоновано проводити спектрофотометричне і спектрофлуориметричне визначення валсартану в субстанції та таблетках за реакцією взаємодії з барвниками. У першому випадку утворюється жовтий комплекс з максимальним поглинанням при 413-419 нм. Використовувалися бромфеноловий і бромтимоловий синій, бромкрезоловий зелений. Спектрофлуориметричний метод заснований на утворенні неекстрактивного бінарного комплексу між еозином і валсартаном без використання ПАР. Запропоновані методи були успішно застосовані для визначення цих препаратів у їхніх таблетках та за наявності продуктів їх розпаду [28].

А. Elbashir та R. Osman описали ВЕРХ методику, для одночасного визначення амлодипіну, гідрохлоротіазиду і валсартану. Підібрано оптимізовані умови для розділення трьох аналітів. Колонка С-18 (250 мм × 4,6 мм, внутрішній діаметр 5 мкм. Температуру колонки підтримували на рівні 40<sup>0</sup>С; швидкість потоку рухомої фази: 1,5 мл/хв; довжина хвилі: 230 нм. МВ аналітів становили 0,011, 0,010 і 0,010 мкг/мл, а МКВ - 0,032, 0,020 і 0,019 мкг/мл відповідно. Методика також показала належну стійкість до варіацій у рухомій фазі, рН, температурі колонки та концентрації ацетонітрилу. Розроблена методика визначення є відносно швидкою (8 хв) [29].

Науковці з Індії опрацювали ВЕРХ методику, для визначення компонентів у комбінації сакубітрил/валсартан за наявності домішок і продуктів розпаду. Проведено валідацію методики та встановлено, що всі параметри були в межах критеріїв прийнятності. Усі продукти розкладання відокремлювались один від одного, домішки були стабільними в процесі дослідження [30].

В літературі описана методика ВЕРХ для одночасного визначення пропранололу гідрохлориду та валсартану у ЛФ. Було використано ряд рухомих фаз для одночасного елюювання обох компонентів і досягнення гострих піків. Виявлено, що найкращим складом рухомої фази є ацетонітрил, метанол і 0,01 М динатрій гідрофосфат (рН = 3,5) у співвідношенні 50:35:15 (об./об.). За згаданих хроматографічних умов гострі піки, що належать аналітам, були отримані при



часах утримання 6,62 і 9,76 хвилин відповідно. Запропонована методика валідована за лінійністю, прецизійністю, точністю, специфічністю, робастністю, селективністю, МВ і МКВ [31].

S. Abdel-Nay та співавтори за допомогою методики ВЕРХ проводили визначення лозартану, валсартану та їх нітрозодіетиламінової домішки. Перевагою цієї методики є економічність та дотримання принципів «зеленої хімії». Хроматографічне розділення проводили з використанням звичайної колонки RP-C18. Градієнтне елюювання проводили з використанням двох композицій рухомої фази (А і В). Рухома фаза А складалася з 0,02М алілметакрилату, з рН 7,2. В якості рухомої фази В було використано етанол. Встановлено, що методика має мінімальний екологічний вплив за показниками зеленості GAPI та AGREE [32].

Вчені з Єгипту запропонували методику ВЕРХ для одночасного визначення амлодипіну бесилату та валсартану у таблетках. Хроматографічний процес було проведено з використанням бінарного градієнтного елюювання, що складався з двох систем розчинників: розчину (А) одноосновного фосфату натрію, який доводили фосфорною кислотою до рН 2,5 та розчину (В), що складався з ацетонітрилу (45:55). Хроматографування проводили при швидкості потоку 1,0 мл/хв, об'ємі ін'єкції 10 мкл, УФ-виявлення при 235 нм, температурі колонки 30<sup>0</sup>С і температурі автосамплера 10<sup>0</sup>С. Ця методика була валідована відповідно до вимог ІСН, які включають точність, прецизійність, вибірковість, стійкість, міцність, МВ, МКВ, лінійність. Лінійні залежності були отримані в діапазонах 10-300 мкг/мл і 5-200 мкг/мл з коефіцієнтами кореляції 0,9997 і 0,9998 для амлодипіну бесилату і валсартану відповідно [33].

G. Dyade і R. Sawant розробили та валідували ВЕРХ методику для одночасного визначення амлодипіну бесилату і валсартану в твердій лікарській формі та розувастатину і валсартану *in bulk*. Хроматографічне розділення проводили на колонці RP-C18. Оптимізовану рухому фазу (ацетонітрил:вода) доводили до рН 4,8 за допомогою оцтової кислоти, швидкість потоку становила 0,8 мл/хв у співвідношенні 75:25% об'єм/об'єм, а детектування здійснювали при

245 нм. Було встановлено, що відсоток знайденого валсартану становив 100,05 у суміші з амлодипіном і 100,32 з розувастатином. Лінійність для валсартану спостерігалася в діапазоні 5–50 мкг/мл. RSD становить <2%, що вказує на високий ступінь точності та прецизійності запропонованої методики [34].

У статті французького національного агентства з безпеки ліків і медичної продукції у відділі лабораторного контролю описана методика визначення домішки NDMA (нітрозодиметиламіну) в діючій речовині валсартану та готових лікарських формах методом ВЕРХ/УФ. Методика призначена для виявлення та кількісного визначення N-нітрозодиметиламіну (NDMA) у активному фармацевтичному інгредієнті валсартану та таблетках методом ВЕРХ-УФ. Нітрозаміни мають канцерогенні властивості і тому вимагають відповідних умов для поводження з ними. Методика передбачає використання двох стандартних розчинів, що містить NDMA, 2 розчинів субстанції або препарату і один розчин суміші NDMA і субстанції чи препарату. Лінійність методики встановлена в межах від 0,01 мкг/мл до 0,25 мкг/мл. [35].

Дослідники з Індії розробили методику ВЕРХ для кількісного визначення валсартану та гідрохлортіазиду *in bulk* та в таблетованій лікарській формі. Ізократичний аналіз було виконано на колонці Inertsil BDS C18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм) з використанням рухомої фази, що складалася з метанолу і 0,05 М фосфатного буферу рН 4,5 (55:45 об./об.) зі швидкістю потоку 1,0 мл/хв. Проводили УФ-детектування при 281 нм. Встановлено, що час утримання становить 3,541 хв для валсартану та 5,221 хв для гідрохлортіазиду. Аналітична методика була валідована згідно з рекомендаціями ІСН. Лінійність спостерігалася в діапазоні 20-60 мкг/мл з коефіцієнтами кореляції 0,999 для валсартану та 0,998 для гідрохлортіазиду. Було виявлено, що відсоток знайденого становить 100,12 та 100,89 для валсартану та гідрохлортіазиду відповідно. RSD було менше 2% [36].

Науковці зі Словаччини запропонували вольтамперометричне визначення комплексу валсартан-Ni та з'ясували можливість застосування такої методики у фармацевтичному аналізі. Валсартан визначали на ртутному електроді в

присутності нікелю (II), завдяки наявності чутливого катодного піку при  $-0,7\text{В}$ , що можна пояснити відновленням комплексу, між нікелем і валсартаном. Отримані значення МВ і МКВ дозволяють визначати аналіт і в біологічних рідинах [37].

Вчені з Туреччини проводили одночасне визначення валсартану та амлодипіну у сироватці крові людини та фармацевтичних лікарських формах методом вольтамперометрії. Валсартан й амлодипін є електрохімічно активними речовинами, що дозволило одночасно їх визначити в сироватці крові людини та у фармацевтичних лікарських формах. Високий відсоток знайденого препарату у порівнянні до уведеного вказує на те, що запропонована методика може бути використана для одночасного кількісного визначення аналітів без використання інших реагентів [38].

N.Gürler з співавторами вивчали електрохімічну поведінку валсартану на скловугільному електроді методами вольтамперометрії та в результаті розробили адсорбційні методики стріппінгу для прямого визначення аналіта у фармацевтичних препаратах і зразках біологічних рідин. Порівняння результатів з результатами, отриманими стандартним методом засвідчило незначні розбіжності [39].

Індійськими вченими розроблено та валідовано першу похідну спектрофлуориметричну методику для одночасного кількісного визначення небівололу гідрохлориду і валсартану у комбінованій таблетованій лікарській формі без попереднього поділу. Небіволол визначали при  $294\text{ нм}$  (точка перетину нульової довжини хвилі валсартану). Валсартан визначали при  $404\text{ нм}$  (точка перетину нульової довжини хвилі небівололу). Перші похідні графіки амплітуда-концентрація були лінійними в діапазоні  $0,1\text{-}2,1\text{ мкг/мл}$  для обох препаратів. Запропонована методика валідована щодо лінійності, прецизійності, точності, селективності, меж виявлення та кількісного визначення [40].

S. Shalan, N. El-Enany, F. Belal описали спектрофлуориметричну методику визначення валсартану у комбінованій таблетованій формі з амлодипіном. Пропонований спосіб заснований на вимірюванні синхронної інтенсивності

флуоресценції препаратів при  $\Delta\lambda = 80$  нм у водному розчині додецилсульфату натрію. Залежність флуоресценції від концентрації була лінійною у діапазоні 0,5–4 мкг/мл і 0,05–3,0 мкг/мл для валсартану та амлодипіну, відповідно з МВ 0,027 і 0,022 мкг/мл і МКВ 0,083 та 0,007 мкг/мл для валсартану та амлодипіну, відповідно. Запропонована методика була застосована для визначення аналітів в сумішах, таблетованих ЛФ і для тестування однорідності вмісту таблеток [41].

Індійськими дослідниками запропоновано кількісне визначення валсартану та продукту його деградації проводити методом вискоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою з використанням рухомої фази вода: ацетонітрил: крижана оцтова кислота: фосфатний буфер у співвідношенні 500:500:1:0,5 об. /v/v/v при 225 нм з використанням колонки nucleosil C18, 125 × 4,0 мм, 5 мкм. Зразок валсартану містив основну домішкою 0,5 % з часом утримування 0,38 і чистота субстанції становила 98,70 %. За допомогою ВЕРХ мас-спектроскопії (LC-MS) було отримано типову хроматограму валсартану з часом утримання 9,03 хв і домішки з 3,3 хв. Було встановлено, що середній % знайденого для валсартану становить 100,04 % [42].

Науковці з Єгипту розробили мас-спектроскопічну методику для одночасного визначення сакубітрилу та валсартану з сумісним введенням препаратів у плазмі крові людини з використанням твердофазної екстракції. Твердофазну екстракцію проводили для очищення та екстракції лікарських засобів з людської плазми. Хроматографічне розділення проводили на Agilent SB-C18 (1,8 мкм, 2,1 x 50 мм) з використанням лозартану як внутрішнього стандарту. Виявлення проведено за допомогою потрійного квадрупольного тандемного мас-спектрометра [43].

Одночасне визначення метолазону та валсартану в плазмі крові здійснювали за допомогою рідинної хроматографії/мас-спектрометрії. Було розроблено онлайн методику твердофазної екстракції у поєднанні з методом рідинної хроматографії та тандемної мас-спектрометрії для одночасного визначення метолазону та валсартану у плазмі крові собак породи бігль. Для видалення домішок у зразках плазми використовували твердофазну

екстракційну колонку Retain PEP Javelin (10 мм × 2,1 мм). Метолазон, валсартан і внутрішній стандарт (лозартан) розділяли на колонці Poroshell 120 SB-C18 (4,6 мм × 50 мм × 2,7 мкм) за допомогою процедури градієнтного елюювання. Підкислену суміш ацетонітрил/вода використовували як рухому фазу. Методика була лінійною у діапазоні 0,1–100 нг/мл та 1–1000 нг/мл для метолазону та валсартану відповідно [44].

Науковцями з Кореї запропонована методика визначення R-енантіомеру валсартану у фармацевтичній формі шляхом капілярного електрофорезу. Капілярний зонний електрофорез пройшов успішно застосовується для визначення енантімерної чистоти валсартану з використанням ацетил- $\beta$ -циклодекстрину (A- $\beta$ -CD) як хірального селектора. В оптимізовані умови був включений 25 мМ фосфатний буфер, рН 8,0, що містить 10 мМ A- $\beta$ -CD як фонового електроліту. Лінійність для R-енантіомеру валсартану встановлено в діапазоні концентрацій 0,05–3,0 %. МВ складала 0,01 %, МКВ - 0,05 %. Відсоток знайденого R-енантіомеру валсартану коливався від 97,0 до 99,6 %. Аналіз застосовували для визначення хіральної чистоти таблеток валсартану та виявлення R-енантіомеру валсартану [45].

У літературі описано методику капілярного електрофорезу для одночасного визначення амлодипіну бесилату та валсартану у фармацевтичних препаратах та плазмі за допомогою УФ-фотодіодного матричного детектора. Електрофоретичні умови були оптимізовані для покращення розділення, чутливості і збільшення швидкості процесу. Методика була лінійною в діапазоні 1,0–35 і 1,0–350 мг/л,  $R^2 = 0,9999$  і  $0,9994$  для амлодипіну та валсартану відповідно [46].

Запропоноване одночасне визначення валсартану, амлодипіну бесилату та гідрохлоротіазиду за допомогою капілярного зонного електрофорезу у комбінованих таблетках. Розділення було досягнуто на капілярі з плавненого кремнезему шляхом застосування потенціалу 15 кВ і фонового електроліту, що містить 40 мМ фосфатного буферу при рН 7,5 з УФ-детектором при 230 нм. Методика показала задовільну лінійність в діапазонах 10-200, 2-20 і 2-20 г/мл<sup>-1</sup> з

МВ 1,82, 0,39, 0,65 г/мл<sup>-1</sup> і МКВ 5,51, 1,17, 1,96 г/мл<sup>-1</sup> для валсартану, амлодипіну бесилату та гідрохлоротіазиду відповідно [47].

Польські вчені провели порівняльне дослідження денситометричного методу, відеосканування та капілярного електрофорезу для визначення валсартану та амлодипіну в комбінованій лікарській формі. Тонкошарову хроматографію проводили на ТШХ пластинах з рухомою фазою, що складається з ацетонітрил-фосфатного буфера при рН 9,0 (5:5, V/V) і температурі 20 °С. Денситометрію проводили в режимі відбиття при 217 нм для валсартану та в режимі абсорбції при 370 нм для амлодипіну. Для валсартану та амлодипіну було розроблено відеосканування при 254 та 366 нм відповідно. Для хроматографічного аналізу валсартану калібрувальний графік був побудований в діапазоні 0,4-2,8 мкг на точку. Капілярний електрофорез (СЕ) проводили з використанням капіляра з плавненого кремнезему і УФ-детектування при 237 нм. Калібрувальний графік був побудований в діапазоні 0,1-0,6 мг/мл для валсартану. Усі методики були перевірені щодо робастності, специфічності, стабільності, лінійності, прецизійності та точності та вважаються придатними для фармацевтичного аналізу [48].

N. Ramadan з колегами проводили потенціометричне визначення амлодипіну та валсартану за допомогою мікророзмірних та полімерних матричних мембранних сенсорів. Було проведено статистичне порівняння між результатами, отриманими за вказаною методикою, і результатами, отриманими за офіційними методиками та не виявлено суттєвої різниці. Описані сенсори придатні для кількісного визначення амлодипіну та валсартану у чистому вигляді та у суміші, у плазмі крові та фармацевтичних препаратах. Використання запропонованих сенсорів має переваги завдяки швидкості реакції та усуненню етапів попередньої обробки або розділення лікарського засобу [49].

Глобальним трендом при розробці аналітичних методик є фокус на їх екологічності, відповідності до принципів «зеленої» хімії і це замінює традиційний лінійний підхід «бери–використай–утилізуй» та добре поєднується

з концепцією циркулярної економіки, заснованої на ресурсоефективності та мінімізації відходів [50].

Однак традиційні показники «зеленої» хімії, як наприклад, економія атомів (молекулярна маса продукту/сума молярної маси вихідних матеріалів), E-фактор (кг відходів/кг продукту) і реакційна масова ефективність), які були введені на початку 1990-х років і фактично за останні два десятиліття були прийняті в усьому світі як академічним середовищем, так і промисловістю, зазвичай не уповні відповідають цілям екологічної аналітичної хімії і повинні бути доповнені показниками, які вимірюють вплив на навколишнє середовище, враховувати кількість і токсичність реагентів, утворених відходів, енергетичні потреби, кількість стадій, мініатюризацію та автоматизацію, тому аналітична спільнота розробляє альтернативні інструменти для оцінки зеленості методик, як наприклад аналітична екошкала та аналітичний калькулятор GREENness. Підхід аналітичної екошкали базується на призначенні штрафних балів параметрам аналітичного процесу, які не відповідають ідеальному зеленому аналізу [51]. Комплексний аналітичний калькулятор GREENness для оцінки зеленості методик, застосовує критерії що базуються на 12 принципах зеленої аналітичної хімії (SIGNIFICANCE), а результатом є піктограма, яка графічно відображає оцінку аналітичної процедури за кожним показником з врахуванням коефіцієнтів значимості [52].

Загалом, для кількісного визначення валсартану використовують різноманітні аналітичні методи: ВЕРХ, спектрофотометрію, титриметрію, спектрофлуориметрію, вольтамперометрію, капілярний електрофорез, хроматомас-спектроскопію. Часто, багато з них мають обмеження в застосуванні, досить складні, займають багато часу, є необхідність використання шкідливих розчинників чи реагентів, висококоштовного обладнання високі вимоги до кваліфікації аналітика. Наприклад доцільність застосування ВЕРХ є у випадку визначення сумішей АФІ та/або за наявності впливу матриці, завдяки розділенню та можливістю виявлення низьких концентрацій. Спектрофотометричні методики прості у застосуванні, однак вибірковість

визначення валсартану за власним поглинанням при аналізі ЛФ часто недостатня і потребує застосування допоміжних прийомів, з яких багатообіцяючим є застосування реакцій з барвниками, що дозволяє працювати у видимій області спектра за поглинанням утвореного комплексу і уникнути заважаючого впливу ексципієнтів. Отже, існує необхідність у розробці швидких простих зелених спектрофотометричних методик аналізу валсартану у лікарській формі таблеток для фармацевтичного аналізу, де важливі час та економічна ефективність.

### **Висновки до розділу 1**

1. Валсартан є одним з найбільш популярних сартанів для лікування гіпертонії завдяки своїй ефективності та добрій переносимості пацієнтами і широко представлений на фармацевтичному ринку України.
2. Аналіз наукових джерел щодо методів визначення валсартану з врахуванням переваг та недоліків, показав, що найширше використовуються УФ-видима спектрофотометрія та ВЕРХ які мають ряд обмежень.
3. Спектрофотометрія залишається найпопулярнішим методом завдяки простоті, швидкості, вартості технічного оснащення та розхідних матеріалів і високим аналітичним характеристикам, а особливу зацікавленість викликає застосування реакції утворення комплексів з барвниками завдяки зміщенню аналітичної довжини хвилі у видиму область спектра.
3. З урахуванням недоліків існуючих методів аналізу валсартану, актуальним завданням є розробка і валідація нових, швидких, простих спектрофотометричних методик його кількісного визначення у субстанції та ЛЗ з дотримання принципів «зеленої хімії».



## РОЗДІЛ 2 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ОБ'ЄКТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА МОДЕЛЮВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ

### 2.1 Фізико-хімічні властивості об'єктів дослідження

Валсартан (INN, USAN), , N-пентаноїл-N-[2'-(1*H*-тетразол-5-іл)біфеніл-4-іл метил]-*L*-валін (Рис. 1), білий або майже білий дрібний гігроскопічний порошок. Майже без запаху. Практично нерозчинний у воді (1,406 мг/л), легко розчинний у спиртових розчинниках, наприклад у метанолі і етанолі та розчині натрію гідроксиду, також розчинний в диметилсульфоксиді, диметилформаміді і н-бутиламіні (30 мг/мл), малорозчинний у дихлорметані, не розчиняється в ефірі, хлороформі і розведених мінеральних кислотах. [10, 53].

Рекомендовано зберігати в герметичних контейнерах при температурі 25 °С, допускається відхилення від 15 °С до 30 °С. Молекулярна маса C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> становить 435,5 г/моль [4].

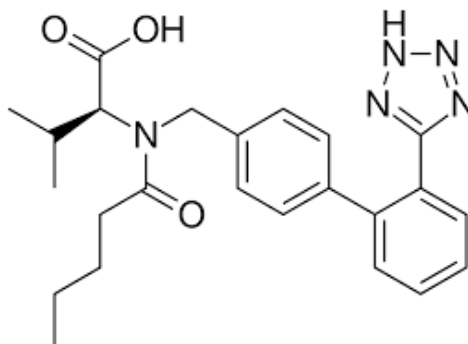


Рис. 2.1. Хімічна будова валсартану

Температура плавлення субстанції знаходиться в діапазоні від 116 °С до 117 °С. В УФ спектрі водного підкисленого розчину спостерігається  $\lambda_{\max}$  при 203 і 248 нм [54].

Валсартан комерційно доступний у формі таблеток, де АФІ поєднується з ексципієнтами, такими як колоїдний діоксид кремнію, кросповідон, оксиди заліза, магнію стеарат, гідроксипропілметилцелюлоза, целюлоза мікрокристалічна, поліетиленгліколь 8000 і діоксид титану. Розчинність

валсартану залежить від рН, при рН 5-8 вона найвища і падає при його зниженні [55].

У роботі використовували ФСЗ валсартану ( $C_{24}H_{29}N_5O_3$ , CAS - 137862-53-4), «Sigma-Aldrich», ( $\geq 98\%$ , ВЕРХ).

ЛЗ валсартану: Валсартан-КРКА (KRKA d.d., Словенія) таблетки по 160 мг, серія DB4631, Валсартан-Тева (Teva, Ізраїль) таблетки по 160 мг, серія 049921, Валсартан-Сандоз (Lek Pharmaceuticals d.d., Словенія), таблетки по 160 мг, серія 180822.

Усі реактиви що використовувалися в процесі досліджень були кваліфікації «Для аналізу». Застосовували метанол («Honeywell Riedel-de Haen™», 99,9%), спирт етиловий 96% (АТ «Лубнифарм»), бромфеноловий синій («Honeywell Fluka»,  $\geq 98\%$ , ВЕРХ), метиловий червоний («Honeywell Fluka»,  $\geq 98\%$ , ВЕРХ).

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

В роботі також застосовували ваги лабораторні електронні RADWAG AS 200/C, ультразвукову баню Sonorex Digitec DT100H, рН-метр I-160MI з універсальним скляним електродом, орбітальний шейкер лабораторний універсальний ШО-10 та мірний посуд класу 2 класу. Статистичну обробку та визначення валідаційних характеристик проводили відповідно до вимог ДФУ 2.0 [56] та ICH Q2 [57]

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

*Приготування розчину БФС  $1,3 \times 10^{-3}$  М*

Точну наважку БФС 43,5475 мг вносили в мірну колбу об'ємом 50 мл, додавали 20 мл метанолу, ретельно струшували до повного розчинення і доводили до позначки тим же розчинником.

*Приготування розчину ФСЗ валсартану в метанолі*

Точну наважку ФСЗ валсартану 24,54 мг вносили в мірну колбу об'ємом 25 мл додавали 15 мл метанолу. Суміш ретельно струшували і доводили до позначки тим же розчинником.

*Методика отримання калібрувального графіка*

В серію мірних колб об'ємом 25 мл вносили зростаючі кількості розчину ФСЗ валсартану в метанолі (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 мл) додавали 1,0 мл  $1,3 \times 10^{-3}$  М розчину БФС і доводили об'єм до позначки 25,0 мл метанолом. Поглинання отриманої суміші вимірювали одразу ж при 424 нм проти компенсаційного розчину, який готували аналогічно, без додавання ФСЗ валсартану. Калібрувальну залежність отримували шляхом побудови графіку виміряних значень поглинання проти концентрації валсартану в розчині.

*Методика визначення валсартану з БФС у таблетках*

Двадцять таблеток ЛЗ валсартану точно зважували та розтирали в порошок. Кількість порошку, еквівалентну 24,54 мг валсартану, переносили в мірну колбу об'ємом 25 мл додавали 15 мл метанолу, отриману суміш ретельно струшували протягом 15 хв, доводили до позначки тим же розчинником витримували в ультразвуковій бані впродовж 2 хв та відфільтровували, з використанням нейлонової фільтрувальної мембрани 0,2 мкм, відкидаючи перші порції фільтрату. Аліквоту отриманого розчину 0,4 мл вносили в мірну колбу об'ємом 25 мл, додавали 1,0 мл  $1,3 \times 10^{-3}$  М розчину ВРВ, доводили до позначки метанолом. Поглинання вимірювали при 424 нм проти компенсаційного розчину, який готували аналогічно, без додавання розчину препарату. Розрахунок вмісту валсартану  $C_{24}H_{29}N_5O_3$  у лікарській формі у відсотках від заявленого ( $W, \%$ ) здійснювали 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 валсартану

$A_0$  - поглинання метанольного розчину ФСЗ валсартану

$a_1$  – маса наважки порошку розтертих таблеток, мг

$a_0$  – маса наважки ФСЗ валсартану, мг

$P$  – вміст валсартану у ФСЗ валсартану, %

$G$  – середня маса таблетки, мг

$L$  – декларований вміст валсартану у одній таблетці, мг

### 2.3 Спектрофотометрична методика визначення валсартану в субстанції та лікарських засобах за реакцією з МЧ

*Приготування розчину МЧ  $3,7 \times 10^{-3}$  М*

Точну наважку МЧ 49,8213 мг вносили в мірну колбу об'ємом 50 мл, додавали 20 мл етанолу, ретельно струшували до повного розчинення і доводили до позначки тим же розчинником.

*Приготування розчину ФСЗ валсартану в етанолі*

Точну наважку ФСЗ валсартану 11,73 мг вносили в мірну колбу об'ємом 25 мл і додавали 15 мл етанолу. Суміш ретельно струшували і доводили до позначки тим же розчинником.

*Методика отримання калібрувального графіка*

В серію мірних колб об'ємом 25 мл вносили зростаючі кількості розчину ФСЗ валсартану в етанолі (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 мл) додавали 0,5 мл  $3,7 \times 10^{-3}$  М розчину МЧ і доводили об'єм до позначки 25,0 мл етанолом. Поглинання отриманої суміші вимірювали одразу ж при 494 нм проти компенсаційного розчину, який готували аналогічно, без додавання ФСЗ валсартану. Калібрувальну залежність отримували шляхом побудови графіку вимірних значень поглинання проти концентрації валсартану в розчині.

*Методика визначення валсартану з МЧ у таблетках*

Двадцять таблеток ЛЗ валсартану точно зважували та розтирали в порошок. Кількість порошку, що містила 11,73 мг валсартану, переносили в мірну колбу об'ємом 25 мл додавали 15 мл етанолу, отриману суміш ретельно струшували протягом 15 хв, доводили до позначки тим же розчинником витримували в ультразвуковій бані впродовж 2 хв та відфільтровували, з використанням нейлонової фільтрувальної мембрани 0,2 мкм, відкидаючи перші порції фільтрату. Аліквоту отриманого розчину 0,3 мл вносили в мірну колбу об'ємом 25 мл, додавали 0,5 мл  $3,7 \times 10^{-3}$  М розчину МЧ, доводили до позначки етанолом. Поглинання вимірювали при 494 нм проти компенсаційного розчину, який готували аналогічно, без додавання розчину препарату. Розрахунок вмісту валсартану  $C_{24}H_{29}N_5O_3$  у лікарській формі у відсотках від заявленого ( $W$ , %) здійснювали 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 валсартану

$A_0$  - поглинання етанольного розчину ФСЗ валсартану

$a_1$  – маса наважки порошку розтертих таблеток, мг

$a_0$  – маса наважки ФСЗ валсартану, мг

$P$  – вміст валсартану у ФСЗ валсартану, %

$G$  – середня маса таблетки, мг

$L$  – декларований вміст валсартану у одній таблетці, мг

## РОЗДІЛ 3 РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИХ МЕТОДИК ВИЗНАЧЕННЯ ВАЛСАРТАНУ В СУБСТАНЦІЇ ТА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ

Літературні дані свідчать про актуальність опрацювання методик визначення валсартану за посередництвом утворення комплексу з різними барвниками. Беручи до уваги те, що значна кількість відомих методів визначення валсартану не відповідають вимогам «зеленої» аналітичної хімії (GAC), необхідно було розробити *eco-friendly* аналітичну процедуру визначення валсартану, у відповідності з сучасними запитами фармацевтичного аналізу. Нами запропоновано проводити визначення валсартану шляхом утворення бінарного комплексу між валсартаном та бромфеноловим синім або метиловим червоним на основі асоційованих іонних пар. Цей процес ймовірно уможлиблюють електронодонорні групи присутні у структурі валсартану (амінобутанова кислота і тетразол).

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

Валсартан вибірково утворює іонний парний комплекс з барвниками, про що свідчить утворення забарвленого комплексу з БФС при рН 5,5 з  $\lambda_{\max}$  при 424 нм. Ці іонні асоціати валсартану з аніоном барвником малорозчинні у воді, але в оптимізованих умовах експерименту вони вільно розчиняються у метанолі та не потребують екстрагування неполярними розчинниками або додавання неіонногенних поверхнево-активних речовин, що є значною перевагою при розробці методики [58-59]. Для опрацювання методики кількісного визначення валсартану з БФС нами було запропоновано використати метод диференційної спектрофотометрії, з аналітичною довжиною хвилі що відповідає максимуму поглинання продукту реакції при 424 нм.

Спектр поглинання валсартану з БФС представлений на рис. 3.1.

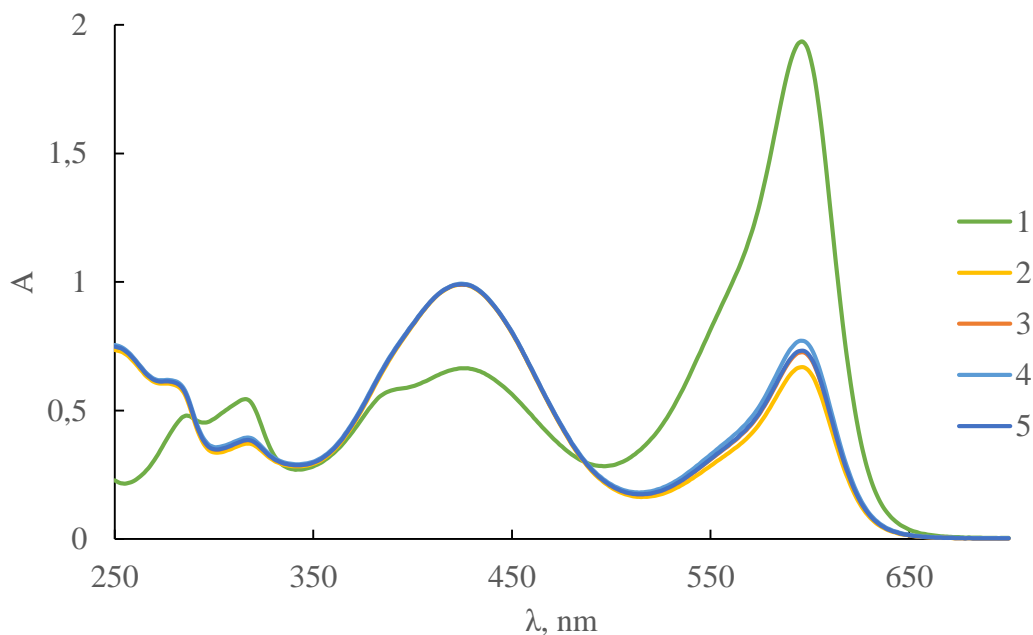


Рис. 3.1 Спектри поглинання валсартану з БФС в метанолі.  $c(\text{БФС}) = 5,2 \times 10^{-5} \text{ M}$ ,  $C(\text{ФСЗ валсартану}) = 16 \text{ мкг/мл}$ , 1 – БФС, 2 – БФС + ФСЗ валсартану, 3 – Валсартан-КРКА 160 мг, 4 – Валсартан-Тева 160 мг, 5 – Валсартан-Сандоз 160 мг.

Для швидкого та кількісного утворення забарвлених іонних парних комплексів з максимальною стабільністю та чутливістю необхідна попередня оптимізація умов перебігу індикаторної реакції. Максимальне поглинання суміші валсартану з БФС спостерігалось в метанольному розчині, а хлороформ, пропанол, ацетонітрил та етилацетат виявилися непридатними. Спектри поглинання барвника, а також валсартану з барвником у різних розчинниках наведені на рис. 3.2.

Абсолютні значення різниці поглинання суміші БФС і валсартану у досліджуваних розчинниках із поглинанням барвника у тих же розчинниках приведені на рис. 3.3. Для подальших досліджень як розчинник було обрано метанол.

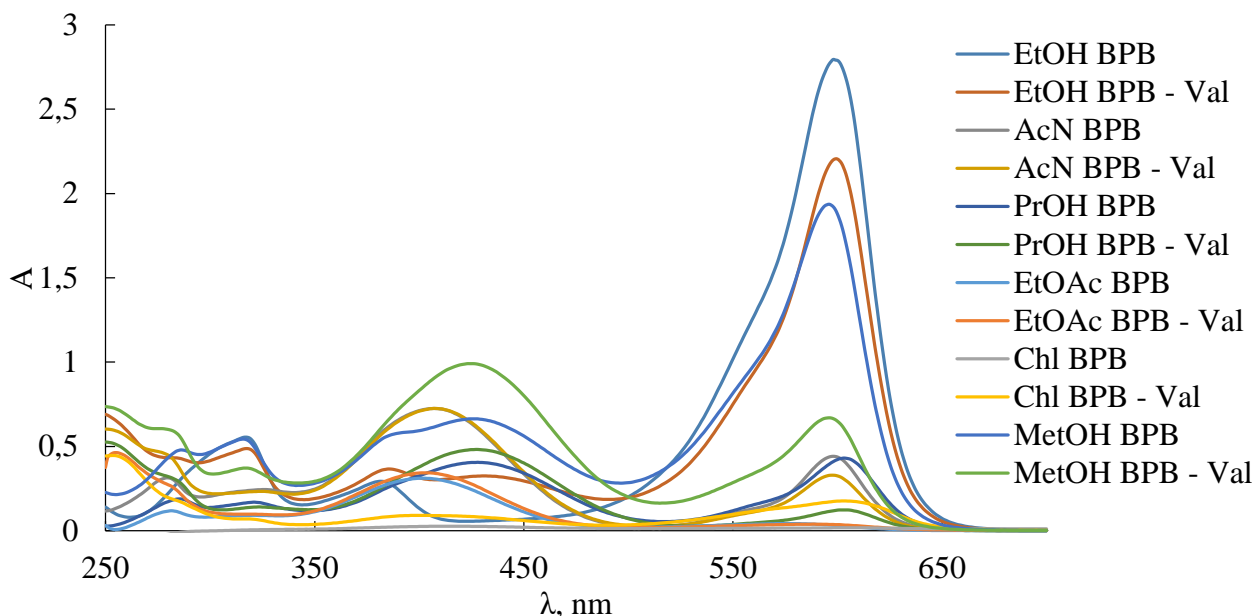


Рис. 3.2 Спектри поглинання БФС і комплексу валсартану з БФС у деяких розчинниках.  $c(\text{БФС}) = 5,2 \times 10^{-5} \text{ М}$ ,  $C(\text{валсартану}) = 16 \text{ мкг/мл}$ , EtOH - етанол, ACN - ацетонітрил, PrOH - пропанол, EtOAc - етилацетат, Chl - хлороформ, MetOH – метанол.

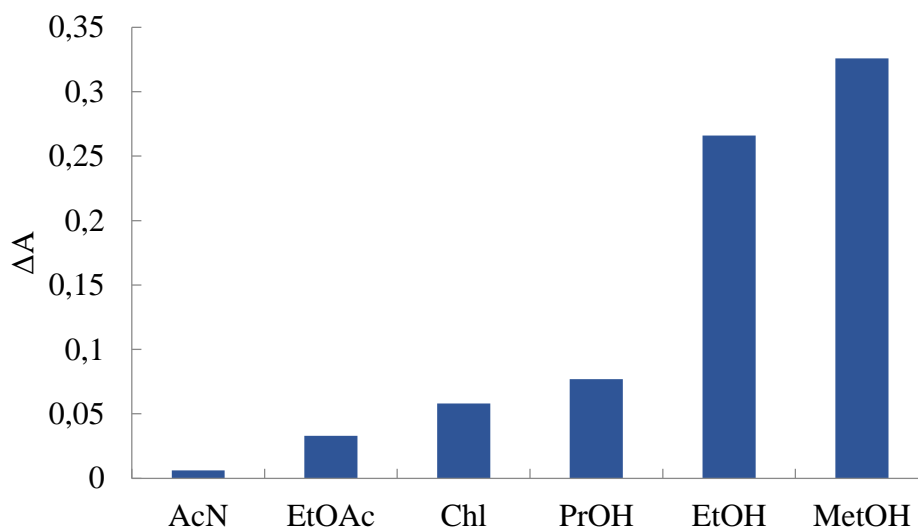


Рис. 3.3 Приріст поглинання в максимумі у розчині валсартан-БФС у різних розчинниках.  $c(\text{БФС}) = 5,2 \times 10^{-5} \text{ М}$ ,  $C(\text{валсартану}) = 16 \text{ мкг/мл}$ .

З метою вивчення стабільності отриманих комплексів у часу проводили вимірювання поглинання отриманого розчину за оптимальних умов на протязі 45 хв. Залежність поглинання продукту реакції валсартану з БФС від часу



наведено на рис. 3.4. Встановлено, що досліджувані розчини стабільні впродовж зазначеного часу.

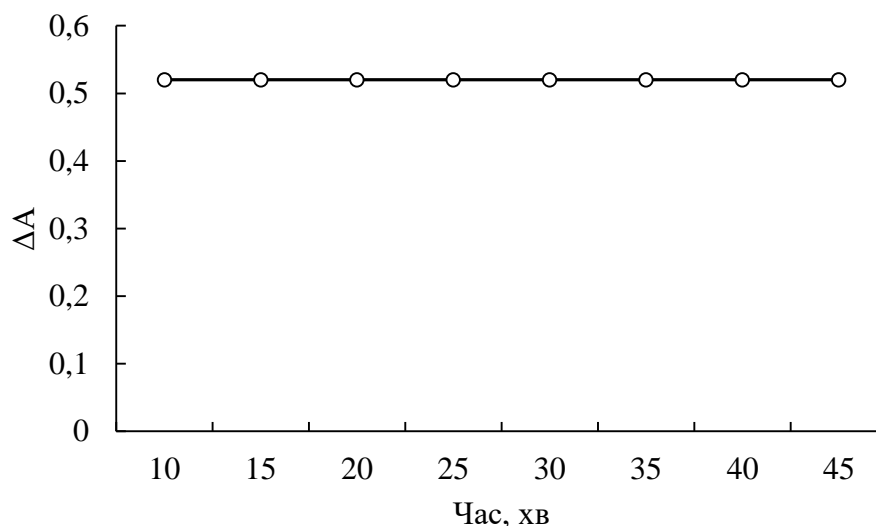


Рисунок 3.4 Залежність поглинання продукту реакції валсартану з БФС у часі.  $c(\text{БФС}) = 5,2 \times 10^{-5} \text{ М}$ ,  $C(\text{валсартану}) = 16 \text{ мкг/мл}$ .

Стехіометрію реакцій визначали, використовуючи метод безперервної варіації (*ізомольярних серій*) Джоба (Job P. 1936). Готували вихідні еквімолярні розчини  $1,3 \times 10^{-3} \text{ М}$  БФС та валсартану і змішували їх в антибатній пропорції, згідно запропонованої методики. Отриманий продукт реєстрували за довжини хвилі 424 нм. На рис. 3.5 видно, що утворення комплексу відбувається за співвідношення об'ємів компонентів ізомольярних серій 1:1 (барвник : валсартан) і стехіометрія взаємодії становить відповідно один до одного.

Розроблена аналітична методика була валідована відповідно до вимог ДФУ 2.0 [56] та ІСН Q2 [57] за такими параметрами: лінійність, діапазон застосування, правильність, прецизійність, селективність та робасність [58-61].

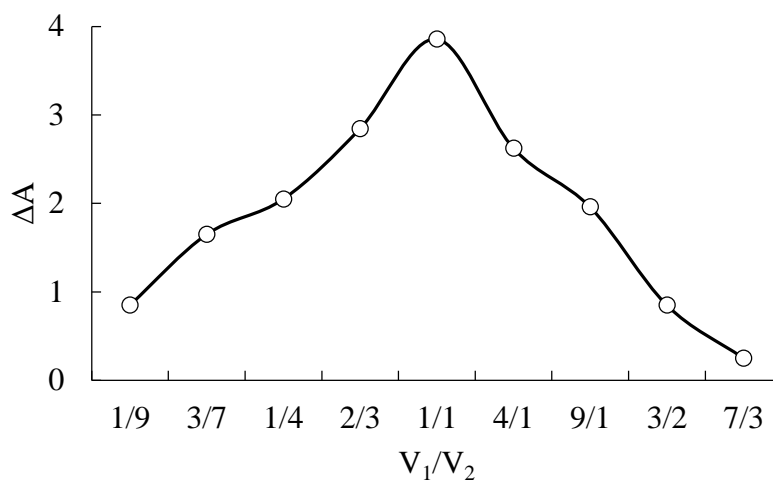


Рисунок 3.5 Графік залежності поглинання комплексу валсартан-БФС від композиції ізомолярного розчину.  $V_1 - 1,3 \times 10^{-3}$  М БФС,  $V_2 - 1,3 \times 10^{-3}$  М розчин ФСЗ валсартану,  $\lambda_{\max} = 424$  нм

### 3.1.1 Лінійність, діапазон застосування методики

Межі підпорядкування закону Бера, молярний показник поглинання, МВ, рівняння регресії та коефіцієнт кореляції були отримані за допомогою обробки результатів методом найменших квадратів [57]. Калібрувальна залежність поглинання від концентрації валсартану за реакцією з БФС приведена на рис. 3.6.

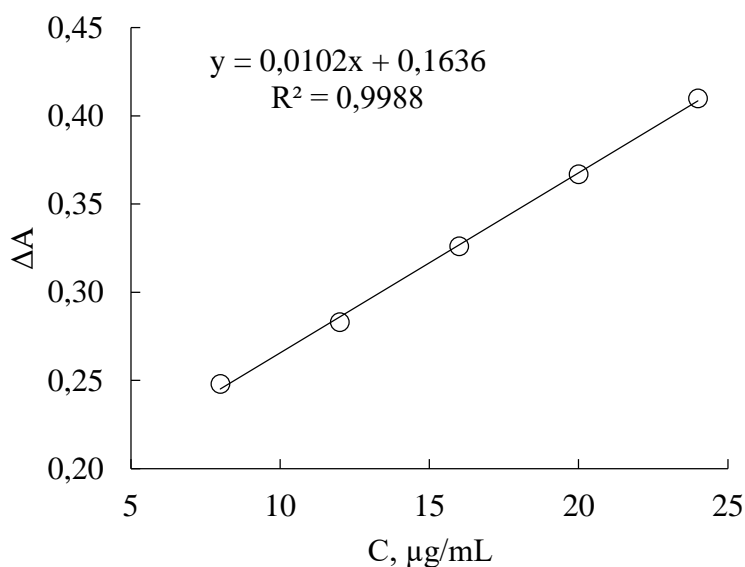


Рис. 3.6 Градувальна залежність для визначення валсартану з БФС.  $c(\text{БФС}) = 5,2 \times 10^{-5}$  М.

Виявлено лінійну залежність між поглинанням у реакції з БФС при  $\lambda_{\max}$  та концентрацією валсартану в діапазоні 8-24 мкг/мл.

За допомогою регресійного аналізу градуовального графіка при 424 нм отримано рівняння регресії типу  $y = b \cdot x + a$ , де  $y$  – поглинання розчину при  $\lambda_{\max}$ ,  $x$  – концентрація валсартану,  $a$  – вільний член розрахованої регресійної залежності,  $b$  – тангенс кута нахилу отриманої регресійної залежності. Параметри регресійного аналізу градуовальної залежності, включаючи стандартні відхилення ( $S_a$  і  $S_b$ ) для нахилу і перетину приведені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

### 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                              |

Високі значення коефіцієнта кореляції ( $R^2 = 0,9988$ ) і малі значення вільного члена лінійної залежності підтверджують лінійність калібрувальної кривої та дотримання закону Бера. Також було розраховано показники аналітичної чутливості спектрофотометричного визначення, встановлено що молярний показник світлопоглинання ( $\epsilon$ ) дорівнював  $4,43 \times 10^3$ , питомий показник світлопоглинання ( $A_{\text{см}}^{\%}$ )  $-1,07 \times 10^{-1}$ , коефіцієнт Сендела ( $S$ )  $-9,83 \times 10^{-2}$  мкг/мл. Параметри лінійної залежності (рис. 3.6, табл. 3.2) відповідають вимогам ДФУ в усьому діапазоні застосування запропонованої методики (8-24 мкг/мл).

Для визначення МВ та МКВ дотримувалися вказівок ІСН [57]. Відповідно, був застосований метод, заснований на стандартному відхиленні відгуку та нахилу градуовальної залежності. Для розрахунку МВ та МКВ були використані

3,3 та 10-кратні значення стандартного відхилення і тангенс нахилу лінії регресії. Розраховані значення МВ та МКВ становили 1,03 мкг/мл та 3,43 мкг/мл.

### 3.1.2 Правильність та прецизійність методики

Щоб перевірити правильність і прецизійність методики було приготовано модельні суміші з точно відомим вмістом валсартану, що охоплюють діапазон застосування методики (з діапазоном концентрацій в межах 70-130 % від номінального вмісту). Згідно рекомендацій ДФУ було розраховано наступні критерії: систематичну похибку  $\delta\%$ , для оцінювання правильності та відносний довірчий інтервал  $\Delta z$ , для оцінки прецизійності. У табл. 3.2 приведено результати здійснених розрахунків.

Таблиця 3.2

#### Результати вивчення правильності та прецизійності методики

| Модельні розчини | Вміст валсартану, %                 |                                      | Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100\%$ |
|------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|---|
|                  | Введено, $X_i = (m_i/m_{rs}) 100\%$ | Знайдено, $Y_i = (A_i/A_{rs}) 100\%$ |   |
| 1                | 2                                   | 3                                    | 4   |
| M <sub>1</sub>   | 70.08                               | 70.11                                | 100.04  |
| M <sub>2</sub>   | 80.55                               | 80.41                                | 99.83   |
| M <sub>3</sub>   | 89.87                               | 90.04                                | 100.19  |
| M <sub>4</sub>   | 95.02                               | 94.84                                | 99.81   |
| M <sub>5</sub>   | 100.05                              | 99.82                                | 99.77   |
| M <sub>6</sub>   | 104.91                              | 105.02                               | 100.10  |
| M <sub>7</sub>   | 110.45                              | 110.87                               | 100.38  |
| M <sub>8</sub>   | 120.28                              | 120.63                               | 100.29  |
| M <sub>9</sub>   | 130.00                              | 130.05                               | 100.04  |

Продовження таблиці 3.2

| 1   | 2 | 3 | 4                           |
|---|---|---|-----------------------------|
| Середнє значення, Z, %  |   |   | 100.05                      |
| Стандартне відхилення, Sz, %  |   |   | 0.05                        |
| Відносний довірчий інтервал<br>$\Delta z = t(95\%,8) \cdot Sz = 2.3060 \cdot Sz, \%$    |   |   | 0.12                        |
| Критичне значення для збіжності результатів<br>$\Delta z \leq \max \Delta A_s = 3.2 \%$ |   |   | виконується<br>( $< 3.2$ )  |
| Систематична похибка $\delta =  Z - 100 , \%$   |   |   | 0.05                        |
| Критерій невизначеності систематичної похибки<br>$\delta \leq \max \delta \%$           |   |   | виконується<br>( $< 0.58$ ) |
| Загальний висновок про методику   |   |   | Коректна                    |

Отримані експериментальні дані стосовно вивчення прецизійності мають припустимий розкидом стосовно середнього значення та низьке стандартне відхиленням Sz % в усьому діапазоні досліджуваних концентрацій. В середньому похибка ( $\delta$ ) запропонованої методики складає 0.05%, що свідчить про задовільну близькість середнього значення поглинання випробуваних розчинів до його номінальних величин.

### 3.1.3 Робастність методики

На стадії опрацювання спектрофотометричної методики визначення валсартану за реакцією з БФС було проведено вивчення робастності, а саме встановлення оптимальних умов перебігу перебігу аналітичної реакції та встановлення чинників, які ймовірно можуть змінювати значення поглинання випробуваного розчину (концентрація БФС та стабільність в часі досліджуваних розчинів). Показано, що варіювання доданого БФС в діапазоні  $\pm 10 \%$  не чинить впливу на результати вимірювань (рис. 3.7, табл. 3.3), а досліджувані розчини не змінюють поглинання впродовж не менше 45 хв (рис. 3.4).

## Вплив кількості доданого БФС на поглинання розчину

| Кількість доданого БФС, мл | $\Delta A$ |
|----------------------------|------------|
| 0.9                        | 0.164      |
| 1.0                        | 0.165      |
| 1.1                        | 0.166      |

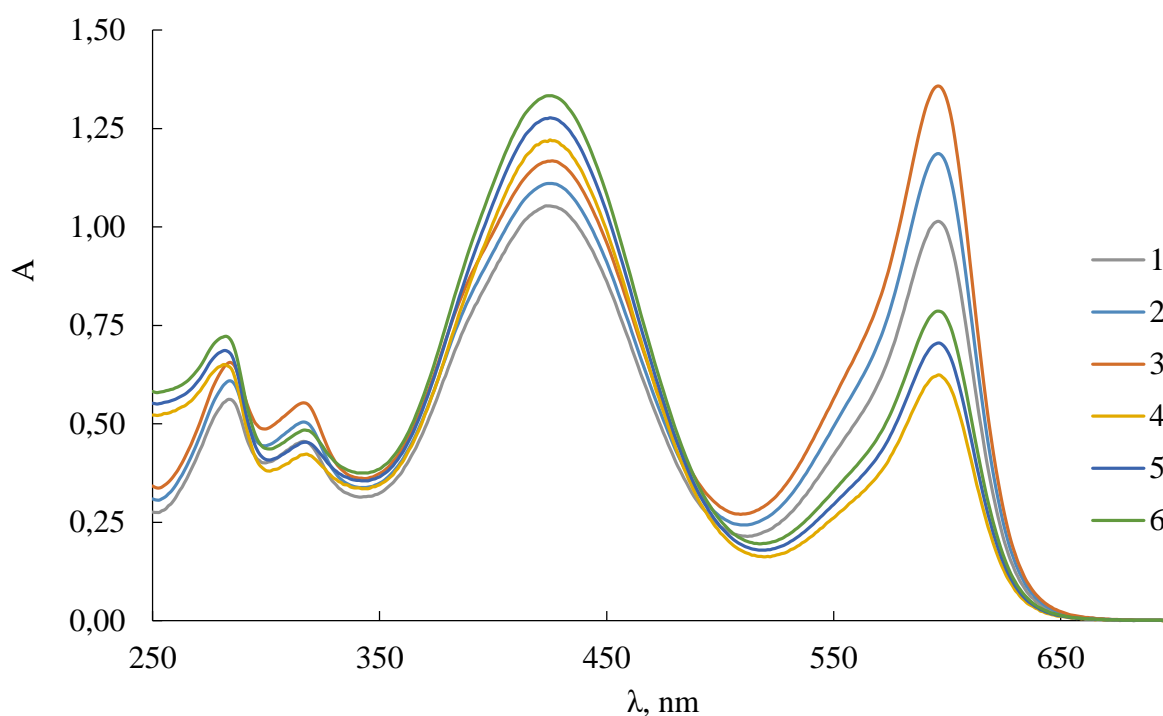


Рис. 3.7 Спектри поглинання БФС та валсартану з БФС в умовах вивчення кількості доданого БФС. 1 -  $c(\text{БФС}) = 4,68 \times 10^{-5} \text{ М}$ , 2 -  $c(\text{БФС}) = 5,20 \times 10^{-5} \text{ М}$ , 3 -  $c(\text{БФС}) = 5,72 \times 10^{-5} \text{ М}$ , 4 -  $c(\text{БФС}) = 4,68 \times 10^{-5} \text{ М}$ ,  $C(\text{ФСЗ валсартану}) = 16 \text{ мкг/мл}$ , 5 -  $c(\text{БФС}) = 5,20 \times 10^{-5} \text{ М}$ ,  $C(\text{ФСЗ валсартану}) = 16 \text{ мкг/мл}$ , 6 -  $c(\text{БФС}) = 5,72 \times 10^{-5} \text{ М}$ ,  $C(\text{ФСЗ валсартану}) = 16 \text{ мкг/мл}$ .

## 3.1.4 Селективність методики

Запропонована методика визначення валсартану з БФС була випробувана з метою оцінки її селективності за допомогою аналізу модельної суміші. Було підтверджено, що поглинання відбувається тільки аналітом. Готували модельну суміш, що містить валсартан (160 мг), моногідрат лактози, целюлозу

мікрокристалічну, повідон, кроскармелозу натрію, кремнію діоксид колоїдний безводний, стеарат магнію, гіпромелозу, діоксид титану. Випробуваний розчин отримували згідно з процедурою, яка була описана для таблеток, а потім аналізували, використовуючи описану раніше методику. Повторні визначення ( $n = 5$ ) для взятої концентрації валсартану 16 мкг/мл показали вміст знайденого валсартану  $100,14 \pm 1,03$  %, отже допоміжні речовини не перешкоджають визначенню валсартану (рис. 3.1). У спектрі плацебо таблеток не спостерігалось поглинання при аналітичній довжині хвилі 424 нм. Отже, що новоопрацьована методика є селективною.

### 3.1.5 Застосування методики для аналізу комерційних фармацевтичних препаратів

Запропонований метод був успішно застосований для аналізу комерційних таблетованих препаратів валсартану (Табл. 3.4). Методика має задовільну відтворюваність і точність ( $RSD \leq 0,63\%$ ,  $\varepsilon \leq 0,66$ ).

Таблиця 3.4

#### Результати кількісного визначення валсартану в таблетках ( $n=6$ , $p=0.95$ )

| Лікарський засіб,<br>вказана кількість АФІ, г | Знайдено, г | Метрологічні<br>характеристики   |
|---|-------------|----------------------------------|
| 1   | 2           | 2                                |
| Таблетки «Валсартан<br>КРКА», 0.16*           | 0.1601      | $\bar{m} = 0.1603$ г             |
|   | 0.1608      | $S = 5.61 \times 10^{-4}$        |
|   | 0.1611      | $t = 2.57$                       |
|   | 0.1602      | $\Delta x = 5.89 \times 10^{-4}$ |
|   | 0.1595      | $RSD = 0.35$                     |
|   | 0.1604      | $\varepsilon = 0.37$ %           |
|   | 0.1585      | $\varepsilon = 0.66$ %           |

## Продовження таблиці 3.4

| 1                                    | 2      | 3                                |
|--------------------------------------|--------|----------------------------------|
| Таблетки «Валсартан<br>ТЕВА» 0.16*   | 0.1609 | $\bar{m} = 0.1603$ г             |
|                                      | 0.1611 | $S = 7.87 \times 10^{-4}$        |
|                                      | 0.1602 | $t = 2.57$                       |
|                                      | 0.1607 | $\Delta x = 8.25 \times 10^{-4}$ |
|                                      | 0.1591 | RSD = 0.49                       |
|                                      | 0.1596 | $\varepsilon = 0.52$ %           |
| Таблетки «Валсартан<br>Сандоз» 0.16* | 0.1593 | $\bar{m} = 0.1598$ г             |
|                                      | 0.1613 | $S = 1 \times 10^{-4}$           |
|                                      | 0.1604 | $t = 2.57$                       |
|                                      | 0.1601 | $\Delta x = 1.05 \times 10^{-4}$ |
|                                      | 0.1592 | RSD = 0.63                       |
|                                      | 0.1585 | $\varepsilon = 0.66$ %           |

\* встановлено за еталонним стандартним фармакопейним методом [9]

## 3.1.6 Прогноз повної невизначеності методики

Розрахунок прогнозування повної невизначеності аналітичної методики здійснюють з метою підтвердження коректності методики. Повна прогнозована відносна невизначеність складається з невизначеності пробопідготовки та невизначеності кінцевої аналітичної операції. Для спектрофотометричного визначення невизначеність кінцевої аналітичної операції складає 0.70 %. Невизначеність пробопідготовки складається з взяття наважки, відбирання аліквот, доведення розчинів до позначки в мірних колбах та ін. Розрахунки невизначеності пробопідготовки для спектрофотометричного визначення валсартану в таблетках «Валсартан КРКА» 0.16 г показано в табл. 3.5.



Таблиця 3.5

**Розрахунок невизначеності пробопідготовки визначення валсартану  
в таблетках «Валсартан КРКА» 0.16 г**

| Операція пробопідготовки                                    | Параметр<br>розрахункової<br>формули | Невизначеність,<br>%           |
|---|--------------------------------------|--------------------------------|
| <b>Розчин порівняння</b>                                    |                                      |                                |
| 1) Взяття наважки ФСЗ валсартану                            | $m_0$                                | 0.2 мг/50 мг *<br>100% = 0.4 % |
| 2) Доведення до об'єму в мірній колбі<br>місткістю 25.00 мл | 25                                   | 0.23 %                         |
| 3) Відбирання аліквоти піпеткою 0.5 мл                      | 0.4                                  | 1.23 %                         |
| 4) Доведення до об'єму в мірній колбі<br>місткістю 25.00 мл | 25                                   | 0.23 %                         |
| <b>Випробовуваний розчин</b>                                |                                      |                                |
| 5) Взяття наважки таблеток                                  | $m_1$                                | 0.2 мг/25 мг *<br>100% = 0.8 % |
| 6) Доведення до об'єму в мірній колбі<br>місткістю 25.00 мл | 25                                   | 0.23 %                         |
| 7) Відбирання аліквоти піпеткою 0.5 мл                      | 0.4                                  | 1.23 %                         |
| 8) Доведення до об'єму в мірній колбі<br>місткістю 25.00 мл | 25                                   | 0.23 %                         |

Відповідно до табл. 3.5 сумарна невизначеність пробопідготовки ( $\Delta_{SP}$ ) складає 2.01 %. Видно що найбільший внесок невизначеності в пробопідготовку для спектрофотометричного визначення валсартану в таблетках «Валсартан КРКА» 0.16 г вносять аналітичні операції 3 і 7 – відбирання аліквоти піпеткою на 0,5 мл.

Розрахована повна невизначеність запропонованої аналітичної методики ( $\Delta_{As}$ ) складає 2.13 %.

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

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

Свідченням того що новоопрацьована спектрофотометрична методика визначення валсартану є коректною і забезпечуватиме належні результати у інших лабораторіях є те що критичне значення ( $\max \Delta_{As}$ ) перевищує прогнозовану повну невизначеність результатів аналізу.

### 3.1.7 Оцінка екологічності новоопрацьованої методики визначення валсартану за реакцією з БФС

Під часом опрацювання аналітичної методики визначення валсартану в субстанції та його препаратах за реакцією з БФС було максимально враховано принципи «зеленої» хімії [50-52]. Оцінку впливу на довкілля проводили з використанням аналітичної еко-шкали (табл. 3.6) та інструменту AGREE (Analytical GREENness) (рис. 3.8).

Таблиця 3.6

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

| Параметри | Штрафні бали |
|-----------|--------------|
| 1         | 2            |
| Реактиви  |              |
| Метанол   | 6            |
| БФС       | 1            |

Продовження таблиці 3.6

| 1                                     | 2                          |
|---------------------------------------|----------------------------|
| Обладнання                            |                            |
| Споживання енергії                    | 1                          |
| Професійні шкідливості                | 0                          |
| Відходи                               | 5                          |
| Загальна кількість пенальті балів: 13 |                            |
| Бал аналітичної еко-шкали: 87         |                            |
| Висновок                              | відмінний «зелений» аналіз |

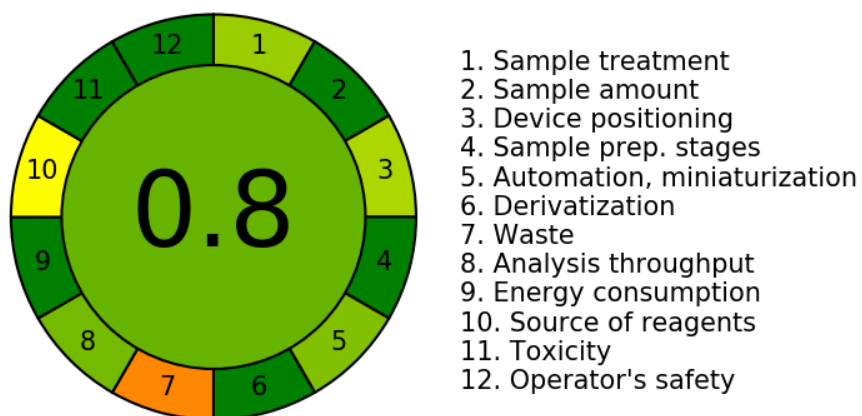


Рис. 3.8 Піктограма оцінювання екологічності спектрофотометричного визначення валсартану з БФС інструментом AGREE

Новоопрацьована спектрофотометрична методика набирає 87 балів, що відповідає вимогам відмінного «зеленого» аналізу, згідно з принципами GAC.

### 3.2 Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення валсартану в субстанції і таблетках за реакцією з метиловим червоним

У попередніх дослідженнях нами встановлено що валсартан також вибірково утворює іон-парні комплекси і з МЧ, при рН 4.3 спостерігається формування забарвленого комплексу з  $\lambda_{\text{max}}$  при 494 нм [62]. Для опрацювання аналітичної методики кількісного визначення валсартану було запропоновано спектрофотометричну процедуру в диференційному варіанті у видимій області спектра за максимумом поглинання іонної пари з МЧ. На рис. 3.9 наведено спектри МЧ та продукту його реакції з валсартаном.

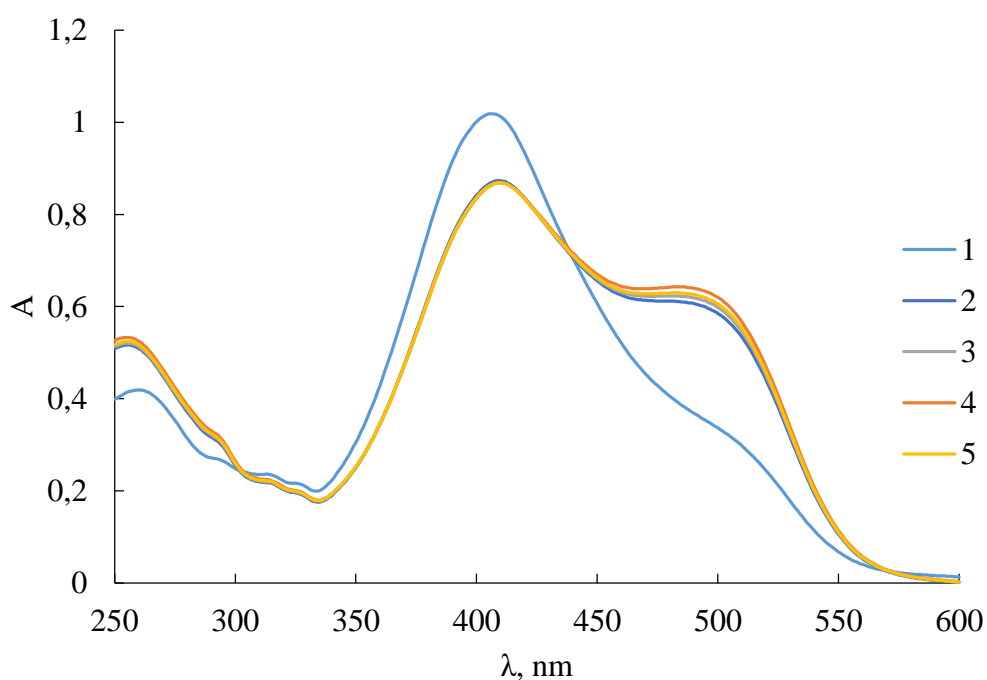


Рис. 3.9 Спектри поглинання продукту реакції валсартану та МЧ в етанолі.  $c(\text{МЧ}) = 7,4 \times 10^{-5} \text{ М}$ ,  $C(\text{ФСЗ валсартану}) = 12 \text{ мкг/мл}$ , 1 – МЧ, 2 – МЧ + ФСЗ валсартану, 3 – Валсартан-КРКА 160 мг, 4 – Валсартан-Тева 160 мг, 5 – Валсартан-Сандоз 160 мг.

Найбільший приріст поглинання при максимумі утвореного продукту валсартану з МЧ по відношенню до розчину барвника спостерігали в етанольних розчинах, тоді як решта розчинників, а саме хлороформ, етилацетат, пропанол, метанол і ацетонітрил за умов експерименту не виявилися придатними. На рис. 3.10 наведено спектри поглинання у різних розчинниках для МЧ та його суміші з валсартаном.

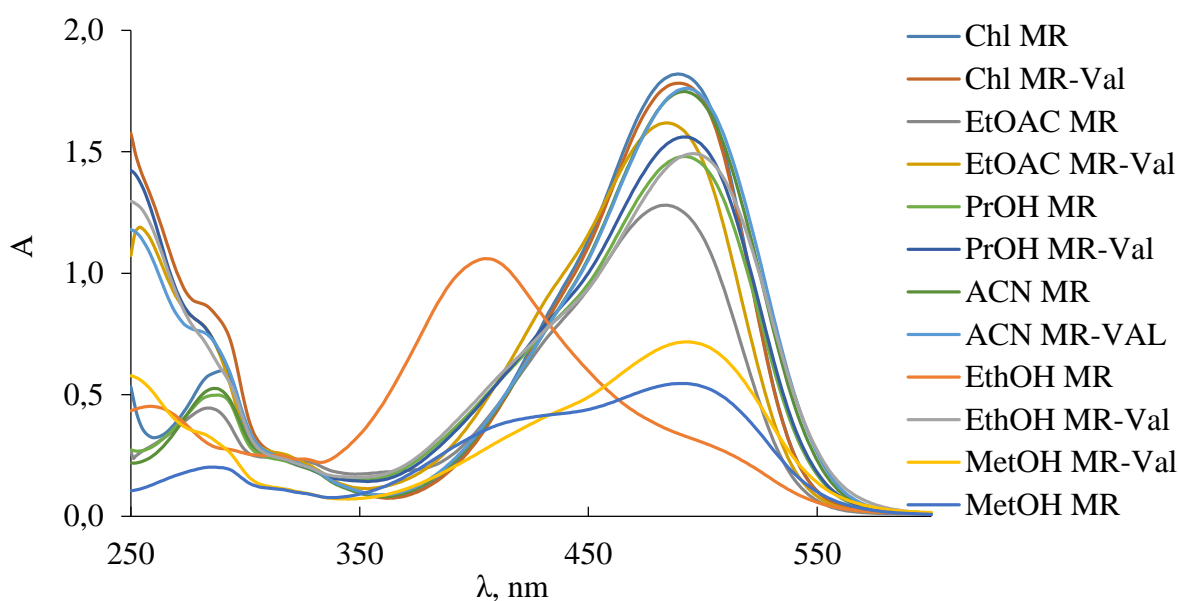


Рис. 3.10 Спектри поглинання МЧ та валсартану з МЧ у різних розчинниках.  $c(\text{МЧ}) = 7,4 \times 10^{-5} \text{ М}$ ,  $C(\text{ФСЗ валсартану}) = 12 \text{ мкг/мл}$ , MetOH – метанол, EtOH – етанол, ACN – ацетонітрил, PrOH – пропанол, Chl – хлороформ, EtOAc – етилацетат.

На рис. 3.11 показано різницю абсорбції ( $\Delta A$ ) комплексу валсартану з МЧ по відношенню до розчину барвника у зазначеному розчиннику.

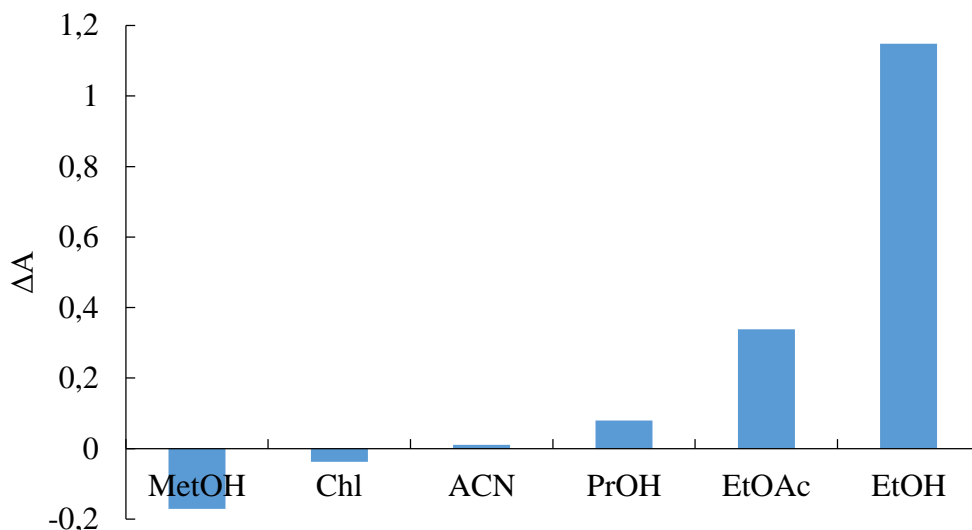


Рис. 3.11 Абсолютні значення  $\Delta A$  різниці в абсорбції валсартану з МЧ у різних розчинниках із абсорбцією МЧ у різних розчинниках. MetOH – метанол, EtOH – етанол, ACN – ацетонітрил, PrOH – пропанол, Chl – хлороформ, EtOAc – етилацетат.  $c(\text{МЧ}) = 7,4 \times 10^{-5} \text{ М}$ ,  $C(\text{ФСЗ валсартану}) = 12 \text{ мкг/мл}$ .

При вивченні стабільності отриманих комплексів валсартану і МЧ у часі, було доведено що досліджувані розчини зберігають стабільне значення абсорбції на протязі 45 хв. Залежність поглинання отриманого продукту реакції МЧ з валсартаном показано на рис. 3.12.

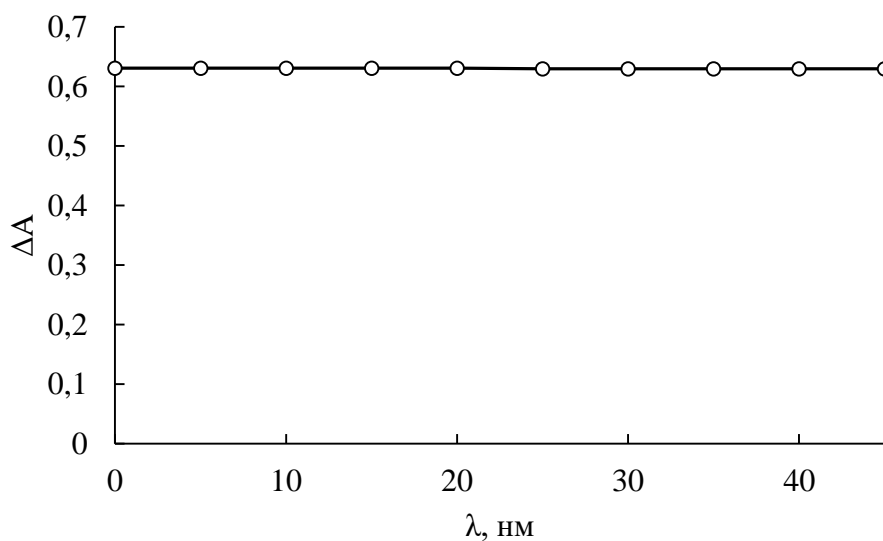


Рис. 3.12 Графік залежності абсорбції утвореного продукту реакції валсартану з МЧ від часу.  $c(\text{МЧ}) = 7,4 \times 10^{-5} \text{ М}$ ,  $C(\text{ФСЗ валсартану}) = 12 \text{ мкг/мл}$ .

Для встановлення аналітичних показників чутливості реакції валсартану з МЧ було розраховано молярний показник світлопоглинання ( $\varepsilon = 2.36 \times 10^4$ ), питомий показник світлопоглинання ( $A_{\%_{cm}}^1 = 5.4 \times 10^{-1}$ ), коефіцієнт Сендела ( $S = 1.84 \times 10^{-2}$  мкг/мл). Порівняння аналітичних показників чутливості реакцій для визначення валсартану з БФС та МЧ, свідчать про вищу чутливість реакції з МЧ, завдяки більшому значенню молярного показника світлопоглинання та нижчому порогу мінімальної відкритої концентрації.

Стехіометрія взаємодії валсартану та МЧ у реакції утворення іон-парного комплексу досліджувалася методом ізомолярних серій (метод Джоба). Для проведення випробування застосовували розчини валсартану та МЧ еквімолярної концентрації ( $3.7 \times 10^{-3}$  М) і готували їх суміші в антибатних пропорціях. Для отримання графічної залежності інтенсивності поглинання від пропорції об'ємів еквімолярних компонентів суміші, реєстрували поглинання отриманого продукту при 494 нм (рис. 3.13). Отримані дані свідчать що стехіометричні співвідношення компонентів реакційної суміші складають 1:1.

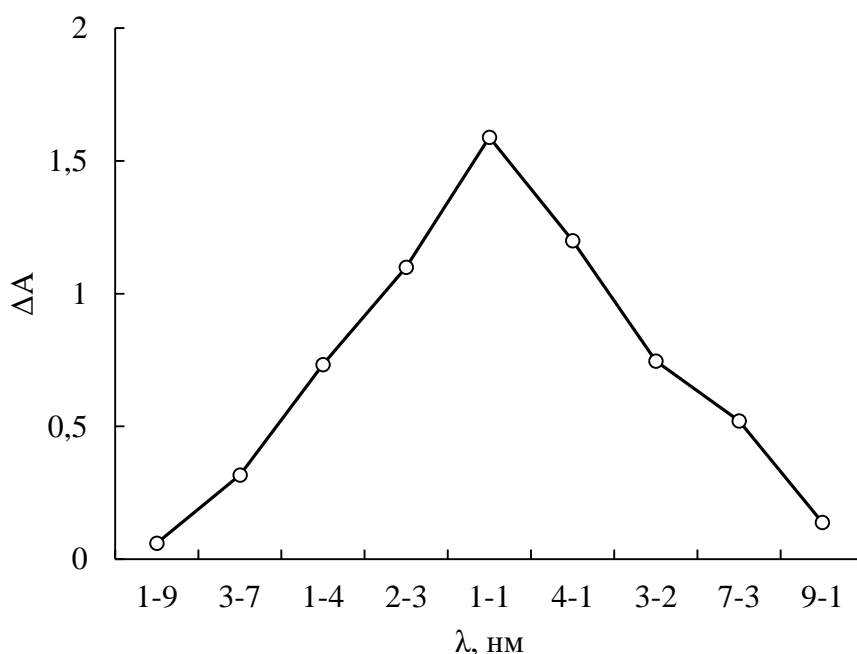


Рис. 3.13 Залежність оптичної густини від композиції суміші ізомолярних розчинів МЧ та валсартану.  $c(\text{МЧ}) = c(\text{валсартану}) = 3.7 \times 10^{-3}$  М,  $\lambda_{\text{макс}} = 494$  нм.

Запропонована методика була валідована за параметрами лінійності, діапазону застосування, правильності, прецизійності, селективності та робасності [58-61].

### 3.2.1 Лінійність, діапазон застосування методики

Відповідно до вимог ДФУ лінійність запропонованої методики вивчали в межах усього діапазону застосування, для цього було приготовлено модельні розчини валсартану. Дані кількісного визначення піддавали регресійному аналізу шляхом використання методу найменших квадратів. Було отримано рівняння регресії у форматі  $y = b \cdot x + a$ , де  $y$  – поглинання випробуваного розчину,  $x$  – концентрація валсартану,  $a$  – вільний член лінійної залежності отриманої регресійної залежності,  $b$  – тангенс нахилу градуовальної залежності.

Залежність поглинання в системі МЧ – валсартан від концентрації аналіта показано на рис. 3.14.

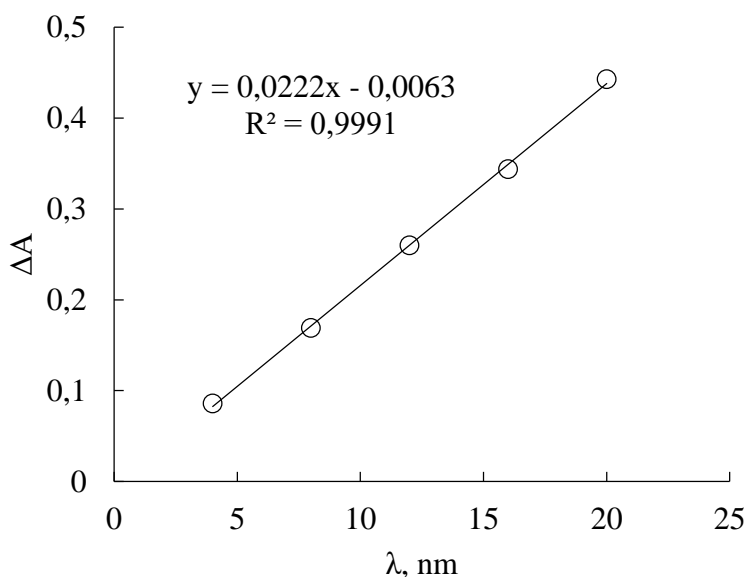


Рис. 3.14 Графік залежності оптичної густини від концентрації валсартану за реакцією з МЧ.  $c(\text{МЧ}) = 7,4 \times 10^{-5} \text{ M}$ .



Результати регресійного аналізу для градувального графіка кількісного визначення валсартану за реакцією з МЧ наведено в таблиці 3.7.

Таблиця 3.7

**Метрологічні характеристики лінійної залежності кількісного визначення валсартану за реакцією з МЧ**

| Величина      | Значення        | Критерій      | Висновок (відповідає або не відповідає) |
|---------------|-----------------|---------------|---|
| $b \pm (S_b)$ | 0.0022±(0.0035) | –             | –                                       |
| $a \pm (S_a)$ | 0.0063±(0.1754) | $ a  > 2.6\%$ | Відповідає                              |
| $R^2$         | 0.9991          | $> 0.9973$    | Відповідає                              |

Параметри лінійної залежності (рис. 3.14, табл. 3.9) знаходяться у відповідності до вимог ДФУ в усьому діапазоні застосування запропонованої методики кількісного визначення валсартану (4-20 мкг/мл). Розраховані значення МВ і МКВ склали 0.68 мкг/мл і 2.26 мкг/мл відповідно.

### 3.2.2 Правильність та прецизійність методики

З метою встановлення правильності та прецизійності методики визначення валсартану з МЧ, було приготовано модельні суміші АФІ з точним відомим вмістом, що знаходився у діапазоні застосування методики (діапазон концентрацій від номінальної складав 70-130 %). Відповідно до рекомендацій ДФУ, було розраховано наступні критерії: для оцінки правильності - систематичну похибку  $\delta\%$ , а для перевірки прецизійності - відносний довірчий інтервал  $\Delta z$ . Отримані результати відображено в табл. 3.8.

Таблиця 3.8

**Результати вивчення правильності та прецизійності методики  
спектрофотометричного визначення валсартану за реакцією з МЧ**

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

Експериментальні дані вивчення прецизійності мають припустиме відхилення стосовно середнього значення, а також низьке стандартне відхиленням  $S_z$  % в усьому діапазоні визначуваних концентрацій. В середньому похибка ( $\delta$ ) новоопрацьованої методики знаходилася на рівні 0.06%, що свідчить про задовільну близькість середнього значення поглинання випробуваних розчинів до номінальних величин.

### 3.2.3 Робасність методики

Робасність оцінювали під час вивчення оптимізації умов перебігу реакції взаємодії валсартану з МЧ на етапі опрацювання спектрофотометричного визначення. Також встановлювали фактори що потенційно можуть впливати на поглинання досліджуваного розчину, а саме концентрацію доданого МЧ і стабільність поглинання отриманих сумішей в часі.

Експериментально доведено відсутність варіації поглинання від кількості доданого МЧ в діапазоні  $\pm 10$  % від запропонованого (рис. 3.15, табл. 3.11), а також стабільність поглинання досліджуваних розчинів на протязі 45 хв (рис. 3.13).

Встановлено, що коливання кількості МЧ у межах  $\pm 10$  % не впливає на результати дослідження (табл. 3.9, рис. 3.15) та досліджувані розчини стабільні впродовж 45 хв (рис. 3.12).

Таблиця 3.9

#### Вплив кількості доданого МЧ на поглинання розчину суміші валсартану і МЧ

| Кількість доданого МЧ, мл | $\Delta A$ |
|---------------------------|------------|
| 0.4                       | 0.370      |
| 0.5                       | 0.374      |
| 0.6                       | 0.373      |

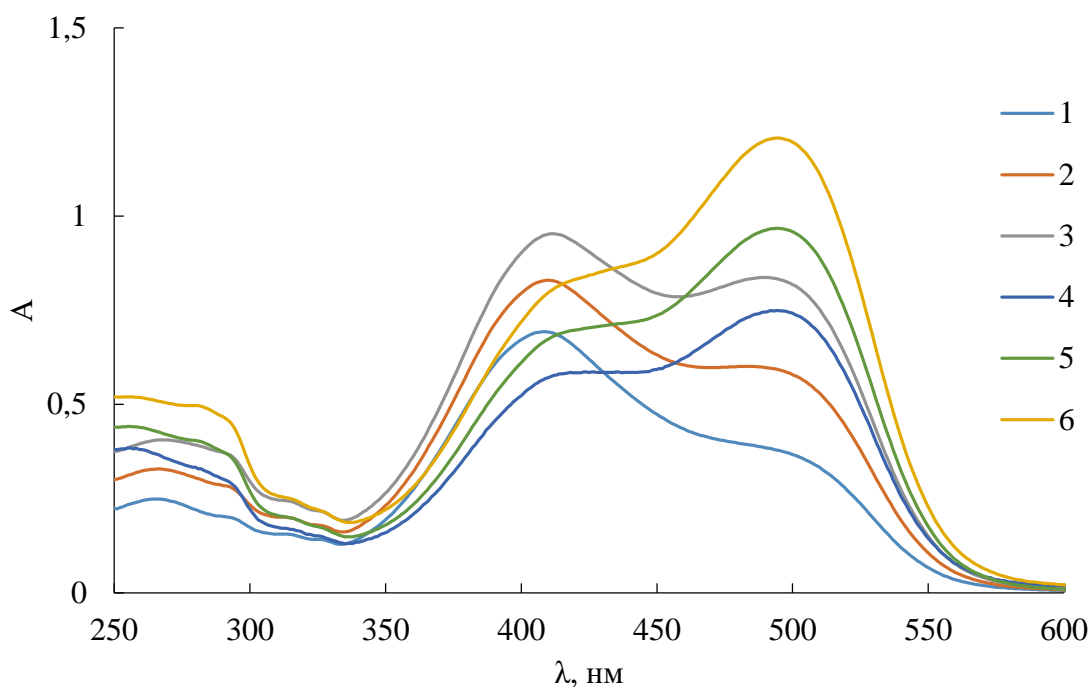


Рис. 3.15 Спектри поглинання МЧ та валсартану з МЧ за умов вивчення кількості доданого барвника. 1 -  $c(\text{МЧ}) = 3,70 \times 10^{-5} \text{ М}$ , 2 -  $c(\text{МЧ}) = 7,40 \times 10^{-5} \text{ М}$ , 3 -  $c(\text{МЧ}) = 8,88 \times 10^{-5} \text{ М}$ , 4 -  $c(\text{МЧ}) = 3,70 \times 10^{-5} \text{ М}$ ,  $C(\text{ФСЗ валсартану}) = 12 \text{ мкг/мл}$ , 5 -  $c(\text{МЧ}) = 7,40 \times 10^{-5} \text{ М}$ ,  $C(\text{ФСЗ валсартану}) = 12 \text{ мкг/мл}$ , 6 -  $c(\text{МЧ}) = 8,88 \times 10^{-5} \text{ М}$ ,  $C(\text{ФСЗ валсартану}) = 12 \text{ мкг/мл}$ .

### 3.2.4 Селективність методики

Селективність запропонованої методики перевіряли шляхом приготування модельного розчину плацебо таблеток, що вміщував допоміжні речовини таблеток валсартану (лактози моногідрат, целюлоза мікрокристалічна, повідон, натрію кроскармелоза, кремнію діоксид колоїдний безводний, магнію стеарат, гіпромелоза, титану діоксид, макрогол 4000, заліза оксид жовтий). Показано що спектр плацебо таблеток у області поглинання продукту взаємодії валсартану з МЧ має вигляд прямої, а відтак новоопрацьована методика є вибірковою стосовно АФІ і використовувані ексципієнти не змінюють результати визначення валсартану (рис. 3.9).

### 3.2.5 Застосування методики для аналізу комерційних фармацевтичних препаратів валсартану

Запропоновану методику було успішно застосовано для кількісного визначення валсартану у його комерційно доступних препаратах. У табл. 3.10 наведено результати визначення у таблетках валсартану трьох різних виробників. Отримані результати свідчать про задовільну точність та правильність визначення.

Таблиця 3.10

#### Результати кількісного визначення валсартану в таблетках ( $n=6, p=0.95$ )

| Лікарський засіб,<br>вказана кількість АФІ, г | Знайдено, г | Метрологічні<br>характеристики   |
|---|-------------|--|
| 1   | 2           | 3  |
| Таблетки «Валсартан<br>КРКА» 0.16*            | 0.1608      | $\bar{m} = 0.1601$ г<br>$S = 5.91 \times 10^{-4}$<br>$t = 2.57$<br>$\Delta x = 6.21 \times 10^{-4}$<br>$RSD = 0.37$<br>$\varepsilon = 0.39$ %                        |
|   | 0.1602      |  |
|   | 0.1591      |  |
|   | 0.1601      |  |
|   | 0.1598      |  |
|   | 0.1605      |  |
| Таблетки «Валсартан<br>ТЕВА» 0.16*            | 0.1604      | $\bar{m} = 0.1600$ г<br>$S = 5.72 \times 10^{-4}$<br>$t = 2.57$<br>$\Delta x = 6 \times 10^{-4}$<br>$RSD = 0.36$<br>$\varepsilon = 0.37$ %<br>$\varepsilon = 0.53$ % |
|   | 0.1601      |  |
|   | 0.1593      |  |
|   | 0.1609      |  |
|   | 0.1596      |  |
|   | 0.1599      |  |
|   | 0.1593      |  |

Продовження таблиці 3.10

| 1                                    | 2  | 3  |
|--------------------------------------|--|--|
| Таблетки «Валсартан<br>Сандоз» 0.16* | 0.1598<br>0.1611<br>0.1605<br>0.1607<br>0.1591<br>0.1593 | $\bar{m} = 0.1601$ г<br>$S = 8.06 \times 10^{-3}$<br>$t = 2.57$<br>$\Delta x = 8.46 \times 10^{-4}$<br>RSD = 0.5<br>$\varepsilon = 0.53$ % |

\* встановлено за еталонним стандартним фармакопейним методом [9]

Було здійснено валідацію новоопрацьованої спектрофотометричної методики згідно рекомендацій ДФУ і ІСН Q2 за параметрами селективності, лінійності, діапазону застосування, правильності, прецизійності, також робасності [56, 57].

### 3.2.6 Прогноз повної невизначеності методики

Коректність запропонованої спектрофотометричної методики перевіряли шляхом прогнозування її повної невизначеності. Для спектрофотометричного визначення невизначеність кінцевої аналітичної операції складає 0.70 %.

Результати розрахунків невизначеності для пробопідготовки кількісного визначення валсартану в таблетках «Валсартан КРКА» по 160 мг приведено в табл. 3.11.

Відповідно до отриманих результатів розрахована невизначеність пробопідготовки ( $\Delta_{SP}$ ) складає 2.61 %.

Аналіз розподілу невизначеності пробопідготовки за операціями для спектрофотометричної методики кількісного визначення валсартану в таблетках «Валсартан КРКА» по 0.16 г свідчить, що максимальну невизначеність в пробопідготовку вносить перша операція – зважування наважки ФСЗ валсартану.

Таблиця 3.11

**Результати розрахунку невизначеності пробопідготовки для  
кількісного визначення валсартану в таблетках «Валсартан КРКА» 160 мг**

| Операція пробопідготовки                                 | Параметр<br>розрахункової<br>формули | Невизначеність, %                  |
|--|--------------------------------------|------------------------------------|
| Розчин порівняння  |                                      |                                    |
| 1) взяття наважки ФСЗ валсартану                         | $m_0$                                | 0.2 мг/11.75 мг × 100%<br>= 1.70 % |
| 2) доведення до позначки в мірній колбі об'ємом 25.00 мл | 25                                   | 0.23 %                             |
| 3) відбирання аліквоти піпеткою 0.5 мл                   | 0.3                                  | 1.23 %                             |
| 4) доведення до позначки в мірній колбі об'ємом 25.00 мл | 25                                   | 0.23 %                             |
| Випробовуваний розчин                                    |                                      |                                    |
| 5) взяття наважки таблеток                               | $m_1$                                | 0.2 мг/24.3 мг × 100%<br>= 0.82 %  |
| 6) доведення до позначки в мірній колбі об'ємом 25.00 мл | 25                                   | 0.23 %                             |
| 7) відбирання аліквоти піпеткою 0.5 мл                   | 0.3                                  | 1.23 %                             |
| 8) доведення до позначки в мірній колбі об'ємом 25.00 мл | 25                                   | 0.23 %                             |

Розрахована повна невизначеність запропонованої методики ( $\Delta_{As}$ ) складає 2.71 %.

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

Відповідно, прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не перевищує критичну величину ( $\max \Delta_{As}$ ) і є свідченням того, що розроблена

спектрофотометрична методика кількісного визначення буде давати коректні результати вимірювань і в інших лабораторіях.

### 3.2.7 Оцінка екологічності новоопрацьованої методики визначення валсартану за реакцією з МЧ

Опрацювання аналітичної методики визначення валсартану в субстанції та його препаратах за реакцією з МЧ відбувалося з врахуванням принципів «зеленої» хімії [50-52]. Оцінку впливу екологічності здійснювали за допомогою аналітичної еко-шкали (табл. 3.12) та інструменту AGREE (Analytical GREEnness) (рис. 3.16).

Таблиця 3.12

#### Аналітична еко-шкала для оцінки озеленіння розробленої методики визначення валсартану з МЧ

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



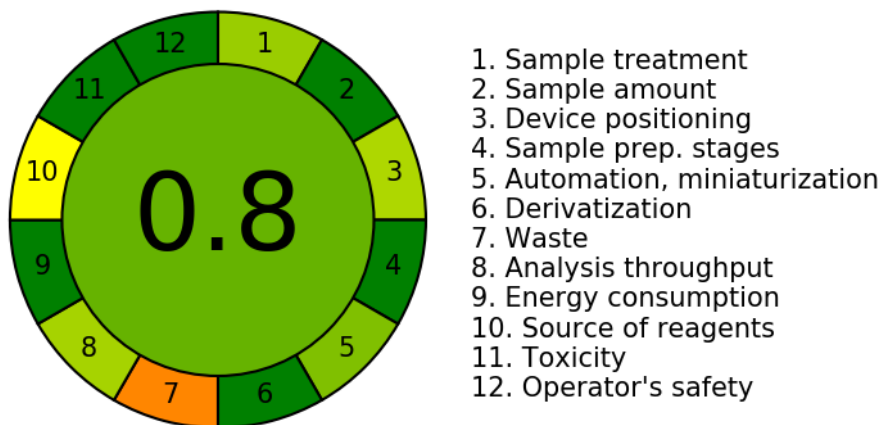


Рис. 3.16 Піктограма оцінювання екологічності спектрофотометричного визначення валсартану з МЧ інструментом AGREE

Отримані дані, наведені в таблиці 3.12, свідчать, що новоопрацьована спектрофотометрична методика визначення валсартану в субстанції і таблетках за реакцією з МЧ, відповідно до принципів GAC, відповідає вимогам відмінного «зеленого» аналізу з аналітичною загальною оцінкою за екошкалою 86.

### Висновки до розділу 3

1. Запропоновано методики та показано переваги здійснення кількісного визначення валсартану методом спектрофотометрії у видимій області. Визначення базується на утворенні іонних асоціатів з використанням бромфенолового синього з  $\lambda_{\text{max}}$  при 424 нм та метилового червоного - 494 нм.

2. Оптимізовано експериментальні умови визначення валсартану, а саме обрано розчинник, концентрації реагентів, оптимальні умови пробопідготовки, встановлено показники чутливості аналітичної реакції та стехіометрію взаємодії барвників із валсартаном, вивчено стабільність комплексів у часі.

3. В оптимізованих експериментальних умовах отримано лінійну залежність між поглинанням та концентрацією валсартану в діапазоні 8-24 мкг/мл з БФС та 4-20 мкг/мл з МЧ. МВ та МКВ становила 1,03 і 3,43 мкг/мл для методики з БФС та 0,68 і 2,26 мкг/мл - для МЧ.

4. Проведена валідація новоопрацьованих методик згідно рекомендацій ДФУ та ІСН Q2 за лінійністю, діапазоном застосування, правильністю, прецизійністю, специфічністю та робастністю. Показано що валідаційні характеристики відповідають критеріям прийнятності.

5. Запропоновані методики були успішно застосовані для кількісного визначення валсартану в таблетках. Вміст АФІ в таблетках «Валсартан-КРКА» 160 мг становить  $100,5 \pm 1,73\%$  ( $RSD = 2,15\%$ ,  $\delta = 0,51\%$ ), у таблетках «Валсартан-Тева» 160 мг –  $100,79 \pm 3,08\%$  ( $RSD = 2,48\%$ ,  $\delta = 1,35\%$ ), а в таблетках «Валсартан-Сандоз» 160 мг –  $100,79 \pm 3,08\%$  ( $RSD = 2,48\%$ ,  $\delta = 1,35\%$ ).

6. Здійснена оцінка впливу новоопрацьованих методик на навколишнє середовище за допомогою аналітичної еко-шкали та інструменту AGREE, згідно з принципами GAC вони відповідають вимогам відмінного «зеленого» аналізу.

7. Запропоновані спектрофотометричні методики кількісного визначення валсартану є простими, швидкими, неекстракційними, не вимагають складної пробопідготовки та висококоштовного обладнання та можуть застосовуватися для рутинного контролю вмісту АФІ у препаратах валсартану лабораторіями контролю якості.

## ВИСНОВКИ

У магістерській роботі розв'язана актуальна задача фармацевтичного аналізу – опрацьовано прості, швидкі, доступні спектрофотометричні методики кількісного визначення спектрофотометричним методом за реакцією утворення іонних асоціатів з бромфеноловим синім та метиловим червоним в субстанції та таблетках та проведено їх валідацію. Перевагами запропонованих спектрофотометричних методик кількісного визначення валсартану є простота, швидкість виконання, відсутність стадії екстрагування, та складної пробопідготовки, а також придатність для рутинного контролю вмісту АФІ у препаратах валсартану у лабораторіях контролю якості.

1. Критично оглянуто методики кількісного визначення щодо методів визначення валсартану з врахуванням переваг та недоліків. Встановлено що спектрофотометрія залишається найпопулярнішим методом завдяки простоті, швидкості, вартості технічного оснащення та розхідних матеріалів і високим аналітичним характеристикам, а особливу зацікавленість викликає застосування реакції утворення комплексів з барвниками завдяки зміщенню аналітичної довжини хвилі у видиму область спектра.

2. Запропоновано методики та показано переваги здійснення кількісного визначення валсартану методом спектрофотометрії у видимій області. Визначення базується на утворенні іонних асоціатів з використанням бромфенолового синього з  $\lambda_{\text{max}}$  при 424 нм та метилового червоного - 494 нм.

3. Оптимізовано експериментальні умови спектрофотометричного визначення валсартану за реакцією із БФС та МЧ, а саме обрано розчинники, підібрано концентрації реагентів, оптимальні умови пробопідготовки, встановлено показники чутливості аналітичної реакції та стехіометрію взаємодії барвників із валсартаном, досліджено стабільність комплексів у часі. Лінійну залежність між поглинанням розчину та концентрацією валсартану отримано за оптимізованих експериментальних умов у діапазоні 8-24 мкг/мл для методики з БФС та 4-20 мкг/мл – з МЧ. МВ та МКВ становила 1,03 і 3,43 мкг/мл для методики з БФС та 0,68 і 2,26 мкг/мл - для МЧ.

4. Новоопрацьовані методики валідовані згідно рекомендацій ДФУ та ІСН Q2 за параметрами лінійності, діапазоном застосування, правильності, прецизійності, специфічності та робасності. Встановлено що валідаційні характеристики є в межах критеріїв прийнятності.

5. Запропоновані методики були успішно застосовані для кількісного визначення валсартану в комерційно доступних таблетках, трьох виробників. Вміст основної речовини у таблетках «Валсартан-КРКА» 160 мг становить  $100,5 \pm 1,73\%$  (RSD = 2,15%,  $\delta = 0,51\%$ ), у таблетках «Валсартан-Тева» 160 мг –  $100,79 \pm 3,08\%$  (RSD=2,48%,  $\delta = 1,35\%$ ), а в таблетках «Валсартан-Сандоз» 160 мг –  $100,79 \pm 3,08\%$  (RSD=2,48%,  $\delta = 1,35\%$ ).

6. Здійснена оцінка екологічності новоопрацьованих методик на навколишнє середовище за допомогою аналітичної еко-шкали та інструменту AGREE, встановлена згідно до 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/c09ca03/>
3. Valsartan: A brief current review / A. Abdullah, M. Rusli // Pharmacophore. – Vol. 11, №2. – 2020. – P. 58-64.
4. Martindale The Complete drug reference 38-th edition, 2015, 4160 p.
5. Валсартан (Valsartanum) Опис активної речовини [Електронний ресурс] // Компендіум – Режим доступу до ресурсу: <https://compendium.com.ua/uk/akt/86/38/valsartanum/#toc-0>.
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. Review of valsartan analysis methods from 2000 to 2020 / E. Satriani, R. Yetti, and H. Rivai // World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences. – 2020. – №9. – Vol. 7. – P. 1268-1287
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. USP Monographs, Valsartan [Електронний ресурс] // The United States Pharmacopoeial Convention. – 2023. – Режим доступу до ресурсу: [https://doi.org/10.31003/USPNF\\_M87730\\_05\\_01](https://doi.org/10.31003/USPNF_M87730_05_01)
12. USP Monographs, Valsartan Tablets [Електронний ресурс] // The United States Pharmacopoeial Convention. – 2022. – Режим доступу до ресурсу: [https://doi.org/10.31003/USPNF\\_M2004\\_04\\_01](https://doi.org/10.31003/USPNF_M2004_04_01).

13. USP Monographs, Valsartan Tablets [Электронный ресурс] // The United States Pharmacopeial Convention. – 2023. – Режим доступа до ресурсу: [https://doi.org/10.31003/USPNF\\_M2004\\_05\\_01](https://doi.org/10.31003/USPNF_M2004_05_01)
14. Development and validation of new UV-spectrophotometric assay method for valsartan in pure and in formulations / G. Sivasankara Rao, S. Venkat Rao, S. Vardhan, D. Ramachandran // *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. – 2013. – №7. – P. 229–232.
15. Estimation of Amlodipine Besylate, Valsartan and Hydrochlorothiazide in Bulk Mixture and Tablet by UV Spectrophotometry / V. Galande, K. Baheti, S. Indraksha, M. Dehghan. // *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2012. – P. 18–23.
16. Simultaneous spectrophotometric determination of sacubitril and valsartan in their recently approved pharmaceutical preparation / K. Attia, M. Nassar, A. El-Olem, S. Ramzy. // *Journal of Applied Pharmaceutical Research*. – 2018. – №2. – P. 133–141.
17. Spectrophotometric method for simultaneous determination of valsartan and substances from the group of statins in binary mixtures / [M. Stolarczyk, A. Apola, A. Maślanka et al. // *Acta Pharm.* – 2017. – №67. – P. 463–476.
18. Maya S. Innovative spectrophotometric methods for simultaneous estimation of the novel two-drug combination: Sacubitril/Valsartan through two manipulation approaches and a comparative statistical study / S. Maya, M. Amal. // *Spectrochimica Acta*. – 2018. – №193. – P. 365–374.
19. Tsvetkova D. Estimation of validation parameters of UV-Spectrophotometric method for analysis of Valsartan / D. Tsvetkova, S. Ivanova. // *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*. – 2018. – P. 37–41.
20. Amira H. Validated spectrophotometric methods for simultaneous determination of nebivolol hydrochloride and valsartan in their tablet / H. Amira, A. Aya, F. Sherin. // *Microchemical Journal*. – 2020.
21. Tohidi M. Application of Continuous Wavelet Transform Coupled with Zero-crossing Technique for the Simultaneous Spectrophotometric Determination of

- Sacubitril and Valsartan in Tablet Dosage Form / M. Tohidi, M. Ramezani, A. Mehramizi. // *Journal of Chemical Health Risks*. – 2019. – №9. – P. 331–344.
22. Novel spectrophotometric methods for simultaneous determination of Amlodipine, Valsartan and Hydrochlorothiazide in their ternary mixture / M. Hayam, A. Maha, M. Shereen, H. Ekram. // *ScienceDirect*. – 2015. – №140. – P. 495–508.
23. Kalaimagal A. Quantification of valsartan by UV-visible and NMR spectroscopy / A. Kalaimagal // *Semantic Scholar*. – 2012. – P. 1–19. ]
24. Makvana C. Spectrophotometric method development and validation for simultaneous estimation of nebivolol hydrochloride and valsartan in bulk and combined pharmaceutical dosage form in release media / C. Makvana, S. Sahoo. // *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*. – 2019. – №6. – P. 299–304.
25. Atiyeh D. Development of a chemometric-assisted spectrophotometric method for quantitative simultaneous determination of Amlodipine and Valsartan in commercial tablet / D. Atiyeh, R. Mahmoud, B. Manouchehr. // *Optik*. – 2020. – P. 218.
26. Sandhyarani K. Determination of Valsartan by Visible Spectrophotometry / K. Sandhyarani, T. Satyasupriya, B. Praveenkumar. // *International journal of innovative research in technology*. – 2021. – №7. – P. 162–164.
27. Salih R. Spectrophotometric determination of Valsartan in pure form and in its pharmaceutical preparations / R. Salih, Q. Rashid. // *Al-Qadisiyah Journal of Pure Science*. – 2021. – №4. – P. 239–246.
28. Spectrophotometric and spectrofluorimetric determination of certain angiotensin receptor blockers through complex formation / M. Omar, O. Abdelmageed, A. Abdel-Gaber, A. Abdel-Megied. // *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. – 2011. – №10. – P. 1499–1510.
29. Elbashir A. Development and validation of stability indicating HPLC method for the simultaneous analysis of amlodipine, hydrochlorothiazide and valsartan

- in pharmaceutical formulation / A. Elbashir, R. Osman. // Journal of Analytical & Pharmaceutical Research. – 2017. – №5. – P. 119–122.
30. Prajapat P. Development and validation of a stability indicating UHPLC method for Sacubitril/Valsartan complex in the presence of impurities and degradation products / P. Prajapat, D. Bhayani, P. Mehta. // Journal of Applied Pharmaceutical Science. – 2020. – №2. – P. 97–107.
31. A validated RP-HPLC method for simultaneous determination of propranolol and valsartan in bulk drug and gel formulation / [S. Imam, A. Ahad, M. Aqil et al.]. // Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences. – 2013. – №1. – P. 61–65.
32. Cost-effective, green HPLC determination of losartan, valsartan and their nitrosodiethylamine impurity: application to pharmaceutical dosage forms / S. Abdel-Hay, M. Elhenawee, K. Maged, A. Ibrahim. // Royal Society Open Science. – 2022. – №6. – P. 1–9.
33. Mahmoud Abdelfatah Mohamed M. Simultaneous Determination of Amlodipine Besylate, Valsartan and Its Related Substances in Their Film-Coated Tablets Dosage Form by RP-HPLC Method / Mahmoud Mahmoud Abdelfatah Mohamed. // Advanced Journal of Chemistry. – 2019. – №4. – P. 335–346.
34. Dyade G. Validated RP-HPLC method and unique mobile phase for the simultaneous estimation of amlodipine besylate and valsartan from solid dosage form and rosuvastatin and valsartan from bulk / G. Dyade, R. Sawant. // Asian Journal of Pharmaceutical Clinical Research. – 2019. – №4. – P. 156–162.
35. French National Agency for Medicines and Health Products Safety Laboratory Controls Division. Determination of NDMA in valsartan active substances and finished products by HPLC/UV / French National Agency for Medicines and Health Products Safety Laboratory Controls Division. – P. 1–4.
36. Quantification of valsartan and hydrochlorothiazide in bulk and tablet formulation by RP-HPLC method / [J. Modugula, S. Rachamalla, M. Jakkireddy et al.]. // The Pharma Innovation Journal. – 2019. – №6. – P. 999–1008.



37. Voltammetric study of valsartan–Ni complex: application to valsartan analysis in pharmaceuticals and in vivo human urine profiling / M. Ragab, M. Korany, S. Galal, A. Ahmed. // *Chemical Papers*. – 2019. – №73. – P. 1209–1219.
38. Simultaneous Determination of Valsartan and Amlodipine Besylate in Human Serum and Pharmaceutical Dosage Forms by Voltammetry / P. Erden, İ. Taşdemir, C. Kaçar, E. Kılıç. // *International journal of electrochemical science*. – 2014. – №9. – P. 2208 – 2220.
39. Electrochemical characterization and voltammetric anodic stripping methods for the determination of valsartan / N. Gürler, D. Bayraktepe, Z. Durmus, E. Dinç. // *Rev. Chim.* – 2013. – P. 1211–1217.
40. Zero-Crossing Point Derivative Simultaneous Spectrofluorimetric Method for Quantification of Nebivolol Hydrochloride and Valsartan Combination in Tablets / [P. Anumolu, G. Sunitha, R. Bagirath et al.]. // *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. – 2014. – №24. – P. 164–168.
41. Shalan S. Simultaneous Determination of Amlodipine besylate and Valsartan using Micelle-enhanced First Derivative Synchronous Spectrofluorimetric Method and Application in Their Co-formulated Tablets / S. Shalan, N. El-Enany, F. Belal. // *Analytical Methods*. – P. 1–28.
42. One step quantification analytical method and characterization of valsartan by LC-MS / [S. Udhayavani, V. Girija Sastry, R. Govinda Rajan et al.]. // *International Journal of Applied Pharmaceutics*. – 2018. – №3. – P. 108–111.
43. Synchronized determination of sacubitril and valsartan with some co-administered drugs in human plasma via UPLC-MS/MS method using solid phase extraction / B. Moussa, M. Hanaa, M. Mahrouse, S. Mahmoud. // *Pharmaceutical Chemistry Department, Faculty of Pharmacy, Cairo University, Kasr El-Aini St., Cairo, Egypt*. – 2021. – P. 1–22.
44. Simultaneous determination of metolazone and valsartan in plasma by on-line SPE coupled with liquid chromatography/tandem mass spectrometry / [J. Zhou, M. Chen, Y. Li et al.]. // *European Journal of Mass Spectrometry*. – 2017. – №5. – P. 305–312.

45. Determination of the R-enantiomer of valsartan in pharmaceutical formulation by capillary electrophoresis / [K. Lee, N. Nguyen, Y. Lee et al]. // *Archives of Pharmacal Research.* – 2014. – №38. – P. 826–833.
46. Alnajjar A. Validation of a capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of amlodipine besylate and valsartan in pharmaceuticals and human plasma / Ahmed O Alnajjar. // *Pub Med.* – 2011. – №2. – P. 498–502.
47. Simultaneous determination of valsartan, amlodipine besylate and hydrochlorothiazide using capillary zone electrophoresis (CZE) / [W. Ebeid, M. Salim, E. Elkady et al.]. // *Department of Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Mansoura, Mansoura, Egypt.* – 2017. – №70. – P. 368–373.
48. Densitometry, video-scanning and capillary electrophoresis for determination of valsartan and amlodipine in a combined dosage form: A comparative study / T. Ingłot, A. Gumieniczek, L. Komsta, R. Zwiazek. // *Acta Chromatographica.* – 2013. – №1. – P. 47–58.
49. Ramadan N. Potentiometric Determination of Amlodipine Besilate and Valsartan Using Microsized and Polymeric Matrix Membrane Sensors / N. Ramadan, H. Mohamed, A. Mostafa. // *Portugaliae Electrochimica Acta.* – 2012. – №1. – P. 15–29.
50. Sheldon R. Metrics of Green Chemistry and Sustainability: Past, Present, and Future // *ACS Sustainable Chem. Eng.* – 2018. – Vol. 6, № 1. – P. 32–48.
51. Gałuszka A. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures / A. Gałuszka, P. Konieczka, Z. Migaszewski, J. Namiesnik // *Trends in Analytical Chemistry.* – 2012. – Vol. 37. – P. 61–72.
52. Pena-Pereira F. AGREE - Analytical GREENness Metric Approach and Software / F. Pena-Pereira, W. Wojnowski, M. Tobiszewski // *Anal. Chem.* – 2020. – Vol. 92. – P. 10076–10082.
53. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/60846>
54. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons / A. C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop, J. Watts (Ed.). Fourth edition. London : Pharmaceutical Press, Lambeth High Street, 2011. P. 1620–1622.

55. Novartis Pharmaceuticals Corp 2019. Diovan (Valsartan) Product Leaflet. <https://www.pharma.us.novartis.com/sites/www.pharma.us.novartis.com/files/diovan.pdf> [June 2019]
56. 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.
57. 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).
58. 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.
59. 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 симпозиуму, присвяченому 100-річчю кафедри фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету, 18 жовтня 2021 р. Харків, 2021. С. 71-72.
60. Peleshok K., Bondar B., Kryskiw L., Kucher T., Poliak O., Logoyda L. Non-extractive spectrophotometric determination of valsartan in pure form and in pharmaceutical products by ion-pair complex formation with bromophenol blue and methyl red // Pharmacia. – 2021. – Vol. 68, № 4. – P. 851-858.
61. Validation of new non-extractive spectrophotometric method for determination of valsartan with bromophenol blue in tablet / Peleshok Kateryna, Bondar Bohdana, Kryskiw Liubomyr, Kucher Tetyana, Poliak Olha, Logoyda Liliya //

Запорізький фармацевтичний форум - 2021: матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю (25-26 листопада 2021 року, м. Запоріжжя). – Запоріжжя, 2021. – С.13.

62. Development and validation of spectrophotometric methods for estimation of valsartan in dosage form / K. Peleshok, L. Kryskiw, T. Kucher, O. Poliak, L. Logoysda. «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.

## Додатки

### Додаток А

#### Список публікацій

1. Validation of new non-extractive spectrophotometric method for determination of valsartan with bromophenol blue in tablet / Peleshok Kateryna, Bondar Bohdana, Kryskiw Liubomyr, Kucher Tetyana, Poliak Olha, Logoyda Liliya // Запорізький фармацевтичний форум - 2021: матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю (25-26 листопада 2021 року, м. Запоріжжя). – Запоріжжя, 2021. – С.13.
2. Optimization of reaction variables for non-extractive spectrophotometric determination of valsartan via ion-pair complex formation with bromophenol blue / Peleshok K., Bondar B., Kryskiw L., Kucher T., Poliak O., Logoyda L. // 100 років успіху та якості: матеріали міжнар. наук.-практ. симпозиуму, присвяченого 100-річчю кафедри фармацевтичної хімії НФаУ (18 жовтня 2021 р.). – Харків, 2021. – С. 71.
3. Peleshok K., Bondar B., Kryskiw L., Kucher T., Poliak O., Logoyda L. Non-extractive spectrophotometric determination of valsartan in pure form and in pharmaceutical products by ion-pair complex formation with bromophenol blue and methyl red // Pharmacia. – 2021. – Vol. 68, № 4. – P. 851-858.

## Додаток Б

Таблиця Б.1. Описані в літературі спектрофотометричні методики визначення валсартану

| № | Об'єкт                            | Принцип  | Аналітичні характеристики  | Посилання |
|---|-----------------------------------|--|--|-----------|
| 1 | Субстанція,<br>ЛФ                 | Пряма УФ-<br>спектрофотометрія, $\lambda_{\text{макс.}}$<br>= 250,8 нм, в метанолі і<br>воді | Лінійність 5-30 мкг/мл, $R^2 =$<br>0,996, 99.26% - 100.7%,   | [14]      |
| 2 | Субстанція,<br>таблетки           | Пряма УФ-<br>спектрофотометрія, $\lambda_{\text{макс.}}$<br>= 250 нм в метанолі              | Лінійність 5-25 мкг/мл,<br>RSD = 0,84, $100.7 \pm 0.7 \%$  | [15]      |
| 3 | Комбінована<br>ЛФ                 | Багатохвильова<br>спектрофотометрія в<br>метанолі при 220 і 250 нм                           | Лінійність 1-15 мкг/мл, $R^2$<br>= 0,9996, RSD = 1,365%,<br>$101,09 \pm 0,586$   | [16]      |
| 4 | Бінарні<br>суміші зі<br>статинами | Похідна<br>спектрофотометрія, D1-D3,<br>розчинник метанол                                    | Лінійність 9.28-32.48 мг/мл,<br>$R^2 = 0.989$ , RSD = 2.5 %,<br>$100 \pm 5 \%$   | [17]      |
| 5 | Комбінований<br>ЛЗ                | Похідна<br>спектрофотометрія   | Лінійність 2,5-25,0 мкг/мл   | [18]      |
| 6 | Субстанція                        | Похідна<br>спектрофотометрія в<br>метанолі і етанолі   | В етанолі лінійність $5 \cdot 10^{-7}$<br>– $3 \cdot 10^{-6}$ г/мл, МВ $1.84 \cdot 10^{-9}$<br>г/мл, RSD = 2.11%, $101.0 \pm$<br>1.78<br>В метанолі лінійність<br>$1.2 \cdot 10^{-6}$ - $2.5 \cdot 10^{-6}$ г/мл, МВ<br>$9.4 \cdot 10^{-8}$ г/мл, RSD = 2.88%,<br>$98.28 \pm 2.17$ | [19]      |
| 7 | Бінарна<br>суміш, ЛФ              | Похідна<br>спектрофотометрія,<br>метанол   | Лінійність 20–60 мкг/мл,<br>$R^2 = 0,9997$ , RSD = 1.07 %  | [20]      |
| 8 | Комбінована<br>ЛФ                 | Похідна<br>спектрофотометрія у воді  | RSD 1,23%. Результати<br>порівняно з ВЕРХ не<br>показали відмінностей  | [21]      |

Продовж. дод. Б

Продовж. табл. Б.1

|    |                            |  |  |      |
|----|----------------------------|--|--|------|
| 9  | Потрійна суміш субстанцій  | Похідна спектрофотометрія в метанолі   | Лінійність 4-40 мкг/мл, $R^2=0,9998$ , $100.08 \pm 1.03$ , $RSD = 0,883\%$                                   | [22] |
| 10 | Субстанція, таблетки       | Похідна спектрофотометрія в дейтерованому хлороформі   | Лінійність 5-30 мкг/мл, $R^2=0,99$   | [23] |
| 11 | Субстанція, комбіновані ЛФ | Спектрофотометрія у фосфатному буфері з додецилсульфатом натрію, $\lambda_{\text{макс}} = 280$ нм  | Лінійність 10-60 мкг/мл, $R^2 = 0,996$ , $97.42\% - 101.43\%$ , $RSD = 0.392\% - 1.197\%$                    | [24] |
| 12 | Комбіновані таблетки       | Хеометрична спектрофотометрія без попередньої підготовки із використанням нейронних мереж, в метанолі.   | Показано відсутність статистично значущої відмінності з результатами отриманими ВЕРХ, $RSD = 0.6577\%$ ,     | [25] |
| 13 | Субстанція, таблетки       | Утворення комплексу з тропеоліном ооо, екстрагування хлороформом, $\lambda_{\text{макс}} = 483$ нм)  | $R^2 = 0,992$<br>Лінійність 8 – 48 мкг/мл;<br>$MB = 0,576$ мкг/мл  | [26] |
| 14 | Субстанція, ЛФ             | Утворення асоціату з 4-хлор-7-нітробензофуразаном, рН = 11,9 і $\lambda_{\text{макс}} = 470$ нм.   | Лінійність 0.4-14.8 мкг/мл, $R^2 = 0.9827$ , $MB = 0.557$ мкг/мл   | [27] |
| 15 | Субстанція, таблетки       | Утворення асоціату з бромфеноловим і бромтимоловим синім, бромкрезоловим зеленим, $\lambda_{\text{макс}} = 413-419$ нм у метанолі, без екстракції. | Лінійність 1,0 - 8,0 мкг/мл <sup>-1</sup> , $R^2 = 0,9998$ , $MB = 0,132$ , $МКВ = 0,399$ , $99,82 \pm 1,02$ | [28] |