

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

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО МОЗ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ТИПЛИНСЬКА Катерина Василівна

УДК 615.07:615.45:615.225.2 (043.3)

ДИСЕРТАЦІЯ
РОЗРОБКА МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ФОРМ
РАМПРИЛУ

226 «Фармація, промислова фармація»

22 «Охорона здоров'я»

Подається на здобуття ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ К. В. Типлинська

Науковий керівник: **Логойда Лілія Святославівна**, доктор фармацевтичних наук, професор

Тернопіль – 2024

АНОТАЦІЯ

Туплинська К. В. Розробка методик контролю якості лікарських форм раміприлу. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація» (22 «Охорона здоров'я»). – Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України, 2024.

Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України, Тернопіль, 2024.

У дисертаційній роботі наведено теоретичне та експериментальне вирішення актуального наукового завдання, що полягає в розробці методик контролю якості лікарських форм раміприлу за показниками «Кількісне визначення», «Супровідні домішки», «Розчинення», «Однорідність дозованих одиниць». Метою роботи була розробка методик контролю якості лікарських форм раміприлу.

Першим кроком у розробці методик контролю якості таблеток раміприлу є розробка хроматографічних методик для рутинного застосування у лабораторіях з контролю якості при проведенні тестів «Кількісне визначення», «Супровідні домішки», «Розчинення», «Однорідність дозованих одиниць». Для визначення супровідних домішок раміприлу у таблетках постало завдання в розробці правильної, прецизійної, простої та «зеленої» ВЕРХ методики. Для розділення на етапі аналітичної розробки використовували колонки Inertsil ODS-3 (4.6 мм x 150 мм, 3 мкм) і Acclaim 120 C18 (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм). Загальний час хроматографування становив близько 25 хв. Об'єм інжекції складав 20 мкл. Колонка Inertsil ODS-3 (150 мм x 4.6 мм, 3 мкм) – октадецилсилільна колонка, що складається з 450 м²/грам частинок, пор 100 Å і 15 % вмісту вуглецю. Оптимальна довжина хвилі детектування – 210 нм. Встановлено, що швидкість потоку 1.5 мл/хв була оптимальною для досягнення відмінного розділення за короткий час аналізу. Використання іон-парних реагентів (натрію

гексансульфонату) є відомим підходом у розробці ВЕРХ методик, який дозволяє розділяти іонні та високополярні речовини на колонках ВЕРХ з оберненою фазою. Проведено валідацію ВЕРХ методики та детально описано підходи до її проведення, оскільки валідація методики при визначенні супровідних речовин є трудомісткою і часто непростю. Даних щодо впливу компонентів, що заважають аналізу, не виявлено. Методика була лінійною у діапазоні застосування. Прецизійність та правильність методики була достатньою. Межа виявлення (МВ) методики визначення домішки А раміприлу становила ~ 0.030 %, домішки В – ~ 0.037 %, домішки С – ~ 0.070 %, домішки D – ~ 0.030 % (критерій прийнятності $МВ \leq 0.15$ %). Межа кількісного визначення (МКВ) методики визначення домішки А раміприлу становила ~ 0.092 %, домішки В – ~ 0.107 %, домішки С – ~ 0.213 %, домішки D – ~ 0.091 % (критерій прийнятності $МКВ \leq 0.25$ %). МВ неідентифікованих домішок становила 0.03 %. Для розрахунку вмісту домішки С необхідно використовувати коефіцієнт перерахунку 2.5. ВЕРХ методика відповідає встановленим вимогам і може використовуватись для контролю якості препаратів «Раміприл, таблетки 2,5 мг», «Раміприл, таблетки 5 мг», «Раміприл, таблетки 10 мг» за показником якості «Супровідні домішки».

З метою проведення кількісного визначення раміприлу в таблетках ми акцентували увагу на розробці експресної, простої та «зеленої» ВЕРХ методики з використанням ізократичного елюювання рухомою фазою, що складалася з 0.2 г/л розчину натрію гексансульфонату (рН 2.7), ацетонітрилу (50:50), на колонці Acclaim 120 C18 (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм) зі швидкістю потоку 1.0 мл/хв. Час утримування раміприлу становив 4.15 хв. Рухома фаза була обрана та сама, що і при аналізі супровідних домішок, проте в ізократичному елююванні. Обрані хроматографічні умови дали можливість розробити експресну та «зелену» ВЕРХ методику кількісного визначення раміприлу в таблетках. Детально описано процедуру валідації методики. Даних щодо впливу компонентів, які заважають аналізу, не виявлено. Методика була лінійною у діапазоні застосування. Прецизійність та правильність методики були достатніми. ВЕРХ методика

відповідає встановленим вимогам та може використовуватись для контролю якості препаратів «Раміприл, таблетки 2.5 мг», «Раміприл, таблетки 5 мг», «Раміприл, таблетки 10 мг» за показниками якості «Ідентифікація», «Кількісне визначення», «Однорідність дозованих одиниць».

З метою визначення раміприлу для проведення тесту «Розчинення» постало завдання розробити експресну, точну та «зелену» ВЕРХ методику визначення раміприлу. Використовували такі ж хроматографічні умови, як і для кількісного визначення раміприлу в таблетках – ізократичне елюювання рухомою фазою, що складалася з 0.2 г/л розчину натрію гексансульфонату (рН 2.7), ацетонітрилу (50:50 об'єм/об'єм), хроматографічна колонка Acclaim 120 C18 (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм) зі швидкістю потоку рухомої фази 1.0 мл/хв, об'єм інжекції – 3 мкл. Проведено валідацію аналітичної методики з детальним описом процедури валідації. Даних щодо впливу компонентів, які заважають аналізу, не виявлено. Методика була лінійною у діапазоні застосування. Прецизійність та правильність методики була достатньою. Модифікована методика відповідає встановленим вимогам і може використовуватись для контролю якості препаратів «Раміприл, таблетки 2,5 мг», «Раміприл, таблетки 5 мг», «Раміприл, таблетки 10 мг» за показником якості «Розчинення».

Розроблено дві прості, експресні, економічно доступні, альтернативні спектрофотометричні методики визначення раміприлу в таблетках за реакціями з бромфеноловим синім (БФС) та крезоловим червоним (КЧ). Розчинником для обох методик був ацетонітрил. Встановлено оптимальні умови кількісного визначення раміприлу в таблетках за реакцією з БФС: концентрація барвника – 2.35×10^{-4} моль/л, об'єм розчину БФС – 1.0 мл, без нагрівання, довжина хвилі – 598 нм, час реакції – 5 хв, температура розчину – 25 °С. Оптимальні умови кількісного визначення раміприлу в таблетках за реакцією з КЧ: концентрація барвника – 1.33×10^{-4} моль/л, об'єм розчину КЧ – 1.0 мл, без нагрівання, довжина хвилі – 395 нм, час реакції – 5 хв, температура розчину – 25 °С. Стехіометричні коефіцієнти відповідали 1 до 1. Спектрофотометрична методика визначення раміприлу за реакцією з БФС була лінійною у діапазоні концентрацій 1.99-5.96

мкг/мл, МВ – 0.20 мкг/мл, МКВ – 0.60 мкг/мл. Спектрофотометрична методика визначення раміприлу за реакцією з КЧ була лінійною у діапазоні концентрацій 0.42-5.44 мкг/мл, МВ – 0.10 мкг/мл, МКВ – 0.36 мкг/мл. Результати проведеної валідації вказують на відповідність критерія прийнятності.

Розроблено ВЕРХ методику для одночасного контролю вмісту домішок раміприлу та гідрохлортіазиду у комбінованому препараті. Також дана методика дозволяє оцінювати якість препарату впродовж терміну придатності. Використовували колонку Inertsil ODS-3 (4.6 мм × 150 мм, 3 мкм); рухому фазу А – 0.2 г/л розчин натрію гексансульфонату (рН 2.7); рухому фазу Б: ацетонітрил; швидкість рухомої фази 1.5 мл/хв; довжина хвилі детектування – 210 нм; температура колонки – 45 °С, градієнтний режим елюювання. При дії стресових факторів на плацебо препарату жодних додаткових піків не виявлено. Найбільш значний вплив на деградацію як раміприлу, так і гідрохлортіазиду мав розчин лугу. Оскільки раміприл був нестійким у лужному середовищі, то склад препарату та розчинники, які використовують при приготуванні зразків, не повинні містити лужних компонентів. Продукти деградації гідрохлортіазиду мали часи утримування від 2 хв до 5 хв, раміприлу від 10 хв до 20 хв. Розроблена методика може забезпечити одночасне визначення домішок раміприлу та гідрохлортіазиду при контролі стабільності комбінованого препарату.

Розроблено аналітичні методики визначення раміприлу та гідрохлортіазиду у промивних водах методом ультраефективної хроматографії з мас-спектометричним детектування. Використовували колонку Kinetex C18 (2.1 мм × 30 мм, 1.7 мкм); рухому фазу – 0.1 % розчин мурашиної кислоти в деіонізованій воді – ацетонітрил (співвідношення 73:27 для визначення раміприлу та 91.5:8.5 для визначення гідрохлортіазиду); швидкість рухомої фази 0.4 мл/хв для визначення раміприлу та 0.35 мл/хв для визначення гідрохлортіазиду; температуру колонки 45 °С для визначення раміприлу та 40 °С для визначення гідрохлортіазиду, режим іонізації – електроспрей у позитивному режимі; параметри детектування – режим реєстрації дочірнього іону 417 → 234 m/z для визначення раміприлу та 298 → 281 m/z для визначення

гідрохлортіазиду. Чутливість методик підтверджено на рівні 0.0026 мкг/мл. Методики можна застосовувати в діапазоні концентрацій 0.0026–0.0255 мкг/мл. Запропоновані методики можуть бути використані для контролю очищення обладнання як монопрепаратів, так і комбінованого препарату.

Розроблено методики контролю за показниками якості «Кількісне визначення» та «Однорідність дозованих одиниць» комбінованих таблеток раміприлу з гідрохлортіазидом з використанням хроматографічних колонок Inertsil ODS-3 (150 мм x 4.6 мм, 3 мкм) та Dionex Acclaim 120 C18 (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм). Для проведення досліджень з розробки методик контролю за показниками якості «Кількісне визначення» та «Однорідність дозованих одиниць» комбінованих таблеток раміприлу з гідрохлортіазидом п'яти різних дозувань використовували ізократичне елюювання та рухоми фазу – розчин рН 2.7 та ацетонітрил Р у співвідношенні 47:53 для колонки Inertsil ODS-3 та 20:80 для колонки Dionex Acclaim 120 C18. Методики були лінійними в діапазоні концентрацій 0.024–0.146 мг/мл для раміприлу та 0.06–0.39 мг/мл для гідрохлортіазиду. Розроблені аналітичні методики відповідають усім дослідженим валідаційним характеристикам та можуть бути використані для рутинного контролю комбінованих препаратів раміприлу з гідрохлортіазидом за показниками якості «Кількісне визначення» та «Однорідність дозованих одиниць».

Розроблено методики контролю за показниками якості «Розчинення» та «Профілі розчинення» комбінованих таблеток раміприлу з гідрохлортіазидом з використанням хроматографічних колонок Inertsil ODS-3 (150 мм x 4.6 мм, 3 мкм) та Dionex Acclaim 120 C18 (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм) та градієнтного (для обох колонок) або ізократичного елюювання (для колонки Dionex Acclaim 120 C18, співвідношення 80:20). Експериментально підібрано умови градієнтного елюювання з початковим співвідношенням рухомих фаз 70:30. При валідації методик досліджували діапазон застосування, правильність та прецизійність методики для п'яти комерційно доступних дозувань комбінованих препаратів. Методики були лінійними в діапазоні концентрацій 0.2–5.0 мкг/мл для раміприлу

та 0.5–12.0 мкг/мл для гідрохлортіазиду. Розроблені методики відповідають усім дослідженим валідаційним характеристикам та можуть бути використані для рутинного контролю комбінованих препаратів раміприлу з гідрохлортіазидом за показниками якості «Розчинення» та для дослідження профілів розчинення.

Ключові слова: аналіз, раміприл, лікарські форми, таблетки, валідація, високоефективна рідинна хроматографія, реагент, спектрофотометрія, спектроскопія, фіксована комбінація.

ANNOTATION

Typlynska K.V. Development of Methods of Quality Control of Dosage Forms of Ramipril. – Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 226 “Pharmacy, Industrial Pharmacy” (22 “Healthcare”). – I. Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, 2024.

I. Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, city of Ternopil, 2024.

The thesis provides a theoretical and experimental solution to an actual scientific task, which consists in the development of methods of quality control of dosage forms of Ramipril according to the indicators “Quantitative Determination”, “Accompanied Impurities”, “Dissolution”, “Uniformity of Dosage Units”. The aim of the work has been the development of methods of quality control of dosage forms of Ramipril.

The first step in the development of quality control methods for Ramipril tablets is the development of chromatographic methods for routine use in quality control laboratories when conducting the tests “Quantitative Determination”, “Accompanied Impurities”, “Dissolution”, “Uniformity of Dosage Units”. To determine the accompanying impurities of Ramipril in tablets, the task has been to develop a correct, precise, simple and “green” HPLC method. Inertsil ODS-3 (4.6 mm x 150 mm, 3 μm) and Acclaim 120 C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 μm) columns have been used for separation at the analytical development stage. The total time of chromatography has been about

25 min. The injection volume has been 20 μ l. The Inertsil ODS-3 column (150 mm x 4.6 mm, 3 μ m) is an octadecylsilyl column consisting of 450 m²/gram particles, 100 Å pores, and 15 % carbon content. The optimal detection wavelength is 210 nm. A flow rate of 1.5 ml/min has been found to be optimal for achieving excellent separation in a short analysis time. The use of ion-pair reagents (sodium hexanesulfonate) is a well-known approach in the development of HPLC methods, which allows the separation of ionic and highly polar substances on reversed-phase HPLC columns. The HPLC validation of the method has been carried out and the approaches to its implementation have been described in detail, since the validation of the method in determination of accompanying substances is time-consuming and often difficult. Data on the influence of components that interfere with the analysis are not found. The method has been linear in the range of application. The precision and correctness of the method is sufficient. The detection limit (DL) of the method for determining impurity A of Ramipril has been ~ 0.030 %, impurity B – ~ 0.037 %, impurity C – ~ 0.070 %, impurity D – ~ 0.030 % (acceptability criterion of DL \leq 0.15%). The limit of quantification (LOQ) of the method for determining impurity A of Ramipril has been ~ 0.092 %, impurities B – ~ 0.107 %, impurities C – ~ 0.213 %, impurities D – ~ 0.091 % (acceptability criterion of LOQ \leq 0.25 %). The DL of unidentified impurities has been 0.03%. To calculate the content of impurity C, it is necessary to use the conversion factor 2.5. The HPLC method meets the established requirements and can be used to control the quality of the agents “Ramipril, tablets 2.5 mg”, “Ramipril, tablets 5 mg”, “Ramipril, tablets 10 mg” according to the quality indicator “Accompanying Impurities”.

In order to carry out the quantitative determination of Ramipril in tablets, we have focused on the development of an express, simple and “green” HPLC method using isocratic elution with a mobile phase consisting of 0.2 g/l sodium hexanesulfonate solution (pH 2.7), Acetonitrile (50:50), on the Acclaim 120 C18 column (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m) at a flow rate of 1.0 ml/min. The retention time of Ramipril has been 4.15 min. The mobile phase has been chosen the same as in the analysis of accompanying impurities, but in isocratic elution. The chosen

chromatographic conditions have made it possible to develop an express and “green” HPLC method for the quantitative determination of Ramipril in tablets. The method validation procedure is described in detail. Data on the influence of components that interfere with the analysis have not been found. The method has been linear in the range of application. The precision and correctness of the method have been sufficient. The HPLC method meets the established requirements and can be used for quality control of the agents “Ramipril, tablets 2.5 mg”, “Ramipril, tablets 5 mg”, “Ramipril, tablets 10 mg” according to the quality indicators “Identification”, “Quantitative Determination”, “Uniformity of Dosage Units”.

In order to determine Ramipril for making the “Dissolution” test, the task has been to develop an express, accurate and “green” HPLC method for the determination of Ramipril. The same chromatographic conditions have been used as for the quantitative determination of Ramipril in tablets – an isocratic elution with a mobile phase consisting of 0.2 g/l sodium hexanesulfonate solution (pH 2.7), Acetonitrile (50:50 v/v), chromatographic column Acclaim 120 C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m) with a mobile phase flow rate of 1.0 ml/min, injection volume – 3 μ l. Validation of the analytical methodology has been carried out with a detailed description of the validation procedure. Data on the influence of components that interfere with the analysis have not been found. The method has been linear in the range of application. The precision and correctness of the technique has been sufficient. The modified technique meets the established requirements and can be used for quality control of the agents “Ramipril, tablets 2.5 mg”, “Ramipril, tablets 5 mg”, “Ramipril, tablets 10 mg” according to the quality indicator “Dissolution”.

Two simple, express, economically available, alternative spectrophotometric methods for the determination of Ramipril in tablets by reactions with bromophenol blue (BPB) and cresol red (CR) have been developed. The solvent for both methods has been Acetonitrile. The optimal conditions for the quantitative determination of Ramipril in tablets by reaction with BPB have been established: dye concentration – 2.35×10^{-4} mol/l, volume of BPB solution – 1.0 ml, without heating, wavelength – 598 nm, reaction time – 5 min, temperature solution – 25 °C. Optimum conditions for

the quantitative determination of Ramipril in tablets by reaction with CR: dye concentration – 1.33×10^{-4} mol/l, volume of CR solution – 1.0 ml, without heating, wavelength – 395 nm, reaction time – 5 min, solution temperature – 25 °C. The stoichiometric coefficients have corresponded to 1 to 1. The spectrophotometric method of determining ramipril by reaction with BPB has been linear in the concentration range of 1.99-5.96 µg/ml, DL – 0.20 µg/ml, LOQ – 0.60 µg/ml. The spectrophotometric method for the determination of Ramipril by reaction with CR has been linear in the concentration range of 0.42-5.44 µg/ml, DL – 0.10 µg/ml, LOQ – 0.36 µg/ml. The results of the conducted validation indicate compliance with the acceptance criterion.

An HPLC method has been developed for the simultaneous control of the content of Ramipril and Hydrochlorothiazide impurities in the combined agent. Also, this method allows to assess the quality of the agent during its shelf life. An Inertsil ODS-3 column (4.6 mm × 150 mm, 3 µm) has been used; mobile phase A – 0.2 g/l sodium hexanesulfonate solution (pH 2.7); mobile phase B: Acetonitrile; mobile phase speed 1.5 ml/min; detection wavelength – 210 nm; column temperature – 45 °C, gradient elution mode. Under the influence of stress factors on the placebo agent, no additional peaks have been detected. Alkaline solution had the most significant effect on the degradation of both Ramipril and Hydrochlorothiazide. Since Ramipril has been unstable in an alkaline environment, the composition of the agent and the solvents used in the preparation of samples should not contain alkaline components. Degradation products of Hydrochlorothiazide have had retention times from 2 min to 5 min, Ramipril from 10 min to 20 min. The developed method can provide simultaneous determination of impurities of Ramipril and Hydrochlorothiazide while controlling the stability of the combined agent.

Analytical methods for the determination of Ramipril and Hydrochlorothiazide in washing waters by the method of ultra-efficient chromatography with mass spectrometric detection have been developed. A Kinetex C18 column (2.1 mm × 30 mm, 1.7 µm) has been used; mobile phase – 0.1% solution of formic acid in deionized water – Acetonitrile (ratio 73:27 for the determination of Ramipril and

91.5:8.5 for the determination of Hydrochlorothiazide); mobile phase speed 0.4 ml/min for the determination of Ramipril and 0.35 ml/min for the determination of Hydrochlorothiazide; the column temperature is 45 °C for the determination of Ramipril and 40 °C for the determination of Hydrochlorothiazide, the ionization mode is electrospray in the positive mode; detection parameters – daughter ion registration mode 417 → 234 m/z for determination of Ramipril and 298 → 281 m/z for determination of Hydrochlorothiazide. The sensitivity of the methods has been confirmed at the level of 0.0026 µg/ml. The methods can be used in the concentration range of 0.0026–0.0255 µg/ml. The proposed methods can be used to control equipment cleaning for both monoagents and a combined agent.

Methods of quality control of “Quantitative Determination” and “Uniformity of Dosage Units” of combined tablets of Ramipril with Hydrochlorothiazide using Inertsil ODS-3 (150 mm x 4.6 mm, 3 µm) and Dionex Acclaim 120 C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) chromatographic columns have been developed. An isocratic elution and a mobile phase have been used to conduct research on the development of quality control methods for “Quantitative Determination” and “Uniformity of Dosage Units” of combined tablets of Ramipril with Hydrochlorothiazide of five different dosages – pH 2.7 solution and Acetonitrile P in a ratio of 47:53 for the column Inertsil ODS-3 and 20:80 for the column Dionex Acclaim 120 C18. The methods have been linear in the concentration range of 0.024–0.146 mg/ml for Ramipril and 0.06–0.39 mg/ml for Hydrochlorothiazide. The developed analytical methods correspond to all the investigated validation characteristics and can be used for routine control of combined agents of Ramipril with Hydrochlorothiazide according to the quality indicators “Quantitative Determination” and “Uniformity of Dosage Units”.

Methods of quality control of “Dissolution” and “Dissolution Profiles” of combined tablets of Ramipril with Hydrochlorothiazide using Inertsil ODS-3 (150 mm x 4.6 mm, 3 µm) and Dionex Acclaim 120 C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) columns and gradient (for both columns) or isocratic elution (for Dionex Acclaim 120 C18 column, ratio 80:20). The conditions of gradient elution with an initial ratio of mobile phases of 70:30 have been experimentally selected. During the validation of the

methods, the range of application, correctness and precision of the method have been investigated for five commercially available dosages of combined drugs. The methods have been linear in the concentration range of 0.2–5.0 µg/ml for Ramipril and 0.5–12.0 µg/ml for Hydrochlorothiazide. The developed methods correspond to all the investigated validation characteristics and can be used for routine control of combined agents of Ramipril with Hydrochlorothiazide according to the quality indicators “Dissolution” and for the study of dissolution profiles.

Key words: analysis, Ramipril, dosage forms, tablets, validation, high performance liquid chromatography, reagent, spectrophotometry, spectroscopy, fixed combination.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні результати дисертації:

1. Typlynska K, Kondratova Y, Horyn M, Logoyda L. Ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry methods for the determination of the residual quantities of ramipril and hydrochlorothiazide for controlling the cleaning of equipment. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2024;4:35-43. **(SCOPUS, Q3)** *(Typlynska K. розробила концепцію і дизайн дослідження, провела експеримент, аналіз та інтерпретацію даних, написала статтю; Kondratova Y., Horyn M., Logoyda L. провели консультування щодо дизайну, мети, завдань та редагування статті).*
2. Typlynska K, Kondratova Y, Logoyda L. Development of methods of quality control of the tablets «Ramipril». *Sci Pharm*. 2023;91(2):21. **(SCOPUS, Q2)** *(Typlynska K. розробила концепцію і дизайн дослідження, провела експеримент, аналіз та інтерпретацію даних, написала статтю; Kondratova Y., Logoyda L. провели консультування щодо дизайну, мети, завдань та редагування статті).*
3. Типлинська КВ, Логойда ЛС. Дослідження профілів деградації раміприлу та гідрохлортіазиду як етап розробки методів визначення вмісту домішок

у комбінованому препараті. Медична та клінічна хімія. 2023;(4):14-20. (Туплинська К. В. розробила концепцію і дизайн дослідження, провела експеримент, аналіз та інтерпретацію даних, написала статтю; Логойда Л. С. провела консультування щодо дизайну, мети, завдань та редагування статті).

4. Туплинська КВ, Логойда ЛС. Розробка і валідація методики визначення раміприлу та гідрохлортіазиду для вивчення профілів розчинення. Медична та клінічна хімія. 2024;(1):124-33. (Туплинська К. В. розробила концепцію і дизайн дослідження, провела експеримент, аналіз та інтерпретацію даних, написала статтю; Логойда Л. С. провела консультування щодо дизайну, мети, завдань та редагування статті).
5. Typlynska K, Horyn M, Kucher T, Kryskiw L, Logoyda L. Two masterful alternative spectrophotometric methods for the determination of ramipril in tablets. ScienceRise: Pharmaceutical Science. 2024;2(48):44-52. (SCOPUS, Q3) (Туплинська К. розробила концепцію і дизайн дослідження, провела експеримент, аналіз та інтерпретацію даних, написала статтю; Horyn M., Kucher T., Kryskiw L., Logoyda L. провели консультування щодо дизайну, мети, завдань та редагування статті).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

6. Typlynska K, Logoyda L. Development of the HPLC method for the determination of related substances in ramipril tablets. In: MOL2NET'22, Conference on Molecular, Biomedical & Computational Sciences and Engineering, 8th ed. congress CHEMBIOMOL-08: Chem. Biol., Org. Chem., Med. Chem., Pharm. Ind., & Mol. Biol. Congress; 2022 December 28. Paris, France-Galveston, USA; 2022. Available from: <https://sciforum.net/paper/view/1391>. (Туплинська К. розробила концепцію і дизайн дослідження, провела експеримент, аналіз та інтерпретацію даних, написала тези; Logoyda L. провела консультування щодо дизайну, мети, завдань та редагування тез).

7. Typlynska K. Development of the HPLC method for the routine determination of ramipril in tablets. В: Матеріали XXVII конгресу студентів та молодих учених Майбутнє за наукою; 2023 квіт. 10-12; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2023. с. 177.
8. Типлинська КВ, Логойда ЛС. Валідація методики контролю якості таблеток Раміприлу за показником «розчинення». В: Матеріали XV Всеукраїнської наукової конференції студентів та аспірантів Хімічні Каразінські читання – 2023; 2023 квіт. 24-26; Харків. Харків; 2023. с. 84. *(Типлинська К. В. розробила концепцію і дизайн дослідження, провела експеримент, аналіз та інтерпретацію даних, написала тези; Логойда Л. С. провела консультування щодо дизайну, мети, завдань та редагування тез).*
9. Типлинська КВ, Логойда ЛС. Дослідження деградації раміприлу у монопрепараті та в комбінації раміприлу з гідрохлортіазидом. В: Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 25-річчю фармацевтичного факультету Національного медичного університету імені О. О. Богомольця, Фармацевтична освіта, наука та практика: стан, проблеми, перспективи розвитку; 2023 груд. 19-20; Київ. Київ; 2023. с. 405. *(Типлинська К. В. розробила концепцію і дизайн дослідження, провела експеримент, аналіз та інтерпретацію даних, написала тези; Логойда Л. С. провела консультування щодо дизайну, мети, завдань та редагування тез).*
10. Типлинська К, Горин М. Розробка та валідація спектрофотометричної методики визначення раміприлу в таблетках за реакцією з бромкрезоловим зеленим. В: Матеріали XXVIII конгресу студентів та молодих учених Майбутнє за наукою; 2024 квіт. 8-10; Тернопіль. Тернопіль; 2024. с. 211. *(Типлинська К. розробила концепцію і дизайн дослідження, провела експеримент, аналіз та інтерпретацію даних, написала тези; Горин М. провела редагування тез).*

11. Typlynska K, Horyn M, Kucher T, Kryskiw L, Logoyda L. Two alternative spectrophotometric methods for the determination of ramipril in tablets. В: Матеріали підсумкової LXVII науково-практичної конференції Здобутки клінічної та експериментальної медицини; 2024 черв. 13-14; Тернопіль. Тернопіль; 2024. с. 219-220. *(Typlynska K. розробила концепцію і дизайн дослідження, провела експеримент, аналіз та інтерпретацію даних, написала тези; Horyn M., Kucher T., L. Kryskiw, L. Logoyda провели консультування щодо дизайну, мети, завдань та редагування тез).*
12. Типлинська КВ, Логойда ЛС. Валідація методики одночасного визначення раміприлу та гідрохлортіазиду для вивчення профілів розчинення. В: Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку»; 2024 квіт. 9-12; Одеса. Одеса; 2024. с. 236-238. *(Типлинська К. В. розробила концепцію і дизайн дослідження, провела експеримент, аналіз та інтерпретацію даних, написала тези; Логойда Л. С. провела консультування щодо дизайну, мети, завдань та редагування тез).*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	20
ВСТУП	21
РОЗДІЛ 1 АНАЛІЗ ІСНУЮЧИХ ПІДХОДІВ ДО РОЗРОБКИ ТА ВАЛІДАЦІЇ МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ФОРМ РАМІПРИЛУ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	28
1.1 Загальна характеристика раміприлу	28
1.2 Огляд спектрофотометричних методик визначення раміприлу в лікарських формах	29
1.3 Огляд хроматографічних методик визначення раміприлу в лікарських формах	33
1.4 Застосування принципів «зеленої» хімії в розробці методик контролю якості лікарських форм раміприлу	40
РОЗДІЛ 2 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ОБ'ЄКТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА МОДЕЛЮВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ	43
2.1 Методологія дослідження	43
2.2 Фізико-хімічні властивості об'єктів дослідження	44
2.3 Характеристика методик дослідження	45
2.3.1 ВЕРХ методика визначення супровідних домішок раміприлу в таблетках	46
2.3.2 ВЕРХ методика визначення раміприлу в таблетках для проведення кількісного визначення	48
2.3.3 ВЕРХ методика визначення раміприлу для проведення тесту «Розчинення»	50
2.3.4 Спектрофотометрична методика визначення раміприлу в таблетках за реакцією з бромфеноловим синім	50

2.3.5	Спектрофотометрична методика визначення раміприлу в таблетках за реакцією з крезоловим червоним	51
2.3.6	ВЕРХ методика визначення раміприлу та гідрохлортіазиду для вивчення профілів розчинення	52
2.3.7	Методика визначення профілів деградації раміприлу та гідрохлортіазиду	53
2.3.8	УВЕРХ-МС методика визначення залишкових кількостей раміприлу та гідрохлортіазиду для контролю очищення обладнання	55
2.3.9	ВЕРХ методики визначення раміприлу та гідрохлортіазиду в комбінованих таблетках для проведення тестів «Кількісне визначення» та «Однорідність дозованих одиниць»	56
2.3.10	ВЕРХ методика визначення таблеток раміприлу та гідрохлортіазиду для проведення контролю за показниками якості «Розчинення» та «Профілі розчинення»	62
РОЗДІЛ 3 РОЗРОБКА МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ТАБЛЕТОК РАМИПРИЛУ		70
3.1	Розробка та валідація методики визначення супровідних домішок раміприлу в таблетках методом рідинної хроматографії	70
3.2	Розробка та валідація методики визначення раміприлу в таблетках для проведення кількісного визначення методом рідинної хроматографії	91
3.3	Розробка та валідація методики визначення раміприлу для проведення тесту «Розчинення» методом рідинної хроматографії	102

3.4 Розробка альтернативних спектрофотометричних методик визначення раміприлу в таблетках за реакціями з бромфеноловим синім та крезоловим червоним	112
РОЗДІЛ 4 РОЗРОБКА МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ КОМБІНОВАНИХ ТАБЛЕТОК РАМИПРИЛУ ТА ГІДРОХЛОРТІАЗИДУ	124
4.1 Дослідження профілів деградації раміприлу та гідрохлортіазиду як етап розробки методів визначення вмісту домішок у комбінованому препараті	124
4.2 Розробка та валідація хроматографічної методики визначення залишкових кількостей раміприлу та гідрохлортіазиду для контролю очищення обладнання	131
4.3 Розробка та валідація методик контролю за показниками якості «Кількісне визначення» та «Однорідність дозованих одиниць» комбінованих таблеток раміприлу з гідрохлортіазидом з використанням хроматографічної колонки Inertsil ODS-3 (150 мм x 4.6 мм, 3 мкм)	143
4.4 Розробка та валідація методик контролю за показниками якості «Кількісне визначення» та «Однорідність дозованих одиниць» комбінованих таблеток раміприлу з гідрохлортіазидом з використанням хроматографічної колонки Dionex Acclaim 120 C18 (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм)	166
4.5 Розробка та валідація методики контролю за показниками якості «Розчинення» та «Профілі розчинення» таблеток раміприлу з гідрохлортіазидом з використанням хроматографічної колонки Dionex Acclaim 120 C18 (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм)	184

4.6 Розробка та валідація методики контролю за показниками якості «Розчинення» та «Профілі розчинення» таблеток раміприлу з гідрохлортіазидом з використанням хроматографічної колонки Inertsil ODS-3 (150 мм x 4.6 мм, 3 мкм)	212
ВИСНОВКИ	237
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	241
ДОДАТКИ	257

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФІ	– активний фармацевтичний інгредієнт
БФС	– бромфеноловий синій
ВЕРХ-МС	– високоефективна рідинна хроматографія з мас-спектрометричним детектуванням
ВЕРХ/УФ	– високоефективна рідинна хроматографія з УФ детектуванням
ДМД	– діодно-матричне детектування
ДФУ	– Державна Фармакопея України
КЧ	– крезоловий червоний
МВ	– межа виявлення
МКВ	– межа кількісного визначення
МКЯ	– методи контролю якості
МС	– мас-спектрометричний
УВЕРХ	– ультраефективна хроматографія
УФ	– ультрафіолетовий
ФСЗ	– фармакопейний стандартний зразок
CV	– коефіцієнт варіації (coefficient of variation)
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 Стюдента
x, y	– поточні координати в рівнянні лінійної залежності

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Показники якості лікарських засобів, що забезпечують їх ефективність і безпеку, встановлюють у реєстраційній документації та фармакопеї. При цьому якість лікарських засобів закладається на етапі фармацевтичної розробки, для якої визначено загальний методологічний підхід і спеціальні підходи відносно різних лікарських форм, препаратів-генериків, оригінальних препаратів тощо. Фармацевтичні підприємства, що мають великий продуктовий портфель, стикаються з проблемою значної витрати часу та необхідністю залучення додаткових одиниць обладнання для проведення рутинного контролю лікарських засобів. Тому методики контролю якості потребують постійного перегляду та проведення їх оптимізації з залученням сучасних технічних засобів. Розробка та оптимізація таких аналітичних методик дозволяє значно скоротити час, що витрачається на проведення аналізу та підготовки / регенерації обладнання / хроматографічних колонок, а також зменшити вартість проведення контролю якості лікарських засобів. Зважаючи на нові підходи щодо забезпечення якості активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) та готових лікарських форм (вимоги ІСН, Державної Фармакопеї України (ДФУ), Європейської Фармакопех (Ph. Eur.)), виникає необхідність створення аналітичних методик, які б відповідали діючим вимогам фармацевтичної регуляції України, країн ЄС, США та ін. в аспекті контролю якості, оскільки підходи, які були застосовані 10 років тому, наразі є дещо застарілими. Для забезпечення регуляторної відповідності виникає необхідність доопрацювання існуючих методик, а в деяких випадках і розробки нових.

Відповідно до даних Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я (ВООЗ), гіпертонія є одним з головних факторів смертності та інвалідності в світі. Цей фактор призводить приблизно до 10.8 мільйонів передчасних смертей щороку. В Україні кардіоваскулярні захворювання є причиною смерті в 64 % випадків, більше половини з них спричинені саме гіпертонією. Увага дослідників

зосереджена на вивченні методів аналізу інгібіторів ангіотензинперетворювального ферменту (АПФ) у лікарських засобах та їх оптимізації. Раміприл є несольфгідрильним інгібітором АПФ з антигіпертензивною дією. У монографії Ph. Eur. раміприлу та Фармакопеї США (USP) описано методику ВЕРХ для перевірки домішок раміприлу як діючої речовини та таблеток раміприлу. Недоліками цієї методики є тривалий час хроматографування та витрата значного об'єму рухомої фази. Монографія раміприлу Ph. Eur. регламентує титриметричний метод (алкаліметрію) для визначення раміприлу як діючої речовини. Недоліком цього методу є неможливість використання для аналізу лікарських форм раміприлу. Аналіз даних наукової літератури показав, що не має системних досліджень щодо розробки/оптимізації методик контролю якості монокомпонентних лікарських форм раміприлу та в комбінації з гідрохлортіазидом, які б були придатними для рутинного застосування у лабораторіях з контролю якості за показниками «Кількісне визначення», «Супровідні домішки», «Розчинення», «Однорідність дозованих одиниць».

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана згідно з планами науково-дослідних робіт Тернопільського національного медичного університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України «Цілеспрямований пошук біологічно активних речовин в ряду 7,8-дизаміщених теофіліну; розробка та валідація методик контролю якості антигіпертензивних лікарських засобів зі статинами» (номер державної реєстрації 0121U100062) та «Розробка і валідація аналітичних та біоаналітичних методик визначення лікарських засобів; ідентифікація оригінальних функціональних похідних теофіліну з антирадикальними властивостями» (номер державної реєстрації 0124U000057).

Мета дослідження: розробка методик контролю якості лікарських форм раміприлу.

Завдання дослідження:

1. провести критичний аналіз оригінальних наукових публікацій щодо розробки методик контролю якості лікарських форм раміприлу, оцінити переваги та недоліки існуючих аналітичних методик;
2. розробити методики контролю якості лікарських форм раміприлу та комбінацій раміприлу/гідрохлортіазиду за показниками «Кількісне визначення», «Супровідні домішки», «Розчинення» та «Однорідність дозування»;
3. запропонувати альтернативні спектрофотометричні методики визначення раміприлу в таблетках за реакцією з сульфоталеїновими барвниками (бромфеноловим синім (БФС), крезоловим червоним (КЧ)), експериментально обґрунтувати оптимальні умови проведення кількісного визначення, встановити коефіцієнти стехіометричних співвідношень «раміприл – сульфоталеїновий барвник»;
4. розробити методики вивчення профілів розчинення лікарських форм раміприлу та комбінацій раміприлу/гідрохлортіазиду;
5. дослідити профілі деградації раміприлу та гідрохлортіазиду як етапу розробки методів визначення вмісту домішок у комбінованому препараті;
6. розробити хроматографічну методику визначення залишкових кількостей раміприлу та гідрохлортіазиду для контролю очищення обладнання;
7. провести валідацію розроблених аналітичних методик;
8. запровадити розроблені валідовані аналітичні методики у роботу лабораторіїв АТ «Farmak».

Об'єкт дослідження – обґрунтування підходів та розробка методик контролю якості лікарських форм раміприлу та комбінації раміприл/гідрохлортіазид.

Предмет дослідження – розробка методик контролю якості лікарських форм раміприлу та комбінацій раміприлу/гідрохлортіазиду за показниками «Кількісне визначення», «Супровідні домішки», «Розчинення» та «Однорідність дозування».

Методи дослідження: високоефективна рідинна хроматографія з діодноматричним детектуванням (ВЕРХ-ДМД), ультраефективна хроматографія з мас-спектрометричним детектування (УВЕРХ-МС), абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій (УФ) та видимій областях; методи моделювання аналізу та візуалізації багатомірних даних – методи валідації, регресійний та кореляційний аналіз, методи визначення впливу аналітичної методики на навколишнє середовище (методи AGREE (Analytical GREENness) та GAPI (Green Analytical Procedure Index)).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше продемонстровано узагальнені підходи до розробки методик контролю якості лікарських форм раміприлу та раміприлу/гідрохлортіазиду за показниками «Кількісне визначення», «Супровідні домішки», «Розчинення», «Однорідність дозованих одиниць».

Розроблено ВЕРХ-ДМД методики визначення раміприлу та комбінації раміприл/гідрохлортіазид для проведення кількісного визначення в таблетках, тесту «Розчинення», «Однорідність дозованих одиниць», вивчення супровідних домішок. Проведено дослідження профілів деградації раміприлу та гідрохлортіазиду як етапу розробки методів визначення вмісту домішок у комбінованому препараті та розроблено методики вивчення профілів розчинення лікарських форм раміприлу та комбінацій раміприлу/гідрохлортіазиду. Розроблено аналітичну методику визначення раміприлу та гідрохлортіазиду у промивних водах методом УВЕРХ-МС. В процесі розробки хроматографічних методик показано просту процедуру розробки, яка передбачала використання 1-2 октадицильних колонок та простих рухомих фаз з використанням іон-парного реагента, для широкої сфери застосування цих методик, а також прості підходи до валідації методик з детальним описом процедури валідації та представленням розрахункових формул.

Розроблено альтернативні спектрофотометричні методики кількісного визначення раміприлу в таблетках за реакцією з БФС та КЧ, експериментально

обґрунтовано оптимальні умови проведення кількісного визначення, здійснено валідацію методик.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблені методики можуть застосовуватися для проведення контролю якості готових лікарських форм раміприлу та комбінації раміприлу/гідрохлортіазиду, вивчення стабільності готових лікарських форм, вивчення впливу змін на готові лікарські форми при запровадженні нових виробників допоміжних речовин, при зміні технології виготовлення, зміні складу препаратів та інших процесах життєвого циклу готових лікарських форм раміприлу та комбінацій раміприлу/гідрохлортіазиду. Спектрофотометричні методики можуть застосовуватися лабораторіями з обмеженим бюджетом як альтернативні та були впроваджені в практику роботи Державної служби з лікарських засобів та контролю за наркотиками в Тернопільській області (акт впровадження від 10.06.2024 р.).

Запропоновані методики можуть застосовуватися атестованими аналітичними лабораторіями як арбітражні методики.

Розроблені валідовані аналітичні методики впроваджено в роботу лабораторіїв АТ «Farmak», що засвідчено актом впровадження від 10.07.2024 р.

Особистий внесок здобувача. Безпосередньо автором проведено патентно-інформаційний пошук та аналіз сучасного стану досліджень за темою дисертаційної роботи. Дисертантом разом з науковим керівником визначено мету, завдання та методики експериментальних досліджень. Автором самостійно розроблено методики контролю якості лікарських форм раміприлу та раміприлу/гідрохлортіазиду за показниками «Кількісне визначення», «Супровідні домішки», «Розчинення», «Однорідність дозованих одиниць», проведено дослідження профілів деградації раміприлу та гідрохлортіазиду, вивчено профілі розчинення лікарських форм раміприлу та комбінацій раміприлу/гідрохлортіазиду, запропоновано аналітичну методику визначення раміприлу та гідрохлортіазиду у промивних водах методом УВЕРХ-МС. Розроблено альтернативні спектрофотометричні методики визначення

раміприлу в таблетках за реакцією з сульфоталеїновими барвниками (БФС, КЧ).

Особисто проведено експериментальні дослідження та статистичну обробку одержаних результатів, систематизовано отримані дані, сформульовано висновки роботи.

Особистий внесок здобувача щодо публікацій у співавторстві зазначено в тексті дисертаційної роботи у списку опублікованих праць. Співавторами наукових праць є науковий керівник та науковці, спільно з якими проведені дослідження. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок. Усі наукові узагальнення, положення, результати, висновки та рекомендації, викладені у дисертації, виконані автором особисто.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи оприлюднено на міжнародній конференції MOL2NET'22, Conference on Molecular, Biomedical & Computational Sciences and Engineering – 8th ed. congress CHEMBIOMOL-08: Chem. Biol., Org. Chem., Med. Chem., Pharm. Ind., & Mol. Biol. Congress (Paris, France-Galveston, USA, December 24, 2022), XXVII міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених (м. Тернопіль, 10–12 квітня 2023 р.), XXVIII міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених (м. Тернопіль, 8–10 квітня 2024 р.), XV Всеукраїнській науковій конференції студентів та аспірантів «Хімічні Каразінські читання – 2023» (м. Харків, 24–26 квітня 2023 р.), науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 25-річчю фармацевтичного факультету Національного медичного університету імені О. О. Богомольця «Фармацевтична освіта, наука та практика: стан, проблеми, перспективи розвитку» (м. Київ, 19–20 грудня 2024 р.), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку» (м. Одеса, 9–12 квітня 2024 р.), LXVII науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (м. Тернопіль, 13–14 червня 2024 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 12 наукових праць, із них 5 статей (3 – у фахових наукових виданнях, що індексуються наукометричною базою *Scopus*, 2 – у фахових виданнях України категорії Б), 7 публікацій в матеріалах вітчизняних і міжнародних конгресів та конференцій.

Обсяг та структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 262 сторінках, складається з анотації, вступу, чотирьох розділів, висновків, списку використаних джерел, що містить 137 найменувань (16 кирилицею та 121 латиною), додатків. Робота ілюстрована 189 таблицями, 34 рисунками. Список використаних джерел і додатки викладено на 21 сторінці.

РОЗДІЛ 1

АНАЛІЗ ІСНУЮЧИХ ПІДХОДІВ ДО РОЗРОБКИ ТА ВАЛІДАЦІЇ МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ФОРМ РАМІПРИЛУ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Загальна характеристика раміприлу

Гіпертонічна хвороба є найпоширенішим захворюванням, яке супроводжується високою смертністю людей працездатного віку та їх інвалідністю від серцево-судинних і цереброваскулярних захворювань [1]. Раміприл є проліками та несольфгідрильним інгібітором АПФ з антигіпертензивною дією [2]. Активним метаболітом раміприлу є раміприлат. У хімічному відношенні раміприл є (2S,3aS,6aS)-1-[(2S)-2-[[[(2S)-1-етокси-1-оксо-4-фенілбутан-2-іл]аміно]пропаноїл]-3,3a,4,5,6,6a-гексагідро-2H-циклопента[b]пірол-2-карбонова кислота (рис. 1.1). Раміприл помірно розчинний у воді, легко розчинний у метанолі, pKa1 = 3.74 (кабонова кислота); pKa2 = 5.15 (вторинний амін), Log P = 2,9 [2, 3].

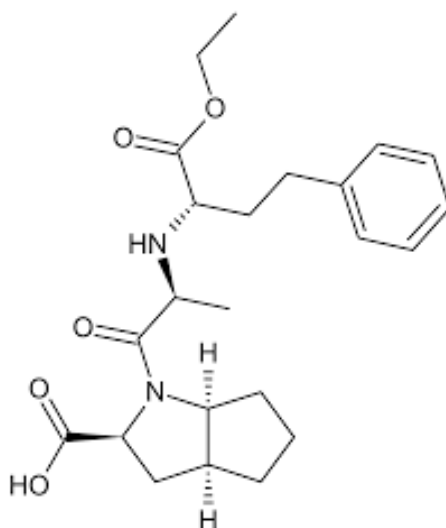


Рисунок 1.1 – Структурна формула раміприлу



Рекомендованими є дози раміприлу 2.5 мг, 5 мг та 10 мг. В Україні раміприл зареєстрований під такими торговими назвами: Рамизес, Тритаце, Рамі Сандоз, Баратон та інші. Найбільш широко застосовуваними є фіксовані комбінації раміприлу з гідрохлортіазилом (діуретиком).

Ph. Eur. [3] регламентує проводити ідентифікацію раміприлу методом абсорбційної спектрофотометрії в ІЧ області та за значенням питомого оптичного обертання. У монографії раміприлу Ph. Eur. [3] та USP [4] описано методики ВЕРХ для визначення домішок АФІ раміприлу [3] та таблеток раміприлу [4]. Недоліками цієї методики є тривалий час хроматографування (більше 50 хв) і втрати значного об'єму рухомої фази на одине хроматографування. Монографія раміприлу Ph. Eur. [3] регламентує титриметричний метод (алкаліметрію) для проведення кількісного визначення раміприлу. Недоліками методу є неможливість визначення раміприлу в лікарських формах.

1.2 Огляд спектрофотометричних методик визначення раміприлу в лікарських формах

В науковій літературі описано не так багато спектрофотометричних методик визначення раміприлу в лікарських формах, що обумовлено значним прогресом останніми роками хроматографічних методів для цілей рутинного фармацевтичного аналізу [5-13]. Проте спектрофотометричні методики заслуговують уваги при проведенні простого кількісного визначення раміприлу, особливо в монокомпонентних лікарських формах, для лабораторій з обмеженим бюджетом, для прикладу лабораторії Держлікслужби.

Єгипетськими науковцями Al-Majed A. A., Belal F., Al-Warthan A. A. розроблено просту спектрофотометричну методику визначення раміприлу в лікарських формах [5]. Методика базувалася на взаємодії раміприлу з калію перманганатом в лужному середовищі, в результаті чого утворювався продукт реакції синювато-зеленуватого забарвлення з максимумом поглинання за

довжини хвилі 610 нм. Методика була лінійною у діапазоні концентрацій 0.1 – 7.5 мкг/мл. Запропоновану методику застосовували для кількісного визначення раміприлу в лікарських формах, окремо або в комбінації з гідрохлоротіазидом. Отримані результати добре узгоджувалися з результатами, одержаними еталонною ВЕРХ методикою.

Rahman N. et al. розроблено кінетичну спектрофотометричну методику визначення раміприлу в лікарських формах [6]. В основі методу лежить реакція карбоксильної групи раміприлу із сумішшю калію йодату (KIO_3) та калію йодиду (KI) у водному середовищі при кімнатній температурі, вимірюючи збільшення абсорбції за довжини хвилі 352 нм як функцію часу. Методики були застосовані для кількісного визначення раміприлу в таблетках та капсулах.

Afiero O. E. et al. запропоновано просту та економічно ефективну спектрофотометричну методику визначення раміприлу в лікарських формах за довжини хвилі 210 нм [7]. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 1 – 38 мкг/мл. Спектрофотометрична методика була успішно застосована для рутинного аналізу таблеток раміприлу.

Kumar M. et al. розроблено УФ-спектрофотометричну методику визначення раміприлу та амлодипіну в таблетках [8]. Абсорбцію вимірювали за довжин хвиль 238.1 нм та 250.9 нм проти буферного розчину рН 6.8. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 5-40 мкг/мл для амлодипіну та 50-250 мкг/мл для раміприлу. Запропонована методика може застосовуватися для рутинного аналізу лікарських форм раміприлу та амлодипіну.

Patel A. B. et al. запропоновано просту, точну та відтворювану спектрофотометричну методику одночасного визначення раміприлу та амлодипіну безилату з використанням похідних першого порядку [9]. Раміприл та амлодипіну безилат показали абсорбцію за довжин хвиль 211.87 нм (нульова точка амлодипіну безилату) і 254.34 нм (нульова точка раміприлу) з використанням води очищеної як розчинника. Лінійність була встановлена в діапазоні концентрацій 2-25 мкг/мл та 2-50 мкг/мл для раміприлу та амлодипіну безилату з коефіцієнтом кореляції 0.999 та 0.998 відповідно. Розроблена

методика була придатною для рутинного аналізу раміприлу та амлодипіну безилату в таблетованій лікарській формі.

Єгипетськими вченими Attala K. та Elsonbaty A. розроблено три УФ-спектрофотометричні методики від мінімальних математичних маніпуляцій на спектрі нульового порядку, а саме: корекція поглинання, індукована подвійна довжина хвилі та метод самодеконволюції Фур'є; для одночасного визначення целекоксибу та раміприлу в їх комбінованих лікарських формах з амлодипіном [10]. У корекції поглинання та методі індукованої подвійної довжини хвилі целекоксиб та раміприл визначали за довжин хвиль 253 і 222 нм для корекції поглинання та (251–270 нм) і (222–230 нм) для індуваного методу подвійної довжини хвилі відповідно з нульового. Амлодипін визначали за довжини хвилі 361 нм від спектру нульового порядку в обох методиках. У методі самодеконволюції Фур'є спектри нульового порядку целекоксибу та амлодипіну деконволюціювали за допомогою вбудованої в програмне забезпечення спектрофотометра вейвлет-функції Фур'є, а потім визначали за довжин хвиль 360 та 269 нм відповідно. Запропоновані методики були простими, точними та чутливими, вимагали мінімальних математичних маніпуляцій, заощаджуючи час, необхідний для аналізу. Методи були лінійними в діапазоні (5–60 мкг/мл), (5–30 мкг/мл) і (5–110 мкг/мл) для кожного з амлодипіну, целекоксибу та раміприлу відповідно. Межа виявлення (МВ) була в діапазоні (0.5781–0.7132 мкг/мл) для амлодипіну, (0.6497–1.0450 мкг/мл) для целекоксибу та (0.0001–0.0003 мкг/мл) для раміприлу, що вказувало на чутливість цих запропонованих методик.

Єгипетським науковцем із Заказік Університету Hisham E. Abdellatef запропоновано три чутливі спектрофотометричні та спектрофлуориметричні методики визначення раміприлу в таблетках [11]. Перша методика базувалася на окисленні препарату 1-хлорбензотриазоловим реактивом (ХБТ) в сильнолужному середовищі з подальшим вимірюванням абсорбції за довжини хвилі 350 нм. Методика підпорядковувалася закону Бера в діапазоні концентрацій 15–50 мкг/мл. Друга та третя неекстракційна методики базувалися

на утворенні потрійного комплексу між міддю (II), еозином і раміприлом за наявності метилцелюлози як ПАР. Потрійний комплекс мав максимум поглинання за довжини 543 нм. Методика підпорядковувалася закону Бера в діапазоні концентрацій 20–80 мкг/мл. Запропоновані методики були успішно застосовані для аналіз таблеток раміприлу.

У 2020 році Elsonbaty A. et al. представлено статтю у високорейтинговому виданні «Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy», яка присвячена аналізу п'ятинарної терапії (атенолол, раміприл, гідрохлоротіазид, симвастатин, аспірин) при багатьох серцево-судинних захворюваннях за допомогою УФ-спектрофотометрії та хемометричних інструментів [12]. Розроблені методики дозволили достовірно визначити такий комплекс терапії в його лабораторно приготовлених сумішах і лікарських засобах в межах результатів, порівнянних з результатами, отриманими методом ВЕРХ, що робить ці хемометричні методи цінними та незамінними аналітичними інструментами для проведення контролю якості.

В тому самому виданні трьома роками пізніше інша єгипетська група науковців Mohamed I. El-Awady et al. опублікувала статтю, присвячену багатокомпонентному спектрофотометричному визначенню чотирма різними методами потрійної суміші для лікування серцево-судинних захворювань [13]. З цією метою розроблено чотири точні, «зелені», експресні УФ-спектрофотометричні методики кількісного визначення потрійної комбінації (аспірин, аторвастатин і раміприл).

Підсумовуючи описані вище спектрофотометричні методики [5-13] можна відмітити, що науковці не часто працюють над розробкою спектрофотометричних методик, що обумовлено обмеженістю сфери їх застосування. Проте для розширення банку альтернативних спектрофотометричних методик є необхідність в подальшій розробці цих методик з урахуванням сучасних підходів до аналітичної розробки. Безперечно, на сьогоднішній день перевага надається хроматографічним методикам визначення.

1.3 Огляд хроматографічних методик визначення раміприлу в лікарських формах

Хроматографічні методики визначення раміприлу в таблетках є найпоширенішими, оскільки мають достатню експресність, правильність та прецизійність, специфічність та селективність, нетрудомісткість [14-29].

Китайськими вченими Dai S.Y. et al. розроблена ВЕРХ методика одночасного визначення раміприлу та амлодипіну у таблетках з використанням хроматографічної колонки Inertsil ODS-3 (250 мм×4.0 мм, 3 мкм) та градієнтного елюювання [14]. Рухома фаза А складалася з 60 мМ буферного розчину натрію перхлорату (містить 7.2 мМ триетиламін)-ацетонітрил (60:40), а рухома фаза В – з 60 мМ буферного розчину натрію перхлорату (містить 7.2 мМ триетиламін)-ацетонітрил (20:80). Лінійність запропонованої методика досліджувалася в діапазоні концентрацій 0.01–0.25 мг/мл ($R^2=0.9998$) для раміприлу та 0.014–0.36 мг/мл ($R^2=0.9997$) для амлодипіну. Результати стрес-тестування показали, що методика є специфічною та селективною. Запропонована методика дає можливість розділяти два основні компоненти від продуктів їх деградації, домішок та допоміжних речовин таблеток. Таким чином, ВЕРХ методика може бути використана для аналізу зразків, отриманих в умовах вивчення стабільності та рутинного аналізу раміприлу та амлодипіну у комбінованих таблетованих лікарських формах. Крім того, методику можна додатково застосовувати для визначення домішок раміприлу у таблетках.

Kumar A. M. et al. запропоновано ВЕРХ методику визначення раміприлу та амлодипіну в лікарських формах з використанням хроматографічної колонки Phenomenex C18 (150 мм×4.6мм, 5 мкм) та ізократичного елюювання рухомою фазою у співвідношенні змішаного фосфатного буфера (0.02 М калію дигідрогенфосфату та 0.002 М безводного дикалію гідрогенфосфату, рН 6.8) та ацетонітрилу (60:40) [15]. Час утримування раміприлу становив (2.13 ± 0.09) хв та амлодипіну безилату – (5.18 ± 0.12) хв. Методика була лінійною в діапазоні

концентрацій 1.5-7.5 мкг/мл для раміприлу та 2.5-15 мкг/мл для амлодипіну. Запропонована ВЕРХ методика була простою, правильною та прецизійною з нижчими значеннями МВ та межі кількісного визначення (МКВ). Крім того, менша тривалість аналізу раміприлу та амлодипіну безилату дає переваги розробленої методики для цілей рутинного аналізу лікарських форм.

Patel J. та Patel M. розроблено ВЕРХ методику визначення раміприлу та амлодипіну в капсулах з використанням хроматографічної колонки Hypersil BDS C8 (150 мм × 4.6 мм, 5 мкм) та рухомої фази – буферний розчин:ацетонітрил (70:30) [16]. Час утримування раміприлу та амлодипіну становив 5.9 хв та 7.5 хв. відповідно. Запропонована методика була лінійною в діапазоні концентрацій 15-35 мкг/мл для раміприлу та 30-70 мкг/мл для амлодипіну відповідно. Результати досліджень показали, що розроблена ВЕРХ методика була простою, експресною та може застосовуватися для рутинного визначення раміприлу та амлодипіну у капсулах.

Praveen S. Rajput et al. запропоновано ВЕРХ методику визначення раміприлу та амлодипіну в лікарських формах з використанням хроматографічної колонки C18 (250 мм × 4.6 мм, 5 мкм) та рухомої фази – ацетонітрил, фосфатного буферного розчину рН= 6.8, метанолу (50: 20:25) [17]. Час утримування раміприлу становив 2.64 та амлодипіну – 7.45 хв. Методики були лінійними в діапазоні концентрацій концентрацій 1–16 мкг/мл для раміприлу та 0.2–3.2 мкг/мл амлодипіну.

Saida Naik. Dheeravath et al. розроблено ВЕРХ методику визначення раміприлу та амлодипіну в лікарських засобах з використанням обернено-фазової колонки ODS (250 мм × 4.6 мм) та рухомої фази – фосфатного буферного розчину, ацетонітрилу та метанолу (зі статті не зрозуміло співвідношення компонентів рухомої фази) [18]. Час хроматографування становив 7 хв, що дає змогу швидко провести кількісне визначення багатьох зразків під час контролю якості.

Hiral J. Panchal et al. запропоновано просту ВЕРХ методику одночасного визначення аторвастатину кальцію, раміприлу та аспірину в капсулах [19].

Методику розроблено з використанням хроматографічної колонки Phenomenex Luna C18 (250 мм × 4.6 мм, 5 мкм) та рухомої фази, що складалася з 0.1 % буферного розчину кислоти фосфорної рН 3.3, ацетонітрилу та метанолу (45:50:5). Часи утримування становили 12.19, 2.35 та 3.95 хв для аторвастатину кальцію, раміприлу та аспірину відповідно. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 1-6 мкг/мл для аторвастатину кальцію, 0.5-3 мкг/мл – раміприлу та 7.5-45 мкг/мл – аспірину. Дана методика дає можливість визначати також домішку кислоти саліцилової кислоти за часом утримування 4.84 хв при аналізі капсул.

М. De Diego et al. розроблено ВЕРХ методику визначення продуктів стресової деградації раміприлу [20]. Стрес-тестування проводили за умов гідролізу (0.1 Н НСl, вода та 0.1 Н NaOH), окислення (3 % H₂O₂), нагрівання (70 °С) та фотолізу (УФ та видиме випромінювання). Раміприл деградував в кислотних, нейтральних, лужних умовах, в умовах окислення та теплового стресу, але був стабільним під час фотолізу. Хроматографічне розділення раміприлу від продуктів деградації було досягнуто з використанням колонки C18 та рухомої фази, що складається з метанолу, тетрагідрофурану, фосфатного буферного розчину (рН 2.4; 0.01 М) (55:5:40). Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 50-300 мкг/мл для раміприлу. Розроблена методика була застосована для кількісного визначення раміприлу в таблетках, а також для дослідження стабільності раміприлу.

Для аналізу раміприлу та моексиприлу гідрохлориду за наявності продуктів деградації Elshanawane A. A. et al. розроблено ВЕРХ методику, яка передбачала застосування ціанопропільної колонки та рухомої фази – водний 0.01 М амоній ацетатний буферний розчин (рН 6), метанол (40:60) [21]. Аналіти піддавали стресовій деградації шляхом гідролізу (0.1 М NaOH і 0.1 М НСl), окислення (30 % H₂O₂), фотолізу (254 нм) і термічної обробки (80 °С). Препарати розкладалися в лужних та кислих умовах і під час термічної обробки, але були стабільними в інших досліджених умовах стресової деградації. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 5–50 мкг/мл ($R^2 > 0.9995$) з МВ та МКВ 0.04 і

0.09 мкг/мл для раміприлу та 0.014 і 0.32 мкг/мл для моексиприлу. Оскільки методика ефективно розділяла раміприл та моексиприл гідрохлорид від продуктів їх розпаду, то її можна використовувати як індикатор стабільності.

Patole S.M. et al. запропоновано ВЕРХ визначення аторвастатину кальцію, раміприлу та аспірину в капсулах з використанням хроматографічної колонки C18 та рухомої фази – метанол, ацетатний буферний розчин, рН 3.1 (70:30) [22]. Час утримування аторвастатину кальцію становив (8.38 ± 0.10) хв, раміприлу – (5.62 ± 0.02) хв, аспірину – (3.04 ± 0.15) хв.

Просту та експресну ВЕРХ методику одночасного визначення раміприлу, аспірину та аторвастатину в лікарських формах розроблено Sharma R. et al. [23]. Хроматографування проводили на колонці C18 (25 см \times 4.6 мм, 5 мкм) з використанням рухомої фази – (А) ацетонітрилу та метанолу (65:35) і (В) 10 мМ натрію дигідрофосфату моногідрату буфера і суміші А:В (60:40), доведеної до рН 3.0 кислотою фосфорною. Загальний час хроматографування становив менше 12 хв. Час утримування раміприлу, аспірину та аторвастатину складали 3.620, 4.920 хв та 11.710 хв відповідно. Методика була лінійною в діапазонах концентрацій 0.5-50 мкг/мл для раміприлу, 0.5-100 мкг/мл – для аспірину та 0.2-20 мкг/мл – для аторвастатину. МВ становили 0.014, 0.10 і 0.0095 нг/мл, МКВ – 0.043, 0.329 і 0.029 нг/мл – раміприлу, аспірину та аторвастатину відповідно. Розроблена методика була успішно застосована для проведення кількісного аналізу лікарських форм.

Srinivasa Rao K. та Srinivas K. запропоновано ВЕРХ методику визначення раміприлу та лозартану калію в лікарських формах з використанням хроматографічної колонки Hypersil ODS C18 (4.6 мм \times 250 мм, 5 мкм) в ізократичному елююванні рухомою фазою – ацетонітрил, метанол, :10 мМ тетрабутиламонію гідрогенсульфат у воді (30:30:40) [24]. Час утримування лозартану калію та раміприлу становив 4.7 та 3.3 хв відповідно. Методика була ланійною в діапазоні концентрацій для лозартану калію 0.04-100 мкг/мл та раміприлу – 0.2-300 мкг/мл відповідно. Розроблена методика була успішно

застосована для кількісного визначення лозартану калію та раміприлу в комбінованих таблетованих формах.

У 2023 році в високореєтинговому виданні «Chemosensors» (видавництво MDPI) польськими науковцями з Ягеллонського Університету опубліковано статтю, присвячену простому, точному та мультианалітному визначенню тринадцяти АФІ (раміприлу, лізиноприлу, еналаприлу, атенололу, метопрололу, лозартану, кандесартану, розувастатину, аторвастатину, симвастатину, амлодипіну, гідрохлоротіазиду, кислоти ацетилсаліцилової) у комбінованих препаратах методом ВЕРХ [25]. Хроматографічний аналіз проводили на колонці ACE-5 C18-PFP (250 мм × 4.6 мм, 5 мкм) з 0.01 М фосфатним буфером (рН = 2.50) і ацетонітрилом у градієнтному елююванні. Загальний час хроматографування складав 35 хв. Розроблена методика відповідала критеріям прийнятності щодо специфічності, лінійності, чутливості, правильності та прецизійності для всіх досліджуваних речовин. Діапазон лінійності спостерігався в широкому діапазоні концентрацій. Чутливість методик була відмінною зі значеннями МВ та МКВ в діапазоні від 0.0009 до 0.0923 мкг/мл і від 0.0027 до 0.2794 мкг/мл відповідно. Запропонована методика була успішно застосована для визначення АФІ в готових модельних сумішах, що відповідають комерційно доступним таблеткам.

Як вже зазначалося в розділі 1.1, комбінації раміприлу з гідрохлортіазидом застосовуються найчастіше, тому доцільним є детальний аналіз представлених у науковій літературі методик контролю якості таких лікарських форм, що має значне практичне значення для рутинного фармацевтичного аналізу.

Belal F. et al. розроблено просту та експресну ВЕРХ методику одночасного визначення раміприлу та гідрохлоротіазид в лікарських формах з використанням ацетонітрилу та розчину натрію перхлорату (0.1 М), доведеного до рН 2.5-0.2 кислотою фосфорною (46:54) та хроматографічної колонки Supelcosil™ LC-8 (5 мм), 15 см × 4.6 мм [26]. Методику також застосовували для визначення раміприлу за наявності продуктів деградації. Методика була

лінійною в діапазоні концентрацій 4.5–45 мкг/мл для раміприлу та 0.6–14 мкг/мл – для гідрохлоротіазиду. Запропонована методика була успішно застосована для аналізу таблеток.

Shoeb A. et al. запропоновано ВЕРХ методику визначення раміприлу, гідрохлортіазиду та бісопрололу в суміші з використанням хроматографічної колонки Hypersil® C18 (250 мм × 4.6 мм, 5 мкм) та рухомої фази – ацетонітрил, метанол, буферний розчин (0.01 М калію дигідрофосфат; рН 3.5) (65:15:20) [27]. Час утримування бісопрололу, гідрохлортіазиду та раміприлу становив 2.2, 2.6 та 4 хв відповідно. Методика показала відмінну лінійність в діапазоні концентрацій 5-40 мкг/мл для кожного аналіту.

У дослідженні Prabhakar V. Raut et al. описується розробка та валідація методики розчинення раміприлу та гідрохлоротіазиду в таблетованій лікарській формі методом ВЕРХ [28]. Проста, експресна, селективна, ізократична ВЕРХ методика була розроблена з використанням хроматографічної колонки Thermo, Sunniest C8 (150 мм x 4.6 мм, 5 мкм) та рухомої фази – буферного розчину та ацетонітрилу (1:1). Час хроматографування становив 10 хв. Калібрувальна крива була лінійною (коефіцієнт кореляції = 1.000) у вибраному діапазоні для обох аналітів.

Kalyan Kumar B. et al. розроблено просту, експресну, точну, ізократичну ВЕРХ методику визначення гідрохлортіазиду, раміприлу та телмісартану в таблетках з використанням хроматографічної колонки XTerra RP8 (4.6 мм x 150 мм, 3.5 мкм) та рухомої фази – ацетонітрил та фосфатний буферний розчин (45:55) [29]. Методика була лінійною в діапазонах концентрацій 12.5-22.5 мкг/мл, 5-9 мкг/мл та 40-72 мкг/мл для гідрохлортіазиду, раміприлу та телмісартану відповідно. Час утримування гідрохлортіазиду, раміприлу та телмісартану становив 2.83 хв, 3.65 хв та 5.03 хв відповідно. Розроблена методика була успішно застосована для кількісного визначення гідрохлоротіазиду, раміприлу та телмісартану у лікарських формах.

В науковій літературі представлені хроматографічні методики визначення раміприлу в плазмі крові для біоаналітичних цілей [30-32].

У 2018 році Bhargav P. et al. опубліковано статтю у виданні «Journal of Chromatographic Science», присвячену науковим проблемам одночасного визначення гідрохлортіазиду та раміприлу у плазмі крові та застосування розробленої методики для дослідження біоеквівалентності [30]. Селективна та чутлива методика ВЕРХ-МС/МС одночасного визначення гідрохлортіазиду та раміприлу в плазмі крові була розроблена з використанням твердофазної екстракції. Хроматографічне розділення аналітів проводили на колонці NuPurity C18 (150 мм × 4.6 мм, 5 мкм) в градієнтних умовах елюювання з метанолом, 0.2 % кислоти мурашиної у воді в якості рухомої фази. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 0.750–300 нг/мл для гідрохлортіазиду та 0.125–80.0 нг/мл – для раміприлу. Розроблена методика була застосована для вивчення біоеквівалентності *in vivo* таблеток 25 мг гідрохлортіазиду і 5 мг раміприлу.

У дослідженні Jatin R. Patel et al. описано методику ВЕРХ-МС/МС одночасного визначення раміприлу та гідрохлортіазиду в плазмі крові з використанням рідинно-рідинної екстракції [31]. Аналіти були виділені метилтретбутиловим ефіром та дихлорметаном (85:15) та розділені на хроматографічній колонці Enable C18 G (150 мм × 4.6 мм, 5 мкм) з використанням метанолу, 0.1 % кислоти мурашиної у воді (85:15) як рухомої фази. Калібрувальна крива була лінійною ($R^2 > 0.99$) в діапазоні концентрацій 2–170 нг/мл для раміприлу та 8–680 нг/мл – для гідрохлортіазиду. Результати цього дослідження показали вибірковість та чутливість методики для одночасного визначення раміприлу та гідрохлортіазиду в плазмі людини.

Gupta V. K. et al. розроблено експресну методику ВЕРХ-МС/МС одночасного визначення раміприлу, раміприлату та телмісартану в плазмі крові людини [32]. Метод твердофазної екстракції використовувався для екстракції раміприлу, раміприлату та телмісартану з плазми людини. В якості внутрішніх стандартів використовували трандолаприлат і гідрохлортіазид. Хроматографування проводили на колонці NuPurity C18 (50 мм × 4.6 мм, 5 мкм) з використанням рухомої фази, що складалася з амонію ацетату та ацетонітрилу (20:80). Нижня межа кількісного визначення (НМКВ) для раміприлу,

раміприлату та телмісартану становила 0.1 нг/мл, 0.1 нг/мл і 2 нг/мл відповідно. Запропоновані хроматографічні умови дозволили підвищити чутливість і вибірковість визначення. Час хроматографування становив 1.5 хв, що свідчить про високу продуктивність аналізу.

1.4 Застосування принципів «зеленої» хімії в розробці методик контролю якості лікарських форм раміприлу

На сьогодні одним із сучасних підходів при розробці методик контролю якості лікарських засобів є дотримання принципів «зеленої» хімії. Методики контролю якості лікарських засобів мають різні сфери застосування, проте всі вони призначені для оптимізації рутинного фармацевтичного аналізу на заводах, де працюють хіміки. Тому такі методи мають бути екологічно безпечними та «зеленими». При проведенні аналізу методик, які описані в розділі 1.2, 1.3, привертає увагу той факт, що ніде не згадується екологічна безпека чи не ставляться науковцями/авторами методик акценти на розробку екологічно безпечних методик визначення раміприлу. Це обумовлено часовими рамками розробки методик, оскільки перші наукові публікації щодо імплементації принципів «зеленої» хімії були опубліковані не раніше 2012 року (Gałaszka A. et al.) [33]. Великий внесок у розвиток «зеленої» хімії зробили Польські науковці з Гданського технічного університету [33-35]. Окрім детального опису інструментів та прикладів розрахунків, авторами розроблено програмне забезпечення калькуляторів «зеленості» AGREE [34] та GAPI [35].

Для прикладу, проведемо розрахунок «зеленості» інструментом AGREE [4, 14]. Монографія USP [4] регламентує визначення раміприлу з використанням рухомої фази – 2.0 г/л розчину натрію перхлорату в суміші триетиламіну, води, ацетонітрилу (рН 3.6) та 2.0 г/л розчину натрію перхлорату в суміші триетиламіну, води, ацетонітрилу (рН 2.6) (60:40) та хроматографічної колонки класу L1 4.6-мм × 15-см, 5 мкм за довжини хвилі 210 нм, швидкості потоку рухомої фази 1.0 мл/хв. Бал за інструментом AGREE становив 0.71.

Проведемо розрахунок «зеленості» інструментом AGREE [14]. ВЕРХ методика [14] регламентує визначення раміприлу та його домішок з використанням рухомої фази – А – 60 мМ буферного розчину натрію перхлорату (містить 7.2 мМ триетиламіну), ацетонітрилу (60:40) та В – 60 мМ буферного розчину натрію перхлорату (містить 7.2 мМ триетиламіну), ацетонітрилу (20:80) і хроматографічної колонки Inertsil ODS-3 (4.0 мм x 250 мм, 3 мкм) за довжини хвилі 210 нм, швидкості потоку рухомої фази 1.0 мл/хв. Бал за інструментом AGREE становив 0.68. Операції 7,8,11 були відзначені червним кольором.

Проаналізувавши вище описане, можна зробити висновок, що актуальним та невирішеним завданням залишається застосування сучасних підходів до розробки/оптимізації методик контролю якості лікарських форм раміприлу з урахуванням (імплементациєю) принципів «зеленої» хімії.

Висновки до розділу I

1. В науковій літературі описані спектрофотометричні методики визначення раміприлу в лікарських формах, проте для розширення банку альтернативних спектрофотометричних методик визначення раміприлу є необхідність в подальшій розробці цих методик з урахуванням сучасних підходів до аналітичної розробки.
2. Як впливає з представленого опису ВЕРХ методик визначення раміприлу в лікарських формах, в науковій літературі недостатньо представлено методики контролю якості лікарських форм раміприлу. В більшості випадків – це методики ВЕРХ з ДМД, виконані застарілими підходами до аналітичної розробки, проте з використанням октадецилсилільних колонок. Вказані методики не висвітлюють сучасних підходів до розробки методик контролю якості лікарських форм раміприлу, які передбачають розробку методик супровідних домішок раміприлу в таблетках, методик визначення раміприлу для проведення тестів «Розчинення», «Кількісне визначення», «Однорідність дозованих одиниць».

3. Фіксовані комбінації раміприлу та гідрохлортіазиду широко представлені на фармацевтичному ринку України та світу, проте їх аналітична розробка не описана в достатній мірі і потребує ґрунтовного вивчення.
4. Описані проблеми в аналітичній розробці лікарських форм раміприлу та їх успішне вирішення мають велике практичне значення для рутинного фармацевтичного аналізу.
5. На сьогодні, імплементація принципів «зеленої» хімії є вкрай необхідною для розробки методик контролю якості і не проводилася при створенні існуючих методик визначення раміприлу в лікарських формах.

РОЗДІЛ 2

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ОБ'ЄКТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА МОДЕЛЮВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ

2.1 Методологія дослідження

Враховуючи вище описані проблеми в розділі 1, над вирішенням яких ми запланували працювати, нами представлено дизайн експерименту (рис. 2.1), який передбачав три основні етапи. Перший етап передбачав розробку методик контролю якості таблеток раміприлу і об'єднував розробку методик супровідних домішок раміприлу в таблетках, методик визначення раміприлу для проведення тестів «Розчинення», «Кількісне визначення», «Однорідність дозованих одиниць». Другий етап передбачав розробку альтернативних спектрофотометричних методик визначення раміприлу в таблетках з використанням БФС та КЧ. Найоб'ємнішим та найґрунтовнішим був третій етап, який передбачав розробку методик контролю якості комбінованих таблеток раміприлу та гідрохлортіазиду, який об'єднував розробку ВЕРХ методик визначення раміприлу та гідрохлортіазиду для вивчення профілів розчинення, розробку хроматографічної методики визначення залишкових кількостей раміприлу та гідрохлортіазиду для контролю очищення обладнання, дослідження профілів деградації раміприлу та гідрохлортіазиду як етапу розробки методів визначення вмісту домішок у комбінованому препараті, розробку ВЕРХ методик визначення раміприлу та гідрохлортіазиду в таблетках для проведення тестів «Розчинення», «Кількісне визначення», «Однорідність дозованих одиниць».

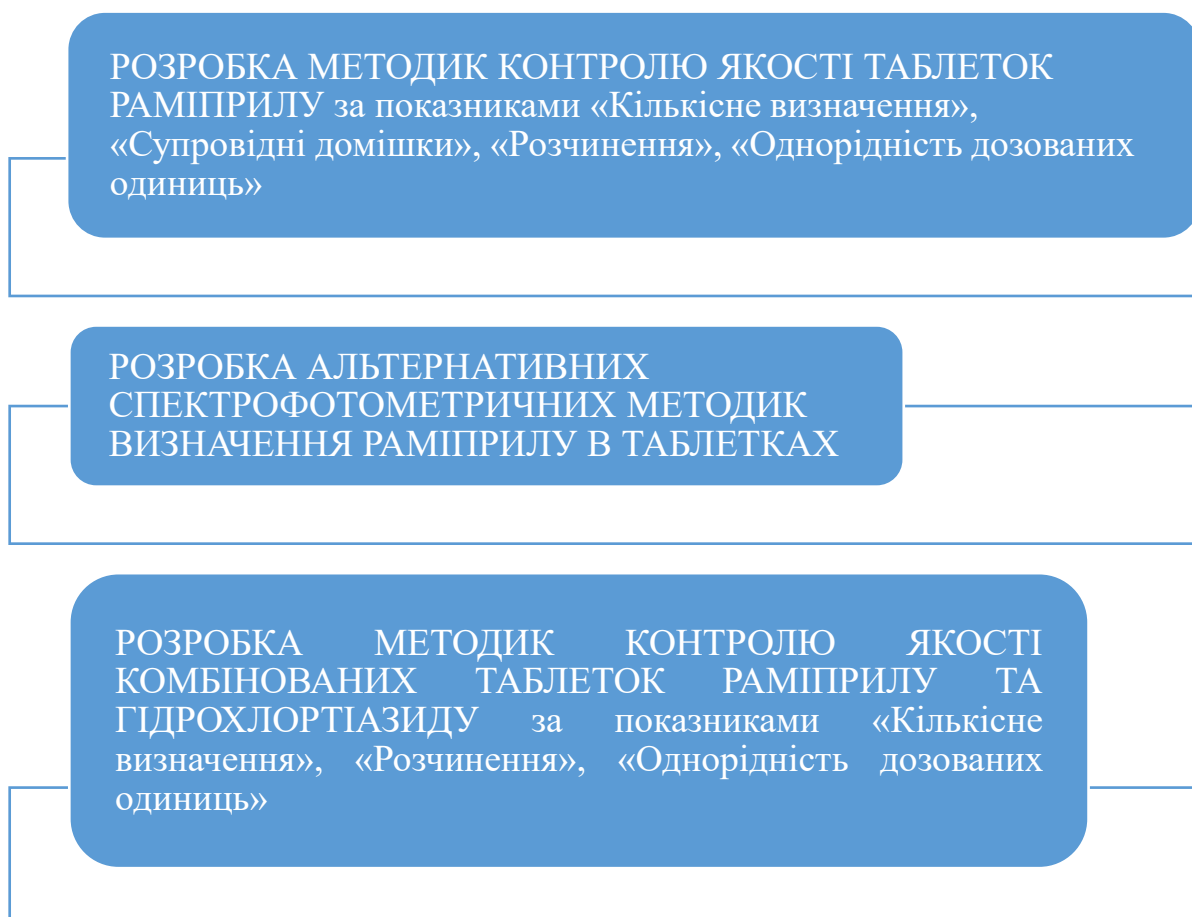


Рисунок 2.1 – Дизайн експерименту

2.2 Фізико-хімічні властивості об'єктів дослідження

У хімічному відношенні раміприл є (2S,3aS,6aS)-1-[(2S)-2-[[[(2S)-1-етокси-1-оксо-4-фенілбутан-2-іл]аміно]пропаноіл]-3,3a,4,5,6,6a-гексагідро-2H-циклопента[b]пірол-2-карбонова кислота (рис.1.1).

Фізико-хімічні властивості: білий чи майже білий кристалічний порошок. Помірно розчинний у воді, легко розчинний у метанолі [3].

При виконанні дослідження використовували робочий стандартний зразок раміприлу (РСЗ) (0.993 мг/г), раміприлу домішки А, В, С, D (USP RS), таблетки “Рамізес” (АТ «Фармак») 2.5 мг, 5 мг, 10 мг.

У хімічному відношенні гідрохлортіазид є 6-хлоро-3,4-дигідро-2H-1,2,4-бензотіадіазин-7-сульфаміду 1,1-діоксид [3] (рис. 2.2).

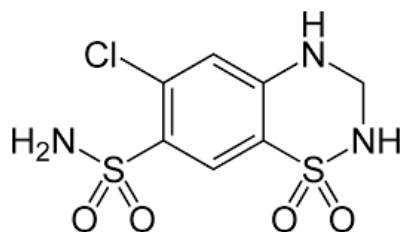


Рисунок 2.2 – Структурна формула гідрохлортіазиду



Фізико-хімічні властивості: білий чи майже білий кристалічний порошок. Виявляє поліморфізм. Дуже мало розчинний у воді, помірно розчинний в етанолі, розчинний у лугах [3].

При виконанні дослідження використовували робочий стандартний зразок гідрохлортіазиду (РСЗ) (0.997 мг/г), таблетки Рамізес Ком у дозуваннях Раміприл 2.5 мг + Гідрохлортіазид 12.5 мг, Раміприл 5 мг + Гідрохлортіазид 25 мг, Раміприл 5 мг + Гідрохлортіазид 12.5 мг, Раміприл 10 мг + Гідрохлортіазид 25 мг, Раміприл 10 мг + Гідрохлортіазид 12.5 мг (АТ «Фармак»).

Використані у роботі реактиви та розчинники: БФС («Honeywell Fluka»), КЧ («Honeywell Fluka»), натрію гідроксид («Sigma-Aldrich»), перекис водню 30 % («Sigma-Aldrich»), ацетонітрил («Sigma-Aldrich», «Honeywell»), кислота фосфорна («Sigma-Aldrich»), натрію гексансульфонат («Sigma-Aldrich», «Supelco»), Етиловий спирт («Укрспирт»), натрію хлорид («Sigma-Aldrich»), кислота хлористоводнева («Carlo Erba»), натрію ацетат безводний («Fluka»), кислота оцтова («Sigma-Aldrich»), калію дигідрофосфат («Sigma-Aldrich»).

2.3 Характеристика методик дослідження

На основі аналізу наукових публікацій щодо розробки методик контролю якості лікарських форм раміприлу з урахуванням сучасних підходів обрано методи ВЕРХ/УФ, УВЕРХ-МС/МС, спектрофотометрії,

Взяття наважок РСЗ, таблеток, реагентів проводили з точністю ± 0.2 мг.

Для вимірювання об'ємів випробовуваних розчинів використовували піпетки, циліндри та мірні колби класу А.

2.3.1 ВЕРХ методика визначення супровідних домішок раміприлу в таблетках

Визначення проводять методом рідинної хроматографії на рідинному хроматографі з ДМД Agilent 1200 [36].

Рухома фаза А. Розчин 0.2 г/л *натрію гексансульфонату Р*, рН якого доведено *фосфорною кислотою Р* до значення 2.7 (наприклад: 200 мг *натрію гексансульфонату Р* розчиняють в 1000 мл води Р, доводять рН *фосфорною кислотою Р* до значення 2.7).

Рухома фаза Б. Ацетонітрил Р.

Розчинник. Рухома фаза А : Рухома фаза В (1 : 1 об/об).

Випробовуваний розчин. Готують розчин з концентрацією 0.5 мг/мл раміприлу у розчиннику (наприклад: 1.30 г порошку розтертих таблеток поміщають у мірну колбу місткістю 50.0 мл, додають 30 мл розчинника, витримують на ультразвуковій бані протягом 15 хв, доводять об'єм розчину розчинником до позначки, перемішують та фільтрують крізь фільтр з діаметром пор 0.45 мкм (нейлоновий фільтр NY, політетрафторетилен PTFE). Коефіцієнт розведення $DF_1 = \frac{1}{50}$).

Розчин порівняння (а). Готують розчин, що містить 2 мг/мл RS раміприлу домішки А, 2 мг/мл RS раміприлу домішки В, 2 мг/мл RS раміприлу домішки С, 2 мг/мл RS раміприлу домішки D, 2 мг/мл RS раміприлу у розчиннику (наприклад: по 2.0 мг стандартних зразків раміприлу домішки А (EP CRS, USP RS), раміприлу домішки В (EP CRS, USP RS), раміприлу домішки С (EP CRS, USP RS) та раміприлу домішки D (EP CRS, USP RS) помістити у мірну колбу місткістю 200.0 мл, розчинити у 100 розчинника та додати 4.0 мл розчину порівняння (а), приготованого у розділі «Кількісне визначення». Метод 2». Довести об'єм колби до мітки розчинником та перемішати. 2.0 мл отриманого

розчину перенести у мірну колбу місткістю 10.0 мл та довести до мітки розчинником. Коефіцієнт розведення: для домішок раміприлу $DF_{0a_{(A,B,C,D)}} = \frac{2}{200 \cdot 10}$; для раміприлу $DF_{0a} = \frac{4 \cdot 2}{50 \cdot 200 \cdot 10}$.

Розчин порівняння (b). Готують розчин з концентрацією 2.5 мкг/мл раміприлу у розчиннику (наприклад: 0.5 мл розчину порівняння (a) приготованого у розділі «Кількісне визначення. Метод 2» доводять розчинником до об'єму 100.0 мл і перемішують. Коефіцієнт розведення: $DF_{0b} = \frac{0,5}{50 \cdot 100}$).

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі зі спектрофотометричним детектором за умов:

- колонка розміром 4.6 ммх150 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії Р з розміром часток 3 мкм (наприклад Inertsil ODS-3);

- режим елюювання: градієнтний за програмою, представленою в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1 – Режим елюювання за умов ВЕРХ визначення супровідних домішок раміприлу в таблетках

Час, хв	Рухома фаза А, %	Рухома фаза Б, %	Примітки
0	86	14	Реєстрація сигналу
6	86	14	Реєстрація сигналу
18	39	61	Реєстрація сигналу
20	39	61	Реєстрація сигналу
22	86	14	Перехід на початкове співвідношення фаз
25	86	14	Урівноваження колонки

- швидкість рухомої фази: 1.5 мл/хв;
- детектування за довжини хвилі: 210 нм;
- температура колонки: $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- час хроматографування: 22 хв, наступна інжекція через 25 хв.
- об'єм проби, що вводиться: 20 мкл.

Час виходу раміприлу – (12-15) хв.

2.3.2 ВЕРХ методика визначення раміприлу в таблетках для проведення кількісного визначення

Визначення проводять методом рідинної хроматографії на рідинному хроматографі з ДМД Agilent 1260 [36].

Метод 2

Рухома фаза А. Розчин 0.2 г/л *натрію гексансульфонату Р*, рН якого доведено *фосфорною кислотою Р* до значення 2.7 (наприклад: 200 мг *натрію гексансульфонату Р* розчиняють в 1000 мл води Р, доводять рН *фосфорною кислотою Р* до значення 2.7).

Рухома фаза Б. Ацетонітрил Р.

Випробовуваний розчин. Готують розчин з концентрацією 0.1 мг/мл раміприлу у розчиннику (наприклад: 5.0 мл випробовуваного розчину, приготованого у розділі «Супровідні домішки. Метод 2», доводять рухомою фазою до об'єму 25.0 мл. Коефіцієнт розведення $DF_1 = \frac{1 \cdot 5}{50 \cdot 25}$).

Розчин порівняння (а). Готують розчин з концентрацією 0.5 мг/мл RS раміприлу у рухомій фазі (наприклад: 25.0 мг раміприлу (BP CRS або USP RS, або РСЗ ПАТ «Фармак», або ФСЗ ДФУ) розчиняють у 40 мл рухомої фази, доводять тим самим розчинником до об'єму 50.0 мл і перемішують. Коефіцієнт розведення $DF_1 = \frac{1}{50}$).

Розчин порівняння (b). Готують розчин з концентрацією 0.1 мг/мл RS раміприлу у рухомій фазі (наприклад: 5.0 мл розчину порівняння (а) доводять рухомою фазою до об'єму 25.0 мл і перемішують. Коефіцієнт розведення $DF_1 = \frac{1 \cdot 5}{50 \cdot 25}$).

Розчин порівняння (с). Готують розчин з концентрацією 5 мкг/мл RS раміприлу у 0.1 М розчині кислоти хлористоводневої (наприклад: 1.0 мл розчину порівняння (а) доводять 0.1 М розчином кислоти хлористоводневої до об'єму

100.0 мл і перемішують. Коефіцієнт розведення $DF_1 = \frac{1}{50 \cdot 100}$).

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі зі спектрофотометричним детектором за таких умов:

- колонка розміром 4.6 мм х 250 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії Р з розміром часток 5 мкм (наприклад Acclaim 120 C18);

- режим елюювання: ізократичний за програмою, описаною в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2 – Режим елюювання за умов ВЕРХ кількісного визначення раміприлу в таблетках

Рухома фаза А, %	Рухома фаза В, %	Примітки
50	50	Рухома фаза А та В може змішуватись в одній ємності або подаються з різних каналів та змішуються у необхідній пропорції насосом хроматографу

- швидкість рухомої фази: 1.0 мл/хв;
- детектування за довжини хвилі 210 нм;
- температура колонки (45 ± 1) °С;
- об'єм проби, що вводиться: 3 мкл
- час хроматографування: 1.3 часу виходу піку раміприлу.

Час виходу піку раміприлу – (3.5-4.5) хв.

Однорідність дозованих одиниць. Визначення проводять відповідно до вимог ДФУ, 2.9.40, методом рідинної хроматографії (ДФУ, 2.2.29) [36].

Випробовуваний розчин. 1 таблетку поміщають в мірну колбу місткістю 25.0 мл, додають 20 мл рухомої фази, витримують в ультразвуковій бані протягом 10 хв, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки і перемішують. Отриманий розчин фільтрують крізь мембранний фільтр з розміром пор 0.45 мкм. Коефіцієнт розведення: $DF_1 = \frac{1}{25}$.

Хроматографують по 3 мкл випробовуваного розчину та розчину порівняння (b), приготованого в розділі «Кількісне визначення», в умовах

описаних в розділі «Кількісне визначення».

Визначають кількісний вміст раміприлу у кожній із 10 відібраних таблеток. Розраховують приймальне число (ДФУ, 2.9.40).

Вимоги тесту вважаються виконаними, якщо приймальне число менше або рівне 15.0. Якщо приймальне число більше 15 виконують випробування, зазначені у ДФУ, 2.9.40.

2.3.3 ВЕРХ методика визначення раміприлу для проведення тесту «Розчинення»

Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ, використовуючи прилад з лопаттю, методом рідинної хроматографії на рідинному хроматографі з ДМД Agilent 1260 [36].

Середовище розчинення – *0.1 М розчин кислоти хлористоводневої*, об'єм середовища розчинення – 500 мл, швидкість обертання лопаті – 50 об/хв, час розчинення – 30 хв.

Випробовуваний розчин. В посудину приладу для розчинення поміщають 1 таблетку. Через 30 хв із центру посудини приладу для розчинення відбирають 25 мл розчину і фільтрують крізь мембранний фільтр з розміром пор 0.45 мкм, відкидаючи перші порції фільтрату. Коефіцієнт розведення: $DF_1 = \frac{1}{500}$.

Хроматографують по 3 мкл випробовуваного розчину та розчину порівняння (с), приготованого в розділі «Кількісне визначення» в умовах, описаних в розділі «Кількісне визначення».

2.3.4 Спектрофотометрична методика визначення раміприлу в таблетках за реакцією з бромфеноловим синім

Визначення проводять методом спектрофотометрії на спектрофотометрі Shimadzu UV-1800, програмний пакет Software UV-Probe 2.62 [36].

Приготування випробовуваного розчину таблеток раміприлу: точну наважку порошку розтертих таблеток, еквівалентну 25 мг раміприлу, переносять

до мірної колби на 25.0 мл, розчиняють в 15.0 мл *ацетонітрилу Р*, доводять *ацетонітрилом Р* до позначки, витримують в УЗ-бані впродовж 2 хв. Після цього розчин фільтрують через паперовий фільтр («Синя стрічка»), відкидаючи перші порції фільтрату. З наступних порцій фільтрату беруть 2.5 мл розчину, переносять до мірної колби на 25.0 мл, доводять *ацетонітрилом Р* до позначки та перемішують. Відбирають аліквоту 0.4 мл розчину, переносять до мірної колби на 10.0 мл, додають 1.0 мл 2.35×10^{-4} М розчину БФС в *ацетонітрилі Р*, доводять *ацетонітрилом Р* до позначки та перемішують.

Приготування розчину порівняння раміприлу: 25 мг ФСЗ раміприлу вміщують до мірної колби місткістю 25.0 мл, розчиняють у *ацетонітрилі Р* та доводять *ацетонітрилом* до позначки, перемішують. 2.5 мл розчину переносять до мірної колби на 25.0 мл, доводять *ацетонітрилом Р* до позначки та перемішують. 0.4 мл розчину, переносять до мірної колби об'ємом 10.0 мл, додають 1.0 мл 2.35×10^{-4} М розчину БФС в *ацетонітрилі Р*, доводять *ацетонітрилом Р* до позначки та перемішують.

Вимірюють абсорбцію випробовуваного розчину та розчину порівняння за довжини хвилі 598 нм на фоні компенсаційного розчину.

2.3.5 Спектрофотометрична методика визначення раміприлу в таблетках за реакцією з крезоловим червоним

Визначення проводять методом спектрофотометрії на спектрофотометрії Shimadzu UV-1800, програмний пакет Software UV-Probe 2.62 [36].

Приготування випробовуваного розчину таблеток раміприлу: точну наважку порошку розтертих таблеток, еквівалентну 2 мг раміприлу, переносять до мірної колби на 50.0 мл, розчиняють в 35.0 мл *ацетонітрилу Р*, доводять *ацетонітрилом Р* до позначки, витримують в УЗ-бані впродовж 2 хв. Після цього розчин фільтрують через паперовий фільтр («Синя стрічка»), відкидаючи перші порції фільтрату. З наступних порцій фільтрату беруть 0.7 мл розчину, переносять до мірної колби на 10.0 мл, додають 1.0 мл 1.35×10^{-4} М розчину КЧ в *ацетонітрилі Р*, доводять *ацетонітрилом Р* до позначки та перемішують.

Приготування розчину порівняння раміприлу: 2 мг ФСЗ раміприлу вміщують до мірної колби місткістю 50.0 мл, розчиняють у ацетонітрилі Р та доводять ацетонітрилом до позначки, перемішують. 0.7 мл розчину переносять до мірної колби об'ємом 10.0 мл, додають 1.0 мл 1.33×10^{-4} М розчину КЧ в ацетонітрилі Р, доводять ацетонітрилом Р до позначки та перемішують.

Вимірюють абсорбцію випробовуваного розчину та розчину порівняння за довжини хвилі 395 нм на фоні компенсаційного розчину.

2.3.6 ВЕРХ методика визначення раміприлу та гідрохлортіазиду для вивчення профілів розчинення

Визначення проводять методом рідинної хроматографії на рідинному хроматографі з ДМД Agilent 1260 [36].

Досліджувані зразки: таблетки Раміприлу з Гідрохлортіазидом 2,5 мг/12,5мг та 10 мг/25 мг та плацебо даних препаратів.

Умови хроматографування. Використовували колонку Inertsil ODS-3 (4.6 мм × 150 мм, 3 мкм); рухома фаза А – 0.2 г/л розчин натрію гексансульфонату (рН 2.7); рухома фаза Б: ацетонітрил; швидкість рухомої фази 1.4 мл/хв; довжина хвилі детектування – 210 нм; температура колонки – 45 °С, градієнтний режим елюювання відповідно таблиці 2.3.

Таблиця 2.3 – Градієнт елюювання

Час хроматографування, хв	Рухома фаза А, %	Рухома фаза Б, %
0	70.0	30.0
1.5	70.0	30.0
2.5	30.0	70.0
3	30.0	70.0
3.1	70.0	30.0
4.5	70.0	30.0

Приготування розчинів. Як розчинник для вихідних розчинів порівняння використовували суміш рухомої фази А : рухомої фази Б (1 : 1). Як середовища розчинення використовували 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої та

буферні розчини рН 1.2, рН 4.5 та рН 6.8.

Готували вихідні розчини раміприлу (концентрація 499 мг/мл) та гідрохлортіазиду (концентрація 1247 мкг/мл). Використовуючи вихідні розчини, готували розчини порівняння для 5-ти дозувань комбінованого препарату. Приготування розчинів порівняння наведено в таблиці 2.4. Розчини порівняння готували для кожного з 4-х досліджуваних середовищ розчинення.

Таблиця 2.4 – Приготування розчинів порівняння

Дозування (раміприл / гідрохлортіазид)	Концентрація раміприлу, мкг/мл	Концентрація гідрохлортіазиду, мкг/мл
2.5 мкг / 12.5 мкг	5	25
5 мкг / 25 мкг	10	50
5 мкг / 12.5 мкг	10	25
10 мкг / 25 мкг	20	50
5 мкг / 12.5 мкг	20	25

Для дослідження лінійності готували 11 розчинів в діапазоні концентрацій для раміприлу 0.100–29.928 мкг/мл, для гідрохлортіазиду 0.249–74.823 мкг/мл. Розчини готували для 4-х середовищ розчинення.

Для приготування випробовуваних розчинів використовували наступні умови розчинення: об'єм середовища розчинення – 500 мл, швидкість обертання лопаті – 75 об/хв, час розчинення – 30 хв.

2.3.7 Методика визначення профілів деградації раміприлу та гідрохлортіазиду

Визначення проводять методом рідинної хроматографії на рідинному хроматографі з ДМД Agilent 1260 [36].

Досліджувані зразки: таблетки Раміприлу по 2.5 мг та Раміприлу з Гідрохлортіазидом 10 мг/12.5 мг, які зберігали протягом 9 місяців за температури 30 °С та відносній вологості 75 % та свіжоприготоване плацебо даних препаратів.

Умови хроматографування. Використовували колонку Inertsil ODS-3 (4.6 мм × 150 мм, 3 мкм); рухома фаза А – 0.2 г/л розчин натрію гексансульфонату (рН 2.7); рухома фаза Б: ацетонітрил; швидкість рухомої фази 1.5 мл/хв; довжина хвилі детектування – 210 нм; температура колонки – 45 °С, градієнтний режим елюювання відповідно таблиці 2.5.

Таблиця 2.5 – Градієнт елюювання

Час хроматографування, хв	Рухома фаза А, %	Рухома фаза Б, %
0	86	14
6	86	14
18	39	61
20	39	61
22	86	14
25	86	14

Приготування розчинів. Як розчинник для зразків використовували суміш рухомої фази А : рухомої фази Б (1 : 1 об/об).

Контрольний зразок таблеток: наважку препарату (або плацебо препарату) еквівалентну 25 мг раміприлу (для монопрепарату) або 25 мг раміприлу та 31.25 мг гідрохлортіазиду розчиняли в розчиннику і доводили до об'єму 25 мл. Отриманий розчин розводили в 10 раз розчинником.

Для дослідження впливу температури таблетки раміприлу, раміприлу з гідрохлортіазидом та їх плацебо витримували впродовж 24 год при 60 °С, далі готували розчини як і контрольний зразок.

Для дослідження впливу кислоти наважку препарату або плацебо як для контрольного зразку розчиняли в 5 мл 0.1 М НСІ витримували за кімнатної температури впродовж 12 год (для комбінованого препарату) або впродовж 2 год за температури 60 °С (для монопрепарату). Далі додавали 5 мл 0.1 NaOH та доводили розчин до 25 мл ацетонітрилом. Отриманий розчин розводили в 10 раз розчинником.

Для дослідження впливу лугу наважку препарату або плацебо як для контрольного зразку розчиняли в 5 мл 0.1 М NaOH витримували за кімнатної

температури впродовж 12 год (для комбінованого препарату) або 1 год (для монопрепарату). Далі додавали 5 мл 0.1 НСІ та доводили розчин до 25 мл ацетонітрилом. Отриманий розчин розводили в 10 раз розчинником.

Для дослідження окислення наважку препарату або плацебо як для контрольного зразку розчиняли в 5 мл 3 % розчину H_2O_2 та витримували впродовж 12 год за кімнатної температури (для комбінованого препарату) або впродовж 2 год за температури 60 °С (для монопрепарату).

Готували три розчини порівняння з наступними концентраціями: раміприл 0.1 мг/мл / гідрохлортіазид 0.125 мг/мл; раміприл 5 мкг/мл / гідрохлортіазид 6.25 мкг/мл; раміприл 1 мкг/мл / гідрохлортіазид 1.25 мкг/мл.

Для ідентифікації домішок раміприлу використовували розчин, що містить по 2 мкг/мл раміприлу домішок А, В, С, D та раміприлу у розчиннику.

2.3.8 УВЕРХ-МС методика визначення залишкових кількостей раміприлу та гідрохлортіазиду для контролю очищення обладнання

Визначення проводять методом рідинної хроматографії на двох рідинних хроматографах з МСД Agilent 6420 та Waters Xevo TQD ACQUITY.

Умови хроматографування. Використовували колонку Kinetex C18 (2.1 мм × 30 мм, 1.7 мкм) для обох речовин. Умови хроматографування для визначення раміприлу: рухома фаза 0.1 % розчин мурашиної кислоти в деіонізованій воді – ацетонітрил (73 : 27); швидкість рухомої фази – 0.4 мл/хв; температура колонки – 45 °С; режим іонізації – електроспрей у позитивному режимі; параметри детектування – режим реєстрації дочірнього йону 417 → 234 m/z. Умови хроматографування для визначення гідрохлортіазиду: рухома фаза 0.1 % розчин мурашиної кислоти в деіонізованій воді – ацетонітрил (91.5 : 8.5); швидкість рухомої фази – 0.35 мл/хв; температура колонки – 40 °С; режим іонізації – електроспрей у позитивному режимі; параметри детектування – режим реєстрації дочірнього йону 298 → 281 m/z.

Приготування розчинів. Розчин порівняння раміприлу: 5.0 мг раміприлу розчиняли у 30 мл етилового спирту та доводили об'єм розчину водою до 50.0

мл. З використанням вихідного розчину готували розчин, що містив 0.01 мкг/мл раміприлу у суміші ацетонітрил : вода (5 : 95).

Розчин порівняння гідрохлортіазиду: 5.0 мг гідрохлортіазиду розчиняли у 40 мл етилового спирту та доводили об'єм розчину водою до 50.0 мл. З використанням вихідного розчину готували розчин, що містив 0.01 мкг/мл гідрохлортіазиду у 0.05 % фосфорній кислоті.

Випробовуваний розчин для визначення раміприлу. 1.1 мл аналізованої промивної води доводили сумішшю ацетонітрил : вода (5 : 95) до 20.0 мл.

Випробовуваний розчин для визначення гідрохлортіазиду. 0.85 мл аналізованої промивної води доводили 0.05 % фосфорною кислотою до 50.0 мл.

Для проведення валідації з використанням Agilent 6420 для обох речовин готували 10 модельних розчинів у діапазоні концентрацій 0.0026 – 0.0255 мкг/мл (еквівалентно 25 – 247 % від нижньої межі діапазону критеріїв прийнятності для раміприлу та 25 – 253 % від нижньої межі діапазону критеріїв прийнятності для гідрохлортіазиду).

Для підтвердження можливості відтворення методики з використанням Waters Xevo TQD ACQUITY готували 5 модельних розчинів у діапазоні концентрацій раміприлу 0.0026 – 0.0250 мкг/мл (еквівалентно 25 – 242 % від нижньої межі діапазону критеріїв прийнятності) та гідрохлортіазиду 0.0026 – 0.0255 мкг/мл (еквівалентно 25 – 250 % від нижньої межі діапазону критеріїв прийнятності).

2.3.9 ВЕРХ методики визначення раміприлу та гідрохлортіазиду в комбінованих таблетках для проведення тестів «Кількісне визначення» та «Однорідність дозованих одиниць»

«Кількісне визначення».

Визначення проводять методом рідинної хроматографії на рідинному хроматографі з ДМД Agilent 1260 [36] за таких умов:

- рухома фаза: розчин рН 2.7 (200 мг натрію гексансульфонату Р (або 219 мг натрію гексансульфонату моногідрату Р) розчиняють в 1000 мл води Р, доводять рН фосфорною кислотою Р до значення 2,7) : ацетонітрил Р (47:53), для колонки Inertsil ODS-3;

- рухома фаза: розчин рН 2.7 (200 мг натрію гексансульфонату Р (або 219 мг натрію гексансульфонату моногідрату Р) розчиняють в 1000 мл води Р, доводять рН фосфорною кислотою Р до значення 2,7) : ацетонітрил Р (20:80), для колонки Dionex Acclaim 120 C18;

- швидкість рухомої фази 1.2 мл/хв;
- детектування за довжини хвилі 210 нм;
- температура колонки 35 °С;
- об'єм інжекції 3 мкл.

Випробовуваний розчин (2.5 мг / 12.5 мг та 5 мг / 25 мг). Готують розчин з концентрацією раміприлу 0.125 мг/мл та гідрохлортіазиду 0.625 мг/мл в розчиннику з використанням порошку розтертих таблеток (наприклад: 400.0 мг порошку розтертих таблеток або порошку розтертої таблетмаси поміщають в мірну колбу місткістю 100.0 мл, додають 70 мл розчинника, витримують на УЗ бані протягом 15 хв, доводять об'єм розчинником до позначки, перемішують і фільтрують крізь фільтр з діаметром пор 0.45 мкм (GF/PET, NY, PTFE), відкидаючи перші 2 мл фільтрату. Коефіцієнт розведення $DF1=1100$).

Випробовуваний розчин (а) (2.5 мг / 12.5 мг та 5 мг / 25 мг). Готують розчин з концентрацією раміприлу 0.05 мг/мл та гідрохлортіазиду 0.25 мг/мл в розчиннику з використанням випробовуваного розчину (наприклад: 10.0 мл випробовуваного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 25.0 мл і перемішують. Коефіцієнт розведення $DF1(a)=1 \cdot 10100 \cdot 25$).

Випробовуваний розчин (5 мг / 12.5 мг та 10 мг / 25 мг). Готують розчин з концентрацією раміприлу 0.25 мг/мл та гідрохлортіазиду 0.625 мг/мл в розчиннику з використанням порошку розтертих таблеток (наприклад: 450.0 мг порошку розтертих таблеток або порошку розтертої таблетмаси поміщають в

мірну колбу місткістю 100.0 мл, додають 70 мл розчинника, витримують на УЗ протягом 15 хв, доводять об'єм розчинником до позначки, перемішують і фільтрують крізь фільтр з діаметром пор 0.45 мкм (GF/PET, NY, PTFE), відкидаючи перші 2 мл фільтрату. Коефіцієнт розведення $DF1=1100$).

Випробовуваний розчин (a) (5 мг / 12,5 мг та 10 мг / 25 мг). Готують розчин з концентрацією раміприлу 0.10 мг/мл та гідрохлортіазиду 0.25 мг/мл в розчиннику з використанням випробовуваного розчину (наприклад: 10.0 мл випробовуваного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 25.0 мл і перемішують. Коефіцієнт розведення $DF1(a)=1 \cdot 10100 \cdot 25$).

Випробовуваний розчин (10 мг / 1,25 мг). Готують розчин з концентрацією раміприлу 0.25 мг/мл та гідрохлортіазиду 0.3125 мг/мл в розчиннику з використанням порошку розтертих таблеток (наприклад: 225.0 мг порошку розтертих таблеток або порошку розтертої таблетмаси поміщають в мірну колбу місткістю 100.0 мл, додають 70 мл розчинника, витримують на УЗ бані протягом 15 хв, доводять об'єм розчинником до позначки, перемішують і фільтрують крізь фільтр з діаметром пор 0.45 мкм (GF/PET, NY, PTFE), відкидаючи перші 2 мл фільтрату. Коефіцієнт розведення $DF1=1100$).

Випробовуваний розчин (a) (10 мг / 1.25 мг). Готують розчин з концентрацією раміприлу 0.10 мг/мл та гідрохлортіазиду 0.25 мг/мл в розчиннику з використанням випробовуваного розчину (наприклад: 10.0 мл випробовуваного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 25.0 мл і перемішують. Коефіцієнт розведення $DF1(a)=1 \cdot 10100 \cdot 25$).

Розчин порівняння (a). Готують розчин з концентрацією СЗ раміприлу 0.5 мг/мл в розчиннику (наприклад: 25.0 мг раміприлу (USP RS, BP CRS або РСЗ АТ «Фармак») розчиняють в розчиннику, витримуючи на ультразвуковій бані протягом 10 хв, доводять тим самим розчинником до об'єму 50.0 мл і перемішують. Коефіцієнт розведення $DF0(a)=150$).

Розчин порівняння (b). Готують розчин з концентрацією СЗ гідрохлортіазиду 0.5 мг/мл в розчиннику (наприклад: 25.0 мг гідрохлортіазиду (USP RS, BP CRS або РСЗ АТ «Фармак») розчиняють в розчиннику, витримуючи

на УЗ бані протягом 10 хв, доводять тим самим розчинником до об'єму 50.0 мл і перемішують. Коефіцієнт розведення $DF0(b)=150$).

Розчин порівняння (с) (для дозувань 2.5 мг / 12.5 мг та 5 мг / 25 мг). Готують розчин з концентрацією СЗ гідрохлортіазиду 0.25 мг/мл та СЗ раміприлу 0.05 мг/мл у розчиннику (наприклад: 10.0 мл розчину порівняння (b) і 2.0 мл розчину порівняння (a) доводять розчинником до об'єму 20.0 мл і перемішують. Коефіцієнт розведення раміприлу $DF0(c_r)=1 \cdot 250 \cdot 20$, гідрохлортіазиду – $DF0(c_h)=1 \cdot 1050 \cdot 20$).

Розчин порівняння (с) (для дозувань 5 мг / 12,5 мг та 10 мг / 25 мг). Готують розчин з концентрацією СЗ гідрохлортіазиду 0.25 мг/мл та СЗ раміприлу 0.10 мг/мл у розчиннику (наприклад: 10.0 мл розчину порівняння (b) і 4.0 мл розчину порівняння (a) доводять розчинником до об'єму 20.0 мл і перемішують. Коефіцієнт розведення раміприлу $DF0(c_r)=1 \cdot 450 \cdot 20$, гідрохлортіазиду – $DF0(c_h)=1 \cdot 1050 \cdot 20$).

Розчин порівняння (с) (для дозування 10 мг / 1.25 мг). Готують розчин з концентрацією СЗ гідрохлортіазиду 0.125 мг/мл та СЗ раміприлу 0.10 мг/мл у розчиннику (наприклад: 5.0 мл розчину порівняння (b) і 4.0 мл розчину порівняння (a) доводять розчинником до об'єму 20.0 мл і перемішують. Коефіцієнт розведення раміприлу $DF0(c_r)=1 \cdot 450 \cdot 20$, гідрохлортіазиду – $DF0(c_h)=1 \cdot 550 \cdot 20$).

Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються такі умови:

- Коефіцієнт симетрії піків раміприлу та гідрохлортіазиду, з хроматограми розчину порівняння, має бути в межах від 0.8 до 1.8;
- Розділення між піками раміприлу та гідрохлортіазиду має бути не менше 2.0;
- Відносне стандартне відхилення площ піків раміприлу або гідрохлортіазиду для 3-х паралельних інжекцій становить не більше 1.0 %.

Нормування для Рамізес Ком, таблетки, наведено у таблицях 2.6-2.10.

Таблиця 2.6 – Нормування для Рамізес Ком, таблетки 2.5 мг / 12.5 мг

Назва показника	Вимоги НД	
	На момент випуску	Протягом терміну придатності
Раміприл	Від 2.38 мг до 2.63 мг в перерахунку на середню масу таблетки	Від 2.25 мг до 2.63 мг в перерахунку на середню масу таблетки
Гідрохлортіазид	Від 11.88 мг до 13.13 мг в перерахунку на середню масу таблетки	

Таблиця 2.7 – Нормування для Рамізес Ком, таблетки 5 мг / 25 мг

Назва показника	Вимоги НД	
	На момент випуску	Протягом терміну придатності
Раміприл	Від 4.75 мг до 5.25 мг в перерахунку на середню масу таблетки	Від 4.50 мг до 2.63 мг в перерахунку на середню масу таблетки
Гідрохлортіазид	Від 23.75 мг до 26.25 мг в перерахунку на середню масу таблетки	

Таблиця 2.8 – Нормування для Рамізес Ком, таблетки 5 мг / 12.5 мг

Назва показника	Вимоги НД	
	На момент випуску	Протягом терміну придатності
Раміприл	Від 4.75 мг до 5.25 мг в перерахунку на середню масу таблетки	
Гідрохлортіазид	Від 11.88 мг до 13.13 мг в перерахунку на середню масу таблетки	

Таблиця 2.9 – Нормування для Рамізес Ком, таблетки 10 мг / 25 мг

Назва показника	Вимоги НД	
	На момент випуску	Протягом терміну придатності
Раміприл	Від 9.5 мг до 10.5 мг в перерахунку на середню масу таблетки	
Гідрохлортіазид	Від 23.75 мг до 26.25 мг в перерахунку на середню масу таблетки	

Таблиця 2.10 – Нормування для Рамізес Ком, таблетки 10 мг / 12.5 мг

Назва показника	Вимоги НД	
	На момент випуску	Протягом терміну придатності
Раміприл	Від 9.5 мг до 10.5 мг в перерахунку на середню масу таблетки	
Гідрохлортіазид	Від 11.88 мг до 13.13 мг в перерахунку на середню масу таблетки	

Однорідність дозованих одиниць.

Випробовуваний розчин (2.5 мг / 12,5 мг). Одну таблетку поміщають в мірну колбу місткістю 50.0 мл, додають 35 мл розчинника, витримують на УЗ бані протягом 15 хв, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки, перемішують і фільтрують крізь фільтр з діаметром пор 0.45 мкм (GF/PET, NY, PTFE) відкидаючи перші 2 мл фільтрату (Коефіцієнт розведення $DF1=150$).

Випробовуваний розчин (5 мг / 25 мг). Одну таблетку поміщають в мірну колбу місткістю 100.0 мл, додають 75 мл розчинника, витримують на УЗ бані протягом 15 хв, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки, перемішують і фільтрують крізь фільтр з діаметром пор 0,45 мкм (GF/PET, NY, PTFE) відкидаючи перші 2 мл фільтрату (Коефіцієнт розведення $DF1=1100$).

Випробовуваний розчин (5 мг / 12.5 мг). Одну таблетку поміщають в мірну колбу місткістю 50.0 мл, додають 75 мл розчинника, витримують на УЗ бані протягом 15 хв, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки, перемішують і фільтрують крізь фільтр з діаметром пор 0.45 мкм (GF/PET, NY, PTFE) відкидаючи перші 2 мл фільтрату (Коефіцієнт розведення $DF1=150$).

Випробовуваний розчин (10 мг / 25 мг). Одну таблетку поміщають в мірну колбу місткістю 100.0 мл, додають 75 мл розчинника, витримують на УЗ бані протягом 15 хв, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки, перемішують і фільтрують крізь фільтр з діаметром пор 0.45 мкм (GF/PET, NY, PTFE) відкидаючи перші 2 мл фільтрату (Коефіцієнт розведення $DF1=1100$).

Випробовуваний розчин (10 мг / 12.5 мг). Одну таблетку поміщають в мірну колбу місткістю 100.0 мл, додають 75 мл розчинника, витримують на УЗ бані протягом 15 хв, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки, перемішують і фільтрують крізь фільтр з діаметром пор 0.45 мкм (GF/PET, NY, PTFE) відкидаючи перші 2 мл фільтрату (Коефіцієнт розведення $DF1=1100$).

Хроматографування проводять за умов, зазначених в розділі «Кількісне визначення».

2.3.10 ВЕРХ методика визначення таблеток раміприлу та гідрохлортіазиду для проведення контролю за показниками якості «Розчинення» та «Профілі розчинення»

Розчинення. Випробування проводять методом рідинної хроматографії (ДФУ*, ЄФ*, 2.2.29, 2.2.46) відповідно вимогам ДФУ 2.9.3, використовуючи прилад з лопаттю.

Розчинник. Ацетонітрил : Розчин рН 2.7 (1:1).

Розчин рН 2.7. 200 мг натрію гексансульфонату Р (або 219 мг натрію гексансульфонату моногідрату Р) розчиняють в 1000 мл води Р, доводять рН фосфорною кислотою Р до значення 2.7.

Середовище розчинення – вода Р; об'єм середовища розчинення – 500 мл; температура середовища – (37.0 ± 0.5) °С; швидкість обертання лопаті – 75 об/хв; час розчинення – 30 хв.

Випробовуваний розчин. по 1 таблетці поміщають в кожну з 6 посудин для розчинення. Через 30 хв відбирають 10 5 мл з центру посудини приладу для розчинення і фільтрують крізь фільтр з діаметром пор 0.45 мкм (GF/PET, NY, PTFE) відкидаючи перші 2 мл фільтрату (Коефіцієнт розведення $DF_1 = \frac{1}{500}$).

Розчин порівняння (а). Готують розчин з концентрацією С3 раміприлу 0.5 мг/мл в розчиннику (Наприклад: 25.0 мг раміприлу (USP RS, BP CRS або PC3 AT «Фармак») розчиняють в розчиннику, витримуючи на УЗ бані протягом 10 хв, доводять тим самим розчинником до об'єму 50.0 мл і перемішують. Коефіцієнт розведення $DF_{0(a)} = \frac{1}{50}$)

Розчин порівняння (b). Готують розчин з концентрацією С3 гідрохлортіазиду 0.5 мг/мл в розчиннику (наприклад: 25.0 мг гідрохлортіазиду (USP RS, BP CRS або PC3 AT «Фармак») розчиняють в розчиннику, витримуючи на УЗ бані протягом 10 хв, доводять тим самим розчинником до об'єму 50.0 мл і перемішують. Коефіцієнт розведення $DF_{0(b)} = \frac{1}{50}$)

Розчин порівняння (с) (для дозування 2.5 мг / 12.5 мг). Готують розчин з концентрацією С3 гідрохлортіазиду 25 мкг/мл та С3 раміприлу 5 мкг/мл у

розчиннику (наприклад: 5.0 мл розчину порівняння (b) і 1.0 мл розчину порівняння (a) доводять розчинником до об'єму 100.0 мл і перемішують. Коефіцієнт розведення раміприлу $DF_{0(c_r)} = \frac{1.1}{50 \cdot 100}$, гідрохлортіазиду – $DF_{0(c_h)} = \frac{1.5}{50 \cdot 100}$).

Розчин порівняння (c) (для дозування 5 мг / 25 мг). Готують розчин з концентрацією СЗ гідрохлортіазиду 50 мкг/мл та СЗ раміприлу 10 мкг/мл у розчиннику (наприклад: 5.0 мл розчину порівняння (b) і 1.0 мл розчину порівняння (a) доводять розчинником до об'єму 50.0 мл і перемішують. Коефіцієнт розведення раміприлу $DF_{0(c_r)} = \frac{1.1}{50 \cdot 50}$, гідрохлортіазиду – $DF_{0(c_h)} = \frac{1.5}{50 \cdot 50}$).

Розчин порівняння (c) (для дозування 5 мг / 12.5 мг). Готують розчин з концентрацією СЗ гідрохлортіазиду 25 мкг/мл та СЗ раміприлу 10 мкг/мл у розчиннику (наприклад: 2.5 мл розчину порівняння (b) і 1.0 мл розчину порівняння (a) доводять розчинником до об'єму 50.0 мл і перемішують. Коефіцієнт розведення раміприлу $DF_{0(c_r)} = \frac{1.1}{50 \cdot 50}$, гідрохлортіазиду – $DF_{0(c_h)} = \frac{1.2,5}{50 \cdot 0}$).

Розчин порівняння (c) (для дозування 10 мг / 25 мг). Готують розчин з концентрацією СЗ гідрохлортіазиду 50 мкг/мл та СЗ раміприлу 20 мкг/мл у розчиннику (наприклад: 5.0 мл розчину порівняння (b) і 2.0 мл розчину порівняння (a) доводять розчинником до об'єму 50.0 мл і перемішують. Коефіцієнт розведення раміприлу $DF_{0(c_r)} = \frac{1.2}{50 \cdot 50}$, гідрохлортіазиду – $DF_{0(c_h)} = \frac{1.5}{50 \cdot 50}$).

Розчин порівняння (c) (для дозування 10 мг / 12.5 мг). Готують розчин з концентрацією СЗ гідрохлортіазиду 25 мкг/мл та СЗ раміприлу 20 мкг/мл у розчиннику (наприклад: 2.5 мл розчину порівняння (b) і 2.0 мл розчину порівняння (a) доводять розчинником до об'єму 50.0 мл і перемішують.

Коефіцієнт розведення раміприлу $DF_{0(c_r)} = \frac{1.2}{50 \cdot 50}$, гідрохлортіазиду – $DF_{0(c_h)} = \frac{1.2,5}{50 \cdot 50}$.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі зі спектрофотометричним детектором за одних з наступних умов:

Метод 1.

- Хроматографічна колонка Dionex Acclaim 120 C18 розміром 4.6 мм x 250 мм з розміром часток 5 мкм, або аналогічна колонка для якої виконуються умови придатності хроматографічної системи;

- рухома фаза: розчин рН 2.7 : ацетонітрил Р (20:80). Вміст ацетонітрилу у рухомій фазі може бути зменшений до 50 %;

- швидкість рухомої фази 1.2 мл/хв;

- детектування за довжини хвилі 210 нм;

- температура колонки 45 °С;

- об'єм інжекції 3 мкл.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються такі умови:

- Коефіцієнт симетрії піків раміприлу та гідрохлортіазиду, з хроматограми розчину порівняння, має бути в межах від 0.8 до 1.8;

- Розділення між піками раміприлу та гідрохлортіазиду має бути не менше 2.0;

- Відносне стандартне відхилення площ піків раміприлу або гідрохлортіазиду для 3-х паралельних інжекцій становить не більше 2.0 %.

Метод 2.

- Хроматографічна колонка Inertsil ODS розміром 4.6 мм x 150 мм, з розміром часток 3 мкм, або аналогічна колонка для якої виконуються умови придатності хроматографічної системи;

- рухома фаза А: розчин рН 2.7;

- рухома фаза Б: ацетонітрил Р;

- режим елюювання градієнтний програмою представлено в таблиці 2.11.

Таблиця 2.11 – Градієнтне елюювання

Час хроматографування, хв	Рухома фаза А, %	Рухома фаза Б, %
0	70.0	30.0
1.5	70.0	30.0
2.5	30.0	70.0
3.0	30.0	70.0
3.1	70.0	30.0
4.5	70.0	30.0

- швидкість рухомої фази 1.4 мл/хв;
- детектування за довжини хвилі 210 нм;
- температура колонки 45 °С;
- об'єм інжекції 3 мкл.

Кількість раміприлу або гідрохлортіазиду, що перейшла у розчин за 30 хв, має бути не менше 70 % (Q) від вмісту діючої речовини в одній таблетці.

Профілі розчинення. Випробування проводять методом рідинної хроматографії (ДФУ*, 2.2.29, 2.2.46) відповідно вимогам ДФУ*, ЄФ*, 2.9.3 за наступних умов:

- об'єм середовища розчинення: 500 мл;
- температура середовища розчинення: (37.0 ± 0.5) °С;
- тип приладу: прилад з лопаттю;
- швидкість обертання лопаті: 75 об/хв;
- спосіб відбору проб: автоматичний;
- точки відбору: 5, 10, 15, і 45 хвилин;

Середовища розчинення:

- буферний розчин хлористоводневої кислоти рН 1.2;
- ацетатний буферний розчин рН 4.5;
- фосфатний буферний розчин рН 6.8;

Розчинник. Ацетонітрил : розчин рН 2.7 (1:1).

Розчин рН 2.7. 200 мг натрію гексансульфонату Р (або 219 мг натрію гексансульфонату моногідрату Р) розчиняють в 1000 мл води Р, доводять рН фосфорною кислотою Р до значення 2.7.

Буферний розчин з хлористоводневою кислотою рН 1.2. До 250.0 мл 0.2 М розчину натрію хлориду Р додають 425.0 мл 2 М розчину кислоти хлористоводневої і доводять об'єм розчину водою Р до 1000.0 мл.

Ацетатний буферний розчин рН 4.5. 2.99 г натрію ацетату Р розчиняють у воді Р, додають 14.0 мл 2 М розчину кислоти оцтової та доводять об'єм розчину водою Р до 1000.0мл.

Фосфатний буферний розчин рН 6.8: До 250.0 мл 0.2 М розчину калію дигідрофосфату Р додають 112.0 мл 0.1 М розчину натрію гідроксиду і доводять об'єм розчину водою Р до 1000.0 мл. При необхідності встановлюють рН.

Випробовуваний розчин. В стакан для розчинення поміщають одну таблетку. Через зазначені проміжки часу зі стакану автоматично відбирають по 2 мл випробованого розчину та фільтрують через фільтр Poroplast 20 мкм (Коефіцієнт розведення $DF_1 = \frac{1}{500}$).

Розчин порівняння (а). Готують розчин з концентрацією СЗ раміприлу 0.5 мг/мл в розчиннику (наприклад: 25.0 мг раміприлу (USP RS, BP CRS або PC3 AT «Фармак»)) розчиняють в розчиннику, витримуючи на УЗ бані протягом 10 хв, доводять тим самим розчинником до об'єму 50.0 мл і перемішують. Коефіцієнт розведення $DF_{0(a)} = \frac{1}{50}$)

Розчин порівняння (b). Готують розчин з концентрацією СЗ гідрохлортіазиду 0.5 мг/мл в розчиннику (наприклад: 25.0 мг гідрохлортіазиду (USP RS, BP CRS або PC3 AT «Фармак»)) розчиняють в розчиннику, витримуючи на УЗ бані протягом 10 хв, доводять тим самим розчинником до об'єму 50.0 мл і перемішують. Коефіцієнт розведення $DF_{0(b)} = \frac{1}{50}$)

Розчин порівняння (с) (для дозування 2.5 мг / 12.5 мг). Готують розчин з концентрацією СЗ гідрохлортіазиду 25 мкг/мл та СЗ раміприлу 5 мкг/мл у розчиннику (наприклад: 5.0 мл розчину порівняння (b) і 1.0 мл розчину порівняння (а) доводять розчинником до об'єму 100,0 мл і перемішують.

Коефіцієнт розведення раміприлу $DF_{0(c_r)} = \frac{1 \cdot 1}{50 \cdot 100}$, гідрохлортіазиду – $DF_{0(c_h)} = \frac{1 \cdot 5}{50 \cdot 100}$.

Розчин порівняння (с) (для дозування 5 мг / 25 мг). Готують розчин з концентрацією СЗ гідрохлортіазиду 50 мкг/мл та СЗ раміприлу 10 мкг/мл у розчиннику (наприклад: 5.0 мл розчину порівняння (b) і 1.0 мл розчину порівняння (a) доводять розчинником до об'єму 50.0 мл і перемішують.

Коефіцієнт розведення раміприлу $DF_{0(c_r)} = \frac{1 \cdot 1}{50 \cdot 50}$, гідрохлортіазиду – $DF_{0(c_h)} = \frac{1 \cdot 5}{50 \cdot 50}$.

Розчин порівняння (с) (для дозування 5 мг / 12.5 мг). Готують розчин з концентрацією СЗ гідрохлортіазиду 25 мкг/мл та СЗ раміприлу 10 мкг/мл у розчиннику (наприклад: 2.5 мл розчину порівняння (b) і 1.0 мл розчину порівняння (a) доводять розчинником до об'єму 50.0 мл і перемішують.

Коефіцієнт розведення раміприлу $DF_{0(c_r)} = \frac{1 \cdot 1}{50 \cdot 50}$, гідрохлортіазиду – $DF_{0(c_h)} = \frac{1 \cdot 2,5}{50 \cdot 0}$.

Розчин порівняння (с) (для дозування 10 мг / 25 мг). Готують розчин з концентрацією СЗ гідрохлортіазиду 50 мкг/мл та СЗ раміприлу 20 мкг/мл у розчиннику (Наприклад: 5.0 мл розчину порівняння (b) і 2.0 мл розчину порівняння (a) доводять розчинником до об'єму 50.0 мл і перемішують.

Коефіцієнт розведення раміприлу $DF_{0(c_r)} = \frac{1 \cdot 2}{50 \cdot 50}$, гідрохлортіазиду – $DF_{0(c_h)} = \frac{1 \cdot 5}{50 \cdot 50}$.

Розчин порівняння (с) (для дозування 10 мг / 12.5 мг). Готують розчин з концентрацією СЗ гідрохлортіазиду 25 мкг/мл та СЗ раміприлу 20 мкг/мл у розчиннику (Наприклад: 2.5 мл розчину порівняння (b) і 2.0 мл розчину порівняння (a) доводять розчинником до об'єму 50.0 мл і перемішують.

Коефіцієнт розведення раміприлу $DF_{0(c_r)} = \frac{1 \cdot 2}{50 \cdot 50}$, гідрохлортіазиду – $DF_{0(c_h)} = \frac{1 \cdot 2,5}{50 \cdot 50}$.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі зі спектрофотометричним детектором за одних з наступних умов:

Метод 1.

- Хроматографічна колонка Dionex Acclaim 120 C18 розміром 4.6 мм x 250 мм з розміром часток 5 мкм, або аналогічна колонка для якої виконуються умови придатності хроматографічної системи;

- рухома фаза: Розчин рН 2,7 : ацетонітрил Р (50:50). Для усіх середовищ розчинення окрім ацетатного буферного розчину рН 4.5 вміст ацетонітрилу може бути збільшений до 80 %;

- швидкість рухомої фази 1,2 мл/хв;

- детектування за довжини хвилі 210 нм;

- температура колонки 45 °С;

- об'єм інжекції 3 мкл.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються такі умови:

- Коефіцієнт симетрії піків раміприлу та гідрохлортіазиду, з хроматограми розчину порівняння, має бути в межах від 0.8 до 1.8;

- Розділення між піками раміприлу та гідрохлортіазиду має бути не менше 2,0;

- Відносне стандартне відхилення площ піків раміприлу або гідрохлортіазиду для 3-х паралельних інжекцій становить не більше 2.0 %.

Метод 2.

- Хроматографічна колонка Inertsil ODS розміром 4.6 мм x 150 мм, з розміром часток 3 мкм, або аналогічна колонка для якої виконуються умови придатності хроматографічної системи;

- рухома фаза А: Розчин рН 2.7;

- рухома фаза Б: Ацетонітрил Р;

- режим елюювання градієнтний представлений за програмою в таблиці

2.12.

Таблиця 2.12 – Градієнтне елюювання

Час хроматографування, хв	Рухома фаза А, %	Рухома фаза Б, %
0	70.0	30.0
1.5	70.0	30.0
2.5	30.0	70.0
3.0	30.0	70.0
3.1	70.0	30.0
4.5	70.0	30.0

- швидкість рухомої фази 1.4 мл/хв;
- детектування за довжини хвилі 210 нм;
- температура колонки 45 °С;
- об'єм інжекції 3 мкл.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються такі умови:

- Коефіцієнт симетрії піків раміприлу та гідрохлортіазиду, з хроматограми розчину порівняння, має бути в межах від 0.8 до 1.8;
- Відносне стандартне відхилення площ піків раміприлу або гідрохлортіазиду для 3-х паралельних інжекцій становить не більше 2.0 %.

РОЗДІЛ 3

РОЗРОБКА МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

ТАБЛЕТОК РАМИПРИЛУ

Першим кроком у розробці методик контролю якості таблеток раміприлу є розробка ВЕРХ методик для рутинного застосування у лабораторіях з контролю якості при проведенні тестів «Кількісне визначення», «Супровідні домішки», «Розчинення», «Однорідність дозованих одиниць».

3.1 Розробка та валідація методики визначення супровідних домішок раміприлу в таблетках методом рідинної хроматографії

Для визначення супровідних домішок раміприлу у таблетках перед нами постало завдання в розробці правильної, прецизійної, простої та «зеленої» ВЕРХ методики. Для розділення на етапі аналітичної розробки використовували колонки Inertsil ODS-3 (4.6 мм x 150 мм, 3 мкм) і Acclaim 120 C18 (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм). На рис. 3.1 представлено апробовану колонку розміром 4.6 мм x 150 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії Р з розміром часток 3 мкм Inertsil ODS-3.

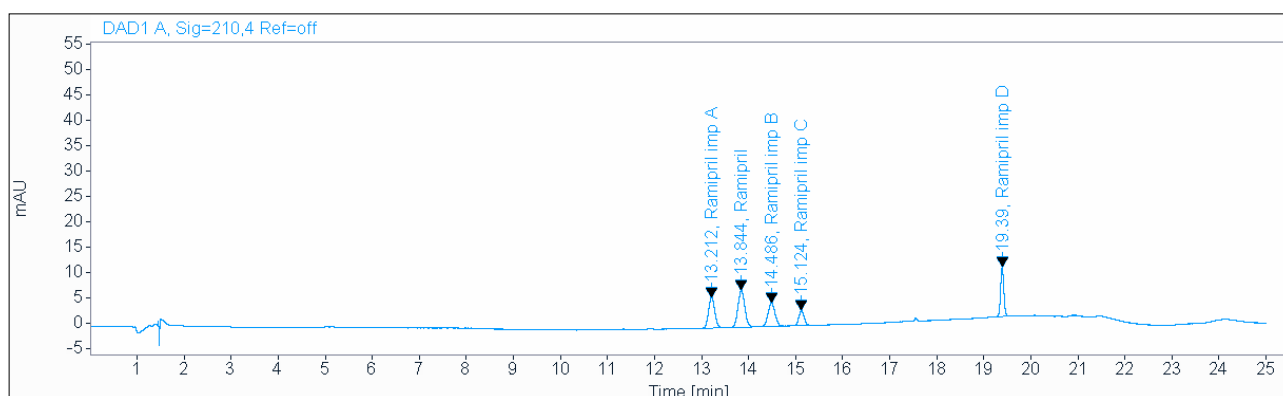


Рисунок 3.1 – Типова хроматограма, отримана при хроматографуванні розчину порівняння (а) (колонка Inertsil ODS-3 (4.6 x 150 мм, 3 мкм))

Загальний час роботи становив близько 25 хв. Об'єм інжекції складав 20 мкл. Колонка Inertsil ODS-3 (150 мм x 4.6 мм, 3 мкм) – октадецилсилільна колонка, що складається з 450 м²/грам частинок, пор 100 Å і 15 % вмісту вуглецю. Оптимальною довжиною хвилі детектування була 210 нм. Вплив швидкості потоку рухомої фази досліджували, використовуючи значення 0.5-1.5 мл/хв. Встановлено, що швидкість потоку 1.5 мл/хв була оптимальною для досягнення відмінного розділення за короткий час аналізу.

Використання іон-парних реагентів є відомим підходом у розробці ВЕРХ методик, який дозволяє розділяти іонні та високополярні речовини на колонках ВЕРХ з оберненою фазою [37]. Враховуючи попередній досвід нашої наукової групи, ми вирішили застосувати натрію гексансульфонат. Використання градієнтного елюювання дозволило розділити домішки раміприлу. Результати ідентифікації піку з розрахованим значенням МКВ наведено в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 – Ідентифікація піків (розчин порівняння (а))

Пік	RT, хв	RRT	МКВ, %
Домішка А	13.2	0.96	0.09
Раміприл	13.8	1.00	N/A
Домішка В	14.5	1.05	0.11
Домішка С	15.1	1.11	0.21
Домішка D	19.4	1.40	0.09

Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються наступні вимоги:

- розчин порівняння (а)
- коефіцієнт розділення між піками раміприлу домішки А і раміприлом має бути не менше 1.5;
- коефіцієнт розділення між піками раміприлу і раміприлу домішки В має бути не менше 1.5.

У розрахунок не включають піки з відносним часом утримування до 0.2 (піки плацебо і рухомої фази) та піки наявні на хроматограмі розчинника.

МКВ неідентифікованих домішок – 0.09 %.

Вміст домішок (X_i) в таблетці, у відсотках, обчислюють за формулою (3.1):

$$X_{1i} = \frac{S_{1i} \cdot k \cdot m_0 \cdot DF_0 \cdot P_0 \cdot (100 - W_0) \cdot b \cdot 100}{S_0 \cdot m_1 \cdot DF_1 \cdot X_4 \cdot 100 \cdot 100} \quad (3.1)$$

де: S_{1i} – середнє значення площ піків піку відповідної домішки з хроматограми випробовуваного розчину;

S_0 – площа піку раміприлу з хроматограми розчину порівняння (b);

m_0 – маса наважки раміприлу, взята для приготування розчину порівняння (a) приготованого в розділі «Кількісне визначення. Метод 2», мг;

m_1 – маса наважки препарату, взята для приготування випробовуваного розчину, г;

DF_0 – коефіцієнт розведення розчину порівняння (b);

DF_1 – коефіцієнт розведення випробовуваного розчину;

P_0 – вміст основної речовини в RS раміприлу, %;

W_0 – вміст води в RS раміприлу, %;

b – середня маса таблеток, взятих для приготування випробовуваного розчину, г;

X_4 – вміст раміприлу у 1 таблетці, розрахований у розділі «Кількісне визначення», мг/таблетка;

k – поправковий коефіцієнт (для домішки С становить 2,5, для інших домішок 1).

Нормування на момент випуску:

- домішки A, B, C: не більше 0.5 % кожної;

- сума домішок D і E: не більше 0.5 %;

- будь-якої домішки: не більше 0.2 %;

- сума домішок: не більше 1.0 %.

Нормування протягом терміну придатності:

- домішки A, B, C: не більше 0.5 % кожної;

- сума домішок D і E: не більше 5.0 %;

- будь-якої домішки: не більше 0.5 %;
- сума домішок: не більше 5.0 %.

Для підтвердження ефективності методики досліджували наступні параметри: специфічність, лінійність в діапазоні застосування, правильність, прецизійність, МВ та МКВ [38].

Різницю між часами утримування для піків раміприлу на хроматограмах розчину порівняння та випробуваного розчину розраховували за формулою (3.2):

$$\Delta_{RT} = \frac{|RT_{RS} - RT_{TS}|}{RT_{RS}} \cdot 100\% \quad (3.2)$$

де: RT_{RS} – час виходу піку домішки А (В, С, або D) раміприлу на хроматограмі розчину порівняння;

RT_{TS} – час виходу піку домішки А (В, С, або D) раміприлу на хроматограмі випробуваного розчину;

Дані щодо розрахунку різниці між часами утримування наведено у таблиці 3.2.

Таблиця 3.2 – Результати розрахунку різниці між часами утримування

Препарат	RT, хв		Δ_{RT} , %
	Розчин порівняння	Модельний розчин P10	
Раміприлу домішка А			
Рамізес, таблетки 2.5 мг	13.209	13.194	0.11
Рамізес, таблетки 5 мг		13.198	0.08
Рамізес, таблетки 10 мг		13.201	0.06
Раміприлу домішка В			
Рамізес, таблетки 2.5 мг	14.482	14.462	0.14
Рамізес, таблетки 5 мг		14.464	0.12
Рамізес, таблетки 10 мг		14.466	0.11
Раміприлу домішка С			
Рамізес, таблетки 2.5 мг	15.118	15.093	0.17
Рамізес, таблетки 5 мг		15.096	0.15
Рамізес, таблетки 10 мг		15.097	0.14
Раміприлу домішка D			
Рамізес, таблетки 2.5 мг	19.390	19.432	0.22
Рамізес, таблетки 5 мг		19.434	0.23
Рамізес, таблетки 10 мг		19.438	0.25

Значення концентрації у нормалізованих координатах розраховували за формулою (3.3):

$$x_i = \frac{C_i}{C_{ref}} \quad (3.3)$$

Значення відгуку приладу у нормалізованих координатах розраховували за формулою (3.4):

$$y_i = \frac{S_i}{S_{ref}} \quad (3.4)$$

Відношення «знайдено/введено розраховували за формулою (3.5):

$$z_i = \frac{y_i}{x_i} \quad (3.5)$$

Отримані значення наведено у таблиці 3.3. Розрахунки параметрів лінійної регресії наведено у таблиці 3.4. Відмінна лінійність методик аналізу домішок раміприлу підтверджується RSD, які були нижчим за 7.0 % (2.2 %, 2.0 %, 2.3 %, 1.8 %), а отриманий коефіцієнт кореляції був майже ідеальним (табл. 3.3, 3.4).

Таблиця 3.3 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії

Пара-метр	Модельний розчин								
	L 1	L 2	L 3	L 4	L 5	L 6	L 7	L 8	L 9
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Раміприлу домішка А									
$x_i, \%$	11.40	22.80	68.40	114.00	159.60	205.20	228.00	250.80	273.60
$y_i, \%$	11.53	23.28	71.28	114.00	161.48	202.53	231.69	264.45	271.57
$z_i, \%$	101.14	102.11	104.20	100.00	101.18	98.70	101.62	105.44	99.26
Раміприлу домішка В									
$x_i, \%$	10.55	21.10	63.30	105.50	147.70	189.90	211.00	232.10	253.20
$y_i, \%$	10.93	21.85	63.82	105.50	145.34	189.15	211.15	238.47	250.51
$z_i, \%$	10.55	21.10	63.30	105.50	147.70	189.90	211.00	232.10	253.20
Раміприлу домішка С									
$x_i, \%$	12.05	24.10	72.30	120.50	168.70	216.90	241.00	265.10	289.20
$y_i, \%$	12.30	24.99	74.00	120.50	170.50	212.66	241.69	277.75	283.89
$z_i, \%$	12.05	24.10	72.30	120.50	168.70	216.90	241.00	265.10	289.20
Раміприлу домішка D									
$x_i, \%$	10.10	20.20	60.60	101.00	141.40	181.80	202.00	222.20	242.40
$y_i, \%$	9.82	20.79	62.02	101.00	140.14	185.34	205.45	224.48	245.69
$z_i, \%$	97.23	102.93	102.35	100.00	99.11	101.95	101.71	101.03	101.36

Продовження таблиці 3.3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Раміприл (вміст неідентифікованих домішок)									
$x_i, \%$	10.10	20.19	60.57	100.95	201.90	504.75	807.60	1009.5 0	1211.4 0
$y_i, \%$	10.20	20.23	61.76	100.95	203.50	505.22	826.28	1050.4 5	1206.8 6
$z_i, \%$	101.08	100.20	101.96	100.00	100.79	100.09	102.31	104.06	99.62

Таблиця 3.4 – Параметри лінійної регресії для раміприлу

Параметр	Раміприлу домішка А	Раміприлу домішка В	Раміприлу домішка С	Раміприлу домішка D	Раміприл
$ a $	0.10	0.13	0.59	0.38	0.05
b	1.01	1.00	1.00	1.01	1.02
r	0.9989	0.9996	0.9988	0.9999	0.9996
Z_{\max}	105.4	103.6	104.8	102.9	104.1
Z_{\min}	98.7	98.4	98.0	97.2	99.9
RSD_Z	2.16	1.95	2.28	1.78	1.41

Відхилення середнього значення «знайдено/введено» від 100 % розраховували за рівнянням (3.6):

$$\delta = |\bar{z} - 100| \quad (3.6)$$

Максимально припустиме значення відхилення «знайдено/введено» від 100 % розраховували за рівнянням (3.7):

$$\delta_{\max} = 0,32 \cdot \Delta_{As} \quad (3.7)$$

Довірчий інтервал розкиду значень «знайдено/введено» розраховували за рівнянням (3.8):

$$\Delta_z = S_z \cdot t(95\%, m - 1) \quad (3.8)$$

де: S_z - стандартне відхилення відношень «знайдено/введено» для всіх розчинів,
 $t(95\%, m - 1)$ – односторонній коефіцієнт Стьюдента для імовірності 95 % (для та степені свободи 9-1=8 становить 1,8595).

Результати проведених розрахунків наведено у таблиці 3.5.

Таблиця 3.5 – Розрахунок правильності та прецизійності за калібрувальною кривою

Параметр	Раміприлу домішка А	Раміприлу домішка В	Раміприлу домішка С	Раміприлу домішка D	Раміприл
Z_{cp}	101.52	100.86	101.16	100.85	101.13
δ	1.52	0.86	1.16	0.85	1.12
δ_{max}	1.60				
Δ_{lin}	4.1	3.7	4.3	3.3	2.6
Δ_{max}	5.0				

Концентрацію домішок раміприлу у випробуваних розчинах з добавками розраховували за формулою («знайдено») (3.9):

$$C_m = \frac{C_0 \cdot S_1}{S_0} \quad (3.9)$$

де: C_0 – концентрація домішок раміприлу у розчині порівняння;

S_1 – площі піків домішок раміприлу у випробуваному розчині;

S_0 – площі піків домішок раміприлу у розчині порівняння.

Теоретичну концентрацію домішок раміприлу у випробуваних розчинах з добавками розраховували за формулою («введено») (3.10):

$$C_t = \frac{V \cdot C_{0\ ref}}{20} + C_{m(1-3)} \quad (3.10)$$

де: $C_{m(1-3)}$ – концентрація домішок раміприлу у препараті, визначена у модельних розчинах P1-P3;

V – аліквота вихідного розчину порівняння, яку додано до модельного розчину, мл;

$C_{0\ ref}$ – концентрація домішок раміприлу у вихідному розчині порівняння.

Співвідношення «знайдено»/«введено» (у відсотках) розраховували за формулою (3.11):

$$\Delta_c = \frac{C_m}{C_t} \cdot 100\% \quad (3.11)$$

Результати розрахунків наведено у таблицях 3.6-3.8.

Таблиця 3.6 – Розрахунки для параметру «правильність» для препарату Раміприл, таблетки 2.5 мг

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
Раміприлу домішка А												
C_m , МКГ/МЛ	0.00	0.00	0.00	0.60	0.57	0.59	2.69	2.78	2.72	3.85	3.83	3.81
C_t , МКГ/МЛ				0.57	0.57	0.57	2.85	2.85	2.85	3.71	3.71	3.71
Δ_c , %				105.4	100.7	104.2	94.2	97.5	95.5	104.0	103.4	102.8
RSD, %				2.36			1.70			0.59		
Раміприлу домішка В												
C_m , МКГ/МЛ	0.00	0.00	0.00	0.55	0.53	0.55	2.64	2.73	2.69	3.45	3.47	3.41
C_t , МКГ/МЛ				0.53	0.53	0.53	2.64	2.64	2.64	3.43	3.43	3.43
Δ_c , %				105.0	99.9	105.1	100.2	103.6	101.8	100.5	101.1	99.5
RSD, %				2.89			1.66			0.80		
Раміприлу домішка С												
C_m , МКГ/МЛ	0.00	0.00	0.00	0.62	0.63	0.63	2.88	2.96	2.92	3.99	3.81	3.83
C_t , МКГ/МЛ				0.60	0.60	0.60	3.01	3.01	3.01	3.92	3.92	3.92
Δ_c , %				103.2	104.2	105.1	95.7	98.1	96.8	101.9	97.4	97.8
RSD, %				0.90			1.25			2.52		
Раміприлу домішка D												
C_m , МКГ/МЛ	1.885	1.912	1.860	2.41	2.46	2.43	4.23	4.36	4.28	5.24	5.05	5.00
C_t , МКГ/МЛ	1.886			2.39	2.39	2.39	4.41	4.41	4.41	5.17	5.17	5.17
Δ_c , %	100.0	101.4	98.6	101.0	103.1	101.8	96.0	98.8	97.1	101.3	97.7	96.8
RSD, %	1.37			1.03			1.47			2.44		

Таблиця 3.7 – Розрахунки для параметру «правильність» для препарату Раміприл, таблетки 5 мг

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
Раміприлу домішка А												
C_m , МКГ/МЛ	0.00	0.00	0.00	0.57	0.59	0.57	2.67	2.71	2.74	3.49	3.55	3.56
C_t , МКГ/МЛ				0.57	0.57	0.57	2.85	2.85	2.85	3.71	3.71	3.71
Δ_c , %				100.6	104.0	99.3	93.9	95.2	96.1	94.1	95.9	96.0
RSD, %				2.40			1.20			1.12		
Раміприлу домішка В												
C_m , МКГ/МЛ	0.00	0.00	0.00	0.53	0.53	0.52	2.61	2.61	2.64	3.39	3.42	3.47
C_t , МКГ/МЛ				0.53	0.53	0.53	2.64	2.64	2.64	3.43	3.43	3.43
Δ_c , %				100.3	99.7	98.6	98.8	98.9	100.1	98.9	99.8	101.3
RSD, %				0.86			0.72			1.21		
Раміприлу домішка С												
C_m , МКГ/МЛ	0.00	0.00	0.00	0.62	0.61	0.61	2.94	2.86	2.91	3.76	3.79	3.82
C_t , МКГ/МЛ				0.60	0.60	0.60	3.01	3.01	3.01	3.92	3.92	3.92
Δ_c , %				102.5	101.8	100.5	97.6	95.1	96.5	96.0	96.8	97.5
RSD, %				0.99			1.33			0.78		
Раміприлу домішка D												
C_m , МКГ/МЛ	1.527	1.501	1.562	2.12	2.11	2.08	3.89	3.90	3.94	4.67	4.72	4.78
C_t , МКГ/МЛ	1.530			2.03	2.03	2.03	4.05	4.05	4.05	4.81	4.81	4.81
Δ_c , %	99.8	98.1	102.1	104.4	103.6	102.4	96.0	96.1	97.1	97.1	98.0	99.3
RSD, %	1.99			0.95			0.64			1.13		

Таблиця 3.8 – Розрахунки для параметру «правильність» для препарату Раміприл, таблетки 10 мг

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
Раміприлу домішка А												
C _m , МКГ/МЛ	0.00	0.00	0.00	0.59	0.56	0.58	2.76	2.76	2.93	3.74	3.55	3.54
C _t , МКГ/МЛ				0.57	0.57	0.57	2.85	2.85	2.85	3.71	3.71	3.71
Δ _c , %				102.6	98.0	102.4	96.8	96.8	102.7	100.9	95.8	95.5
RSD, %				2.61			3.49			3.15		
Раміприлу домішка В												
C _m , МКГ/МЛ	0.00	0.00	0.00	0.53	0.55	0.55	2.61	2.64	2.60	3.30	3.34	3.35
C _t , МКГ/МЛ				0.53	0.53	0.53	2.64	2.64	2.64	3.43	3.43	3.43
Δ _c , %				100.1	104.5	103.6	99.1	100.0	98.8	96.4	97.4	97.8
RSD, %				2.31			0.64			0.74		
Раміприлу домішка С												
C _m , МКГ/МЛ	0.00	0.00	0.00	0.61	0.62	0.61	2.95	3.01	3.18	4.04	3.89	3.89
C _t , МКГ/МЛ				0.60	0.60	0.60	3.01	3.01	3.01	3.92	3.92	3.92
Δ _c , %				100.7	102.6	101.3	97.9	100.0	105.7	103.2	99.4	99.3
RSD, %				0.96			4.01			2.23		
Раміприлу домішка D												
C _m , МКГ/МЛ	1.407	1.323	1.333	1.83	1.97	1.85	3.80	3.82	3.88	4.57	4.54	4.52
C _t , МКГ/МЛ	1.3542			1.86	1.86	1.86	3.88	3.88	3.88	4.64	4.64	4.64
Δ _c , %	103.9	97.7	98.4	98.6	105.7	99.4	98.0	98.4	99.9	98.7	97.9	97.4
RSD, %	3.40			3.84			1.02			0.65		

Розрахунок вмісту раміприлу домішки D у препаратах «Раміприл, таблетки 2,5 мг», «Раміприл, таблетки 5 мг», «Раміприл, таблетки 10 мг» проводили за формулою (3.12):

$$C_m = \frac{c_0 \cdot S_1}{S_0} \quad (3.12)$$

Результати розрахунків для параметру «прецизійність» наведено у таблиці 3.9.

Таблиця 3.9 – Результати розрахунків для параметру «прецизійність»

	X ₁ , МКГ/МЛ	X ₂ , МКГ/МЛ	X ₃ , МКГ/МЛ	X ₄ , МКГ/МЛ	X ₅ , МКГ/МЛ	X ₆ , МКГ/МЛ	X _{ср} , МКГ/МЛ	RSD, %	RSD _{imp} , %	Δ, %
2.5 мг	0.364	0.366	0.368	0.363			0.365	0.55	3.11	3.14
	0.368	0.397	0.384	0.364	0.371		0.377	3.64		
5 мг	0.292	0.303	0.293	0.300	0.300	0.299	0.298	1.53	3.72	1.88
	0.292	0.334	0.303	0.302	0.295	0.296	0.304	5.05		
10 мг	0.259	0.261	0.255	0.258	0.254	0.255	0.257	1.04	2.36	1.97
	0.260	0.272	0.257	0.272	0.255	0.257	0.262	2.95		

Розрахунок МВ / МКВ проводили за співвідношенням сигнал / шум за формулами (3.13), (3.14):

$$LOD = \frac{C \cdot 3,3}{S/N} \quad (3.13)$$

$$LOQ = \frac{C \cdot 10}{S/N} \quad (3.14)$$

де: C – концентрація домішок раміприлу у модельному розчині;

S/N – співвідношення сигнал / шум з хроматограми модельного розчину.

Розрахунки наведено у таблиці 3.10.

Для встановлення необхідності введення коефіцієнту перерахунку розраховували фактори відгуку домішок за формулою (3.15):

$$RF_i = \frac{S_i}{C_i} \quad (3.15)$$

де: S_i – середнє значення площі піку домішки (раміприлу);

C_i – концентрація домішки (раміприлу) у розчині, мкг/мл.

Результати розрахунків наведено у таблиці 3.11.

Таблиця 3.10 – Розрахунок МВ / МКВ за співвідношенням S/N

Параметр	Роз-чин	X, %	S/N	МВ, мкг/мл	МКВ, мкг/мл	МВ, %	МКВ, %
Раміприлу домішка А	L1	0.057	6.57	0.143	0.434	0.029	0.087
	L2	0.114	12.43	0.151	0.458	0.030	0.092
	L3	0.342	4.73	0.139	0.420	0.028	0.084
Раміприлу домішка В	L1	0.053	4.77	0.183	0.553	0.037	0.111
	L2	0.106	9.83	0.177	0.536	0.035	0.107
	L3	0.317	30.80	0.170	0.514	0.034	0.103
Раміприлу домішка С	L1	0.060	3.53	0.281	0.853	0.056	0.171
	L2	0.121	6.33	0.314	0.951	0.063	0.190
	L3	0.362	17.00	0.351	1.063	0.070	0.213
Раміприлу домішка D	L1	0.051	5.57	0.150	0.454	0.030	0.091
	L2	0.101	13.97	0.119	0.362	0.024	0.072
	L3	0.303	40.40	0.124	0.375	0.025	0.075
Неіденти- фікована домішка	L1	0.050	8.00	0.104	0.315	0.021	0.063
	L2	0.101	12.07	0.138	0.418	0.028	0.084
	L3	0.303	35.03	0.143	0.432	0.029	0.086

Таблиця 3.11 – Розрахунок факторів відгуку

Аналіт	Фактор відгуку для модельного розчину								
	L 1	L 2	L 3	L 4	L 5	L 6	L 7	L 8	L 9
Домішка А	14.34	14.48	14.78	14.18	14.35	14.00	14.41	14.95	14.07
Домішка В	14.03	14.03	13.66	13.54	13.33	13.49	13.55	13.92	13.40
Домішка С	5.88	5.97	5.89	5.76	5.82	5.65	5.77	6.03	5.65
Домішка D	12.52	13.25	13.18	12.88	12.76	13.13	13.10	13.01	13.05
Раміприл	14.58	14.45	14.70	14.42	14.54	14.44	14.76	15.01	14.37

Коефіцієнт перерахунку розраховували за формулою (3.16):

$$k_i = \frac{RF_{r-l}}{RF_{imp_i}} \quad (3.16)$$

де: RF_{r-l} – фактор відгуку для раміприлу;

RF_{imp_i} – фактор відгуку для домішки.

Результати розрахунків наведено у таблиці 3.12.

МВ методики визначення домішки А раміприлу становила ~ 0.030 %, домішки В – ~ 0.037 %, домішки С – ~ 0.070 %, домішки D – ~ 0.030 % (критерій прийнятності $МВ \leq 0.15$ %). МКВ методики визначення домішки А раміприлу становила ~ 0.092 %, домішки В – ~ 0.107 %, домішки С – ~ 0.213 %, домішки D – ~ 0.091 % (критерій прийнятності $МКВ \leq 0.25$ %).

Таблиця 3.12 – Визначення коефіцієнтів перерахунку

Аналіт	Коефіцієнт перерахунку для кожного модельного розчину									Середнє значення
	L 1	L 2	L 3	L 4	L 5	L 6	L 7	L 8	L 9	
Домішка А	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.01
Домішка В	1.0	1.0	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.07
Домішка С	2.5	2.4	2.5	2.5	2.5	2.6	2.6	2.5	2.5	2.50
Домішка D	1.2	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.2	1.1	1.12

Розрахунок коефіцієнта перерахунку для домішки А склав 1.01, домішки В – 1.07, домішки С – 2.50, домішки D – 1.12 (критерії прийнятності – $0.8 \leq k \leq 1.2$). Для розрахунку вмісту домішки С необхідно площу піку домішки С помножити на поправочний коефіцієнт (2.5). Для розрахунку вмісту інших зазначених домішок поправочний коефіцієнт можна не застосовувати.

Підсумовуючи вищеописані розрахунки у розділі 3.1, ми угавальними результати дослідження у таблиці 3.13.

Проведено вивчення «зеленості» запропонованої ВЕРХ методики визначення супровідних домішок раміприлу в таблетках інструментами AGREE та GAPI. Піктограми «зеленості» представлено на рисунку 3.2.

Як показано на рисунку 3.2, оцінка інструментом AGREE, розроблена ВЕРХ методика перевершує за балом екологічної безпеки описану в науковій літературі ВЕРХ методику Dai S.Y. *et al.* [14]. Таким чином, запропонований підхід має низький екологічний вплив відповідно до вищезазначених показників оцінки «зеленості».

Таблиця 3.13 – Результати проведеної валідації ВЕРХ методики визначення супровідних домішок раміприлу в таблетках

Дослідження	Параметр	Критерій прийнятності	Оцінка параметру	Відповідність
1	2	3	4	5
Специфічність (Раміприл, таблетки 2.5 мг)	Чистота піку раміприлу, розрахована для піків випробуваного розчину	$PF_{TS} \geq 990$	≥ 999.953	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Різниця часів виходу раміприлу домішки А на хроматограмі розчину порівняння та випробуваного розчину	$\Delta_{RT} \leq 2.0 \%$	0.11 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Різниця часів виходу раміприлу домішки В на хроматограмі розчину порівняння та випробуваного розчину	$\Delta_{RT} \leq 2.0 \%$	0.14 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Різниця часів виходу раміприлу домішки С на хроматограмі розчину порівняння та випробуваного розчину	$\Delta_{RT} \leq 2.0 \%$	0.17 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Різниця часів виходу раміприлу домішки D на хроматограмі розчину порівняння та випробуваного розчину	$\Delta_{RT} \leq 2.0 \%$	0.22 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Коефіцієнт розділення між піком раміприлу та найближчого до нього піку	$R_s \geq 1.5$	2.22	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Специфічність (Раміприл, таблетки 5 мг)	Чистота піку раміприлу, розрахована для піків випробуваного розчину	$PF_{TS} \geq 990$	≥ 999.953	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Різниця часів виходу раміприлу домішки А на хроматограмі розчину порівняння та випробуваного розчину	$\Delta_{RT} \leq 2.0 \%$	0.08 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Різниця часів виходу раміприлу домішки В на хроматограмі розчину порівняння та випробуваного розчину	$\Delta_{RT} \leq 2.0 \%$	0.12 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Різниця часів виходу раміприлу домішки С на хроматограмі розчину порівняння та випробуваного розчину	$\Delta_{RT} \leq 2.0 \%$	0.15 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Різниця часів виходу раміприлу домішки D на хроматограмі розчину порівняння та випробуваного розчину	$\Delta_{RT} \leq 2.0 \%$	0.23 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Коефіцієнт розділення між піком раміприлу та найближчого до нього піку	$R_s \geq 1.5$	2.24	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Специфічність (Раміприл, таблетки 10 мг)	Чистота піку раміприлу, розрахована для піків випробуваного розчину	$PF_{TS} \geq 99$	≤ 999.935	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Різниця часів виходу раміприлу домішки А на хроматограмі розчину порівняння та випробуваного розчину	$\Delta_{RT} \leq 2.0 \%$	0.06 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає

Продовження таблиці 3.13

1	2	3	4	5
	Різниця часів виходу раміприлу домішки В на хроматограмі розчину порівняння та випробуваного розчину	$\Delta_{RT} \leq 2.0 \%$	0.11 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Різниця часів виходу раміприлу домішки С на хроматограмі розчину порівняння та випробуваного розчину	$\Delta_{RT} \leq 2.0 \%$	0.14 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Різниця часів виходу раміприлу домішки D на хроматограмі розчину порівняння та випробуваного розчину	$\Delta_{RT} \leq 2.0 \%$	0.25 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Коефіцієнт розділення між піком раміприлу та найближчого до нього піку	$R_s \geq 1.5$	2.1	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Лінійність	Діапазон застосування (50 % від межі специфікації для неідентифікованої домішки – 120 % від межі специфікації суми домішок D та E)	1.25 мкг/мл – 25.00 мкг/мл	0.25 мкг/мл – 30.29 мкг/мл	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Вільний член рівняння регресії (домішка раміприлу А)	$ a \leq 5.0$	0.1	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Вільний член рівняння регресії (домішка раміприлу В)	$ a \leq 5.0$	0.1	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Вільний член рівняння регресії (домішка раміприлу С)	$ a \leq 5.0$	0.6	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Вільний член рівняння регресії (домішка раміприлу D)	$ a \leq 5.0$	0.4	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Вільний член рівняння регресії (раміприл)	$ a \leq 5.0$	0.1	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Коефіцієнт кореляції (домішка раміприлу А)	$r \geq 0.990$	0.9989	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Коефіцієнт кореляції (домішка раміприлу В)	$r \geq 0.990$	0.9996	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Коефіцієнт кореляції (домішка раміприлу С)	$r \geq 0.990$	0.9988	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Коефіцієнт кореляції (домішка раміприлу D)	$r \geq 0.990$	0.9999	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Коефіцієнт кореляції (раміприл)	$r \geq 0.990$	0.9996	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає

Продовження таблиці 3.13

1	2	3	4	5
	Фактор відгуку індивідуального концентраційного рівня, у % до фактору відгуку цільової концентрації (домішка раміприлу А)	$93.0\% \leq Z \leq 107.0\%$	98.7 % – 105.4 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Фактор відгуку індивідуального концентраційного рівня, у % до фактору відгуку цільової концентрації (домішка раміприлу В)	$93.0\% \leq Z \leq 107.0\%$	98.4 % – 103.6 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Фактор відгуку індивідуального концентраційного рівня, у % до фактору відгуку цільової концентрації (домішка раміприлу С)	$93.0\% \leq Z \leq 107.0\%$	98.0 % – 104.8 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Фактор відгуку індивідуального концентраційного рівня, у % до фактору відгуку цільової концентрації (домішка раміприлу D)	$93.0\% \leq Z \leq 107.0\%$	97.2 % – 102.9 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Фактор відгуку індивідуального концентраційного рівня, у % до фактору відгуку цільової концентрації (раміприл)	$93.0\% \leq Z \leq 107.0\%$	99.9 % – 104.1 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Відносне стандартне відхилення факторів відгуку (домішка раміприлу А)	$RSD \leq 7.0\%$	2.2 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Відносне стандартне відхилення факторів відгуку (домішка раміприлу В)	$RSD \leq 7.0\%$	2.0 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Відносне стандартне відхилення факторів відгуку (домішка раміприлу С)	$RSD \leq 7.0\%$	2.3 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Відносне стандартне відхилення факторів відгуку (домішка раміприлу D)	$RSD \leq 7.0\%$	1.8 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Відносне стандартне відхилення факторів відгуку (раміприл)	$RSD \leq 7.0\%$	1.4 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Правильність (за калібрувальною кривою)	Відхилення середнього значення «знайдено/введено» (домішка раміприлу А)	$\delta \leq 1.60\%$	1.52 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Відхилення середнього значення «знайдено/введено» (домішка раміприлу В)	$\delta \leq 1.60\%$	0.86 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Відхилення середнього значення «знайдено/введено» (домішка раміприлу С)	$\delta \leq 1.60\%$	1.16 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Відхилення середнього значення «знайдено/введено» (домішка раміприлу D)	$\delta \leq 1.60\%$	0.85 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Відхилення середнього значення «знайдено/введено» (раміприл)	$\delta \leq 1.60\%$	1.12 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає

Продовження таблиці 3.13

1	2	3	4	5
Правильність (Раміприл, таблетки 2.5 мг)	Вміст в пробах з добавкою (домішка раміприлу А)	$80.0 \% \leq Z \leq 120.0 \%$	94.2 % – 105.4 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Вміст в пробах з добавкою (домішка раміприлу В)	$80.0 \% \leq Z \leq 120.0 \%$	99.5 % – 105.1 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Вміст в пробах з добавкою (домішка раміприлу С)	$80.0 \% \leq Z \leq 120.0 \%$	95.7 % – 105.1 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Вміст в пробах з добавкою (домішка раміприлу D)	$80.0 \% \leq Z \leq 120.0 \%$	96.0 % – 103.1 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Стандартне відхилення знайденого вмісту для кожного концентраційного рівня (домішка раміприлу А)	$RSD \leq 15.0 \%$	2.4 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Стандартне відхилення знайденого вмісту для кожного концентраційного рівня (домішка раміприлу В)	$RSD \leq 15.0 \%$	2.9 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Стандартне відхилення знайденого вмісту для кожного концентраційного рівня (домішка раміприлу С)	$RSD \leq 15.0 \%$	2.5 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Стандартне відхилення знайденого вмісту для кожного концентраційного рівня (домішка раміприлу D)	$RSD \leq 15.0 \%$	2.4 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Правильність (Раміприл, таблетки 5 мг)	Вміст в пробах з добавкою (домішка раміприлу А)	$80.0 \% \leq Z \leq 120.0 \%$	93.9 % – 104.0 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Вміст в пробах з добавкою (домішка раміприлу В)	$80.0 \% \leq Z \leq 120.0 \%$	99.6 % – 101.3 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Вміст в пробах з добавкою (домішка раміприлу С)	$80.0 \% \leq Z \leq 120.0 \%$	95.1 % – 102.5 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Вміст в пробах з добавкою (домішка раміприлу D)	$80.0 \% \leq Z \leq 120.0 \%$	96.0 % – 104.4 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Стандартне відхилення знайденого вмісту для кожного концентраційного рівня (домішка раміприлу А)	$RSD \leq 15.0 \%$	2.4 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Стандартне відхилення знайденого вмісту для кожного концентраційного рівня (домішка раміприлу В)	$RSD \leq 15.0 \%$	1.2 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Стандартне відхилення знайденого вмісту для кожного концентраційного рівня (домішка раміприлу С)	$RSD \leq 15.0 \%$	1.3 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає

Продовження таблиці 3.13

1	2	3	4	5
	Стандартне відхилення знайденого вмісту для кожного концентраційного рівня(домішка раміприлу D)	$RSD \leq 15.0 \%$	2.0 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Правильність (Раміприл, таблетки 10 мг)	Вміст в пробах з добавкою (домішка раміприлу A)	$80.0 \% \leq Z \leq 120.0 \%$	95.5 % – 102.7 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Вміст в пробах з добавкою (домішка раміприлу B)	$80.0 \% \leq Z \leq 120.0 \%$	96.4 % – 104.5 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Вміст в пробах з добавкою (домішка раміприлу C)	$80.0 \% \leq Z \leq 120.0 \%$	97.9 % – 105.7 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Вміст в пробах з добавкою (домішка раміприлу D)	$80.0 \% \leq Z \leq 120.0 \%$	97.4 % – 105.7 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Стандартне відхилення знайденого вмісту для кожного концентраційного рівня (домішка раміприлу A)	$RSD \leq 15.0 \%$	3.5 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Стандартне відхилення знайденого вмісту для кожного концентраційного рівня (домішка раміприлу B)	$RSD \leq 15.0 \%$	2.3 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Стандартне відхилення знайденого вмісту для кожного концентраційного рівня (домішка раміприлу C)	$RSD \leq 15.0 \%$	4.0 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Стандартне відхилення знайденого вмісту для кожного концентраційного рівня(домішка раміприлу D)	$RSD \leq 15.0 \%$	3.8 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Прецизійність (за калібрувальною кривою)	Довірчий інтервал значень «знайдено/введено» (домішка раміприлу A)	$\Delta \leq 5.0 \%$	4.5 %
Довірчий інтервал значень «знайдено/введено» (домішка раміприлу B)		$\Delta \leq 5.0 \%$	3.7 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Довірчий інтервал значень «знайдено/введено» (домішка раміприлу C)		$\Delta \leq 5.0 \%$	4.3 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Довірчий інтервал значень «знайдено/введено» (домішка раміприлу D)		$\Delta \leq 5.0 \%$	4.2 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Довірчий інтервал значень «знайдено/введено» (раміприл)		$\Delta \leq 5.0 \%$	3.8 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Прецизійність (Раміприл, таблетки 2.5 мг)	Стандартне відхилення знайденого вмісту між пробами приготованими одним аналітиком	$RSD \leq 15.0 \%$	$\leq 3.6 \%$	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Стандартне відхилення знайденого вмісту між пробами приготованими двома аналітиками	$RSD_{imp} \leq 15.0 \%$	3.1 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає

Продовження таблиці 3.13

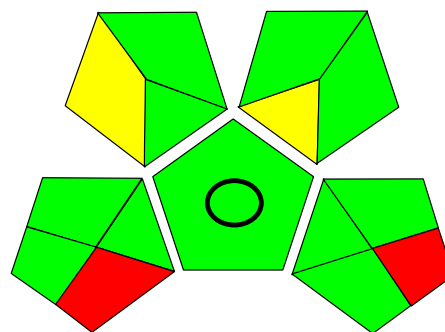
1	2	3	4	5
	Різниця між вмістом отриманим за результатами двох операторів	$\Delta \leq 20.0 \%$	3.1 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Прецизійність (Раміприл, таблетки 5 мг)	Стандартне відхилення знайденого вмісту між пробами приготованими одним аналітиком	$RSD \leq 15.0 \%$	$\leq 5.1 \%$	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Стандартне відхилення знайденого вмісту між пробами приготованими двома аналітиками	$RSD_{imp} \leq 15.0 \%$	3.7 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Різниця між вмістом отриманим за результатами двох операторів	$\Delta \leq 20.0 \%$	1.9 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Прецизійність (Раміприл, таблетки 10 мг)	Стандартне відхилення знайденого вмісту між пробами приготованими одним аналітиком	$RSD \leq 15.0 \%$	$\leq 2.9 \%$	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Стандартне відхилення знайденого вмісту між пробами приготованими двома аналітиками	$RSD_{imp} \leq 15.0 \%$	2.4 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Різниця між вмістом отриманим за результатами двох операторів	$\Delta \leq 20.0 \%$	2.0 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
МВ	Розрахункова МВ (домішка раміприлу А)	$LOD \leq 0.15 \%$	0.03 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Розрахункова МВ (домішка раміприлу В)	$LOD \leq 0.15 \%$	0.04 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Розрахункова МВ (домішка раміприлу С)	$LOD \leq 0.15 \%$	0.07 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Розрахункова МВ (домішка раміприлу D)	$LOD \leq 0.15 \%$	0.02 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Розрахункова МВ (раміприл)	$LOD \leq 0.15 \%$	0.03 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Співвідношення сигнал / шум для модельного розчину L2 (домішка раміприлу А)	$S/N \geq 3$	≥ 10.9	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Співвідношення сигнал / шум для модельного розчину L2 (домішка раміприлу В)	$S/N \geq 3$	≥ 8.5	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Співвідношення сигнал / шум для модельного розчину L2 (домішка раміприлу С)	$S/N \geq 3$	≥ 5.6	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Співвідношення сигнал / шум для модельного розчину L2 (домішка раміприлу D)	$S/N \geq 3$	≥ 12.7	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає

Продовження таблиці 3.13

1	2	3	4	5
	Співвідношення сигнал / шум для модельного розчину L2 (раміприл)	$S/N \geq 3$	≥ 10.0	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
МКВ	Розрахункова МКВ (домішка раміприлу А)	$LOQ \leq 0.25 \%$	0.09 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Розрахункова МКВ (домішка раміприлу В)	$LOQ \leq 0.25 \%$	0.11 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Розрахункова МКВ (домішка раміприлу С)	$LOQ \leq 0.25 \%$	0.21 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Розрахункова МКВ (домішка раміприлу D)	$LOQ \leq 0.25 \%$	0.09 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Розрахункова МКВ (раміприл)	$LOQ \leq 0.25 \%$	0.09 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Співвідношення сигнал / шум для модельного розчину L3 (домішка раміприлу А)	$S/N \geq 10$	≥ 36.9	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Співвідношення сигнал / шум для модельного розчину L3 (домішка раміприлу В)	$S/N \geq 10$	≥ 28.0	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Співвідношення сигнал / шум для модельного розчину L3 (домішка раміприлу С)	$S/N \geq 10$	≥ 16.1	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Співвідношення сигнал / шум для модельного розчину L3 (домішка раміприлу D)	$S/N \geq 10$	≥ 36.3	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Співвідношення сигнал / шум для модельного розчину L3 (раміприл)	$S/N \geq 10$	≥ 31.7	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Коефіцієнти перерахунку ідентифікованих домішок	Розрахований коефіцієнт перерахунку (домішка раміприлу А)	$0.8 \leq k \leq 1.2$	1.0	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Розрахований коефіцієнт перерахунку (домішка раміприлу В)	$0.8 \leq k \leq 1.2$	1.1	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Розрахований коефіцієнт перерахунку (домішка раміприлу С)	$0.8 \leq k \leq 1.2$	2.5	<input type="checkbox"/> відповідає <input checked="" type="checkbox"/> не відповідає
	Розрахований коефіцієнт перерахунку (домішка раміприлу D)	$0.8 \leq k \leq 1.2$	1.2	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає



А



Б

Рисунок 3.2 – Піктограми «зеленості» розробленої ВЕРХ методики визначення супровідних домішок раміприлу в таблетках інструментами AGREE (А) та GAPI (Б)

Підсумовуючи, під час розробки ВЕРХ методики визначення супровідних домішок ми зосередилися на виборі селективної, простої та «зеленої» рухомої фази та хроматографічної колонки для досягнення експрес-відтворюваних результатів. Колонка Inertsil ODS-3 (150 мм x 4.6 мм, 3 мкм) і Acclaim 120 C18 (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм) досягли відмінного розділення з коротким часом аналізу. Враховуючи досвід нашої дослідницької групи в розробці та валідації аналітичних методів АФІ для рутинного фармацевтичного аналізу, ми обрали ацетонітрил та натрію гексансульфонат як компоненти рухомої фази, що дозволило отримати «зелений» аналіз. Проведено валідацію ВЕРХ методики та описано детально підходи до її проведення, оскільки валідація методики при визначенні супровідних речовин є трудомісткою і часто непростюю. Даних щодо впливу компонентів, що заважають аналізу, не виявлено. Методика була лінійною у діапазоні застосування. Прецизійність та правильність методики була достатньою. ВЕРХ методика забезпечує необхідний рівень виявлення супровідних домішок. МВ неідентифікованих домішок становить 0.03 %. Для розрахунку вмісту домішки С необхідно використовувати коефіцієнт перерахунку 2.5. ВЕРХ методика відповідає встановленим вимогам і може використовуватись для контролю якості препаратів «Раміприл, таблетки 2,5 мг»,

«Раміприл, таблетки 5 мг», «Раміприл, таблетки 10 мг» за показником якості «Супровідні домішки» [39-40].

3.2 Розробка та валідація методики визначення раміприлу в таблетках для проведення кількісного визначення методом рідинної хроматографії

З метою проведення кількісного визначення раміприлу в таблетках ми акцентували увагу на розробці експресної, простої та «зеленої» ВЕРХ методики. Хроматограма за умов проведення кількісного визначення раміприлу в таблетках ізократичним елюювання рухомою фазою, що складалася з 0.2 г/л розчину натрію гексансульфонату (рН 2.7), ацетонітрилу (50:50), на колонці Acclaim 120 C18 (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм) зі швидкістю потоку 1.0 мл/хв представлена на рисунку 3.3.

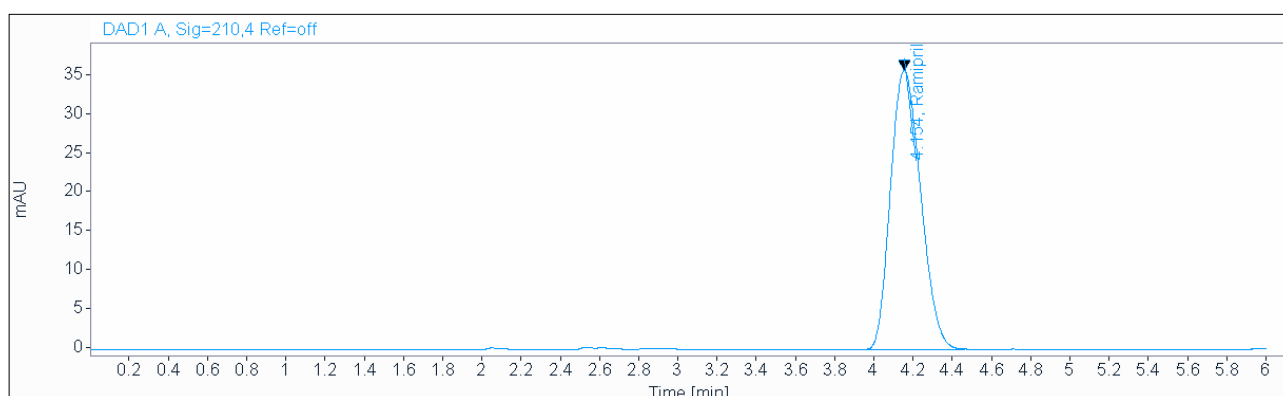


Рисунок 3.3 – Хроматограма за умов проведення кількісного визначення раміприлу в таблетках ізократичним елюювання рухомою фазою, що складалася з 0.2 г/л розчину натрію гексансульфонату (рН 2.7), ацетонітрилу (50:50), на колонці Acclaim 120 C18 (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм) зі швидкістю потоку 1.0 мл/хв

Час утримування становив 4.15 хв. Об'єм інжекції складав 3 мкл. Для розділення використовували колонки Acclaim 120 C18 (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм) або Inertsil ODS-3 (4.6 мм x 150 мм, 3 мкм) або еквівалентні. Експериментальні

дослідження показали, що перша колонка була експреснішою. Оптимальною була довжина хвилі детектування 210 нм. Використовуваний розчинник – рухома фаза А : рухома фаза В (1 : 1). Вплив швидкості потоку рухомої фази вивчали, використовуючи значення 0.5-1.5 мл/хв. Оптимальною була швидкість потоку 1 мл/хв. В процесі аналітичної розробки було протестовано різні пропорції компонентів рухомої фази (рис. 3.4).

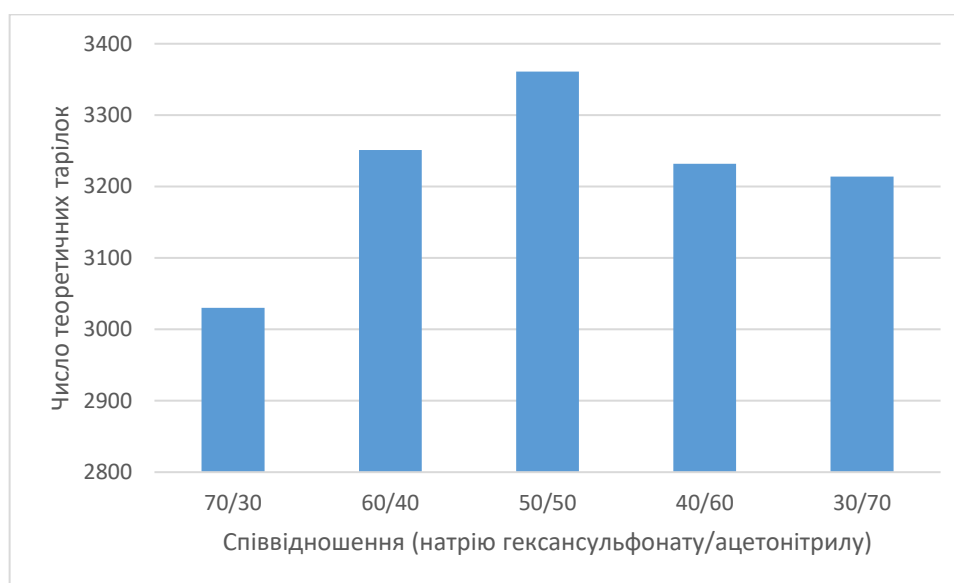


Рисунок 3.4 – Оптимізація складу рухомої фази

Отримані результати (рис. 3.4). показали, що найкращі результати одержано при використанні рухомої фази, що складалася з 0.2 г/л розчину натрію гексансульфонату (рН 2.7) та ацетонітрилу (50:50). При збільшенні відсоткового вмісту ацетонітрилу пік аналіту перешкоджає піку розчинника, тоді як при зниженні відсоткового вмісту ацетонітрилу хвости збільшуються та спостерігається низька кількість теоретичних тарілок.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються наступні вимоги:

- розчин порівняння (b):
 - ефективність хроматографічної колонки, обчислена за піком рампірилу, має бути не менше 2000 теоретичних тарілок

- відносне стандартне відхилення, розраховане для площ піків раміприлу має бути не більше 1.0 %.

Вміст раміприлу (X_4) в одній таблетці, в міліграмах, обчислюють за формулою (3.17):

$$X_4 = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot DF_0 \cdot P_0 \cdot (100 - W_0) \cdot b}{S_0 \cdot m_1 \cdot DF_1 \cdot 100 \cdot 100} \quad (3.17)$$

де: S_{1i} – середнє значення площ піків піку раміприлу з хроматограми випробовуваного розчину;

S_0 – середнє значення площ піків піку раміприлу з хроматограми розчину порівняння (b);

m_0 – маса наважки раміприлу, взята для приготування розчину порівняння (a) приготованого в розділі «Кількісне визначення», мг;

m_1 – маса наважки препарату, взята для приготування випробовуваного розчину, г;

DF_0 – коефіцієнт розведення розчину порівняння (b), приготованого в розділі «Кількісне визначення»;

DF_1 – коефіцієнт розведення випробовуваного розчину;

P_0 – вміст основної речовини в RS раміприлу, %;

W_0 – вміст води в RS раміприлу, %;

b – середня маса таблеток, взятих для приготування випробовуваного розчину, г.

Вміст раміприлу у таблетці має бути від 2.25 мг до 2.63 мг, в перерахуванні на середню масу однієї таблетки 2.5 мг, від 4.5 мг до 5.3 мг, в перерахуванні на середню масу однієї таблетки 5 мг, від 9.0 мг до 10.5 мг, в перерахуванні на середню масу однієї таблетки 10 мг.

Валідацію ВЕРХ методики визначення раміприлу в таблетках трьох різних дозувань проводили відповідно до вимог ДФУ за такими параметрами як специфічність, лінійність, правильність та прецизійність [36]. Робасність вивчали на етапі аналітичної розробки.

Різницю між часами утримування для піків раміприлу на хроматограмах розчину порівняння та випробуваного розчину розраховували за формулою (3.18):

$$\Delta_{RT} = \frac{|RT_{RS} - RT_{TS}|}{RT_{RS}} \cdot 100\% \quad (3.18)$$

де: RT_{RS} – час виходу піку раміприлу на хроматограмі розчину порівняння;

RT_{TS} – час виходу піку раміприлу на хроматограмі випробуваного розчину;

Дані щодо розрахунку різниці між часами утримування наведено у таблиці 3.14.

Таблиця 3.14 – Результати розрахунку різниці між часами утримування

Препарат	RT, хв		Δ_{RT} , %
	Розчин порівняння	Випробуваний розчин	
Раміприл, таблетки 2.5 мг	4.199	4.201	0.05
Раміприл, таблетки 5 мг		4.187	0.29
Раміприл, таблетки 10 мг		4.135	1.52

Значення концентрації у нормалізованих координатах розраховували за формулою (3.19):

$$x_i = \frac{C_i}{C_{ref}} \quad (3.19)$$

Значення відгуку приладу у нормалізованих координатах розраховували за формулою (3.20):

$$y_i = \frac{S_i}{S_{ref}} \quad (3.20)$$

Відношення «знайдено/введено розраховували за формулою (3.21):

$$z_i = \frac{y_i}{x_i} \quad (3.21)$$

Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії наведено у таблиці 3.15. Розрахунки параметрів лінійної регресії представлено в таблиці 3.16.

Таблиця 3.15 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії

Пара-метр	Моделльний розчин						
	L 1	L 2	L 3	L 4	L 5	L 6	L 7
$x_i, \%$	66.03	81.27	91.43	101.59	111.75	121.91	137.15
$y_i, \%$	66.35	81.15	91.23	100.82	111.98	122.09	137.62
$z_i, \%$	100.47	99.85	99.78	99.24	100.21	100.15	100.35

Таблиця 3.16 – Параметри лінійної регресії для раміприлу

Параметр	Раміприл
$ a $	0.45
b	1.00
r	0.9999
Z_{\max}	100.5
Z_{\min}	99.2
RSD_Z	0.42

Коефіцієнт b розраховували за рівнянням (3.22):

$$b = \frac{m \cdot \sum_{i=1}^m x_i y_i - \sum_{i=1}^m x_i \sum_{i=1}^m y_i}{m \cdot \sum_{i=1}^m x_i^2 - (\sum_{i=1}^m x_i)^2} \quad (3.22)$$

де m – кількість модельних розчинів.

Коефіцієнт a розраховували за рівнянням (3.33):

$$a = \frac{\sum_{i=1}^m y_i - b \cdot \sum_{i=1}^m x_i}{m} \quad (3.33)$$

Коефіцієнт кореляції r розрахувати за рівнянням (3.34):

$$r = \frac{m \cdot \sum_{i=1}^m x_i y_i - \sum_{i=1}^m x_i \sum_{i=1}^m y_i}{\sqrt{(m \cdot \sum_{i=1}^m x_i^2 - (\sum_{i=1}^m x_i)^2) \cdot (m \cdot \sum_{i=1}^m y_i^2 - (\sum_{i=1}^m y_i)^2)}} \quad (3.34)$$

Відмінний коефіцієнт кореляції отримано при регресійному аналізі в діапазоні застосування методики 0.066-0.137 мг/мл. Відмінна лінійність методики для аналізу раміприлу була підтверджена RSD отриманих факторів відгуку, який був нижчим за 3% (0.42%), а отриманий коефіцієнт кореляції був майже ідеальним (0.9999).

Відхилення середнього значення «знайдено/введено» від 100 % розраховували за рівнянням (3.35):

$$\delta = |\bar{z} - 100| \quad (3.35)$$

Максимально припустиме значення відхилення «знайдено/введено» від 100 % розраховували за рівнянням (3.36):

$$\delta_{max} = 0,32 \cdot \Delta_{As} \quad (3.36)$$

Довірчий інтервал розкиду значень «знайдено/введено» розраховували за рівнянням (3.37):

$$\Delta_z = S_z \cdot t(95\%, m - 1) \quad (3.37)$$

де: S_z - стандартне відхилення відношень «знайдено/введено» для всіх розчинів;
 $t(95\%, m - 1)$ – односторонній коефіцієнт Стьюдента для імовірності 95% (для та степені свободи $7-1=6$ становить 1.9432).

Результати розрахунку правильності та прецизійності за калібрувальною кривою наведено у таблиці 3.17.

Таблиця 3.17 – Розрахунок правильності та прецизійності за калібрувальною кривою

Параметр	Раміприл
Z_{cp}	100.01 %
δ	0.01 %
δ_{max}	0.51 %
Δ_{lin}	0.82 %
Δ_{max}	1.60 %

Концентрацію раміприлу у випробуваних розчинах з добавками розраховували за формулою («знайдено») (3.38):

$$C_m = \frac{C_0 \cdot S_1}{S_0} \quad (3.38)$$

де: C_0 – концентрація раміприлу у розчині порівняння;

S_1 – площі піків раміприлу у випробуваному розчині;

S_0 – площі піків раміприлу у розчині порівняння.

Теоретичну концентрацію раміприлу у випробуваних розчинах з добавками розраховували за формулою («введено») (3.39):

$$C_t = \frac{C_1 \cdot 3,2 + V \cdot C_{0ref}}{25} \quad (3.39)$$

де: C_1 – концентрація раміприлу у препараті, визначена відповідно до МКЯ;

3.2 – аліквота препарату, взята для приготування модельного розчину, мл;

V – аліквота вихідного розчину порівняння, яку додано до модельного розчину, мл;

C_{0ref} – концентрація раміприлу у вихідному розчині порівняння.

Співвідношення «знайдено»/«введено» (у відсотках) розраховували за формулою (3.40):

$$\Delta_c = \frac{C_m}{C_t} \cdot 100\% \quad (3.40)$$

Результати розрахунків для параметру «правильність» наведено у таблиці 3.18.

Таблиця 3.18 – Розрахунки для параметру «правильність»

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Раміприл, таблетки 2.5 мг									
C_m , мг/мл	0.0619	0.0628	0,0614	0.1026	0.1034	0.1037	0.1319	0.1319	0.1315
C_t , мг/мл	0.0619	0.0619	0.0619	0.1026	0.1026	0.1026	0.1331	0.1331	0.1331
Δ_c , %	99.6	101.1	98.8	99.6	100.4	100.7	98.7	98.7	98.4
RSD, %	1.13			0.55			0.17		
Раміприл, таблетки 5 мг									
C_m , мг/мл	0.0603	0.0609	0.0615	0.1035	0.1038	0.1026	0.1313	0.1348	0.1332
C_t , мг/мл	0.0613	0.0613	0.0613	0.1020	0.1020	0.1020	0.1325	0.1325	0.1325
Δ_c , %	98.12	99.16	100.11	101.22	101.55	100.34	98.84	101.44	100.28
RSD, %	1.00			0.62			1.30		
Раміприл, таблетки 10 мг									
C_m , мг/мл	0.0632	0.0616	0.0606	0.1021	0.1033	0.1033	0.1318	0.1324	0.1314
C_t , мг/мл	0.0624	0.0624	0.0624	0.1028	0.1028	0.1028	0.1330	0.1330	0.1330
Δ_c , %	101.18	98.70	97.02	99.26	100.43	100.48	99.05	99.45	98.74
RSD, %	2.12			0.69			0.36		

Розрахунок вмісту раміприлу у препаратах «Раміприл, таблетки 2,5 мг», «Раміприл, таблетки 5 мг», «Раміприл, таблетки 10 мг» проводили за формулою (3.41):

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot P_0 \cdot (100 - W_0) \cdot b}{S_0 \cdot m_1 \cdot 10000} \quad (3.41):$$

Результати розрахунків для параметру «прецизійність» наведено у таблиці 3.19.

Таблиця 3.19 – Результати розрахунків для параметру «прецизійність»

Лікарська форма	X ₁ , мг/таб	X ₂ , мг/таб	X ₃ , мг/таб	X ₄ , мг/таб	X ₅ , мг/таб	X ₆ , мг/таб	X _{ср} , мг/таб	RSD, %
2.5 мг	2.46	2.44	2.46	2.45	2.45	2.44	2.45	0.45
5 мг	4.61	4.58	4.58	4.52	4.75	4.55	4.60	1.70
10 мг	9.81	9.85	9.95	9.90	9.88	9.88	9.88	0.54

Відмінна правильність методики аналізу раміприлу підтверджується RSD знайденого вмісту для кожного рівня концентрації, який був нижчим за 3 % (1.1 %, 1.3 %, 2.1 %), і відхиленням середнього значення «знайдено/введено», яке було менше 0.51 % (0.01 %). Отримані результати засвідчили високу правильність запропонованої методики.

Відмінна прецизійність методики аналізу раміприлу була підтверджена RSD знайденого вмісту між зразками, який був нижчим за 2 % (0.45 %, 1.70 %, 0.54 %) та довірчим інтервалом значень "знайдено/введено", який був нижчим за 1.60 % (0.82 %). Отримані результати продемонстрували високу правильність та прецизійність запропонованої ВЕРХ методики.

Підсумовуючи вищеописані розрахунки у розділі 3.2, ми угагальними результати дослідження у таблиці 3.20.

Проведено вивчення «зеленості» запропонованої ВЕРХ методики визначення раміприлу в таблетках інструментами AGREE та GAPI. Піктограми «зеленості» представлено на рисунку 3.5.

Таблиця 3.20 – Результати проведеної валідації ВЕРХ методики визначення раміприлу в таблетках

Дослідження	Параметр	Критерій прийнятності	Оцінка параметру	відповідність
1	2	3	4	5
Специфічність (Рамізес, таблетки 2.5 мг)	Чистота піку раміприлу, розрахована для піків випробуваного розчину	$PF_{TS} \geq 990$	999.995	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Різниця часів виходу раміприлу на хроматограмі розчину порівняння та випробуваного розчину	$\Delta_{RT} \leq 2.0\%$	0.05 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Специфічність (Рамізес, таблетки 5 мг)	Чистота піку раміприлу, розрахована для піків випробуваного розчину	$PF_{TS} \geq 990$	999.994	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Різниця часів виходу раміприлу на хроматограмі розчину порівняння та випробуваного розчину	$\Delta_{RT} \leq 2.0\%$	0.29 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Специфічність (Рамізес, таблетки 10 мг)	Чистота піку раміприлу, розрахована для піків випробуваного розчину	$PF_{TS} \geq 990$	999.993	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Різниця часів виходу раміприлу на хроматограмі розчину порівняння та випробуваного розчину	$\Delta_{RT} \leq 2.0\%$	1.52 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Лінійність	Діапазон застосування	70%-130% (0.070-0.130 мг/мл)	66%-137% (0.066-0.137 мг/мл)	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Вільний член рівняння регресії	$ a \leq 3$	0.45	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Коефіцієнт кореляції	$r \geq 0.999$	0.9999	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Фактор відгуку індивідуального концентраційного рівня, у % до фактору відгуку цільової концентрації	$98.0\% \leq Z \leq 102.0\%$	99.2%-100.5%	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Відносне стандартне відхилення факторів відгуку	$RSD \leq 3.0\%$	$\leq 0.42\%$	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Правильність (Раміприл, таблетки 2.5 мг)	Відхилення середнього значення «знайдено/введено»	$\delta \leq 0.51\%$	0.01 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Вміст в пробах з добавкою	$97.0\% \leq Z \leq 103.0\%$	98.4%-101.1%	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Стандартне відхилення знайденого вмісту для кожного концентраційного рівня	$RSD \leq 3.0\%$	$\leq 1.1\%$	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає

Продовження таблиці 3.20

1	2	3	4	5
Правильність (Раміприл, таблетки 5 мг)	Відхилення середнього значення «знайдено/введено»	$\delta \leq 0.51 \%$	0.01 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Вміст в пробах з добавкою	$97.0 \% \leq Z \leq 103.0 \%$	98.1%-101.5%	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Стандартне відхилення знайденого вмісту для кожного концентраційного рівня	$RSD \leq 3.0 \%$	$\leq 1.3 \%$	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Правильність (Раміприл, таблетки 10 мг)	Відхилення середнього значення «знайдено/введено»	$\delta \leq 0.51 \%$	0.01 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Вміст в пробах з добавкою	$97.0 \% \leq Z \leq 103.0 \%$	97.0%-101.2%	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Стандартне відхилення знайденого вмісту для кожного концентраційного рівня	$RSD \leq 3.0 \%$	$\leq 2.1 \%$	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Прецизійність (Раміприл, таблетки 2.5 мг)	Довірчий інтервал значень «знайдено/введено»	$\Delta \leq 1.60 \%$	0.82 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Стандартне відхилення знайденого вмісту між пробами	$RSD_r \leq 2.0 \%$	$\leq 0.45 \%$	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Прецизійність (Раміприл, таблетки 5 мг)	Довірчий інтервал значень «знайдено/введено»	$\Delta \leq 1.60 \%$	0.82 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Стандартне відхилення знайденого вмісту між пробами	$RSD_r \leq 2.0 \%$	$\leq 1.70 \%$	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Прецизійність (Раміприл, таблетки 10 мг)	Довірчий інтервал значень «знайдено/введено»	$\Delta \leq 1.60 \%$	0.82 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Стандартне відхилення знайденого вмісту між пробами	$RSD_r \leq 2.0 \%$	$\leq 0.54 \%$	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає

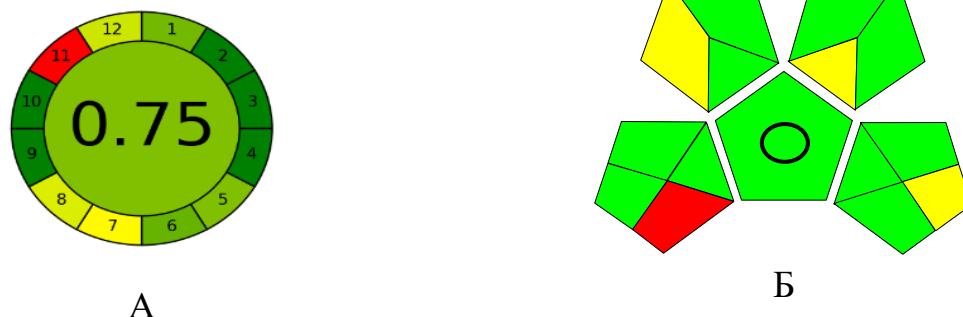


Рисунок 3.5 – Піктограми «зеленості» розробленої ВЕРХ методики визначення раміприлу в таблетках інструментами AGREE (А) та GAPI (Б)

Як показано на рисунку 3.5, оцінка інструментом AGREE, розроблена ВЕРХ методика перевершує за балом екологічної безпеки фармакопейну USP методику [4]. Таким чином, запропонований підхід має низький екологічний вплив відповідно до вищезазначених показників оцінки «зеленості».

Підсумовуючи, під час розробки ВЕРХ методики визначення раміприлу в таблетках ми зосередилися на виборі простої та «зеленої» рухомої фази і хроматографічної колонки для досягнення експрес-відтворюваних результатів. Колонка Acclaim 120 C18 (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм) була відмінним вибором. Рухома фаза була обрана та сама, що і при аналізі супровідних домішок, проте в ізократичному елююванні. Обрані хроматографічні умови дали можливість розробити експресну та «зелену» ВЕРХ методику кількісного визначення раміприлу в таблетках. Детально описано процедуру валідації методики. Даних щодо впливу компонентів, що заважають аналізу, не виявлено. Методика була лінійною у діапазоні застосування. Прецизійність та правильність методики були достатніми. ВЕРХ методика відповідає встановленим вимогам та може використовуватись для контролю якості препаратів «Раміприл, таблетки 2.5 мг», «Раміприл, таблетки 5 мг», «Раміприл, таблетки 10 мг» за показниками якості «Ідентифікація», «Кількісне визначення», «Однорідність дозованих одиниць» [39, 41].

3.3 Розробка та валідація методики визначення раміприлу для проведення тесту «Розчинення» методом рідинної хроматографії

З метою визначення раміприлу для проведення тесту «Розчинення» перед нами постало завдання розробити експресну, точну та «зелену» ВЕРХ методику визначення раміприлу. Використовували такі ж хроматографічні умови, як і для кількісного визначення раміприлу в таблетках – ізократичне елюювання рухомою фазою, що складалася з 0.2 г/л розчину натрію гексансульфонату (рН 2.7), ацетонітрилу (50:50 об'єм/об'єм), хроматографічна колонка Acclaim 120 C18 (250 мм х 4.6 мм, 5 мкм) зі швидкістю потоку рухомої фази 1.0 мл/хв, об'єм інжекції – 3 мкл (рис. 3.6).

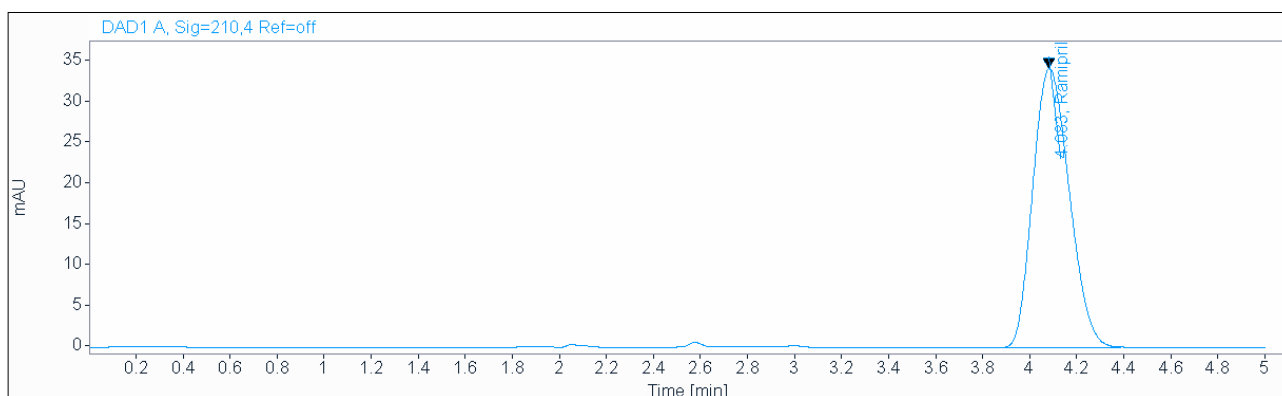


Рисунок 3.6 – Типова хроматограма раміприлу за умов проведення тесту «Розчинення»

Кількість раміприлу (X_3), що перейшла із таблетки в розчин, у відсотках, обчислюють за формулою (3.42):

$$X_3 = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot DF_0 \cdot P_0 \cdot (100 - W_0) \cdot 100}{S_0 \cdot DF_1 \cdot N \cdot 100 \cdot 100} \quad (3.42)$$

де: S_{1i} – середнє значення площ піків піку раміприлу з хроматограми випробовуваного розчину;

S_0 – середнє значення площ піків піку раміприлу з хроматограми розчину порівняння (с);

m_0 – маса наважки раміприлу, взята для приготування розчину порівняння (а) приготованого в розділі «Кількісне визначення», мг;

DF_0 – коефіцієнт розведення розчину порівняння (с), приготованого в розділі «Кількісне визначення»;

DF_1 – коефіцієнт розведення випробовуваного розчину;

P_0 – вміст основної речовини в RS раміприлу, %;

W_0 – вміст води в RS раміприлу, %;

N – номінальний вміст раміприлу у 1 таблетці, мг/таблетка;

Кількість раміприлу, що перейшла у розчин за 30 хв, має бути не менше 80 % (Q) від вмісту діючої речовини в одній таблетці.

Різницю між часами утримування для піків раміприлу на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину розраховували за формулою (3.43):

$$\Delta_{RT} = \frac{|RT_{RS} - RT_{TS}|}{RT_{RS}} \cdot 100\% \quad (3.43)$$

де: RT_{RS} – час виходу піку раміприлу на хроматограмі розчину порівняння;

RT_{TS} – час виходу піку раміприлу на хроматограмі випробовуваного розчину;

Дані щодо розрахунку різниці між часами утримування наведено у таблиці 3.21.

Таблиця 3.21 – Результати розрахунку різниці між часами утримування

Препарат	RT, хв		Δ_{RT} , %
	Розчин порівняння	Випробований розчин	
Раміприл, таблетки 2.5 мг	4.129	4.126	0.07
Раміприл, таблетки 5 мг	4.113	4.112	0.02
Раміприл, таблетки 10 мг	4.091	4.095	0.10

Значення концентрації у нормалізованих координатах розраховували за формулою (3.44):

$$x_i = \frac{c_i}{c_{ref}} \quad (3.44)$$

Значення відгуку приладу у нормалізованих координатах розраховували за формулою (3.45):

$$y_i = \frac{S_i}{S_{ref}} \quad (3.45)$$

Відношення «знайдено/введено розраховували за формулою (3.46):

$$z_i = \frac{y_i}{x_i} \quad (3.46)$$

Отримані значення розрахунку параметрів лінійної регресії наведено у таблиці 3.22.

Таблиця 3.22 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії

Пара-метр	Модельний розчин						
	L 1	L 2	L 3	L 4	L 5	L 6	L 7
Раміприл, таблетки 2.5 мг							
$x_i, \%$	50.79	101.59	152.38	203.18	304.77	406.36	507.95
$y_i, \%$	51.28	101.59	150.13	200.35	300.44	404.84	503.68
$z_i, \%$	100.95	100.00	98.52	98.61	98.58	99.63	99.16
Раміприл, таблетки 5 мг							
$x_i, \%$	25.40	50.79	76.19	101.59	152.38	203.18	253.97
$y_i, \%$	26.00	51.51	76.12	101.59	152.34	205.28	255.40
$z_i, \%$	102.38	101.41	99.91	100.00	99.97	101.03	100.56
Раміприл, таблетки 10 мг							
$x_i, \%$	12.70	25.40	38.10	50.79	76.19	101.59	126.99
$y_i, \%$	12.87	25.49	37.67	50.27	75.39	101.59	126.39
$z_i, \%$	101.33	100.37	98.89	98.98	98.95	100.00	99.53

Коефіцієнт **b** розраховували за рівнянням (3.47):

$$b = \frac{m \cdot \sum_{i=1}^m x_i y_i - \sum_{i=1}^m x_i \sum_{i=1}^m y_i}{m \cdot \sum_{i=1}^m x_i^2 - (\sum_{i=1}^m x_i)^2} \quad (3.47)$$

де: m – кількість модельних розчинів.

Коефіцієнт **a** розраховували за рівнянням (3.48):

$$a = \frac{\sum_{i=1}^m y_i - b \cdot \sum_{i=1}^m x_i}{m} \quad (3.48)$$

Коефіцієнт кореляції **r** розраховували за рівнянням (3.49):

$$r = \frac{m \cdot \sum_{i=1}^m x_i \cdot y_i - \sum_{i=1}^m x_i \cdot \sum_{i=1}^m y_i}{\sqrt{(m \cdot \sum_{i=1}^m x_i^2 - (\sum_{i=1}^m x_i)^2) \cdot (m \cdot \sum_{i=1}^m y_i^2 - (\sum_{i=1}^m y_i)^2)}} \quad (3.49)$$

Розрахунки параметрів лінійної регресії наведено у таблиці 3.23. Відмінна лінійність методики аналізу раміприлу була підтверджена RSD отриманих факторів відгуку, який був нижчим за 5 % (0.91 %), а отриманий коефіцієнт кореляції був ідеальним (1.0000).

Таблиця 3.23 – Параметри лінійної регресії для раміприлу

Параметр	Раміприл, таблетки 2.5 мг	Раміприл, таблетки 5 мг	Раміприл, таблетки 10 мг
a	0.09	0.04	0.02
b	0.99	1.01	1.00
r	1.0000	1.0000	1.0000
Z _{max}	101.0	102.4	101.3
Z _{min}	98.5	99.9	98.9
RSD _Z	0.91	0.91	0.91

Відхилення середнього значення «знайдено/введено» від 100% розраховували за рівнянням (3.50):

$$\delta = |\bar{z} - 100| \quad (3.50)$$

Максимально припустиме значення відхилення «знайдено/введено» від 100% розраховували за рівнянням (3.51):

$$\delta_{max} = 0,32 \cdot \Delta_{As} \quad (3.51)$$

Довірчий інтервал розкиду значень «знайдено/введено» розраховували за рівнянням (3.52):

$$\Delta_z = S_z \cdot t(95\%, m - 1) \quad (3.52)$$

де: S_z - стандартне відхилення відношень «знайдено/введено» для всіх розчинів;
 $t(95\%, m - 1)$ – однобічний коефіцієнт Стьюдента для імовірності 95 %
(для та степені свободи 7-1=6 становить 1.9432.

Результати розрахунку правильності та прецизійності за калібрувальною кривою наведено у таблиці 3.24.

Таблиця 3.24 – Розрахунок правильності та прецизійності за калібрувальною кривою

Параметр	Раміприл, таблетки 2.5 мг	Раміприл, таблетки 5 мг	Раміприл, таблетки 10 мг
Z_{cp}	99.35	100.76	99.72
δ	0.65	0.75	0.28
δ_{max}	0.96	0.96	0.96
Δ_{lin}	1.76	1.79	1.77
Δ_{max}	3.00	3.00	3.00

Концентрацію раміприлу у випробуваних розчинах з добавками розраховували за формулою («знайдено») (3.53):

$$C_m = \frac{C_0 \cdot S_1}{S_0} \quad (3.53)$$

де: C_0 – концентрація раміприлу у розчині порівняння;

S_1 – площі піків раміприлу у випробуваному розчині;

S_0 – площі піків раміприлу у розчині порівняння.

Теоретичну концентрацію раміприлу у випробуваних розчинах для препарату Рамізес, таблетки 2.5 мг з добавками розраховували за формулою («введено») (3.54):

$$C_t = \frac{C_1 \cdot 0,5 + V \cdot C_{0 \text{ ref}}}{100} \quad (3.54)$$

Теоретичну концентрацію раміприлу у випробуваних розчинах з добавками для препарату Рамізес, таблетки 5 мг розраховували за формулою («введено») (3.55):

$$C_t = \frac{C_1 \cdot 1,0 + V \cdot C_{0 \text{ ref}}}{100} \quad (3.55)$$

Теоретичну концентрацію раміприлу у випробуваних розчинах з добавками для препарату Рамізес, таблетки 10 мг розраховували за формулою («введено») (3.56):

$$C_t = \frac{C_1 \cdot 2,0 + V \cdot C_{0ref}}{100} \quad (3.56)$$

де: C_1 – концентрація раміприлу у препараті, визначена відповідно до МКЯ;

0.5 (1.0; 2.0) – аліквота препарату, взята для приготування модельного розчину, мл;

V – аліквота вихідного розчину порівняння, яку додано до модельного розчину, мл;

C_{0ref} – концентрація раміприлу у вихідному розчині порівняння.

Співвідношення «знайдено»/«введено» (у відсотках) розраховували за формулою (3.57):

$$\Delta_c = \frac{C_m}{C_t} \cdot 100\% \quad (3.57)$$

Результати розрахунків для параметру «правильність» наведено у таблиці 3.25.

Таблиця 3.25 – Розрахунки для параметру «правильність»

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Раміприл, таблетки 2.5 мг									
C_m , мг/мл	0.0024	0.0024	0.0025	0.0049	0.0049	0.0049	0.0064	0.0064	0.0064
C_t , мг/мл	0.0025	0.0025	0.0025	0.0050	0.0050	0.0050	0.0065	0.0065	0.0065
Δ_c , %	96.37	96.67	100.72	97.92	98.58	98.65	98.09	98.33	98.54
RSD, %	2.48			0.41			0.23		
Раміприл, таблетки 5 мг									
C_m , мг/мл	0.0049	0.0048	0.0049	0.0098	0.0099	0.0098	0.0129	0.0130	0.0129
C_t , мг/мл	0.0048	0.0048	0.0048	0.0098	0.0098	0.0098	0.0129	0.0129	0.0129
Δ_c , %	100.99	99.76	100.56	99.03	99.18	98.84	99.51	99.61	98.91
RSD, %	0.63			0.17			0.38		
Раміприл, таблетки 10 мг									
C_m , мг/мл	0.0098	0.0099	0.0098	0.0199	0.0201	0.0202	0.0260	0.0258	0.0258
C_t , мг/мл	0.0097	0.0097	0.0097	0.0198	0.0198	0.0198	0.0259	0.0259	0.0259
Δ_c , %	100.12	100.82	100.52	100.15	100.78	101.30	100.12	99.37	99.38
RSD, %	0.35			0.57			0.44		

Розрахунок вмісту раміприлу у препаратах «Рамізес, таблетки 2.5 мг», «Рамізес, таблетки 5 мг», «Рамізес, таблетки 10 мг» проводили за формулою (3.58):

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot P_0 \cdot (100 - W_0) \cdot b}{S_0 \cdot m_1 \cdot 100 \cdot a} \quad (3.58)$$

Результати розрахунків для параметру «прецизійність» наведено у таблиці 3.26.

Таблиця 3.26 – Результати розрахунків для параметру «прецизійність»

	X ₁ , мг/таб	X ₂ , мг/таб	X ₃ , мг/таб	X ₄ , мг/таб	X ₅ , мг/таб	X ₆ , мг/таб	X _{ср} , мг/таб	RSD, %
2.5 мг	98.77	97.46	97.25	96.04	95.36	97.18	97.0	1.22
5 мг	100.13	100.57	101.53	100.80	97.10	102.24	100.4	2.08
10 мг	97.08	98.26	97.29	97.29	97.95	98.02	97.6	0.80

Відмінну правильність методики аналізу раміприлу підтверджено RSD знайденого вмісту для кожного рівня концентрації, який був нижчим за 5 % (2.5 %, 0.6 %, 0.6 %), і відхиленням середнього значення "знайдено/введено", яке було менше 0.96 % (0.65 %, 0.75 %, 0.28 %). Отримані результати продемонстрували високу правильність розробленої ВЕРХ методики. Відмінна прецизійність методики аналізу раміприлу була підтверджена RSD знайденого вмісту між зразками, який був нижчим за 4.0 % (1.2 %, 2.1 %, 0.8 %) та довірчим інтервалом значень "знайдено/введено", який був нижчим за 3.00 % (1.76 %, 1.79 %, 1.77 %). Отримані результати продемонстрували відмінну правильність та прецизійність запропонованої ВЕРХ методики.

Підсумовуючи вищеписані розрахунки у розділі 3.3, ми угагальними результатами дослідження у таблиці 3.27.

Запропонована ВЕРХ методика визначення раміприлу для проведення тесту «Розчинення» має такий самий бал за інструментом AGREE (0.75) та GAPI як і ВЕРХ методика кількісного визначення раміприлу в таблетках (рис. 3.5), оскільки використовуються ті самі хроматографічні умови. Можна зробити висновок, що розроблена ВЕРХ методика визначення раміприлу для проведення тесту «Розчинення» є екологічно безпечною та відповідає принципам «зеленої» хімії [39, 42].

Таблиця 3.27 – Результати проведеної валідації ВЕРХ методики визначення раміприлу для провднення тесту «Розчинення»

Дослідження	Параметр	Критерій прийнятності	Оцінка параметру	Відповідність
1	2	3	4	5
Специфічність (Раміприл, таблетки 2.5 мг)	Чистота піку раміприлу, розрахована для піків випробуваного розчину	$PF_{TS} \geq 990$	999.989	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Різниця часів виходу раміприлу на хроматограмі розчину порівняння та випробуваного розчину	$\Delta_{RT} \leq 2.0\%$	0.07 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Специфічність (Раміприл, таблетки 5 мг)	Чистота піку раміприлу, розрахована для піків випробуваного розчину	$PF_{TS} \geq 990$	999.993	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Різниця часів виходу раміприлу на хроматограмі розчину порівняння та випробуваного розчину	$\Delta_{RT} \leq 2.0\%$	0.02	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Специфічність (Раміприл, таблетки 10 мг)	Чистота піку раміприлу, розрахована для піків випробуваного розчину	$PF_{TS} \geq 990$	999.995	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Різниця часів виходу раміприлу на хроматограмі розчину порівняння та випробуваного розчину	$\Delta_{RT} \leq 2.0\%$	0.10	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Лінійність (Раміприл, таблетки 2.5 мг)	Діапазон застосування	60%-120% (0.003-0.006 мг/мл)	50.8%-508.0% (0.0025-0.0254 мг/мл)	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Вільний член рівняння регресії	$ a \leq 5$	0.09	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Коефіцієнт кореляції	$r \geq 0.995$	1.0000	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Фактор відгуку індивідуального концентраційного рівня, у % до фактору відгуку цільової концентрації	$95.0\% \leq Z \leq 105.0\%$	98.5%-101.0%	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Відносне стандартне відхилення факторів відгуку	$RSD \leq 5.0\%$	$\leq 0.91\%$	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Лінійність (Раміприл, таблетки 5 мг)	Діапазон застосування	60%-120% (0.006-0.0120 мг/мл)	25.4%-254% (0.0025-0.0254 мг/мл)	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Вільний член рівняння регресії	$ a \leq 5$	0.04	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає

Продовження таблиці 3.27

1	2	3	4	5
	Коефіцієнт кореляції	$r \geq 0.995$	1.0000	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Фактор відгуку індивідуального концентраційного рівня, у % до фактору відгуку цільової концентрації	$95.0\% \leq Z \leq 105.0\%$	99.9%-102.4%	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Відносне стандартне відхилення факторів відгуку	$RSD \leq 5.0 \%$	$\leq 0.91 \%$	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Лінійність (Раміприл, таблетки 10 мг)	Діапазон застосування	60%-120% (0.012-0.024 мг/мл)	12.7%-127.0% (0.0025-0.0254 мг/мл)	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Вільний член рівняння регресії	$ a \leq 5$	0.02	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Коефіцієнт кореляції	$r \geq 0.995$	1.0000	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Фактор відгуку індивідуального концентраційного рівня, у % до фактору відгуку цільової концентрації	$95.0\% \leq Z \leq 105.0\%$	98.9%-101.3%	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Відносне стандартне відхилення факторів відгуку	$RSD \leq 5.0 \%$	$\leq 0.91 \%$	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Правильність (Раміприл, таблетки 2.5 мг)	Відхилення середнього значення «знайдено/введено»	$\delta \leq 0.96 \%$	0.65 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Вміст в пробах з добавкою	$90.0 \% \leq Z \leq 110.0 \%$	96.4%-100.7%	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Стандартне відхилення знайденого вмісту для кожного концентраційного рівня	$RSD \leq 5.0 \%$	$\leq 2.5 \%$	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Правильність (Раміприл, таблетки 5 мг)	Відхилення середнього значення «знайдено/введено»	$\delta \leq 0.96 \%$	0.75 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Вміст в пробах з добавкою	$90.0 \% \leq Z \leq 110.0 \%$	98.8%-101.0%	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Стандартне відхилення знайденого вмісту для кожного концентраційного рівня	$RSD \leq 5.0 \%$	$\leq 0.6 \%$	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає

Продовження таблиці 3.27

1	2	3	4	5
Правильність (Раміприл, таблетки 10 мг)	Відхилення середнього значення «знайдено/введено»	$\delta \leq 0.96 \%$	0.28 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Вміст в пробах з добавкою	$90.0 \% \leq Z \leq 110.0 \%$	99.4%-101.3%	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Стандартне відхилення знайденого вмісту для кожного концентраційного рівня	$RSD \leq 5.0 \%$	$\leq 0.6 \%$	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Прецизійність (Раміприл, таблетки 2.5 мг)	Довірчий інтервал значень «знайдено/введено»	$\Delta \leq 3.00 \%$	1.76 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Стандартне відхилення знайденого вмісту між пробами	$RSD_r \leq 4.0 \%$	$\leq 1.2 \%$	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Прецизійність (Раміприл, таблетки 5 мг)	Довірчий інтервал значень «знайдено/введено»	$\Delta \leq 3.00 \%$	1.79 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Стандартне відхилення знайденого вмісту між пробами	$RSD_r \leq 4.0 \%$	$\leq 2.1 \%$	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
Прецизійність (Раміприл, таблетки 10 мг)	Довірчий інтервал значень «знайдено/введено»	$\Delta \leq 3.00 \%$	1.77 %	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає
	Стандартне відхилення знайденого вмісту між пробами	$RSD_r \leq 4.0 \%$	$\leq 0.8 \%$	<input checked="" type="checkbox"/> відповідає <input type="checkbox"/> не відповідає

Проведено валідацію аналітичної методики з детальним описом процедури валідації. Даних щодо впливу компонентів, що заважають аналізу, не виявлено. Методика була лінійною у діапазоні застосування. Прецизійність та прецизійність методики була достатньою. Модифікована методика відповідає встановленим вимогам і може використовуватись для контролю якості препаратів «Раміприл, таблетки 2,5 мг», «Раміприл, таблетки 5 мг», «Раміприл, таблетки 10 мг» за показником якості «Розчинення».

3.4 Розробка альтернативних спектрофотометричних методик визначення раміприлу в таблетках за реакціями з бромфеноловим синім та крезоловим червоним

Спектрофотометричні методики є часто альтернативою ВЕРХ методикам для лабораторій з обмеженим бюджетом. З огляду на хімічну структуру (див. рис. 3.1), раміприл не є складним аналітом для розробки спектрофотометричних методик. Наша наукова група має досвід розробки спектрофотометричних методик визначення різних АФІ з використанням сульффталеїнових барвників як реагентів, тому ми апробували сульффталеїнові барвники як потенційні реагенти для подальшої розробки методики. При аналізі наукової літератури, пов'язаної з розробкою спектрофотометричних методик визначення раміприлу в лікарських формах, не виявлено аналітичної методики, де в якості реагентів використовувалися б сульффталеїнові барвники [5-13]. Сульффталеїнові барвники широко застосовуються в фармацевтичному аналізі при розробці спектрофотометричних методик як реагенти для визначення нітрогенвмісних органічних речовин [43-80]. Сульффталеїнові барвники існують у розчині у двох протонуваних формах – монопротонуваних (протон відщеплюється від сульфогрупи) та в діаніонній формі (другий протон відщеплюється від одного з фенольних гідроксилів) [81]. Нами апробовано різні сульффталеїнові барвники (БФС, бромкрезоловий

зелений (БКЗ), бромтимоловий синій, тимоловий синій, КЧ) з метою вибору оптимального для подальшої розробки методики. При застосуванні БКЗ, бромтимолового синього, тимолового синього виникали певні труднощі. Для прикладу, при взаємодії раміприлу з БКЗ (4.8×10^{-4} М) спостерігали зменшення смуги поглинання однократно іонізованої форми барвника з одночасним збільшенням смуги поглинання двократноіонізованої форми барвника [82]. Утворений комплекс давав максимум поглинання за довжини хвилі 618 нм. Оптимальним розчинником обрано метанол. Лінійність методики спостерігали в діапазоні концентрацій від 8.3 мкг/мл до 15.3 мкг/мл. Такий вузький діапазон обумовлений складністю роботи з сульфоталеїновими барвниками при розробці спектрофотометричних методик (наявність таутомерії, нелінійність методик та інше). МВ та МКВ становили 0.51 мкг/мл та 1.52 мкг/мл відповідно. Проте прогнозована повна невизначеність результатів аналізу перевищила критичних значень ($\max \Delta_{As}$), тому дана методика потребує певного доопрацювання. Для подальших досліджень з розробки методик ми обрали БФС [83] та КЧ (рис. 3.7) [84].

За наявності раміприлу кислотно-лужний баланс БФС зміщується в бік дііонізованої форми, оскільки раміприл утворює більш стійкі іонні зв'язки з цією формою барвника (рис. 3.8). Раміприл утворює комплекси з БФС з максимумом поглинання за довжини хвилі 598 нм в середовищі ацетонітрилу. Оптимальною концентрацією БФС була 2.35×10^{-4} М. Встановлено, що для досягнення найвищої абсорбції необхідно 1.0 мл розчину БФС. За наявності раміприлу кислотно-лужний баланс КЧ зміщується в бік моноіонізованої форми, оскільки раміприл утворює більш стійкі іонні зв'язки з цією формою барвника (рис. 3.8). Раміприл утворює комплекси з КЧ з максимумом поглинання за довжини хвилі 395 нм в ацетонітрильному середовищі. Оптимальна концентрація КЧ була 1.33×10^{-4} М. Для досягнення найвищої абсорбції необхідно 1.0 мл розчину КЧ. Спектри поглинання продуктів взаємодії раміприл – БФС та раміприл КЧ представлено на рисунку 3.8.

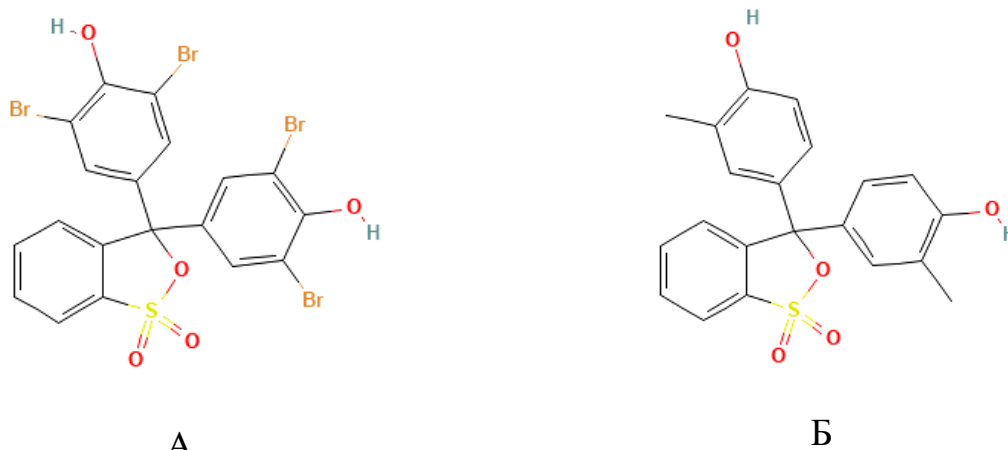


Рисунок 3.7 – Структурні формули БФС (А) [83] та КЧ (Б) [84]

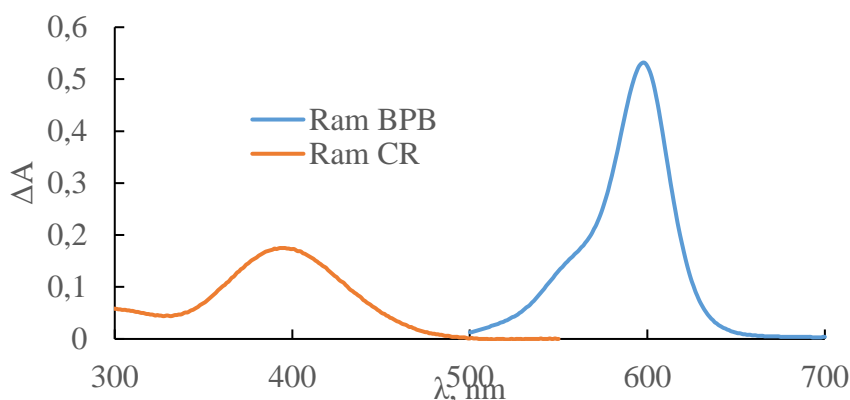


Рисунок 3.8 – Спектри поглинання продуктів взаємодії раміприл (9.56×10^{-6} М) – БФС (2.35×10^{-5} М в ацетонітрилі) та раміприл (1.11×10^{-5} М) – КЧ (1.33×10^{-4} М в ацетонітрилі)

На наступному етапі досліджень ми працювали над вибором оптимального розчинника. Вибір розчинників представлено на рисунках 3.9, 3.10. Оптимальним розчинником виявився ацетонітрил для обох барвників. За даними інструменту the Hansen space green solvent selection tool, ацетонітрил мав показник G 5.8, як показано на рисунку 3.11 (відходи = 2.8, здоров'я = 5.9, навколишнє середовище = 8.9, безпека = 7.7) [85].

Стехіометричні коефіцієнти реагуючих компонентів визначали методом неперервних змін (метод Джоба) та насичення (метод молярних співвідношень). Як видно з рисунків 3.12, 3.13, стехіометричні коефіцієнти реагуючих компонентів між раміприлом та барвниками становили 1: 1.

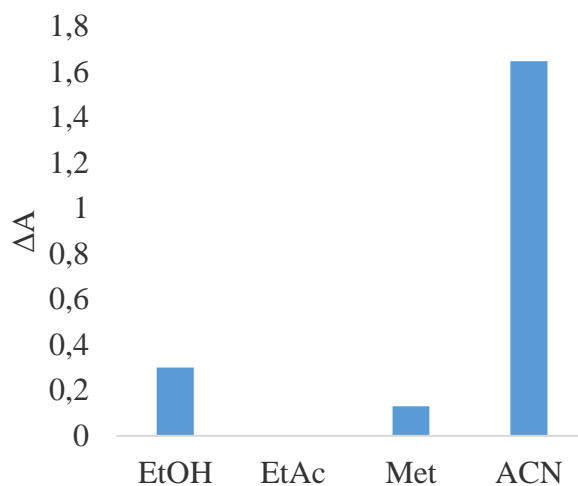


Рисунок 3.9 – Абсолютні значення абсорбції раміприлу з БФС у різних розчинниках ($C_M = 2.35 \times 10^{-4} \text{ M}$)

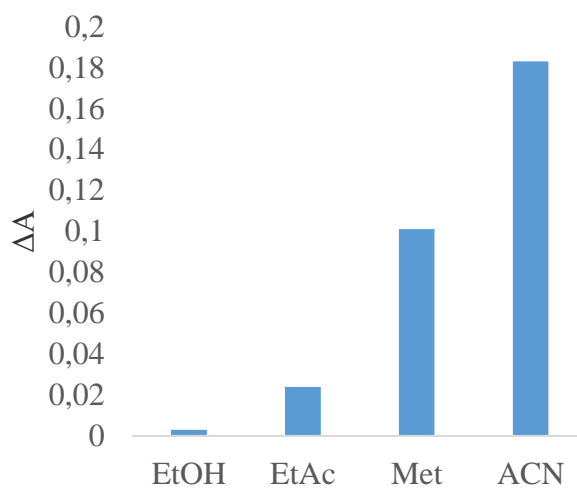


Рисунок 3.10 – Абсолютні значення абсорбції раміприлу з КЧ у різних розчинниках ($C_M = 1.33 \times 10^{-4} \text{ M}$)

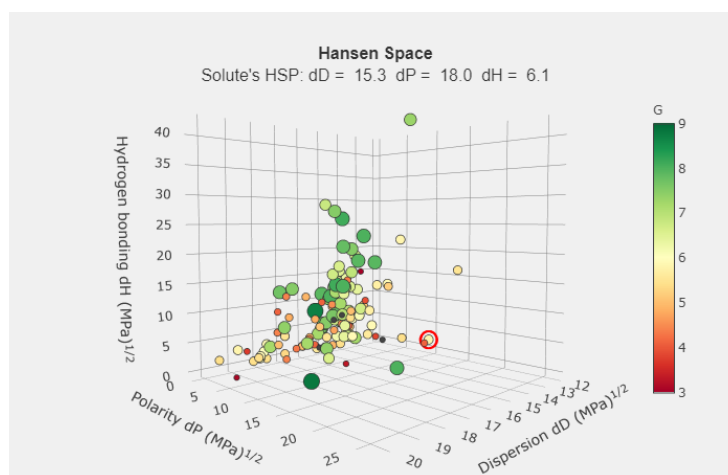
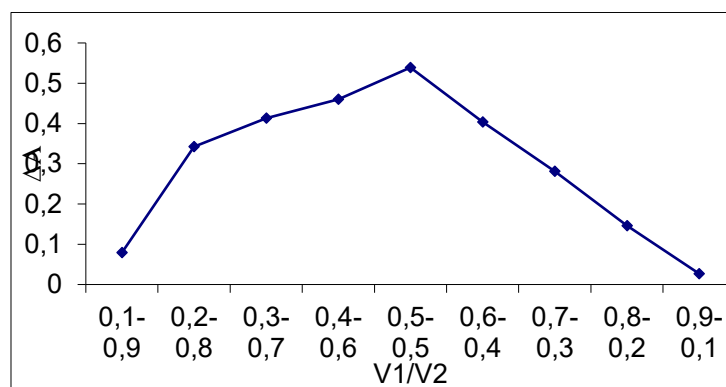
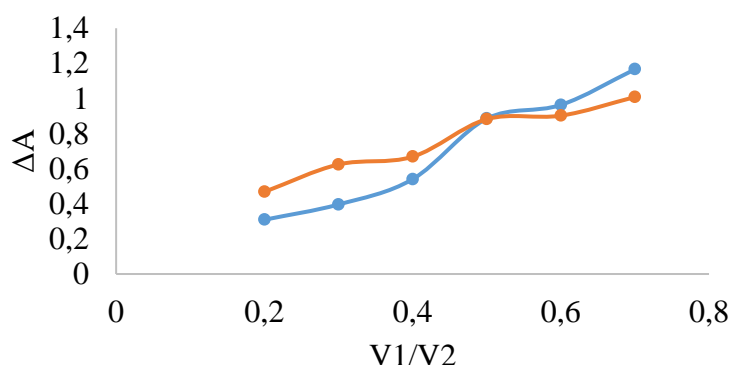


Рисунок 3.11 – Рівень стійкості розчинника ацетонітрилу, що генерується Hansen space green solvent selection tool



А



Б

Рисунок 3.12 – Вивчення стехіометричних коефіцієнтів реагуючих компонентів раміприл-БФС методом неперервних змін ($C_M=2.35 \times 10^{-4}$ М) (А) та насичення ($C_M=3.09 \times 10^{-4}$ М) (Б)

У таблиці 3.28 наведено оптимальні параметри спектрофотометричного визначення раміприлу шляхом утворення іонно-парних комплексів з використанням БФС та КЧ.

Підсумовуючи, можна відмітити чутливість, відсутність екстракції, специфічність методики, оскільки в методиці застосовуються невеликі наважки раміприлу, мірні колби на 10.0 мл, що значно підвищує екологічну безпеку аналізу, оскільки скорочує витрати розчинників та аналіту. Великою перевагою методики є відсутність екстракції, що позитивно впливає на розрахунок «зеленості» [86, 87]. Гідрохлортіазид як компонент фіксованої комбінації (раміприл+гідрохлортіазид) не взаємодіє з сульфоталеїновими барвниками (такі негативні результати також були отримані в нашій роботі).

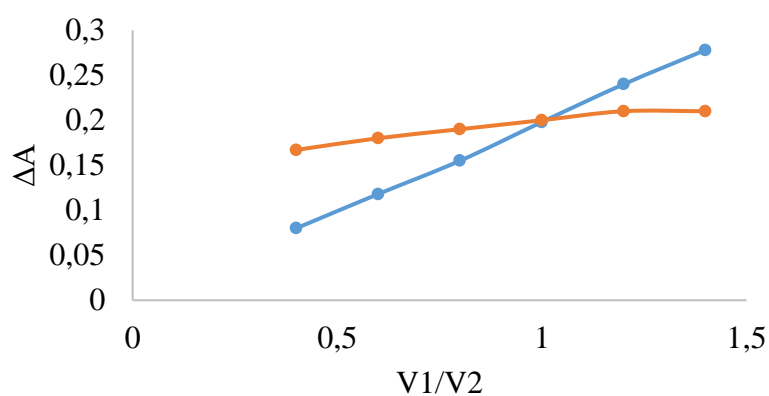
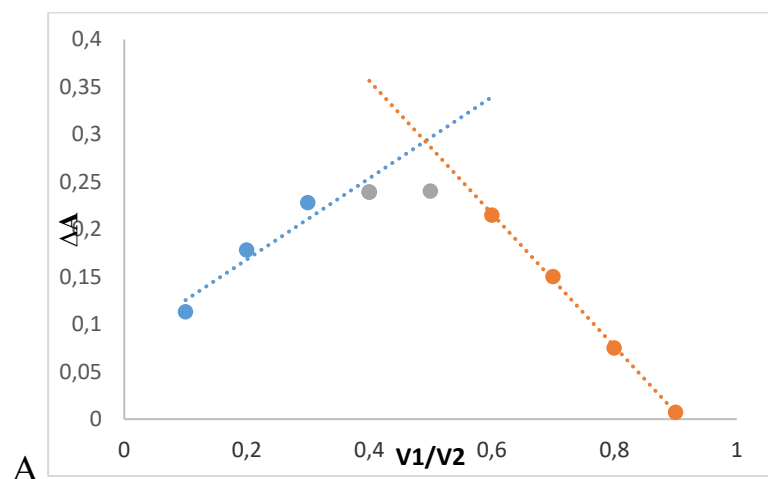


Рисунок 3.13 – Вивчення стехіометричних коефіцієнтів реагуючих компонентів раміприл-КЧ методом неперервних змін ($C_M=4.75 \times 10^{-4}$ М) (А) та насичення ($C_M=1.33 \times 10^{-4}$ М) (Б)

Таблиця 3.28 – Оптимальні параметри спектрофотометричного визначення раміприлу шляхом утворення іонно-парних комплексів з використанням БФС та КЧ

Параметри	КЧ	БФС
Концентрація реагента, М	1.33×10^{-4}	2.35×10^{-4}
Об'єм реагента, мл	1.0	1.0
Розчинник	ацетонітрил	
Довжина хвилі, нм	395	598
Час реакції, хв	5	
Стехіометричні коефіцієнти	1: 1	
Температура, °С	25 ± 5	

Валідацію спектрофотометричних методик проводили відповідно до вимог ДФУ [36] та ІСН [38] за такими валідаційними характеристиками як лінійність, правильність та прецизійність, робасність.

При розробці методики вивчали робасність (стабільність розчинів, зміна об'єму реагенту, часу реакції). У попередніх експериментах при розробці методу визначено, що зміни при дослідженні робасності в межах $\pm 10\%$ істотно не впливають на абсорбцію (табл. 3.29). Отримані результати відповідали критеріям прийнятності (в діапазоні 98.0 – 102.0 %).

Таблиця 3.29 – Результати вивчення робасності методики

Параметри	БФС	КЧ
	(%) Recovery* \pm SD	
Стабільність, год		
1	99.95 \pm 0.83	99.35 \pm 1.48
5	99.65 \pm 0.95	100.42 \pm 0.73
10	98.80 \pm 1.28	98.82 \pm 1.02
Об'єм реагента, мл		
0.9	99.23 \pm 0.59	99.28 \pm 0.83
1.0	99.11 \pm 1.74	100.48 \pm 0.90
1.1	100.08 \pm 1.02	100.91 \pm 1.98
Час, хв		
5	100.28 \pm 0.89	98.49 \pm 1.39
10	99.12 \pm 1.36	99.03 \pm 0.92
15	98.03 \pm 1.24	98.29 \pm 1.20
Примітка. * – результати трьох вимірювань.		

Лінійність запропонованих спектрофотометричних методик визначення раміприлу за реакціями з БФС та КЧ вивчали в діапазоні концентрацій 1.99-5.96 мг/мл (БФС) та 0.42-5.44 мг/мл (КЧ) регресійним аналізом. Результати вивчення лінійності представлено в таблиці 3.30.

Коефіцієнт кореляції перевищив 0.998, тобто лінійність аналітичної процедури була достатньою. МВ та МКВ становили 0.20 мкг/мл та 0.60 мкг/мл для БФС і 0.10 мкг/мл та 0.36 мкг/мл для КЧ.

Таблиця 3.30 – Результати вивчення лінійності методики

Параметр	БФС	КЧ
Діапазон застосування, мкг/мл	1.99-5.96	0.42-5.44
r	0.9985	0.9994
$a \pm (S_a)$	$-0.1325 \pm 2.39 \times 10^{-2}$	$-0.0043 \pm 1.0520 \times 10^{-3}$
$b \pm (S_b)$	$0.1721 \pm 5.73 \times 10^{-3}$	$0.0385 \pm 3.5500 \times 10^{-3}$
МВ, мкг/мл	0.20	0.10
МКВ, мкг/мл	0.60	0.36

Для оцінки правильності запропонованих методик досліджено три рівні концентрації препарату (1.99, 3.98 та 5.96 мкг/мл) та (0.42, 2.93 та 5.44 мкг/мл) для БФС та КЧ відповідно. Розраховані дані показали відмінну узгодженість між вимірними і фактичними значеннями, що доводить правильність розроблених методик, як показано в таблиці 3.31.

Таблиця 3.31 – Результати вивчення правильності методики

№	БФС			КЧ		
	Введена конц. (мкг/мл) *	Знайдена конц. (мкг/мл) *	Відношення знайденого до введеного*, %	Введена конц. (мкг/мл) *	Знайдена конц. (мкг/мл) *	Відношення знайденого до введеного*, %
1	1.99	1.9823	99.61	0.42	0.4157	98.98
2	3.98	4.0217	101.05	2.93	2.9467	100.57
3	5.96	5.9485	99.81	5.44	5.4483	100.15
Середнє			100.16			99.90
SD			0.73			0.77
RSD			0.70			0.74

Примітка. * – результати трьох вимірювань.

Середні значення знаходилися в межах 99.0–101.0 %. Індивідуальні значення для кожного з рівнів концентрації знаходилися в межах 98.0–102.0 %. RSD для індивідуальних значень становило менше 1.0 %.

Близькість експериментальних значень один до одного оцінювали з внутрішньо- і міжсерійною прецизійністю. Внутрішньосерійна прецизійність

була виконана шляхом реплікації аналізу трьох різних концентрацій раміприлу в три різні часи протягом дня, тоді як міжсерійна прецизійність – шляхом перевірки одних і тих же концентрацій протягом наступних трьох днів. Отримані результати представлено в таблиці 3.32. Результати кількісного визначення раміприлу в таблетках наведено в таблиці 3.33. Результати вивчення правильності та прецизійності відповідали критерія прийнятності.

Таблиця 3.32 – Результати вивчення прецизійності методики

Концент- раційний рівень	БФС		КЧ	
	%Mean Recovery* \pm SD			
	Внутрішньо- серійна прецизійність	Міжсерійна прецизійність	Внутрішньо- серійна прецизійність	Міжсерійна прецизійність
1	100.17 \pm 1.25	100.49 \pm 0.93	100.05 \pm 0.73	100.67 \pm 1.48
2	99.10 \pm 1.74	98.82 \pm 0.84	99.07 \pm 1.65	99.82 \pm 1.92
3	99.84 \pm 1.05	101.12 \pm 1.85	99.92 \pm 0.70	98.13 \pm 1.94
Примітка. * – результати трьох вимірювань.				

Таблиця 3.33 – Результати кількісного визначення раміприлу в таблетках

Дозування, мг	5		10	
	БФС	КЧ	БФС	КЧ
	5.150	5.189	10.093	9.975
	5.035	5.279	10.258	10.258
	5.119	4.983	10.119	10.008
	5.149	5.239	9.986	9.989
	5.197	5.289	10.058	10.118
	5.047	4.988	10.349	10.267
Середнє	5.122	5.162	10.144	10.115
SD	0.069	0.141	0.135	0.152
RSD	1.337	2.724	1.328	1.506

Перш ніж розпочати наші дослідження, ми поставили за мету розробити екологічні, а отже «зелені», спектрофотометричні методи. При розробці методик ми враховували 12 принципів «зеленої» хімії. Застосування ацетонітрилу дозволяє уникнути екстракції комплексу раміприл-барвник токсичними органічними розчинниками, а отже, значно підвищити «зеленість»

запропонованих методик. Піктограми «зеленості» аналітичних методик з використанням інструментів AGREE і GAPI наведено на рисунках 3.14, 3.15.

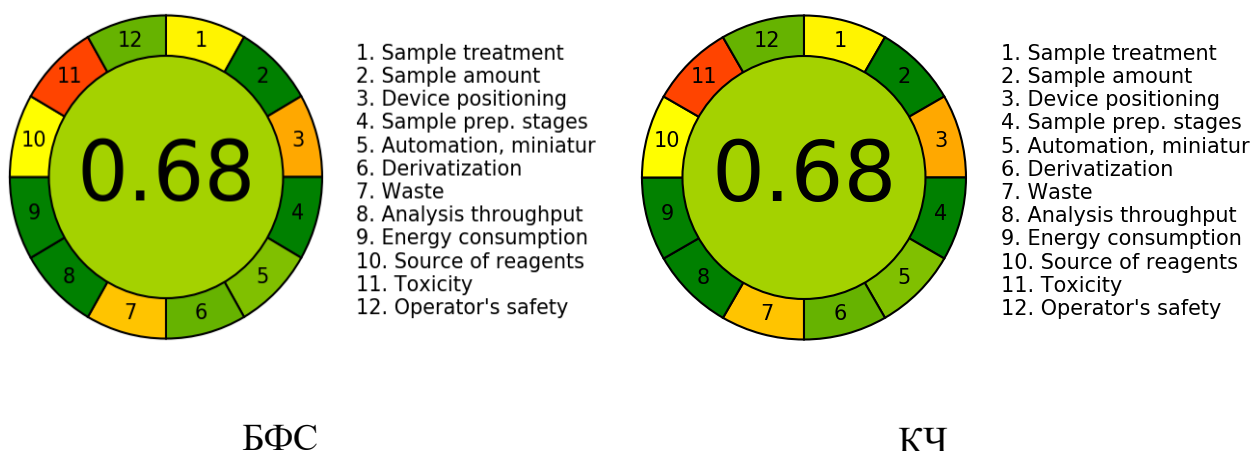


Рисунок 3.14 – Піктограми «зеленості» інструментами AGREE

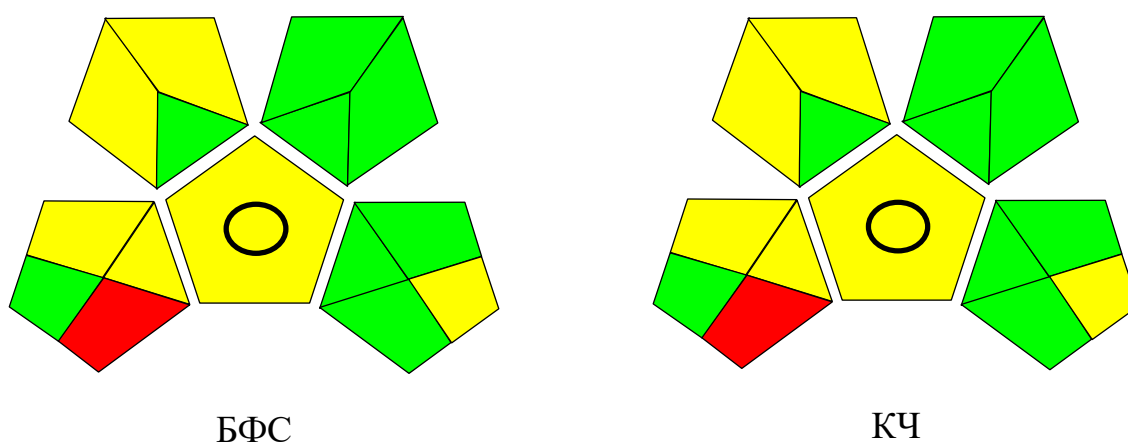


Рисунок 3.15 – Піктограми «зеленості» інструментами GAPI

Піктограми «зеленості» інструментами AGREE та GAPI обох методик виглядають однаково, оскільки відрізняються лише незначною пробопідготовкою. Оцінка за інструментом AGREE становив 0.68, що свідчить про відмінний «зелений» аналіз.

Підсумовуючи результати, отримані в розділі 3.4, можна відмітити, що огляд наукової літератури вказує на необхідність поповнення бази спектрофотометричних методик визначення раміприлу в таблетках для цілей рутинного фармацевтичного аналізу. Сульфофталеїнові барвники є перспективними

реагентами в спектрофотометричному аналізі лікарських форм, про що свідчать численні дослідження. Спектрофотометричні методики визначення раміприлу за реакцією з сульфоталеїновими барвниками в науковій літературі не описано. За результатами експериментальних досліджень в якості реагентів ми вибрали БФС та КЧ, а розчинником для обох методик був ацетонітрил. Встановлено оптимальні умови кількісного визначення раміприлу в таблетках за реакцією з БФС: концентрація барвника – 2.35×10^{-4} моль/л, об'єм розчину БФС – 1.0 мл, без нагрівання, довжина хвилі – 598 нм, час реакції – 5 хв, температура розчину – 25 °С. Оптимальні умови кількісного визначення раміприлу в таблетках за реакцією з КЧ: концентрація барвника – 1.33×10^{-4} моль/л, об'єм розчину КЧ – 1.0 мл, без нагрівання, довжина хвилі – 395 нм, час реакції – 5 хв, температура розчину – 25 °С. Стехіометричні коефіцієнти відповідали 1 до 1. Спектрофотометрична методика визначення раміприлу за реакцією з БФС була лінійною у діапазоні концентрацій 1.99-5.96 мкг/мл, МВ – 0.20 мкг/мл, МКВ – 0.60 мкг/мл. Спектрофотометрична методика визначення раміприлу за реакцією з КЧ була лінійною у діапазоні концентрацій 0.42-5.44 мкг/мл, МВ – 0.10 мкг/мл, МКВ – 0.36 мкг/мл. Результати проведеної валідації вказують на відповідність критерія прийнятності.

Висновки до розділу 3

1. Під час розробки методик контролю якості таблеток раміприлу ми зосередилися на виборі селективної, простої та «зеленої» рухомої фази та хроматографічної колонки для досягнення експрес-відтворюваних результатів. З використанням хроматографічних колонок Inertsil ODS-3 (150 мм x 4,6 мм, 3 мкм) та Acclaim 120 C18 (250 мм x 4,6 мм, 5 мкм) було досягнуто відмінного розділення за короткий час аналізу.
2. Враховуючи досвід нашої дослідницької групи в розробці та валідації аналітичних методик для рутинного фармацевтичного аналізу, ми обрали ацетонітрил та іон-парний реагент натрію гексансульфонат як компоненти рухомої фази, що дозволило отримати «зелений» аналіз. Усі три розроблені ВЕРХ методики передбачали використання однієї і тієї ж рухомої фази, що

складалася з 0.2 г/л розчину натрію гексансульфонату (рН 2.7) та ацетонітрилу. ВЕРХ методика визначення супровідних домішок раміприлу в таблетках передбачала використання градієнтного елюювання, а ВЕРХ методика кількісного визначення раміприлу в таблетках та для проведення тесту «Розчинення» ізократичне елюювання (50:50). Простота ВЕРХ методик є зручною для використання хіміками, тому запропоновані методики можуть бути широко використані для цілей рутинного фармацевтичного аналізу. Крім того, ВЕРХ методики є експресними (час аналізу супровідних домішок становить близько 25 хв, кількісне визначення – 4.5 хв) та «зеленими».

3. Проведено валідацію трьох ВЕРХ методик з детальним описом процедури валідації. Критерії прийнятності для всіх валідаційних характеристик були чітко сформульовані. Для оцінки впливу запропонованих методик на навколишнє середовище застосовувалися метрики екологічності (AGREE та GAPI). Запропоновані ВЕРХ методики мають низький екологічний вплив відповідно до вищезгаданих показників оцінки «зеленості» порівняно з описаними в науковій літературі методиками.
4. Розроблено дві прості, експресні, економічно доступні, альтернативні спектрофотометричні методики визначення раміприлу в таблетках. Підбрано оптимальні умови пробопідготовки та кількісного визначення, які забезпечують правильний, прецизійний, швидкий та «зелений» аналіз раміприлу в таблетках. Аналітичні методики були лінійними в діапазоні концентрацій 1.99-5.96 мкг/мл (для БФС) та 0.42-5.44 мкг/мл (для КЧ). Розроблені два спектрофотометричні методи можуть бути використані як альтернативні методики для рутинного аналізу таблеток раміприлу.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в наукових працях автора [39-42, 82, 86, 87].

РОЗДІЛ 4

РОЗРОБКА МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ КОМБІНОВАНИХ ТАБЛЕТОК РАМІПРИЛУ ТА ГІДРОХЛОРТІАЗИДУ

Відповідно до даних всесвітньої організації охорони здоров'я, гіпертонія є одним з головних факторів смертності та інвалідності в світі [88]. Цей фактор призводить приблизно до 10.8 мільйонів передчасних смертей щороку [88]. В Україні кардіоваскулярні захворювання є причиною смерті в 64 % випадків, більше половини з них спричинені саме гіпертонією [88]. Одним з рекомендованих для коригування артеріального тиску препаратів [89] є комбінації діуретиків та інгібіторів ангіотензинперетворювального ферменту (АПФ). Тому наявність на ринку ефективних та доступних комбінованих препаратів (в тому числі генеричних) є важливою, а їх аналітична розробка є необхідною [90-97].

4.1 Дослідження профілів деградації раміприлу та гідрохлортіазиду як етап розробки методів визначення вмісту домішок у комбінованому препараті

Відповідно до літературних даних раміприл був стійким до дії УФ-випромінювання [20, 98, 99], гідрохлортіазид при дії УФ-випромінювання або не деградував взагалі [100], або його деградація була не значною [101, 102]. Оскільки обидві діючі речовини є стійкими до УФ-випромінювання, то дана стресова дія надалі не досліджувалась.

Відповідно [101, 100, 102], витримка за підвищеної температури на гідрохлортіазид також не мала значного впливу. Відповідно [98, 99] при нагріванні раміприлу продуктів деградації також не виявлено, тоді як відповідно [20] під час тривалого нагрівання (21 день при 70 °C) спостерігалось збільшення вмісту раміприлу дикетопіперазину.

При дії кислот на гідрохлортіазид значної деградації вдалось досягти [100] – утворювалось 15 % 4-аміно-6-хлорбензен-1,3-дисульфонамідру (Ph.Eur.

домішки В) при дії 1 М НСІ протягом 0,5 год при 80 °С. Хоча відповідно [101] при більш жорстких умовах значної деградації досягти не вдалось, тоді як раміприл виявляв нестабільність до дії кислот. Відповідно [98] при дії 0.1 М НСІ протягом 12 год при 40 °С зруйнувалось понад 66 % раміприлу. Основними продуктами деструкції були раміприлат та раміприл дікетопіперазин.

Гідрохлортіазид виявляє меншу стійкість до дії лугів, ніж до дії кислот [101, 100, 102]. Відповідно [100] основним продуктом деструкції як і при кислотному гідролізі є 4-аміно-6-хлорбензен-1,3-дисульфонамід. Дані щодо стабільності раміприлу до дії лугу суперечливі. Відповідно [20] при дії 0.1 М NaOH протягом 5 хв при 60 °С руйнувалось 34.6 % раміприлу. В той час як відповідно [98] при дії такої ж концентрації лугу протягом 12 годин при 40 °С деградації майже не спостерігалось, що узгоджується з даними [99].

До дії окислювачів гідрохлортіазид також проявляє стійкість. Для отримання продуктів деструкції його витримували в 30 % перекису водню при підвищенні температури (60 °С) [101, 10]. Відповідно [98] раміприл проявляє приблизно такий же рівень деградації при дії 30 % перекису водню за температури (40 °С).

У випадку [101, 98, 100, 99] досліджувався вплив стресових факторів на чисту субстанцію, у випадку [102] – на таблетки, у випадку [20] – на субстанцію з додаванням внутрішнього стандарту. У випадку [101, 20, 102] кислоту, луг або окиснювач додавали в метанольний розчин, у випадку [98, 100, 99] – до речовини або точний алгоритм не був описаний. Тобто на утворення продуктів деструкції впливає не лише природа речовини та інтенсивність дії, а й склад розчину. Тому для подальших досліджень використовували порошок розтертих таблеток. Кислоту, луг або перекис водню додавали безпосередньо до зразка для уникнення впливу органічного розчинника на результат.

Мета дослідження – дослідити профіль деградації раміприлу і гідрохлоритізиду та встановити можливість використання розробленої методики для одночасного визначення домішок обох компонентів у комбінованому препараті [103, 104].

Методи контролю вмісту супровідних домішок у лікарських засобах мають забезпечувати надійне виявлення продуктів деградації активних компонентів. Для демонстрації спроможності аналітичних методик надійно оцінювати продукти деградації аналізують зразки, які піддаються різним стресовим діям (наприклад нагрівання, окислення, кислотний / лужний гідроліз та інші) [37].

Нами попередньо розроблено ВЕРХ методику визначення раміприлу в таблетках [39], яку ми апробували в наших дослідженнях для вивчення профілів деградації. У плацебо препарату (вихідному зразку та у зразках, які підлягали стресовим діям) не виявлено жодних піків, які могли б інтерферувати з піками раміприлу, гідрохлортіазиду або їх домішок. У зразках плацебо, які підлягали стресовим діям, не утворювалось жодних додаткових піків в порівнянні з контрольним зразком. Тобто ні компоненти плацебо, ні їх можливі продукти деградації не впливають на можливість визначення супровідних домішок раміприлу або гідрохлортіазиду.

На рисунках 4.1-4.5 представлено типові хроматограми раміприлу в умовах дослідження профілів деградації.

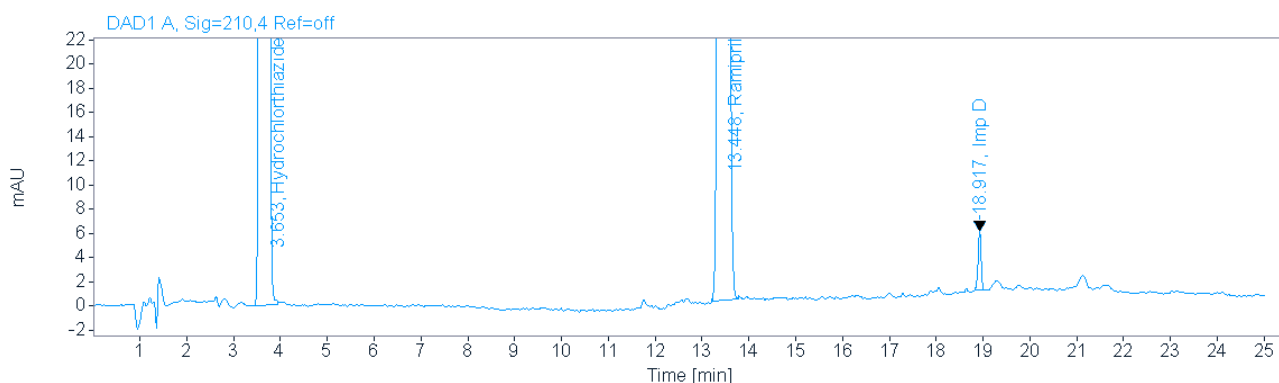


Рисунок 4.1 – Хроматограма вихідного зразка раміприлу та гідрохлортіазиду

У вихідному зразку таблеток раміприлу з гідрохлортіазидом домішок гідрохлортіазиду не було виявлено. Деградації гідрохлортіазиду під дією температури не спостерігалось. При дії кислоти, луку та окисника утворювалась домішка з відносним часом утримування (по відношенню до гідрохлортіазиду) 0.77. Найбільша кількість цієї домішки утворювалась при дії окисника.

Найбільша кількість продуктів деградації спостерігалась при лужному гідролізі (було виявлено з RRT 0.77, RRT 0.83 та RRT 1.04). Результати визначення вмісту домішок наведено у таблиці 4.1.

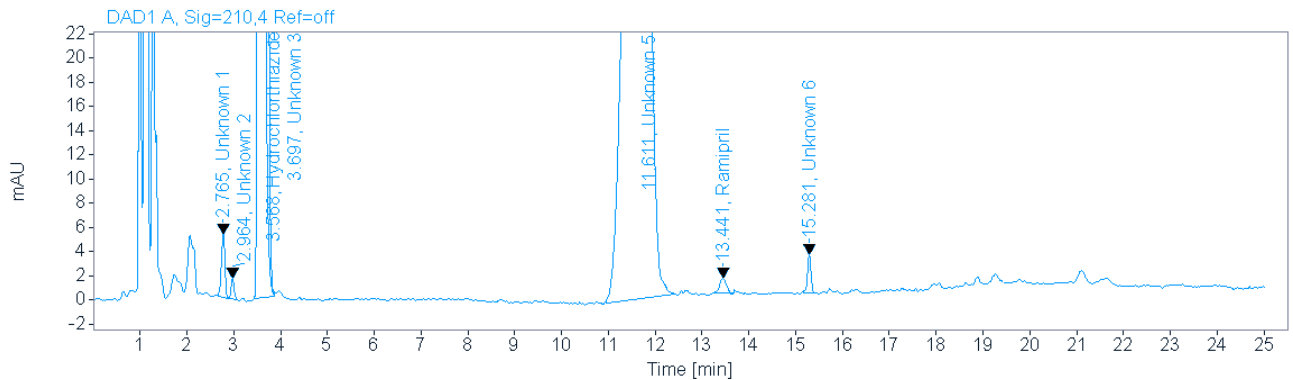


Рисунок 4.2 – Хроматограма розчину раміприлу та гідрохлортіазиду під дією луку

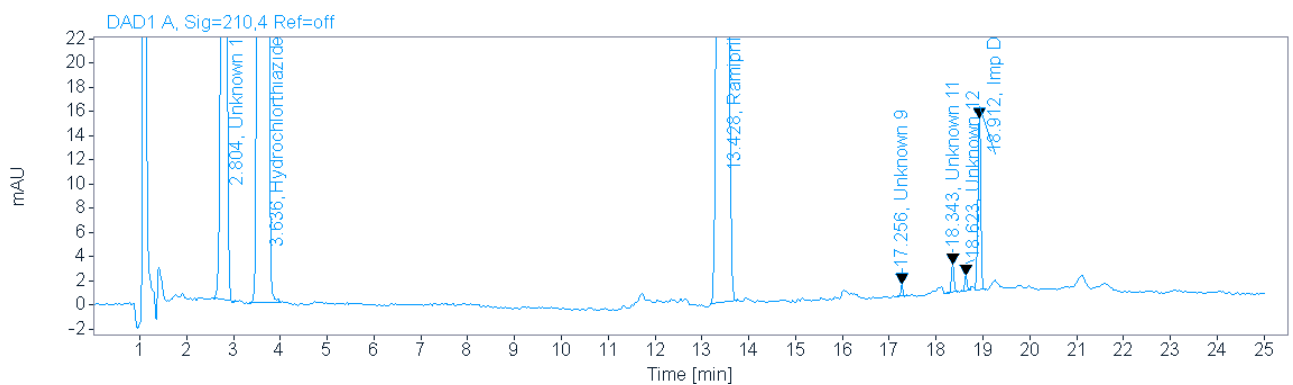


Рисунок 4.3 – Хроматограма розчину раміприлу та гідрохлортіазиду під дією окислення

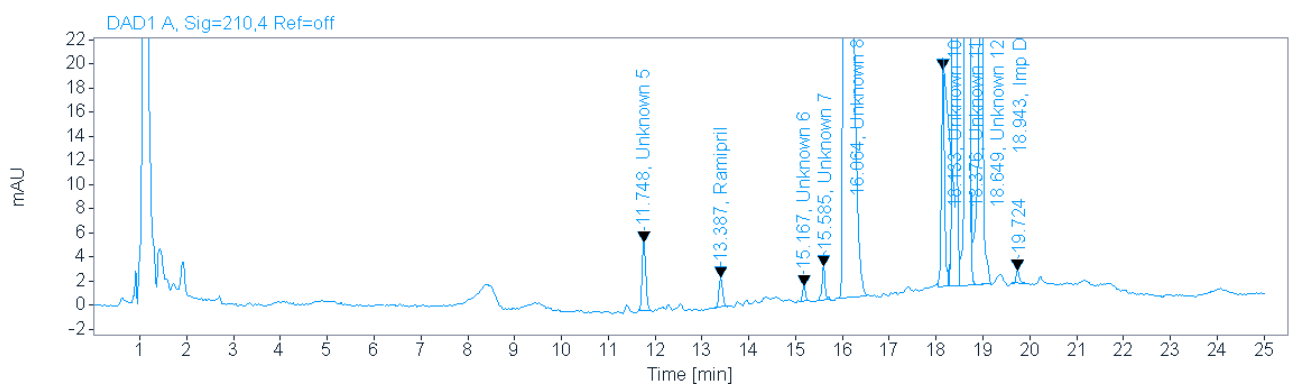


Рисунок 4.4 – Хроматограма розчину раміприлу під дією окислення

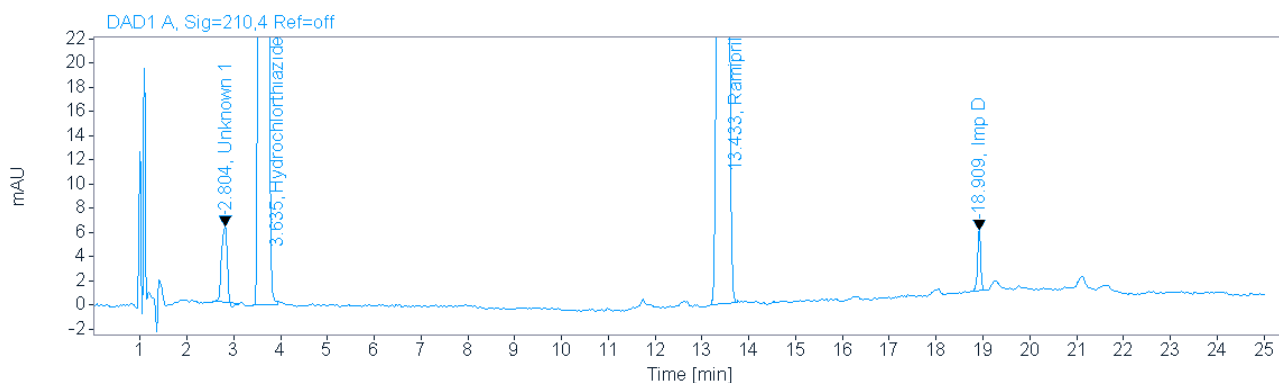


Рисунок 4.5 – Хроматограма розчину раміприлу та гідрохлортіазиду під дією
кислоти

Таблиця 4.1 – Результати визначення вмісту домішок гідрохлортіазиду у
комбінованому препараті після стресової дії

Аналіт	Стрессова дія				
	Вихідний зразок	60 °C 24 год	5 мл 0.1 М HCl 12 год	5 мл 0.1 М NaOH 12 год	5 мл 0.3 % H ₂ O ₂ 12 год
Домішка 1 (RRT0.77)	нмд	нмд	0.887 %	0.475 %	6.446 %
Домішка 2 (RRT0.83)	нмд	нмд	нмд	0,140 %	нмд
Домішка 3 (RRT1.04)	нмд	нмд	нмд	2.467 %	нмд
Гідрохлор-тіазид	100.567 %	99.867 %	98.345 %	95.836 %	92.479 %
Сума	100.567 %	99.867 %	99.232 %	98.917 %	98.925 %
Примітка. нмд – нижче межі детектування.					

У вихідному зразку таблеток раміприлу з гідрохлортіазидом виявлено домішку раміприлу дікетопіперазин (Ph.Eur. домішка D) у кількості 0.924 %. При дії кислоти вміст домішок раміприлу не змінювався. Дія температури сприяла збільшенню вмісту домішки D та з'являлась домішка раміприлату (Ph.Eur. домішка E). В результаті окислення вміст домішки D зростав та з'являлись додаткові піки (відносні часи утримування (по відношенню до піку раміприлу) 1.28, 1.37 та 1.39). Під дією лугу раміприл майже повністю

перетворювався на раміприлат. Результати визначення вмісту домішок наведено у таблиці 4.2.

Таблиця 4.2 – Результати визначення вмісту домішок раміприлу у комбінованому препараті після стресової дії

Аналіт	Стрессова дія				
	Вихідний зразок	60 °C 24 год	5 мл 0.1 М HCl 12 год	5 мл 0.1 М NaOH 12 год	5 мл 0.3 % H ₂ O ₂ 12 год
Домішка E (RRT0.86)	нмд	0.190 %	нмд	100.959 %	нмд
Домішка 4 (RRT1.12)	нмд	нмд	нмд	0.689 %	нмд
Домішка 7 (RRT1.28)	нмд	нмд	нмд	нмд	0.137 %
Домішка 9 (RRT1.37)	нмд	нмд	нмд	нмд	0.393 %
Домішка 10 (RRT1.39)	нмд	нмд	нмд	нмд	0.243 %
Домішка D (RRT1.41)	0.924 %	3.184 %	0.967 %	нмд	2.522 %
Раміприл	98.118 %	94.528 %	97.784 %	0.543 %	92.730 %
Сума	99.043 %	97.802 %	98.751 %	102.190 %	96.025 %
Примітка. нмд – нижче межі детектування.					

За результатами деградації комбінованого препарату, умови дії на монопрепарат вирішили змінити. Оскільки в лужному середовищі раміприл повністю зруйнувався, то час витримки з лугом скоротили до 1 год. Витримку з кислотою та окисником скоротили до 2 год, однак підвищили температуру до 60 °C.

У вихідному зразку монопрепарату раміприлу виявлено домішку D у кількості 4.674 % та неспецифіковану домішку з відносним часом утримування (по відношенню до піку раміприлу) 1.16. При дії температури дещо збільшувався вміст домішки D, та з'являлась домішка з RRT1.34. При дії кислоти при нагріванні деградації не спостерігалось. При дії луку раміприл та його домішка D повністю зруйнувались, навіть при зменшенні часу витримки. Підвищення температури при дослідженні окислення призвело до повного руйнування

раміприлу з утворенням 8 продуктів деградації. Результати визначення вмісту домішок наведено у таблиці 4.3.

Таблиця 4.3 – Результати визначення вмісту домішок раміприлу у монопрепараті після стресової дії

Аналіт	Стрессова дія				
	Вихідний зразок	60 °C 24 год	5 мл 0.1 М HCl 2 год 60 °C	5 мл 0.1 М NaOH 2 год	5 мл 0.3 % H ₂ O ₂ 2 год 60 °C
Домішка E (RRT0.86)	нмд	нмд	нмд	97.968 %	1.380 %
Домішка 4 (RRT1.12)	нмд	нмд	нмд	нмд	0.257 %
Домішка 5 (RRT1.16)	0.398 %	0.431 %	0.437 %	0.312 %	0.555 %
Домішка 6 (RRT1.19)	нмд	нмд	нмд	нмд	35.985 %
Домішка 8 (RRT1.34)	нмд	1.118 %	нмд	0.478 %	3.609 %
Домішка 9 (RRT1.37)	нмд	нмд	нмд	нмд	16.298 %
Домішка 10 (RRT1.39)	нмд	нмд	нмд	нмд	35.358 %
Домішка D (RRT1.41)	4.674 %	5.698 %	4.949 %	нмд	9.813 %
Раміприл	95.498 %	91.409 %	92.063 %	нмд	0.599 %
Сума	100.570 %	98.656 %	97.449 %	98.758 %	103.854 %
Примітка. нмд – нижче межі детектування.					

Сумарний вміст гідрохлортіазиду та його домішок незначно відрізняється від 100 %, так само, як і сумарний вміст раміприлу та його домішок. Це дозволяє припустити, що всі продукти деградації обох АФІ були враховані. Також це підтверджує можливість розрахунку вмісту домішок за піком основної речовини.

Продукти деградації гідрохлортіазиду елюювались в діапазоні часів утримування від 2 до 5 хв, раміприлу – від 10 до 20 хв. Тобто методика дозволяє відокремити домішки кожної з діючих речовин.

4.2 Розробка та валідація хроматографічної методики визначення залишкових кількостей раміприлу та гідрохлортіазиду для контролю очищення обладнання

Очищення обладнання та контроль повноти очищення обладнання є важливим етапом запобігання контамінації лікарського засобу попередньо виготовленим лікарським засобом. Кожен виробник повинен гарантувати, що на поверхні обладнання після проведення очищення не залишилось залишків активного інгредієнту або миючих засобів понад допустимий максимум. Повноту очищення обладнання контролюють шляхом аналізу останніх за часом промивних вод або аналізом змивів з поверхні обладнання. Методики, що використовуються для аналізу промивних вод, мають бути високоселективними та чутливими. Для розробки таких методик використовують методи ВЕРХ з спектрофотометричним або МС детектуванням, газову хроматографію, іонообмінну хроматографію, атомно-абсорбційну спектрометрію та УФ-спектрофотометрію. УФ-спектрофотометрію через недостатню чутливість неможливо використовувати для високоактивних речовин. Іонообмінну хроматографію та атомно-абсорбційну спектрометрію, зазвичай, використовують для контролю залишкового вмісту миючих засобів [105] або препаратів, що містять іони металів [106]. Газова хроматографія може бути використана для контролю лише летких сполук. Методи ВЕРХ з спектрофотометричним детектування є найбільш розповсюдженими, однак їх використання обмежене для високоактивних сполук, та сполук, що мають слабкі хроматофори [107]. Тому все більшої популярності почали набувати методи УВЕРХ з МС детектуванням. Використання високоселективного детектора та хроматографічних колонок дозволяє розробити швидкі методики з використанням невеликого об'єму малотоксичних рухомих фаз (суміш 0.1 % мурашиної кислоти з ацетонітрилом).

Мета дослідження – розробка хроматографічної методики визначення залишкових кількостей раміприлу та гідрохлортіазиду для контролю очищення обладнання на двох рідинних хроматографах з МС детектором [108].

Розробку та валідацію методики проводили з використанням рідинного хроматографу з МС детектором Agilent 6420. Вміст ацетонітрилу у рухомій фазі варіювали таким чином, що б час виходу піку гідрохлортіазиду становив від 0.5 хв до 1.5 хв. Маса 417 m/z для раміприлу відповідає молекулярному іону [M⁺]. Дочірній іон (234 m/z) утворюється шляхом відщеплення від материнського іону СО та частини молекули з брутто формулою C₈H₁₃NO₂ [108]. Маса 298 m/z для гідрохлортіазиду відповідає молекулярному іону [M⁺]. дочірній іон (281 m/z) утворюється шляхом відщеплення аміногрупи.

Найменший припустимий вмісту раміприлу у промивному розчині становив 0.188 мкг/мл, гідрохлортіазиду – 0.592 мкг/мл. Розведення промивних розчинів підбиралось таким чином, що б номінальна концентрація аналіту в випробовуваному розчині становила 0.010 мкг/мл.

Для дослідження специфічності методики визначення раміприлу аналізували розчинник (суміш ацетонітрил : вода (5 : 95)) та розчин порівняння. Типові хроматограми наведено на рисунку 4.6.

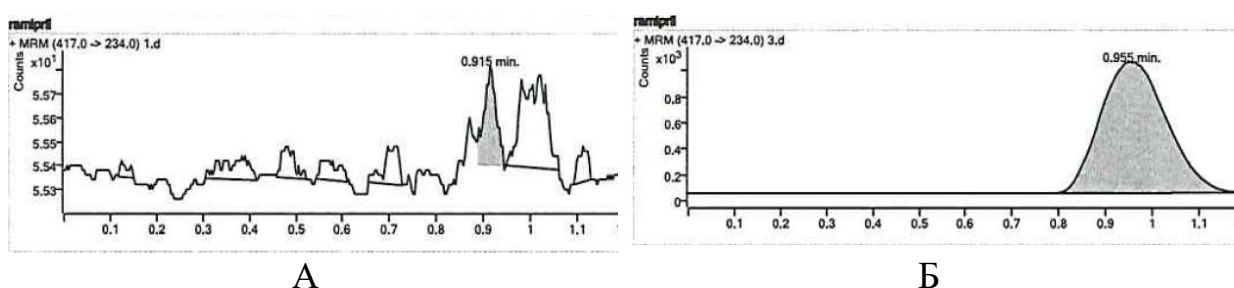


Рисунок 4.6 – Приклади хроматограм раміприлу, отриманих за допомогою Agilent 6420: А – хроматограма розчинника; Б – хроматограма розчину порівняння

Для дослідження специфічності методики визначення гідрохлортіазиду аналізували розчинник (0.05 % фосфорна кислота) та розчин порівняння. Типові хроматограми наведено на рисунку 4.7.

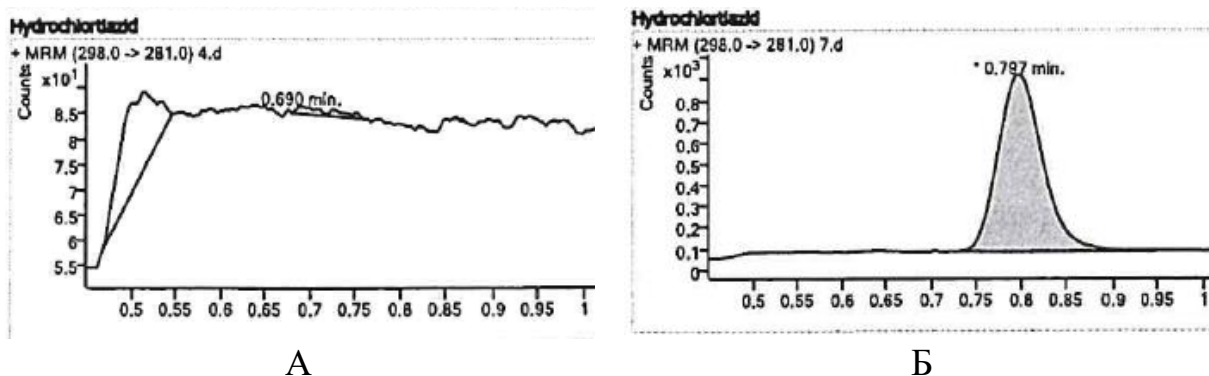


Рисунок 4.7 – Приклади хроматограм гідрохлортіазиду, отриманих за допомогою Agilent 6420: А – хроматограма розчинника; Б – хроматограма розчину порівняння

На хроматограмі розчинника піків, що можуть інтерферувати з піком раміприлу або гідрохлортіазиду не виявлено.

Лінійність, правильність та прецизійні досліджували об'єднаним експериментом у діапазоні концентрацій 0.0026 – 0.0255 мкг/мл (як для раміприлу, так і для гідрохлортіазиду).

Розраховували параметри лінійної регресії. За отриманим рівнянням регресії розраховували «знайдене» значення площ піків за формулою (4.1):

$$s_i = a + b \cdot C_i \quad (4.1)$$

де: s – значення площ піків, розраховане за рівнянням регресії;

C_i – концентрація аналізу у відповідному розчині для дослідження лінійності, мкг/мл;

a – вільний член рівняння регресії;

b – кутовий коефіцієнт рівняння регресії.

Розрахунок нормалізованого значення вільного члену рівняння регресії (у відсотках до сигналу обладнання що відповідає номінальній концентрації аналізу у розчині) проводили за формулою (4.2):

$$|a_i|, \% = \left| \frac{a \cdot C_0}{S_0 \cdot C_{nom}} \right| \cdot 100 \% \quad (4.2)$$

де: S_0 – площа піку аналізу у розчині порівняння;

C_0 – концентрація аналізу у розчині порівняння (0.01 мкг/мл);

C_{nom} – концентрація аналізу, що еквівалентна найменшому критерію вмісту у промивному розчині (0.01 мкг/мл).

Знайдену концентрацію аналізу у модельних розчинах розраховували за формулою (4.3):

$$C_{m_i} = \frac{C_0 \cdot S_i}{S_0} \quad (4.3)$$

де: S_i – площа аналізу у відповідному модельному розчині.

Співвідношення «Знайдено» / «Введено» розраховували за формулою (4.4):

$$Recovery_i = \frac{C_{m_i}}{C_{t_i}} \cdot 100\% \quad (4.4)$$

де: C_t – задана концентрація у модельних розчинах, мкг/мл.

Результати хроматографування та розрахунки для раміприлу наведено у таблиці 4.4, для гідрохлортіазиду – у таблиці 4.5.

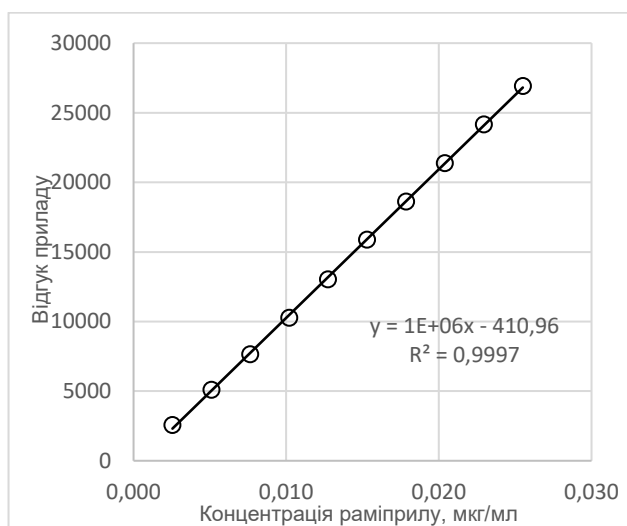
Таблиця 4.4 – Результати дослідження для раміприлу

Розчин	C_t , МКГ/МЛ	S_i	RSD_S	s_i	$S_i - s_i$	C_m , МКГ/МЛ	Recovery, %
M1	0.0026	2569	0.586	2311	258	0.0026	102.416
M2	0.0051	5097	0.606	5033	64	0.0052	101.605
M3	0.0077	7652	0.356	7755	-103	0.0078	101.693
M4	0.0102	10278	0.500	10477	-199	0.0104	102.449
M5	0.0128	13042	0.342	13199	-156	0.0133	104.002
M6	0.0153	15885	0.405	15921	-36	0.0162	105.556
M7	0.0179	18616	0.800	18643	-27	0.0189	106.034
M8	0.0204	21375	0.316	21364	10	0.0217	106.529
M9	0.0230	24156	0.562	24086	70	0.0246	107.014
M10	0.0255	26928	0.529	26808	119	0.0274	107.364

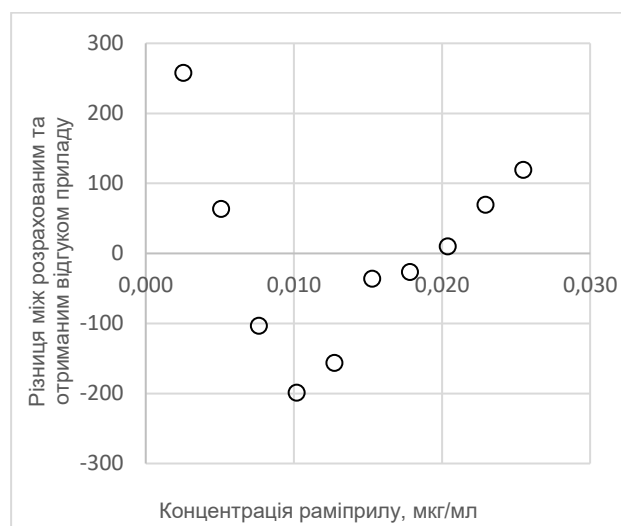
Графік залежності відгуку приладу від концентрації раміприлу у модельних розчинах наведено на рисунку 4.8, гідрохлортіазиду – на рисунку 4.9.

Таблиця 4.5 – Результати дослідження для гідрохлортіазиду

Розчин	C_t , МКГ/МЛ	S_i	RSD_S	s_i	$S_i - s_i$	C_m , МКГ/МЛ	Recovery, %
M1	0.0026	729	2.777	756	-26	0.0026	100.011
M2	0.0051	1492	1.106	1477	16	0.0052	102.320
M3	0.0077	2138	2.082	2198	-60	0.0075	97.726
M4	0.0102	2910	1.369	2919	-8	0.0102	99.771
M5	0.0128	3670	0.904	3640	30	0.0128	100.651
M6	0.0153	4405	0.386	4361	44	0.0154	100.682
M7	0.0179	5184	0.947	5082	102	0.0181	101.559
M8	0.0204	5834	0.338	5803	31	0.0204	100.006
M9	0.0230	6405	0.351	6524	-119	0.0224	97.584
M10	0.0255	7235	0.194	7245	-10	0.0253	99.212



А



Б

Рисунок 4.8 – Графік залежності відгуку приладу від концентрації раміприлу: А – графік регресії; Б – графік залишків

Для раміприлу коефіцієнт кореляції калібрувальної прямої становив 0.99986, що задовольняє критерій прийнятності (не менше 0.995). Відношення вільного члена рівняння регресії до номінальної концентрації раміприлу становило 4.041 %, що задовольняє критерій прийнятності (не більше 5.0 %). Залишки довільним чином розкидані довкола нуля. Тобто методика була лінійною у досліджуваному діапазоні.

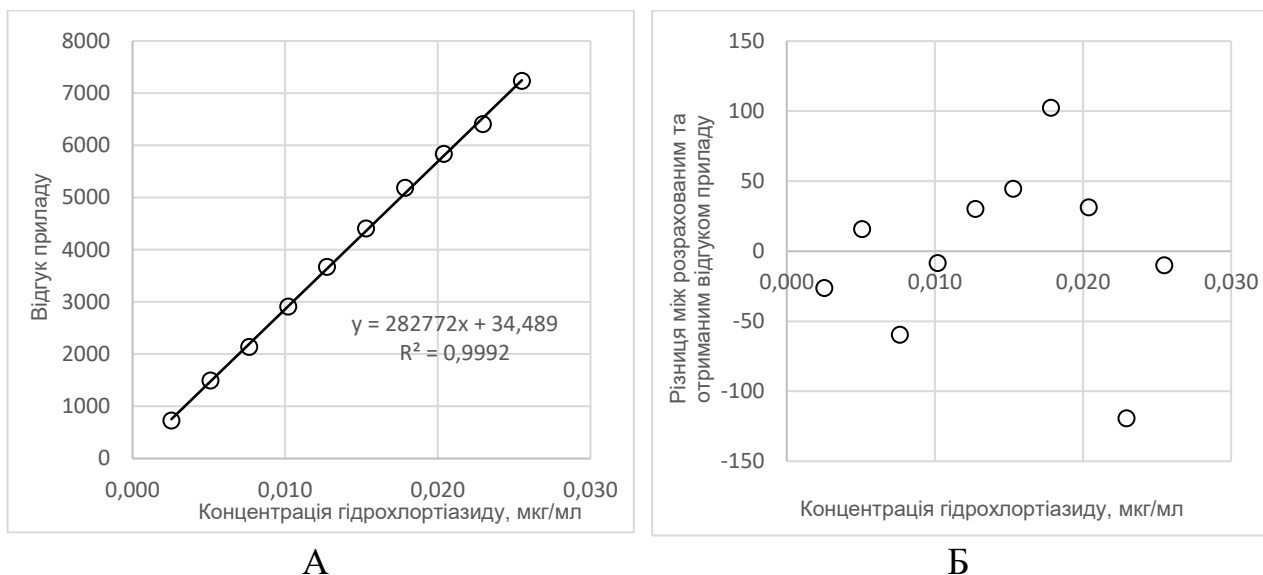


Рисунок 4.9 – Графік залежності відгуку приладу від концентрації гідрохлортіазиду: А – графік регресії; Б – графік залишків

Для гідрохлортіазиду коефіцієнт кореляції калібрувальної прямої становив 0.99961, що задовольняє критерій прийнятності (не менше 0.995). Відношення вільного члена рівняння регресії до номінальної концентрації гідрохлортіазиду становило 1.198 %, що задовольняє критерій прийнятності (не більше 5.0 %). Залишки довільним чином розкидані довкола нуля. Тобто методика була лінійною у досліджуваному діапазоні.

Індивідуальні значення ступенів вилучення раміприлу знаходяться в межах 101.6–107.4 %, що задовольняє критерій прийнятності (90.0–110.0 %). Середнє значення ступеню вилучення становило 104.5 %, що задовольняє критерій прийнятності (95.0–105.0 %). Тобто правильність методики достатня.

Індивідуальні значення ступенів вилучення гідрохлортіазиду знаходяться в межах 97.6–102.3 %, що задовольняє критерій прийнятності (90.0–110.0 %). Середнє значення ступеню вилучення становило 100.0 %, що задовольняє критерій прийнятності (95.0–105.0 %). Тобто правильність методики достатня.

Відносне стандартне відхилення ступенів вилучення раміприлу становило 2.191 %, що задовольняє критерій прийнятності (не більше 5.0 %). Тобто прецизійність методики достатня.

Відносне стандартне відхилення ступенів вилучення гідрохлортіазиду становило 1.505 %, що задовольняє критерій прийнятності (не більше 5.0 %). Тобто прецизійність методики достатня.

МВ (DL) та МКВ (QL) розраховували за параметрами калібрувальної прямої в діапазоні концентрацій (0.0026–0.0128 мкг/мл) за формулою (4.5), (4.6):

$$QL = \frac{10 \cdot S_a}{b} \quad (4.5)$$

$$DL = \frac{3,3 \cdot S_a}{b} \quad (4.6)$$

де: S_i – відхилення вільного члену рівняння регресії.

Результати розрахунків для наведено у таблиці 4.6.

Таблиця 4.6 – Результати розрахунку МВ та МКВ

Аналіт	b	S_a	МВ, мкг/мл	МКВ, мкг/мл
Раміприл	1024654	91	0.0003	0.0009
Гідрохлортіазид	286248	39	0.0005	0.0014

Для підтвердження МКВ проводили розрахунок співвідношення сигнал/шум, ступені вилучення, та RSD між ступенями вилучення для модельних розчинів М1. Результати хроматографування та розрахунки для раміприлу наведено наведено у таблиці 4.7 , для гідрохлортіазиду – у таблиці 4.8.

Таблиця 4.7 – Підтвердження МКВ раміприлу

Параметр	Розчин	М1		
		1	2	3
Концентрація, мкг/мл		0.0026		
Площа піку		2586	2559	2561
Індивідуальні значення ступеня вилучення	Критерій	90.0 % – 110.0 %		
	Результат	103.107	102.030	102.110
RSD між ступенями вилучення	Критерій	≤ 10.0 %		
	Результат	0.586 %		
Співвідношення сигнал/шум	Критерій	≥ 10		
	Результат	642.69	804.84	619.24

Таблиця 4.8 – Підтвердження МКВ гідрохлортіазиду

Параметр	Розчин	M1		
		1	2	3
Концентрація, мкг/мл		0.0026		
Площа піку		713	723	752
Індивідуальні значення ступеня вилучення	Критерій	90.0 % – 110.0 %		
	Результат	97.772	99.143	103.120
RSD між ступенями вилучення	Критерій	≤ 10.0 %		
	Результат	2.8 %		
Співвідношення сигнал/шум	Критерій	≥ 10		
	Результат	41.44	53.81	66.86

МКВ раміприлу підтверджено на рівні концентрації 0.0026 мкг/мл, що становить 25 % від найменшому критерію вмісту раміприлу у промивному розчині. Розраховане значення майже у три рази менше підтвердженої концентрації, тобто на нижній межі дослідженого діапазону методика відтворюється з достатнім рівнем надійності.

МКВ гідрохлортіазиду підтверджено на рівні концентрації 0.0026 мкг/мл, що становить 25 % від найменшому критерію вмісту гідрохлортіазиду у промивному розчині. Розраховане значення удвічі менше підтвердженої концентрації, тобто на нижній межі дослідженого діапазону методика відтворюється з достатнім рівнем надійності.

Також досліджували можливість відтворення методик на іншій одиниці обладнання (рідинний хроматограф з МС детектором Waters Xevo TQD ACQUITY). Типові хроматограми розчинника та розчину порівняння для раміприлу наведено на рисунку 4.10, для гідрохлортіазиду – на рисунку 4.11.

На хроматограмі розчинника не виявлено піків, що можуть інтерферувати з піком раміприлу або гідрохлортіазиду.

Лінійність, правильність та прецизійні досліджували об'єднаним експериментом у діапазоні концентрацій раміприлу 0.0026 – 0.0250 мкг/мл та гідрохлортіазиду 0.0026 – 0.0252 мкг/мл.

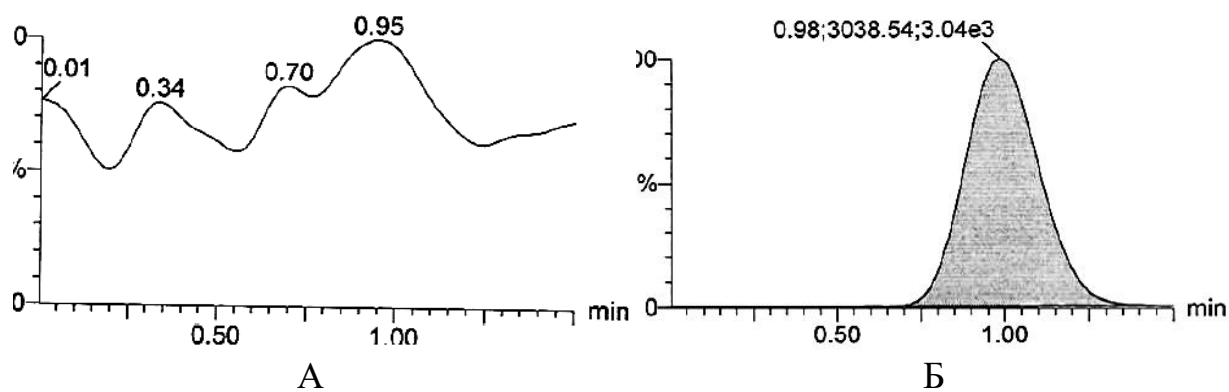


Рисунок 4.10 – Приклади хроматограм раміприлу, отриманих за допомогою Waters Xevo TQD ACQUITY: А – хроматограма розчинника; Б – хроматограма розчину порівняння

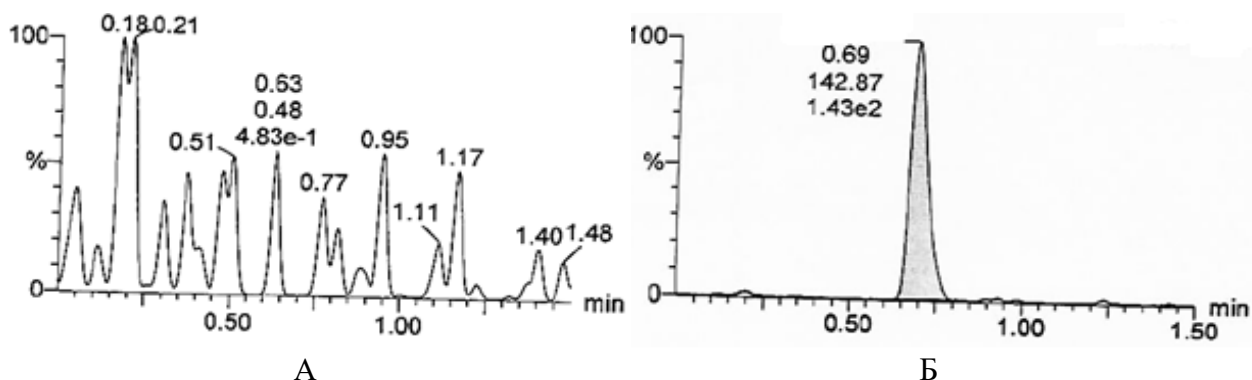


Рисунок 4.11 – Приклади хроматограм гідрохлортіазиду, отриманих за допомогою Waters Xevo TQD ACQUITY: А – хроматограма розчинника; Б – хроматограма розчину порівняння

Результати хроматографування та розрахунки для раміприлу наведено у таблиці 4.9, для гідрохлортіазиду – у таблиці 4.10. Графік залежності відгуку приладу від концентрації раміприлу у модельних розчинах наведено на рисунку 4.12, гідрохлортіазиду – на рисунку 4.13.

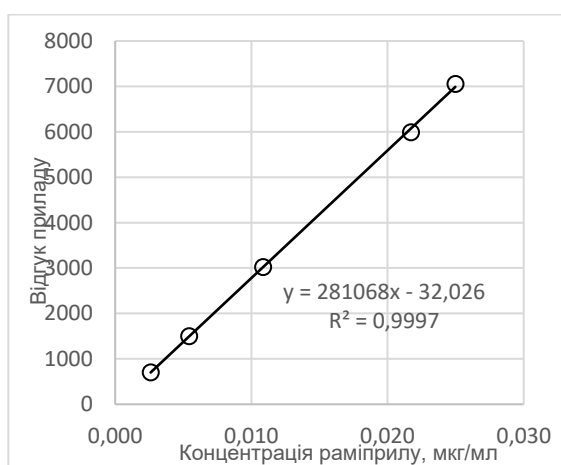
Для раміприлу коефіцієнт кореляції калібрувальної прямої становив 0.99983, що задовольняє критерій прийнятності (не менше 0.995). Відношення вільного члена рівняння регресії до номінальної концентрації гідрохлортіазиду становило 1.121 %, що задовольняє критерій прийнятності (не більше 5.0 %). Залишки довільним чином розкидані довкола нуля. Тобто методика була лінійною у досліджуваному діапазоні.

Таблиця 4.9 – Результати дослідження раміприлу

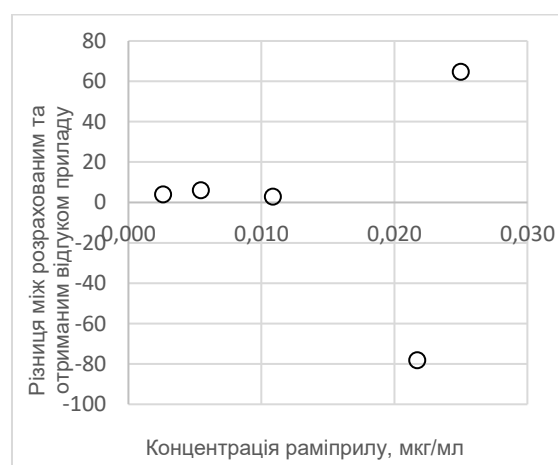
Розчин	C_t , мкг/мл	S_i	RSD_S	s_i	S_i-s_i	C_m , мкг/мл	Recovery, %
M1	0.0026	705	1.349	701	4	0.0025	97.115
M2	0.0054	1500	1.470	1494	6	0.0054	99.250
M3	0.0109	3023	1.288	3020	3	0.0109	100.000
M4	0.0217	5995	0.941	6073	-78	0.0215	99.140
M5	0.0250	7053	2.311	6988	65	0.0253	101.433

Таблиця 4.10 – Результати дослідження гідрохлортіазиду

Розчин	C_t , мкг/мл	S_i	RSD_S	s_i	S_i-s_i	C_m , мкг/мл	Recovery, %
M1	0.0026	33	3.464	33	1	0.0026	98.270
M2	0.0055	69	1.449	70	-1	0.0053	97.642
M3	0.0109	141	1.473	142	-1	0.0109	100.000
M4	0.0219	293	1.423	287	6	0.0227	103.538
M5	0.0252	325	2.263	330	-5	0.0252	100.003



А



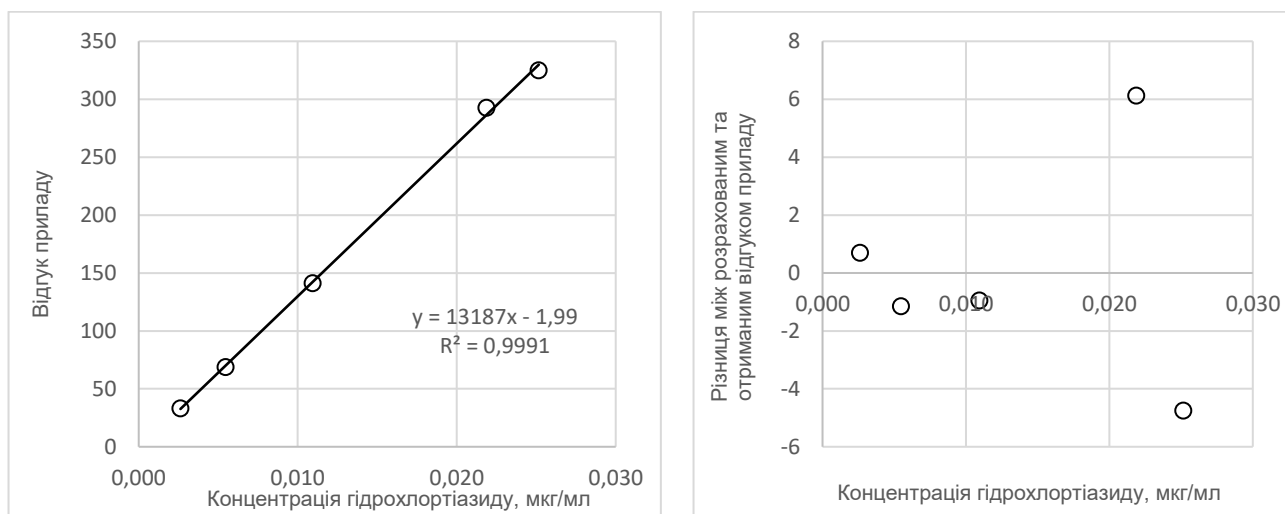
Б

Рисунок 4.12 – Графік залежності відгуку приладу від концентрації раміприлу:

А – графік регресії; Б – графік залишків

Для гідрохлортіазиду коефіцієнт кореляції калібрувальної прямої становив 0.99954, що задовольняє критерій прийнятності (не менше 0.995). Відношення вільного члена рівняння регресії до номінальної концентрації гідрохлортіазиду становило 1.567 %, що задовольняє критерій прийнятності (не більше 5.0 %).

Залишки довільним чином розкидані довкола нуля. Тобто методика була лінійною у досліджуваному діапазоні.



А

Б

Рисунок 4.13 – Графік залежності відгуку приладу від концентрації гідрохлортіазиду: А – графік регресії; Б – графік залишків

Індивідуальні значення ступенів вилучення раміприлу знаходилися в межах 97.1–101.4 %, що задовольняє критерій прийнятності (90.0–110.0 %). Середнє значення ступеню вилучення становило 99.4 %, що задовольняє критерій прийнятності (95.0–105.0 %). Тобто правильність методики достатня.

Індивідуальні значення ступенів вилучення гідрохлортіазиду знаходилися в межах 97.6–103.5 %, що задовольняє критерій прийнятності (90.0–110.0 %). Середнє значення ступеню вилучення становило 99.9 %, що задовольняє критерій прийнятності (95.0–105.0 %). Тобто правильність методики достатня.

Відносне стандартне відхилення ступенів вилучення раміприлу становило 1.275 %, що задовольняє критерій прийнятності (не більше 5.0 %). Тобто прецизійність методики достатня.

Відносне стандартне відхилення ступенів вилучення гідрохлортіазиду становило 2.294 %, що задовольняє критерій прийнятності (не більше 5.0 %). Тобто прецизійність методики достатня.

Для підтвердження МКВ проводили розрахунок співвідношення сигнал/шум, ступені вилучення, та RSD між ступенями вилучення для модельних розчинів М1. Результати хроматографування та розрахунки для раміприлу наведено у таблиці 4.11, для гідрохлортіазиду – у таблиці 4.12. МКВ на рівні концентрації 0.0026 мкг/мл підтверджено.

Таблиця 4.11 – Підтвердження МКВ раміприлу

Параметр	Розчин	М1		
		1	2	3
Концентрація, мкг/мл		0.0026		
Площа піку		695	714	705
Індивідуальні значення ступеня вилучення	Критерій	90.0 % – 110.0 %		
	Результат	95.783	98.401	97.161
RSD між ступенями вилучення	Критерій	≤ 10.0 %		
	Результат	1.349		
Співвідношення сигнал/шум	Критерій	≥ 10		
	Результат	668	681	602

Таблиця 4.12 – Підтвердження МКВ гідрохлортіазиду

Параметр	Розчин	М1		
		1	2	3
Концентрація, мкг/мл		0.0026		
Площа піку		34	34	32
Індивідуальні значення ступеня вилучення	Критерій	90.0 % – 110.0 %		
	Результат	100.236	100.236	94.340
RSD між ступенями вилучення	Критерій	≤ 10.0 %		
	Результат	3.464		
Співвідношення сигнал/шум	Критерій	≥ 10		
	Результат	127	140	135

4.3 Розробка та валідація методик контролю за показниками якості «Кількісне визначення» та «Однорідність дозованих одиниць» комбінованих таблеток раміприлу з гідрохлортіазидом з використанням хроматографічної колонки Inertsil ODS-3 (150 мм x 4.6 мм, 3 мкм)

Аналітична розробка багатокомпонентних лікарських форм є складною та багатогранною з використанням складних хімічних підходів [110-137]. Для проведення досліджень з розробки методик контролю за показниками якості «Кількісне визначення» та «Однорідність дозованих одиниць» комбінованих таблеток раміприлу з гідрохлортіазидом використовували ізократичне елюювання. Вміст ацетонітрилу в рухомій фазі має більш суттєвий вплив на час утримування раміприлу, ніж гідрохлоротіазиду. При зменшенні вмісту ацетонітрилу до 40 % змінюється порядок виходу піків. Також при зменшенні вмісту ацетонітрилу значно збільшується ширина піку раміприлу, що негативно впливає на розділення між піками та ускладнює інтегрування піку раміприлу (табл. 4.13).

Таблиця 4.13 – Параметри хроматографічної системи при підборі співвідношення рухомих фаз

Співвідношення рухомих фаз (рухома фаза (А) : рухома фаза (В))	Раміприл			Гідрохлоротіазид				Час хроматографування, хв
	RT	As	N	RT	Rs	As	N	
50 : 50	1.448	1.012	493	1.838	2.244	1.164	7126	~ 3.2
60 : 40	2.681	1.167	1166	2.324	1.777	1.115	11063	~ 4.2
65 : 35	3.597	1.133	761	2.370	3.978	1.195	9492	~ 5
47 : 53	1.122	1.105	548	1.482	2.642	1.075	5258	~ 2.8

Тому збільшено вміст ацетонітрилу в рухомій фазі до 53 %. Хоча за цих умов спостерігається чисельне зменшення ефективності хроматографічної

системи, за рахунок зменшення часу утримування піків, однак розділення між піками достатнє та ширина піку раміприлу вдвічі менша. Окрім того, час хроматографування скорочується в 2 рази (рис. 4.14). Тому обрано співвідношення 0.2 г/л розчину натрію гексансульфонату (рН 2.7) : ацетонітрилу 47:53.

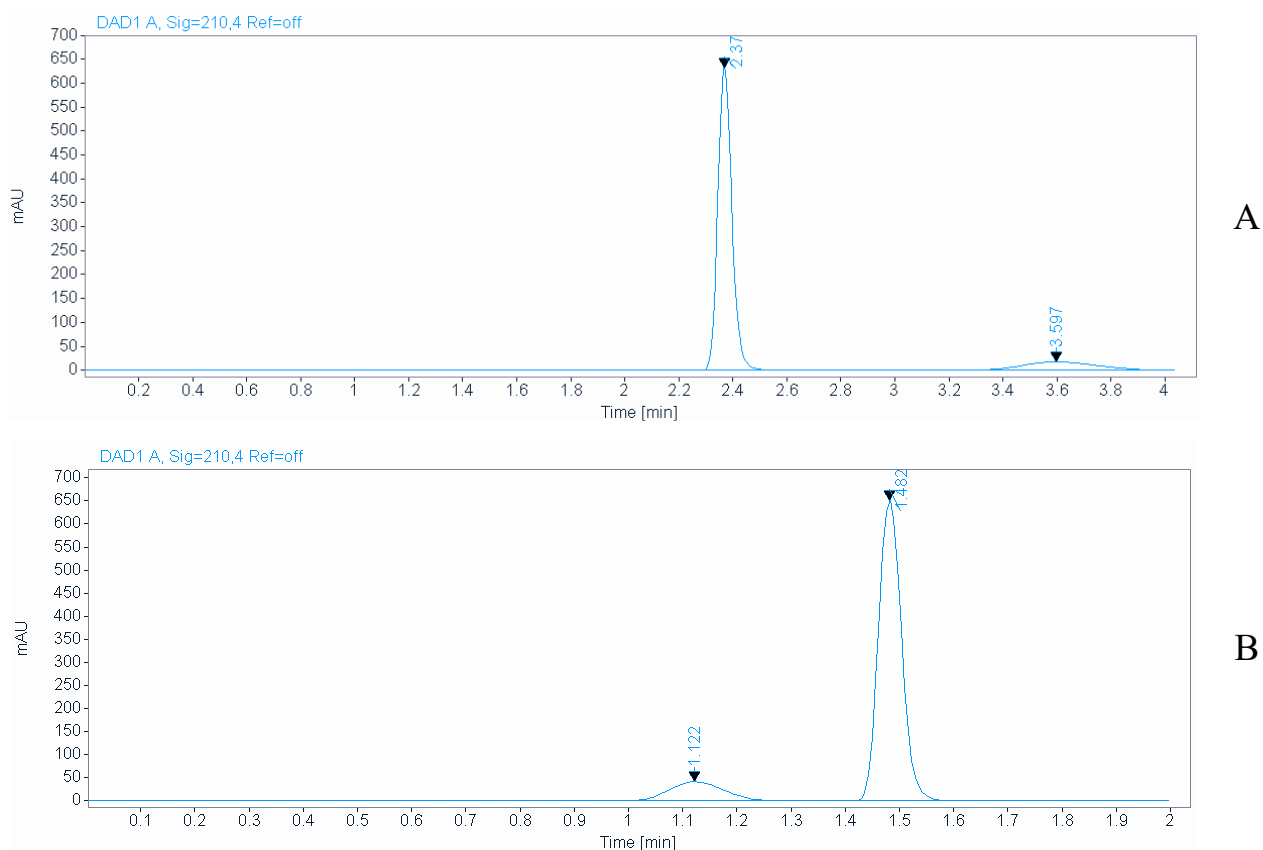


Рисунок 4.14 – Приклад хроматограми випробовуваного розчину за різних співвідношень рухомих фаз (А – співвідношення 65 : 35, В – 47 : 63)

Досліджували робасність методики за обраного співвідношення рухомих фаз за зміною наступних факторів:

- швидкості потоку (± 0.1 мг/хв);
- температури термостату колонки (± 5 °С);
- вмісту ацетонітрилу у рухомій фазі (± 2 %);
- рН 0.2 г/л розчину натрію гексансульфонату (± 0.2);
- концентрації натрію гексансульфонату у розчині (± 0.1 г/л).

При дослідження робасності аналізували розчини порівняння та випробовувані розчини для 3-х дозувань препаратів. Розраховували зміну відгуку у розчинах за формулою (4.7):

$$RRF = \frac{S_{1_i} \cdot S_{0_{nom}}}{S_{0_i} \cdot S_{1_{nom}}} \cdot 100\% \quad (4.7)$$

де: S_{1_i} – площа піку у випробовуваному розчині за змінених умов;

$S_{1_{nom}}$ – площа піку у випробовуваному розчині за номінальних умов;

S_{0_i} – площа піку у розчині порівняння за змінених умов;

$S_{0_{nom}}$ – площа піку у розчині порівняння за номінальних умов.

Результати хроматографування та проведені розрахунки наведено у таблицях 4.14-4.16.

Таблиця 4.14 – Результати дослідження впливу варіювання умов хроматографування на відтворення методики

Розчин	Аналіт	Параметр	Умови хроматографування				
			номінальні	+ 0.1, мл/хв	- 0.1, мл/хв	+ 5, °C	- 5, °C
1	2	3	4	5	6	7	8
Дозування 5 мг + 25 мг							
РП	Рл	S	289.738	267.186	316.770	289.507	290.361
		RSD, %	0.055	0.140	0.040	0.132	0.070
		As	1.1	1.1	1.1	1.1	1.2
		N	550-557	500-510	581-605	657-699	415-424
	ГХТ	S	1921.92	1770.27	2097.08	1919.28	1924.09
		RSD, %	0.005	0.122	0.034	0.152	0.117
		Rs	2.6-2.7	2.5	2.8	2.4	2.8-2.9
		As	1.0-1.1	1.0-1.1	1.0-1.1	1.1	1.0-1.1
		N	5236-5293	4642-4677	5956-6009	5127-5143	5343-4396
		RRF, %	н/в	100.068	100.226	99.915	100.401
ВР	Рл	S	260.490	240.379	285.437	260.062	262.098
		RRF, %	н/в	100.068	100.226	99.915	100.401
	ГХТ	S	1948.25	1795.03	2125.51	1932.14	1939.39
		RRF, %	н/в	100.028	99.986	99.310	99.433
Дозування 5 мг + 12.5 мг							
РП	Рл	S	511.933	472.947	559.213	511.208	512.942
		RSD, %	0.029	0.075	0.083	0.105	0.167
		As	1.1	1.1	1.1	1	1.2
		N	540-558	497-498	555-577	677-682	412-416
	ГХТ	S	1937.28	1786.39	2113.64	1932.95	1923.13
		RSD, %	0.031	0.062	0.089	0.129	0.101
		Rs	2.6	2.5	2.7-2.8	2.4	2.9
		As	1.1	1.0-1.1	1.1-1.2	1.1	1.0-1.1
		N	5292-5307	4625-4685	5988-6017	5116-5148	5318-5329
		RRF, %	н/в	100.028	99.986	99.310	99.433

Продовження таблиці 4.14

1	2	3	4	5	6	7	8
ВР	Рл	S	519.398	478.233	566.362	519.370	522.374
		RRF, %	н/в	99.664	99.823	100.136	100.375
	ГХТ	S	1931.05	1776.05	2103.62	1934.25	1933.48
		RRF, %	н/в	99.742	99.847	100.390	100.812
Дозування 10 мг + 12.5 мг							
РП	Рл	S	499.823	461.647	547.852	500.862	502.839
		RSD, %	0.215	0.183	0.121	0.238	0.070
		As	1.1-1.2	1.1-1.2	1.1-1.2	1.0-1.1	1.2
		N	542-554	505-518	555-584	673-695	411-416
	ГХТ	S	981.50	905.34	1072.65	980.49	981.97
		RSD, %	0.283	0.138	0.088	0.220	0.225
		Rs	2.6	2.5	2.8	2.4	2.8
		As	1.1	1.0-1.1	1.0-1.4	1.1	1.1-1.2
ВР	Рл	S	510.559	471.372	557.567	510.011	510.992
		RRF, %	н/в	99.959	99.633	99.685	99.485
	ГХТ	S	996.10	917.14	1085.54	993.59	997.13
		RRF, %	н/в	99.818	99.719	99.851	100.054
Примітка. Рл – раміприл, ГХТ – гідрохлортіазид, РП – розчин порівняння, ВР – випробовуваний розчин.							

Таблиця 4.15 – Результати дослідження впливу варіювання приготування рухомої фази А на відтворення методики

Розчин	Аналіт	Пара-метр	Умови хроматографування				
			номінальні	+ 0.01, г/л	- 0.01, г/л	+ 0.2, рН	- 0.2, рН
1	2	3	4	5	6	7	8
Дозування 5 мг + 25 мг							
РП	Рл	S	289.738	294.417	293.118	294.246	292,225
		RSD	0.055	0.462	0.062	0.350	0,210
		S	1.1	1.1	1.1	1	1,1-1,2
		RSD, %	550-557	563-581	458-579	411-428	696-773
	ГХТ	As	1921.92	1949.37	1942.92	1944.48	1940,89
		N	0.005	0.328	0.054	0.116	0,028
		S	2.6-2.7	2.7	2.7-2.8	2.1	3,2-3,4
		RSD,%	1.0-1.1	1.1	1.0-1.1	1.0-1.2	1,0-1,2
ВР	Рл	As	260.490	263.534	263.132	266.834	264,902
		N	н/в	99.561	99.849	100.866	100,828
	ГХТ	S	1948.25	1957.86	1956.93	1953.06	1957,65
		RRF,%	н/в	99.078	99.360	99.084	99,501
Дозування 5 мг + 12.5 мг							
РП	Рл	S	511.933	516.028	514.478	519.484	516,029
		RSD, %	0.029	0.237	0.182	0.781	0,530
		As	1.1	1.1	1.1-1.2	1.0-1.1	1,1-1,2
		N	540-558	542-580	545-555	408-427	760-774

Продовження таблиці 4.15

1	2	3	4	5	6	7	8
	ГХТ	S	1937.28	1959.03	1951.36	1985.14	1957,29
		RSD,%	0.031	0.354	0.204	1.448	0,884
		Rs	2.6	2.7	2.7	2.0-2.1	3,4
		As	1.1	1.1-1.2	1.1	1.0-1.1	1,1-1,2
		N	5292-5307	5161-5251	5167-5200	5184-5205	5089-5143
ВР	Рл	S	519.398	524.636	524.731	526.301	523,445
		RRF,%	н/в	100.207	100.527	99.856	99,979
	ГХТ	S	1931.05	1946.76	1947.66	1978.74	1951,98
		RRF, %	н/в	99.694	100.133	99.999	100,050
Дозування 10 мг + 12.5 мг							
РП	Рл	S	499.823	504.306	502.010	503.866	501,914
		RSD, %	0.215	0.208	0.140	0.247	0,519
		As	1.1-1.2	1.1	1.1	1.0-1.1	1,1-1,2
		N	542-554	543-554	548-551	427-437	757-762
	ГХТ	S	981.50	979.18	976.01	978.09	976,03
		RSD,%	0.283	0.583	0.144	0.310	0,675
		Rs	2.6	2.6-2.7	2.7	2.1	3,4
		As	1.1	1.0-1.1	1.1	1.0-1.2	1,0-1,1
		N	5277-5339	5151-5256	5209-5230	5155-5218	5150-5203
		ВР	Рл	S	510.559	512.275	514.731
RRF,%	н/в			99.444	100.378	99.442	99,344
ГХТ	S		996.10	994.03	994.17	995.18	993,03
	RRF, %		н/в	100.029	100.367	100.256	100,250
Примітка. Рл – раміприл, ГХТ – гідрохлортіазид, РП – розчин порівняння, ВР – випробований розчин.							

Таблиця 4.16 – Результати дослідження впливу зміни співвідношення рухомих фаз на відтворення методики

Розчин	Аналіт	Параметр	Умови хроматографування		
			номінальні	+ 2, %	- 2, %
1	2	3	4	5	6
Дозування 5 мг + 25 мг					
РП	Рл	S	289.738	290,165	289,031
		RSD, %	0.055	0,049	0,092
		As	1.1	1,1-1,2	1,1
		N	550-557	527-537	485-504
	ГХТ	S	1921.92	1921,25	1918,43
		RSD,%	0.005	0,035	0,127
		Rs	2.6-2.7	2,8	2,3-2,4
		As	1.0-1.1	1,0-1,1	1,0-1,1
		N	5236-5293	5045-5116	5417-5456
		ВР	Рл	S	260.490
RRF,%	н/в			100,058	100,180

Продовження таблиці 4.16

1	2	3	4	5	6
	ГХТ	S	1948.25	1952,81	1941,76
		RRF, %	н/в	100,269	99,848
Дозування 5 мг + 12.5 мг					
РП	Рл	S	511.933	512,506	509,792
		RSD, %	0.029	0,063	0,111
		As	1.1	1,1	1,1
		N	540-558	523-529	487-493
	ГХТ	S	1937.28	1936,00	1932,28
		RSD,%	0.031	0,087	0,127
		Rs	2.6	2,8	2,3
		As	1.1	1,0-1,1	1,2
		N	5292-5307	5070-5083	5366-5384
ВР	Рл	S	519.398	520,049	518,804
		RRF,%	н/в	100,013	100,305
	ГХТ	S	1931.05	1930,93	1933,55
		RRF, %	н/в	100,060	100,388
Дозування 10 мг + 12.5 мг					
РП	Рл	S	499.823	502,285	501,950
		RSD, %	0.215	0,150	0,242
		As	1.1-1.2	1,2	1,1
		N	542-554	517-529	492-504
	ГХТ	S	981.50	983,52	982,82
		RSD,%	0.283	0,132	0,328
		Rs	2.6	2,8	2,3
		As	1.1	1,1-1,2	1,1
		N	5277-5339	5081-5117	5442-5481
ВР	Рл	S	510.559	510,489	509,109
		RRF,%	н/в	99,496	99,293
	ГХТ	S	996.10	994,29	992,77
		RRF, %	н/в	99,613	99,532
Примітка. Рл – раміприл, ГХТ – гідрохлортіазид, РП – розчин порівняння, ВР – випробований розчин.					

Зміна відгуку за змінених умов, в порівнянні з відгуком за номінальних умов, знаходиться у межах 99.1–100.9 %. Тобто методика робасна до невеликих змін в швидкості потоку, температури термостату колонки, вмісту ацетонітрилу у рухомій фазі, рН 0.2 г/л розчину натрію гексансульфонату та концентрації натрію гексансульфонату у розчині.

При збільшенні швидкості потоку спостерігалось незначне зменшення розділення між піками та кількості тарілок за обома пікама. При зменшенні швидкості потоку спостерігалось незначне збільшення розділення між піками та

кількості тарілок за обома пікама, однак збільшувалася ширина піку раміприлу та дещо погіршувалася симетрія піку гідрохлортізиду. Тому обрана швидкість потоку була оптимальною.

При збільшенні температури термостату колонки зменшувалася ширина піку раміприлу та збільшувалася кількість теоретичних тарілок за цим піком, однак погіршувалося розділення між пікама. При зменшенні температури термостату колонки розділення між пікама збільшувалося, однак також збільшувалася ширина піку раміприлу та кількість теоретичних тарілок за цим піком зменшувалася. Тобто обрана температура термостату колонки була оптимальною.

При збільшенні кількості ацетонітрилу у рухомій фазі покращувалося розділення між пікама, однак зменшувалося число теоретичних тарілок за обома пікама. Окрім того, час утримування піку раміприлу зменшувався та наближався до неутриманого об'єму. При зменшенні кількості ацетонітрилу в рухомій фазі зменшувалося розділення між пікама та число теоретичних тарілок за піком раміприлу. Тобто обране співвідношення фаз також було оптимальним.

Зміна концентрації натрію гексансульфонату не мала суттєвого впливу на параметри придатності хроматографічної системи.

При зменшенні рН 0.2 г/л розчину натрію гексансульфонату спостерігалось зменшення ширини піку раміприлу та, як наслідок, кількості теоретичних тарілок, та коефіцієнту розділення між пікама. При збільшенні рН навпаки – збільшувалася ширина піку раміприлу, зменшувалася кількість теоретичних тарілок та розділення між пікама. Тобто зменшення рН 0.2 г/л розчину натрію гексансульфонату призводить до покращення параметрів придатності хроматографічної системи. Рекомендований виробником діапазон рН для хроматографічної колонки Inertsil ODS-3 становить 2–7.5. Робота з рухомими фазами з рН близьким до критичних значень, особливо за високих температур, призводить до зменшення терміну експлуатації хроматографічної колонки. Оскільки обране значення рН (2.7) є близьким до критичного значення, зазначеного виробником колонки та аналіз буде проводитись за високої

температури (45 °C), то було прийнято рішення не зменшувати рН розчину для продовження терміну експлуатації хроматографічної колонки.

Тобто наступні умови хроматографування обрано як оптимальні:

- рухома фаза: розчин рН 2.7 (200 мг натрію гексансульфонату Р (або 219 мг натрію гексансульфонату моногідрату Р) розчиняють в 1000 мл води Р, доводять рН фосфорною кислотою Р до значення 2,7): ацетонітрил Р (47:53), для колонки Inertsil ODS-3;

- швидкість рухомої фази – 1.2 мл/хв;
- детектування за довжини хвилі – 210 нм;
- температура колонки – 35 °C;
- об'єм інжекції – 3 мкл.

На основі рекомендацій ЄФ та отриманих при дослідженні робасності даних, запропоновано наступні вимоги до придатності хроматографічної системи:

- коефіцієнт симетрії піків раміприлу та гідрохлортіазиду, з хроматограми розчину порівняння, має бути в межах від 0.8 до 1.8;
- розділення між піками раміприлу та гідрохлортіазиду має бути не менше 2.0;
- відносне стандартне відхилення площ піків раміприлу або гідрохлортіазиду для 3-х паралельних інжекцій становить не більше 1.0 %.

При валідації методики досліджували діапазон застосування, правильність та прецизійність методики.

На фармацевтичному ринку комерційно доступними є 5 дозувань комбінованих препаратів раміприлу з гідрохлортіазидом:

- Раміприл 2.5 мг + Гідрохлортіазид 12.5 мг;
- Раміприл 5 мг + Гідрохлортіазид 25 мг;
- Раміприл 5 мг + Гідрохлортіазид 12.5 мг;
- Раміприл 10 мг + Гідрохлортіазид 25 мг;
- Раміприл 10 мг + Гідрохлортіазид 12.5 мг.

Виходячи з цих дозувань запропоновано готувати випробовувані розчини в таких концентраціях:

- для дозувань 2.5 мг / 12.5 мг та 5 мг / 25 мг концентрація раміприлу 0.05 мг/мл, гідрохлортіазиду – 0.25 мг/мл;

- для дозувань 5 мг / 12.5 мг та 10 мг / 25 мг концентрація раміприлу 0.10 мг/мл, гідрохлортіазиду – 0.25 мг/мл;

- для дозування 10 мг / 12.5 мг концентрація раміприлу 0.10 мг/мл, гідрохлортіазиду – 0.12 мг/мл).

Можливість застосування методики має бути підтверджена в діапазоні 80 % від нижньої межі специфікації – 120 % від верхньої межі специфікації для кількісного визначення та 70 – 130 % від номінального вмісту для однорідності дозованих одиниць [38].

Для підтвердження діапазону застосування аналізували 6 модельних розчинів в діапазоні концентрацій вказаних у таблиці 4.17.

Таблиця 4.17 – Досліджені діапазони застосування

Аналіт	Раміприл	Гідрозлортіазид
Концентрація у розчині, мг/мл	0.024 – 0.146	0.06 – 0.39
Еквівалентно номінальному вмісту для дозувань 2.5 мг / 12.5 мг та 5 мг / 25 мг, %	49 – 292	26 – 155
Еквівалентно номінальному вмісту для дозувань 5 мг / 12.5 мг та 10 мг / 25 мг, %	24 – 146	26 – 155
Еквівалентно номінальному вмісту для дозування 10 мг / 12.5, %	24 – 146	52 – 310

Розрахунок нормалізованого значення вільного члену рівняння регресії (у відсотках до сигналу обладнання що відповідає номінальній концентрації аналіту у розчині) проводили за формулою (4.9):

$$|a_i|, \% = \left| \frac{a \cdot C_{ref}}{S_{ref} \cdot C_{nom}} \right| \cdot 100 \% \quad (4.9)$$

де: S_{ref} – середнє значення площ піків аналіту з хроматограми розчину порівняння;

C_{ref} – концентрація аналіту у розчині порівняння, мг/мл;

C_{nom} – номінальна концентрація аналіту у випробовуваному розчині.

Результати хроматографування наведено у таблицях 4.18, 4.19.

Таблиця 4.18 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для раміприлу

Розчин	C_t , мг/мл	S	S_{Av}	RSD, %	s_i	$S_i - s_i$
L1	0.024	123.17	123.07	0.21	122.32	0.85
		122.78			122.32	0.46
		123.27			122.32	0.95
L2	0.049	245.87	246.45	0.40	246.60	-0.73
		245.87			246.60	-0.73
		247.59			246.60	0.99
L3	0.073	370.69	370.69	0.20	370.88	-0.18
		371.43			370.88	0.55
		369.94			370.88	-0.94
L4	0.097	493.00	494.34	0.28	495.15	-2.15
		495.74			495.15	0.59
		494.27			495.15	-0.88
L5	0.122	618.04	618.50	0.13	619.43	-1.39
		619.42			619.43	-0.01
		618.04			619.43	-1.39
L6	0.146	746.988	745.05	0.37	743.70	3.28
		741.929			743.70	-1.78
		746.218			743.70	2.51

Таблиця 4.19 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для гідрохлортіазиду

Розчин	C_t , мг/мл	S	S_{Av}	RSD, %	s_i	$S_i - s_i$
1	2	3	4	5	6	7
L1	0.06	507.43	507.18	0.17	502.03	5.40
		506.22			502.03	4.19
		507.90			502.03	5.87
L2	0.13	987.80	990.98	0.33	997.95	-10.15
		990.80			997.95	-7.15
		994.34			997.95	-3.61
L3	0.19	1497.60	1499.30	0.15	1493.87	3.73
		1501.88			1493.87	8.01
		1498.41			1493.87	4.54
L4	0.26	1974.66	1979.75	0.26	1989.79	-15.13
		1984.99			1989.79	-4.80
		1979.59			1989.79	-10.20

Продовження таблиці 4.19

1	2	3	4	5	6	7
L5	0.32	2490.76	2491.64	0.13	2485.71	5.05
		2495.17			2485.71	9.46
		2488.98			2485.71	3.27
L6	0.39	2984.72	2982.14	0.17	2981.63	3.09
		2985.31			2981.63	3.68
		2976.40			2981.63	-5.23

Розрахунки параметрів лінійної регресії наведено у таблиці 4.20. За параметрами лінійної регресії розраховували межу виявлення та межу кількісного визначення.

Таблиця 4.20 – Параметри лінійної регресії

Параметр		Критерій	Раміприл	Гідрозлортіазид
a		н/в	-1.95	6.11
a , %	2.5 мг / 12.5 мг та 5 мг / 25 мг	≤ 1.0 %	0.767	0,317
	5 мг / 12.5 мг та 10 мг / 25 мг		0.382	0,315
	10 мг / 12.5		0.383	0,633
b		н/в	5108.25	7671.53
r		≥ 0.998	0.99998	0.99997
S ₀		н/в	1.48	7.41
S _a			0.79	3.98
МКВ, мг/мл			0.0016	0.0052
МВ, мг/мл			0.0005	0.0017

Розраховане значення межі кількісного визначення понад 10 разів менше, ніж номінальна концентрація у випробовуваних розчинах, тобто експериментального підтвердження межі кількісного визначення проводити не потрібно.

Оскільки для приготування модельних розчинів для дослідження правильності використовували АФІ раміприлу та гідрохлортіазиду, то потрібно було підтвердити можливість використання значення вмісту основної речовини в АФІ відповідно сертифікату виробника у розрахунках внесеної концентрації. Для цього готували 2 паралелі розчину порівняння з використанням СЗ та 2 паралелі паралелі контрольного розчину з використанням АФІ. Для кожного розчину розраховували фактор відгуку за формулою (4.10):

$$RF_i = \frac{S_i}{C_i} \quad (4.10)$$

де: S_i – площа піку аналіту у відповідному розчині;

C_i – концентрація аналіту у відповідному розчині, мг/мл.

Розраховували відносні фактори відгуку для розчинів за формулою (4.11):

$$RRF_i = \frac{RF_i}{RF_1} \cdot 100\% \quad (4.11)$$

де RF_1 – фактор відгуку для 1-ї паралелі розчину порівняння.

Результати хроматографування та розрахунки наведено у таблицях 4.21, 4.22.

Таблиця 4.21 – Розрахунок відносних факторів відгуку для раміприлу

Розчин	2.5 мг / 12.5 мг та 5 мг / 25 мг		5 мг / 12.5 мг та 10 мг / 25 мг		10 мг / 12.5		КР1	КР2
	РП1	РП2	РП1	РП2	РП1	РП2		
Індивідуальні значення площ піків	251.75	252.00	503.83	503.83	505.91	505.11	254.94	252.49
	251.44	252.27	502.86	504.43	503.48	505.05	258.72	253.06
	252.99	252.40	503.32	504.03	503.04	505.75	255.41	253.88
Середнє	252.06	252.22	503.33	504.10	504.14	505.30	256.35	253.14
RSD, %	0.324	0.081	0.096	0.061	0.306	0.077	0.803	0.276
C_i , мг/мл	0.0495	0.0497	0.10	0.10	0.10	0.10	0.0503	0.0495
RF_i	5097	5080	5089	5077	5097	5089	5096	5113
RRF_i , %	н/в	99.665	99.845	99.597	100.00 5	99.835	99.980	100.32 0

Примітка. РП – розчин порівняння, КР – контрольний розчин.

Таблиця 4.22 – Розрахунок відносних факторів відгуку для гідрохлортіазиду

Розчин	2.5 мг / 12.5 мг та 5 мг / 25 мг		5 мг / 12.5 мг та 10 мг / 25 мг		10 мг / 12.5		КР1	КР2
	РП1	РП2	РП1	РП2	РП1	РП2		
Індивідуальні значення площ піків	1906.03	1952.50	1898.87	1947.21	953.20	972.58	1909.80	1912.72
	1907.80	1955.21	1898.18	1949.83	952.85	976.10	1916.77	1913.19
	1912.41	1954.17	1898.78	1946.45	953.97	979.47	1909.81	1912.98
Середнє	1908.75	1953.96	1898.61	1947.83	953.34	976.05	1912.13	1912.96
RSD, %	0.173	0.070	0.020	0.091	0.060	0.353	0.210	0.012
C_i , мг/мл	0.2493	0.2552	0.2493	0.2552	0.1246	0.1276	0.2500	0.2480
RF_i	7658	7656	7617	7632	7650	7648	7649	7713
RRF_i , %	н/в	99.969	99.469	99.656	99.891	99.875	99.882	100.725

Примітка. РП – розчин порівняння, КР – контрольний розчин.

Відносні фактори відгуку знаходяться у межах критерію прийнятності (98.0–102.0 %), тобто значення вмісту основної речовини в АФІ (99.8 % для раміприлу і 99,2 % для гідрохлортіазиду) можна використовувати в подальших розрахунках.

Для дослідження правильності методики готували та аналізували 12 модельних розчинів на 4-х концентраційних рівнях, що містили плацебо та АФІ раміприлу та гідрохлортіазиду.

Знайдену концентрацію аналіту у модельних розчинах розраховували за формулою (4.12):

$$C_{m_i} = \frac{C_{01} \cdot \bar{S}_i}{\bar{S}_{01}} \quad (4.12)$$

де: \bar{S}_i – середнє значення площ піків аналіту у відповідному модельному розчині;

\bar{S}_{01} – середнє значення площ піків аналіту у розчині порівняння;

C_{01} – концентрація аналіту у розчині порівняння.

Співвідношення «Знайдено C_{m_i} » / «Введено C_{t_i} » розраховували за формулою (4.13):

$$Recovery_i = \frac{C_{m_i}}{C_{t_i}} \cdot 100\% \quad (4.13)$$

Результати хроматографування та розрахунки наведено у таблицях 4.23, 4.24.

Таблиця 4.23 – Експериментальні дані для дослідження правильності визначення раміприлу

Розчин	C_t , мг/мл	S	S_{Av}	RSD, %	2.5 мг / 12.5 мг та 5 мг / 25 мг		5 мг / 12.5 мг та 10 мг / 25 мг		10 мг / 12.5	
					C_m , мг/мл	Recovery, %	C_m , мг/мл	Recovery, %	C_m , мг/мл	Recovery, %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
M1_1	0.0311	159.89	160.19	0.17	0.03	100.73	0.031	100.89	0.03	100.73
	0.0311	160.43			0.03	101.07	0.032	101.23	0.03	101.07
	0.0311	160.26			0.03	100.97	0.031	101.12	0.03	100.96
M1_2	0.0299	153.30	153.44	0.27	0.03	100.44	0.030	100.60	0.03	100.44
	0.0299	153.90			0.03	100.84	0.030	100.99	0.03	100.83
	0.0299	153.11			0.03	100.32	0.030	100.48	0.03	100.32

Продовження таблиці 4.23

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
M1_3	0.0299	150.55	150.80	0.24	0.03	98.64	0.030	98.79	0.03	98.64
	0.0299	150.63			0.03	98.70	0.030	98.85	0.03	98.69
	0.0299	151.21			0.03	99.07	0.030	99.23	0.03	99.07
M2_1	0.0507	253.89	257.30	1.46	0.05	98.24	0.050	98.39	0.05	98.24
	0.0507	256.65			0.05	99.31	0.050	99.46	0.05	99.30
	0.0507	261.35			0.05	101.12	0.051	101.28	0.05	101.12
M2_2	0.0515	263.99	263.93	0.07	0.05	100.57	0.052	100.72	0.05	100.56
	0.0515	263.71			0.05	100.46	0.052	100.61	0.05	100.45
	0.0515	264.07			0.05	100.60	0.052	100.75	0.05	100.59
M2_3	0.0515	262.448	262.96	0.17	0.05	99.98	0.052	100.13	0.05	99.97
	0.0515	263.135			0.05	100.24	0.052	100.39	0.05	100.23
	0.0515	263.309			0.05	100.30	0.052	100.46	0.05	100.30
M3_1	0.0982	504.47	504.82	0.19	0.10	100.77	0.099	100.93	0.10	100.77
	0.0982	504.08			0.10	100.70	0.099	100.85	0.10	100.69
	0.0982	505.91			0.10	101.06	0.099	101.22	0.10	101.06
M3_2	0.0978	495.83	496.60	0.13	0.10	99.45	0.097	99.61	0.10	99.45
	0.0978	497.05			0.10	99.70	0.098	99.85	0.10	99.69
	0.0978	496.91			0.10	99.67	0.098	99.82	0.10	99.66
M3_3	0.1010	508.33	508.86	0.16	0.10	98.74	0.100	98.89	0.10	98.73
	0.1010	509.83			0.10	99.03	0.100	99.18	0.10	99.02
	0.1010	508.43			0.10	98.75	0.100	98.91	0.10	98.75
M4_1	0.1377	707.74	705.76	0.26	0.14	100.81	0.139	100.96	0.14	100.80
	0.1377	705.45			0.14	100.48	0.139	100.64	0.14	100.48
	0.1377	704.11			0.14	100.29	0.138	100.45	0.14	100.29
M4_2	0.1397	709.67	709.17	0.06	0.14	99.64	0.139	99.79	0.14	99.63
	0.1397	708.84			0.14	99.52	0.139	99.68	0.14	99.52
	0.1397	708.99			0.14	99.54	0.139	99.70	0.14	99.54
M4_3	0.1385	694.429	695.19	0.10	0.14	98.34	0.136	98.50	0.14	98.34
	0.1385	695.727			0.14	98.53	0.137	98.68	0.14	98.52
	0.1385	695.407			0.14	98.48	0.137	98.63	0.14	98.48

Таблиця 4.24 – Експериментальні дані для дослідження правильності визначення раміприлу

Розчин	C _t , мг/мл	S	S _{Av}	RSD, %	2.5 мг / 12.5 мг та 5 мг / 25 мг		5 мг / 12.5 мг та 10 мг / 25 мг		10 мг / 12.5	
					C _m , мг/мл	Recovery, %	C _m , мг/мл	Recovery, %	C _m , мг/мл	Recovery, %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
M1_1	0.078	602.16	603.20	0.16	0.08	101.10	0.079	101.64	0.08	101.21
	0.078	604.11			0.08	101.43	0.079	101.97	0.08	101.54
	0.078	603.33			0.08	101.30	0.079	101.84	0.08	101.41
M1_2	0.075	578.71	577.18	0.48	0.08	100.76	0.076	101.30	0.08	100.87
	0.075	578.85			0.08	100.79	0.076	101.33	0.08	100.90
	0.075	574.00			0.07	99.94	0.075	100.48	0.08	100.05
M1_3	0.075	583.45	583.63	0.05	0.08	101.06	0.077	101.59	0.08	101.17
	0.075	583.48			0.08	101.06	0.077	101.60	0.08	101.17
	0.075	583.96			0.08	101.14	0.077	101.68	0.08	101.25

Продовження таблиці 4.24

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
M2_1	0.127	978.48	981.00	0.22	0.13	100.94	0.128	101.48	0.13	101.05
	0.127	982.53			0.13	101.36	0.129	101.90	0.13	101.47
	0.127	982.00			0.13	101.30	0.129	101.85	0.13	101.41
M2_2	0.123	948.96	949.17	0.05	0.12	100.74	0.125	101.28	0.12	100.85
	0.123	948.89			0.12	100.73	0.125	101.27	0.12	100.84
	0.123	949.68			0.12	100.81	0.125	101.35	0.12	100.92
M2_3	0.124	956.25	957.24	0.12	0.12	100.86	0.126	101.40	0.13	100.97
	0.124	956.96			0.12	100.94	0.126	101.48	0.13	101.05
	0.124	958.51			0.13	101.10	0.126	101.64	0.13	101.21
M3_1	0.250	1920.43	1922.60	0.10	0.25	100.47	0.252	101.01	0.25	100.58
	0.250	1924.03			0.25	100.66	0.253	101.20	0.25	100.77
	0.250	1923.34			0.25	100.63	0.252	101.16	0.25	100.74
M3_2	0.249	1916.34	1918.41	0.09	0.25	100.42	0.252	100.96	0.25	100.53
	0.249	1919.61			0.25	100.59	0.252	101.13	0.25	100.70
	0.249	1919.28			0.25	100.57	0.252	101.11	0.25	100.68
M3_3	0.248	1909.72	1913.40	0.18	0.25	100.72	0.251	101.25	0.25	100.82
	0.248	1914.10			0.25	100.95	0.251	101.49	0.25	101.06
	0.248	1916.38			0.25	101.07	0.252	101.61	0.25	101.18
M4_1	0.350	2658.38	2657.02	0.11	0.35	99.30	0.349	99.83	0.35	99.41
	0.350	2653.78			0.35	99.13	0.348	99.66	0.35	99.24
	0.350	2658.89			0.35	99.32	0.349	99.85	0.35	99.43
M4_2	0.349	2672.88	2673.48	0.03	0.35	99.96	0.351	100.49	0.35	100.06
	0.349	2674.30			0.35	100.01	0.351	100.54	0.35	100.12
	0.349	2673.26			0.35	99.97	0.351	100.50	0.35	100.08
M4_3	0.347	2615.84	2617.63	0.08	0.34	98.38	0.343	98.91	0.34	98.49
	0.347	2617.11			0.34	98.43	0.344	98.95	0.34	98.54
	0.347	2619.93			0.34	98.54	0.344	99.06	0.34	98.64

Оцінку результатів наведено у таблицях 4.25, 4.26.

Отримані результати задовольняють критерії прийнятності. Правильність методики достатня.

Таблиця 4.25 – Оцінка результатів правильності визначення раміприлу

Параметр	Критерій	Результат		
		2.5 мг / 12.5 мг та 5 мг / 25 мг	5 мг / 12.5 мг та 10 мг / 25 мг	10 мг / 12.5 мг
Мінімальне значення ступеня вилучення	$\geq 98.0 \%$	98.241 %	98.394 %	98.236 %
Максимальне значення ступеня вилучення	$\leq 102.0 \%$	101.125 %	101.282 %	101.120 %
Середнє значення ступенів вилучення	99.0–101.0 %	99.864 %	100.019 %	99.859 %

Таблиця 4.26 – Оцінка результатів правильності визначення гідрохлортіазиду

Параметр	Критерій	Результат		
		2.5 мг / 12.5 мг та 5 мг / 25 мг	5 мг / 12.5 мг та 10 мг / 25 мг	10 мг / 12.5 мг
Мінімальне значення ступеня вилучення	$\geq 98.0 \%$	98.381 %	98.907 %	98.488 %
Максимальне значення ступеня вилучення	$\leq 102.0 \%$	101.430 %	101.972 %	101.540 %
Середнє значення ступенів вилучення	99.0–101.0 %	100.458 %	100.994 %	100.567 %

Для дослідження прецизійності 2 аналітики протягом 2-х днів готували та аналізували по 6 паралелей випробовуваних розчинів для 3-х дозувань препарату для показника якості «Кількісне визначення» та по 10 паралелей випробовуваних розчинів для 3-х дозувань препарату для показника якості «Однорідність дозованих одиниць». Кожен аналітик використовував інші серії хроматографічних колонок та обладнання.

Результати хроматографування та розрахунки для показника якості «Кількісне визначення» наведено в таблицях 4.27-4.32. Оцінку результатів наведено у таблицях 4.33, 4.34.

Таблиця 4.27 – Результати хроматографування випробовуваних розчинів приготованих відповідно до методики кількісного визначення раміприлу для дозування 5 мг / 25 мг

Параметр	m, мг	S	RSD	X, мг/табл
1	2	3	4	5
Аналітик А				
BP1	396.5	245.587	0.083	4.832
BP2	400.4	253.811	0.239	4.945
BP3	397.2	245.814	0.090	4.828
BP4	398.0	246.942	0.010	4.840
BP5	399.9	248.111	0.170	4.840
BP6	397.8	246.481	0.140	4.834

Продовження таблиці 4.27

1	2	3	4	5
Аналітик Б				
BP7	400.2	244.991	0.053	4.827
BP8	400.4	244.762	0.118	4.820
BP9	400.3	244.281	0.125	4.811
BP10	399.7	243.007	0.251	4.794
BP11	399.9	245.292	0.036	4.836
BP12	400.0	242.822	0.178	4.786

Таблиця 4.28 – Результати хроматографування випробовуваних розчинів приготованих відповідно до методики кількісного визначення раміприлу для дозування 5 мг / 12.5 мг

Параметр	m, мг	S	RSD	X, мг/табл
Аналітик А				
BP1	449.4	503.840	0.221	4.981
BP2	449.9	499.886	0.153	4.936
BP3	444.8	491.891	1.329	4.913
BP4	449.9	507.888	0.267	5.015
BP5	447.2	493.549	0.701	4.903
BP6	445.0	490.949	0.880	4.901
Аналітик Б				
BP7	449.4	492.299	0.181	4.976
BP8	449.9	491.894	0.150	4.967
BP9	450.0	493.954	0.222	4.986
BP10	449.9	492.873	0.076	4.977
BP11	450.0	497.273	0.473	5.020
BP12	450.1	484.613	0.122	4.891

Таблиця 4.29 – Результати хроматографування випробовуваних розчинів приготованих відповідно до методики кількісного визначення раміприлу для дозування 10 мг / 12.5 мг

Параметр	m, мг	S	RSD	X, мг/табл
1	2	3	4	5
Аналітик А				
BP1	219.4	476.936	0.370	9.844
BP2	224.0	481.530	0.214	9.735
BP3	224.9	483.488	0.143	9.735
BP4	225.0	479.847	0.118	9.658
BP5	225.2	476.528	0.140	9.582

Продовження таблиці 4.29

1	2	3	4	5
BP6	220.0	475.517	0.286	9.788
Аналітик Б				
BP7	225.2	480.353	0.025	9.856
BP8	224.7	476.960	0.317	9.808
BP9	220.7	466.974	0.027	9.777
BP10	225.0	486.048	0.102	9.982
BP11	221.1	464.245	0.034	9.702
BP12	224.7	474.697	0.541	9.762

Таблиця 4.30 – Результати хроматографування випробовуваних розчинів приготованих відповідно до методики кількісного визначення гідрохлортіазиду для дозування 5 мг / 25 мг

Параметр	m, мг	S	RSD	X, мг/табл
Аналітик А				
BP1	396.5	1891.700	0.135	24.868
BP2	400.4	1924.250	0.166	25.050
BP3	397.2	1877.170	0.038	24.634
BP4	398.0	1888.700	0.131	24.735
BP5	399.9	1889.820	0.054	24.632
BP6	397.8	1888.977	0.135	24.751
Аналітик Б				
BP7	400.2	1826.015	0.027	24.766
BP8	400.4	1812.450	0.039	24.569
BP9	400.3	1813.160	0.133	24.585
BP10	399.7	1807.130	0.188	24.540
BP11	399.9	1814.110	0.044	24.623
BP12	400.0	1824.345	0.065	24.755

Таблиця 4.31 – Результати хроматографування випробовуваних розчинів приготованих відповідно до методики кількісного визначення гідрохлортіазиду для дозування 5 мг / 12.5 мг

Параметр	m, мг	S	RSD	X, мг/табл
1	2	3	4	5
Аналітик А				
BP1	449.4	1890.547	0.190	12.583
BP2	449.9	1915.087	0.158	12.732
BP3	444.8	1869.523	0.282	12.572
BP4	449.9	1903.037	0.287	12.652

Продовження таблиці 4.31

1	2	3	4	5
BP5	447.2	1888.173	0.160	12.629
BP6	445.0	1873.573	0.271	12.593
Аналітик Б				
BP7	449.4	1814.850	0.105	12.619
BP8	449.9	1813.675	0.331	12.597
BP9	450.0	1802.080	0.514	12.513
BP10	449.9	1814.600	0.158	12.603
BP11	450.0	1834.595	0.074	12.739
BP12	450.1	1802.400	0.013	12.513

Таблиця 4.32 – Результати хроматографування випробовуваних розчинів приготованих відповідно до методики кількісного визначення гідрохлортіазиду для дозування 10 мг / 12.5 мг

Параметр	m, мг	S	RSD	X, мг/табл
Аналітик А				
BP1	219.4	943.324	0.282	12.683
BP2	224.0	976.514	0.270	12.859
BP3	224.9	972.198	0.034	12.751
BP4	225.0	969.765	0.096	12.714
BP5	225.2	957.891	0.225	12.547
BP6	220.0	942.231	0.207	12.633
Аналітик Б				
BP7	225.2	931.799	0.092	12.809
BP8	224.7	935.395	0.328	12.888
BP9	220.7	912.782	0.093	12.804
BP10	225.0	928.567	0.054	12.776
BP11	221.1	907.405	0.011	12.705
BP12	224.7	915.238	0.150	12.610

Таблиця 4.33 – Порівняння результатів для валідаційної характеристики «Прецизійність» для кількісного визначення раміприлу

Параметр	Критерій	5 мг / 25 мг		5 мг / 12.5 мг		10 мг / 12.5 мг	
		А	Б	А	Б	А	Б
1	2	3	4	5	6	7	8
Середнє для 6 паралелей, мг/табл	н/в	4.853	4.812	4.942	4,969	9,724	9,814
RSD для 6 паралелей, %	≤ 1.0 %	0.933	0.401	0.945	0,858	0,956	0,983

Продовження таблиці 4.33

1	2	3	4	5	6	7	8
Середнє для 12 паралелей, мг/табл	н/в	4.833		4.956		0.956	
RSD для 12 паралелей, %	≤ 1.5 %	0.818		0.909		9.769	
Різниця між результатами (Δ), %	≤ 2.0 %	0.821		0.555		1.045	

Таблиця 4.34 – Порівняння результатів для валідаційної характеристики «Прецизійність» для кількісного визначення гідрохлортіазиду

Параметр	Критерій	5 мг / 25 мг		5 мг / 12.5 мг		10 мг / 12.5 мг	
		А	Б	А	Б	А	Б
Середнє для 6 паралелей, мг/табл	н/в	24.778	24.640	12.627	12,597	12,698	12,765
RSD для 6 паралелей, %	≤ 1.0 %	0.642	0.395	0.473	0,662	0,836	0,754
Середнє для 12 паралелей, мг/табл	н/в	24.709		12.612		12.732	
RSD для 12 паралелей, %	≤ 1.5 %	0.587		0.562		0.808	
Різниця між результатами (Δ), %	≤ 2.0 %	0.554		0.237		0.540	

Результати хроматографування на розрахунки для показника якості «Однорідність дозованих одиниць» наведено в таблицях 4.35, 4.36. Оцінку результатів наведено у таблицях 4.37, 4.38.

Таблиця 4.35 – Результати хроматографування випробовуваних розчинів, приготованих відповідно до методики однорідності дозованих одиниць раміприлу

Параметр	S	RSD	X, %	S	RSD	X, %	S	RSD	X, %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Аналітик А									
Дозування	5 мг / 25 мг			5 мг / 12.5 мг			10 мг / 12.5 мг		
BP1	254.83	0.105	100.57	493.61	0.086	97.29	508.20	0.225	99.47
BP2	249.63	0.431	98.52	505.98	0.218	99.73	488.38	0.224	95.59
BP3	252.03	0.240	99.47	506.41	0.135	99.81	474.73	0.846	92.92
BP4	254.79	0.049	100.56	504.13	0.226	99.36	482.55	0.001	94.45
BP5	253.16	0.220	99.91	505.13	0.358	99.56	488.97	0.144	95.70

Продовження таблиці 4.35

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BP6	254.91	0.113	100.61	493.83	0.280	97.33	494.41	0.161	96.77
BP7	255.44	0.448	100.81	511.28	0.129	100.77	498.25	0.492	97.52
BP8	251.48	0.870	99.25	492.09	0.119	96.99	498.81	0.191	97.63
BP9	254.41	0.027	100.41	494.17	0.658	97.40	499.72	0.074	97.81
BP10	251.63	1.391	99.31	513.30	0.616	101.17	498.66	0.407	97.60
Аналітик Б									
BP11	251.79	0.323	99.21	507.10	0.797	102.79	469.00	0.171	94.43
BP12	245.86	0.393	96.87	507.10	0.797	102.79	485.82	0.214	97.82
BP13	257.88	0.013	101.61	503.88	0.102	102.14	483.70	0.046	97.39
BP14	253.32	0.171	99.81	499.47	0.401	101.24	479.58	0.099	96.56
BP15	248.41	0.325	97.88	503.22	0.083	102.00	487.12	0.292	98.08
BP16	253.34	0.553	99.82	486.74	0.254	98.66	468.65	0.055	94.36
BP17	259.17	0.936	102.12	501.41	0.437	101.64	490.20	0.164	98.70
BP18	250.53	0.108	98.71	492.67	2.038	99.86	486.90	0.025	98.04
BP19	253.34	0.083	99.82	484.97	0.037	98.30	490.70	0.372	98.80
BP20	249.21	0.186	98.19	504.41	1.139	102.24	489.69	0.577	98.60

Таблиця 4.36 – Результати хроматографування випробовуваних розчинів, приготованих відповідно до методики однорідності дозованих одиниць гідрохлортіазиду

Параметр	S	RSD	X, %	S	RSD	X, %	S	RSD	X, %
Аналітик А									
Дозування	5 мг / 25 мг			5 мг / 12.5 мг			10 мг / 12.5 мг		
BP1	1864.6	0.103	97.97	1927.0	0.053	101.57	999.4	0.078	102.41
BP2	1924.1	0.181	101.10	1971.0	0.034	103.89	999.0	0.118	102.38
BP3	1911.8	0.154	100.45	1981.8	0.164	104.46	964.2	0.515	98.81
BP4	1882.0	0.078	98.88	1980.2	0.246	104.38	984.2	0.148	100.86
BP5	1901.9	0.179	99.93	1977.6	0.359	104.24	1001.6	0.049	102.64
BP6	1903.8	0.083	100.03	1928.7	0.199	101.66	1004.4	0.134	102.93
BP7	1869.3	0.154	98.22	2005.3	0.118	105.71	1015.7	0.249	104.08
BP8	1940.1	0.276	101.94	1921.3	0.036	101.27	1015.1	0.111	104.02
BP9	1869.7	0.053	98.24	1928.2	0.551	101.64	1014.5	0.071	103.96
BP10	1931.1	0.285	101.47	2004.3	0.122	105.65	1004.6	1.639	102.95
Аналітик Б									
BP11	1781.7	0.222	96.65	1907.6	0.762	105.91	922.2	0.114	99.52
BP12	1837.3	0.450	99.67	1884.1	0.152	104.61	937.3	0.207	101.16
BP13	1883.5	0.113	102.18	1889.3	0.788	104.89	954.6	0.076	103.02
BP14	1807.1	0.076	98.03	1883.1	0.323	104.55	922.0	0.052	99.51
BP15	1826.1	0.132	99.07	1899.3	0.041	105.45	917.3	0.300	98.99
BP16	1821.4	0.813	98.81	1837.7	0.526	102.03	921.5	0.103	99.46
BP17	1817.1	0.523	98.57	1904.6	0.421	105.74	957.5	0.143	103.33
BP18	1863.8	0.191	101.11	1858.3	1.641	103.17	956.7	0.107	103.25
BP19	1792.1	0.253	97.22	1805.3	0.082	100.23	957.3	0.208	103.32
BP20	1853.3	0.073	100.54	1898.0	0.086	105.38	957.0	0.521	103.28

Таблиця 4.37 – Порівняння результатів для валідаційної характеристики «Прецизійність» для однорідності дозованих одиниць раміприлу

Параметр	Критерій	5 мг / 25 мг		5 мг / 12.5 мг		10 мг / 12.5 мг	
		А	Б	А	Б	А	Б
Середнє для 10 паралелей, %	н/в	99.941	99.403	99.253	100,708	96,546	97,279
RSD для 10 паралелей, %	≤ 2.0 %	0.769	1.623	1.572	1,630	1,972	1,704
Середнє для 20 паралелей, %	н/в	99.672		99.981		96.913	
RSD для 12 паралелей, %	≤ 2.5 %	1.265		1.728		1.834	
Різниця між результатами (Δ), %	≤ 3.0 %	0.538		1.455		0.733	

Таблиця 4.38 – Порівняння результатів для валідаційної характеристики «Прецизійність» для однорідності дозованих одиниць гідрохлортіазиду

Параметр	Критерій	5 мг / 25 мг		5 мг / 12.5 мг		10 мг / 12.5 мг	
		А	Б	А	Б	А	Б
Середнє для 10 паралелей, %	н/в	99.822	99.184	103.448	104,195	102,504	101,483
RSD для 10 паралелей, %	≤ 2.0 %	1.443	1.742	1.686	1,767	1,584	1,906
Середнє для 20 паралелей, %	н/в	99.503		103.822		101.993	
RSD для 12 паралелей, %	≤ 2.5 %	1.590		1.721		1.780	
Різниця між результатами (Δ), %	≤ 3.0 %	0.638		0.746		1.020	

Отримані результати задовольняють критерії прийнятності. Прецизійність методики є достатньою.

Досліджували стабільність випробовуваних розчинів та розчинів порівняння впродовж 28 год.

Розраховували відношення площ піків за формулою (4.14):

$$RRF = \frac{\bar{S}_t}{\bar{S}_0} \cdot 100\% \quad (4.14)$$

де: \bar{S}_0 – середнє значення площі піків аналіту при хроматографуванні свіжоприготованого розчину;

\bar{S}_i – середнє значення площі піків аналіту при хроматографуванні розчинів після зберігання.

Результати наведено у таблицях 4.39, 4.40.

Таблиця 4.39 – Дослідження стабільності раміприлу в розчинах

Час зберігання	Критерій	5 мг / 25 мг		5 мг / 12.5 мг		10 мг / 12.5 мг	
		S	RRF	S	RRF	S	RRF
Розчин порівняння							
0 год	99.0 – 101.0 %	289.738	н/в	519.398	н/в	499.823	н/в
8 год		290.160	100.146	512.534	100.117	501.340	100.304
22 год		292.164	100.837	1946.653	100.484	502.142	100.464
28 год		292.312	100.889	516.316	100.856	500.140	100.063
Випробовуваний розчин							
0 год	99.0 – 101.0 %	260.490	н/в	519.398	н/в	510.559	н/в
8 год		261.005	100.198	522.664	100.629	509.860	99.863
22 год		262.579	100.802	524.315	100.947	508.074	99.513
28 год		262.775	100.877	522.900	100.674	510.080	99.906

Таблиця 4.40 – Дослідження стабільності гідрохлортіазиду в розчинах

Час зберігання	Критерій	5 мг / 25 мг		5 мг / 12.5 мг		10 мг / 12.5 мг	
		S	RRF	S	RRF	S	RRF
Розчин порівняння							
0 год	99.0 – 101.0 %	1921.920	н/в	1937.280	н/в	981.500	н/в
8 год		1922.490	100.030	1939.237	100.101	980.078	99.855
22 год		1923.393	100.077	1946.653	100.484	977.872	99.630
28 год		1939.093	100.894	1950.647	100.690	973.647	99.200
Випробовуваний розчин							
0 год	99.0 – 101.0 %	1948.247		1931.047		996.103	
8 год		1940.660	99.611	1947.373	100.845	994.788	99.868
22 год		1943.620	99.763	1943.727	100.657	990.113	99.399
28 год		1947.257	99.949	1943.693	100.655	994.491	99.838

Розчини порівняння та випробовувані розчини стабільні протягом не менше ніж 28 год.

Розроблена аналітична методика відповідає усім дослідженим валідаційним характеристикам і може бути використана для рутинного контролю комбінованих препаратів раміприлу з гідрохлортіазидом за показниками якості «Кількісне визначення» та «Однорідність дозованих одиниць».

4.4 Розробка та валідація методик контролю за показниками якості «Кількісне визначення» та «Однорідність дозованих одиниць» комбінованих таблеток раміприлу з гідрохлортіазидом з використанням хроматографічної колонки Dionex Acclaim 120 C18 (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм)

Для проведення досліджень також використовували ізократичне елюювання. Як і у випадку з колонкою Inertsil ODS-3 вміст ацетонітрилу в рухомій фазі має більш суттєвий вплив на час утримування раміприлу, ніж гідрохлортіазиду. При зменшенні вмісту ацетонітрилу зменшується ширина піку раміприлу і, відповідно, збільшується кількість тарілок розрахована за цим піком. Час утримування раміприлу зменшується, що призводить до зменшення коефіцієнту розділення між піками. Параметри придатності хроматографічної системи наведено у таблиці 4.41.

Таблиця 4.41 – Параметри хроматографічної системи при підборі співвідношення рухомих фаз

Співвідношення (рухома фаза А : рухома фаза В)	Гідрохлортіазид			Раміприл				Час хроматографування, хв
	RT	As	N	RT	Rs	As	N	
50 : 50	1.084	15106	11.978	1.201	7742	50 : 50	1.084	~ 6.4
40 : 60	1.041	13851	7.704	1.273	9788	40 : 60	1.041	~ 5
30 : 70	1.007	13043	5.605	1.232	11418	30 : 70	1.007	~ 4.4
20 : 80	1.136	12212	5.209	1.187	12667	20 : 80	1.136	~ 4
10 : 90	0.931	6271	5.831	1.169	11415	10 : 90	0.931	~ 4

Оптимальним обрано вміст ацетонітрилу у рухомій фазі 80 %. Це дозволяє зменшити тривалість інжектування на понад 2 хв разом зі збереженням гарного розділення між основними піками. Збільшення вмісту ацетонітрилу до 90 % призводить до зменшення кількості теоретичних тарілок за піком раміприлу без суттєвого зменшення часу хроматографування, тому є недоцільним. За необхідності, вміст ацетонітрилу у рухомій фазі може бути зменшений. Приклади

хроматограм, отриманих з різним вмістом ацетонітрилу у рухомій фазі, наведено на рис. 4.15.

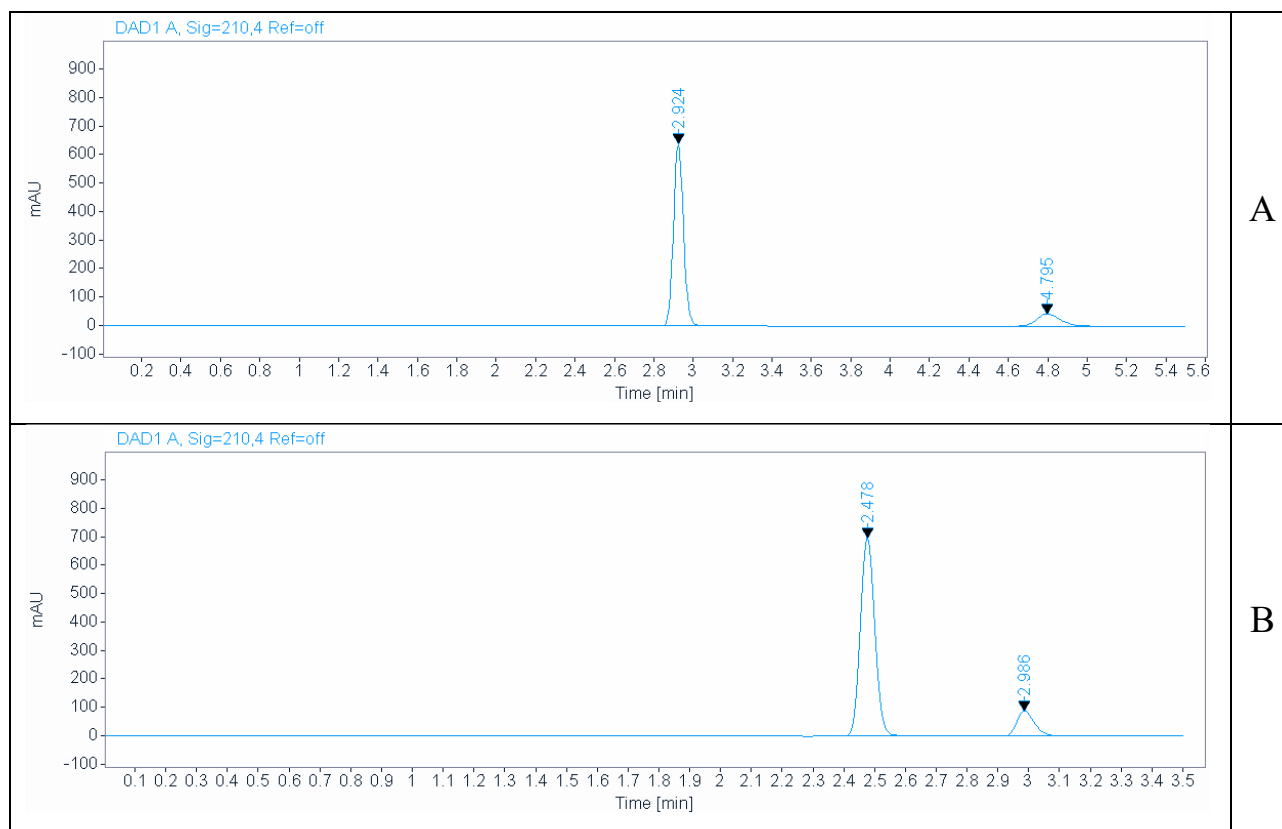


Рисунок 4.15 – Приклад хроматограми випробовуваного розчину за різних співвідношень рухомих фаз (А – Співвідношення 50 : 50, В – Співвідношення 20 : 80).

Досліджували робасність методики за обраного співвідношення рухомих фаз за зміною:

- швидкості потоку (± 0.1 мг/хв);
- температури термостату колонки (± 5 °С);
- вмісту ацетонітрилу у рухомій фазі ($\pm 5\%$);
- рН 0.2 г/л розчину натрію гексансульфонату (± 0.2);
- концентрації натрію гексансульфонату у розчині (± 0.1 г/л).

При дослідження робасності аналізували розчини порівняння та випробовувані розчини для 3-х дозувань препаратів. Результати хроматографування та розрахунки наведено у таблицях 4.42-4.44.

Таблиця 4.42 – Результати дослідження впливу варіювання умов хроматографування на відтворення методики

Розчин	Аналіт	Пара-метр	Умови хроматографування					
			номінальні	+ 0.1, мл/хв	- 0.1, мл/хв	+ 5, °C	- 5, °C	
Дозування 5 мг + 25 мг								
РП	Рл	S	1905.620	1776.367	2096.733	1900.553	1906.723	
		RSD, %	0.011	0.064	0.074	0.101	0.116	
		As	1.1	1.0-1.1	1.0-1.1	1.0-1.1	1.0-1.1	
		N	9711-9700	8639-8689	10895-11009	9502-9657	9743-9860	
	ГХТ	S	260.34	243.04	283.10	260.29	260.79	
		RSD,%	0.091	0.173	0.069	0.054	0.315	
		Rs	4.2-4.3	3.7-3.8	4	3.7	3.2-3.3	
		As	1.1-1.2	1.1-1.2	1.1-1.2	1.1-1.2	1.1-1.2	
		N	9994-10119	8775-8936	10585-10675	9704-9817	8909-9056	
		BP	Rл	S	1929.563	1784.497	2114.587	1923.073
			RRF,%	н/в	99.211	99.600	99.929	100.148
		ГХТ	S	258.31	239.87	282.11	258.60	261.10
		RRF, %	н/в	99.473	100.433	100.133	100.908	
Дозування 5 мг + 12.5 мг								
РП	Рл	S	1913.310	1785.937	2099.390	1914.843	1922.623	
		RSD, %	0.009	0.418	0.157	0.200	0.151	
		As	1-1.1	1.0-1.1	1.0-1.1	1.0-1.1	1.0-1.1	
		N	9589-9687	8662-8683	10965-11002	9542-9628	9762-9849	
	ГХТ	S	522.49	482.86	569.78	519.96	522.58	
		RSD,%	0.066	0.226	0.151	0.358	0.405	
		Rs	4	3.6	3.8	3.5	3.1	
		As	1.2-1.3	1.2-1.3	1.2-1.3	1.1-1.2	1.2-1.3	
		N	9065-9123	8130-8256	9644-9766	9117-9210	8280-8356	
		BP	Rл	S	1945.347	1799.117	2120.117	1939.847
			RRF,%	н/в	99.079	99.324	99.637	99.625
		ГХТ	S	529.23	490.06	578.86	528.25	531.58
		RRF, %	н/в	100.199	100.299	100.302	100.429	
Дозування 10 мг + 12.5 мг								
РП	Рл	S	949.816	894.918	1057.257	959.742	957.409	
		RSD, %	0.152	0.171	0.123	0.268	0.316	
		As	1	1.0-1.1	1.0-1.1	1.0-1.1	1.0-1.1	
		N	9596-9686	8692-8751	10977-11054	9552-9680	9895-9903	
	ГХТ	S	520.43	479.71	564.92	518.71	522.18	
		RSD,%	0.077	0.115	0.114	0.232	0.486	
		Rs	4	3.6	3.8	3.5	3.1-3.2	
		As	1.2-1.3	1.2-1.3	1.2-1.3	1.1-1.3	1.2-1.3	
		N	9112-9197	8213-8311	9725-9787	9103-9252	8320-8353	
		BP	Rл	S	965.104	906.312	1073.500	984.510
			RRF,%	н/в	99.669	99.928	100.956	100.669
		ГХТ	S	514.74	476.70	561.17	517.92	520.72
		RRF, %	н/в	100.470	100.433	100.951	100.823	

Примітка. Рл – раміприл, ГХТ – гідрохлортіазид, РП – розчин порівняння, ВР – випробовуваний розчин.

Таблиця 4.43 – Результати дослідження впливу варіювання приготування рухомої фази А на відтворення методики

Розчин	Аналіт	Параметр	Умови хроматографування				
			номінальні	+ 0.01, г/л	- 0.01, г/л	+ 0.2, рН	- 0.2, рН
Дозування 5 мг + 25 мг							
РП	Рл	S	1905.620	1908.393	1909.023	1910.447	1912.743
		RSD	0.011	0.062	0.181	0.106	0.059
		S	1.1	1.0-1.1	1.0-1.1	1.1	1.1
		RSD, %	9711-9700	9603-9801	9719-9815	9626-9742	9697-9767
	ГХТ	As	260.34	262.34	261.38	261.17	259.47
		N	0.091	1.522	0.269	0.153	0.407
		S	4.2-4.3	3.2-3.7	3.3-3.8	3.2-3.4	2.9-3.2
		RSD,%	1.1-1.2	1.2	1.1-1.2	1.1-1.2	1.1-1.2
		Rs	9994-10119	9293-9552	9450-9749	9207-9255	9133-9733
ВР	Рл	As	1929.563	1934.250	1932.173	1936.080	1940.540
		N	н/в	100.097	99.957	100.084	100.194
	ГХТ	S	258.31	260.86	259.32	260.57	256.48
		RRF,%	н/в	100.217	99.990	100.552	99.624
Дозування 5 мг + 12.5 мг							
РП	Рл	S	1913.310	1922.380	1920.927	1928.673	1930.273
		RSD, %	0.009	0.145	0.159	0.101	0.480
		As	1-1.1	1.0-1.1	1.0-1.1	1.0-1.1	1.1
		N	9589-9687	9598-9684	9589-9726	9621-9696	9694-9733
	ГХТ	S	522.49	521.25	519.96	521.93	522.01
		RSD,%	0.066	0.110	0.082	0.139	0.396
		Rs	4	3.2-3.3	3.5-3.5	3.5	2.7
		As	1.2-1.3	1.1-1.2	1.2	1.1-1.2	1.1-1.3
		N	9065-9123	8738-8788	8819-8863	8252-8344	8900-8956
ВР	Рл	S	1945.347	1954.150	1953.160	1954.670	1950.800
		RRF,%	н/в	99.979	100.004	99.679	99.399
	ГХТ	S	529.23	531.83	531.08	531.28	529.63
		RRF, %	н/в	100.732	100.839	100.496	100.169
Дозування 10 мг + 12.5 мг							
РП	Рл	S	949.816	963.202	962.537	964.715	965.252
		RSD, %	0.152	0.355	0.337	0.106	0.108
		As	1	1.1	1.1	1.0-1.1	1.1
		N	9596-9686	9634-9673	9742-9782	9742-9789	9789-9863
	ГХТ	S	520.43	519.55	518.78	519.85	516.03
		RSD,%	0.077	0.257	0.230	0.176	0.673
		Rs	4	3.2	3.4	3.5	2.7
		As	1.2-1.3	1.1-1.3	1.2-1.3	1.2	1.2
		N	9112-9197	8702-8751	8806-8881	8370-8405	9035-9064
ВР	Рл	S	965.104	983.675	984.379	988.756	985.338
		RRF,%	н/в	100.508	100.649	100.869	100.464
	ГХТ	S	514.74	512.74	515.56	516.82	512.64
		RRF, %	н/в	99.780	100.476	100.515	100.441
Примітка. Рл – раміприл, ГХТ – гідрохлортіазид, РП – розчин порівняння, ВР – випробований розчин.							

Таблиця 4.44 – Результати дослідження впливу зміни співвідношення рухомих фаз на відтворення методики

Розчин	Аналіт	Параметр	Умови хроматографування		
			номінальні	+ 5, %	- 5, %
Дозування 5 мг + 25 мг					
РП	Рл	S	1905.620	1933.787	1891.507
		RSD, %	0.011	0.109	0.119
		As	1.1	1.1	1
		N	9711-9700	8464-8586	10030-10075
	ГХТ	S	260.34	263.74	261.02
		RSD,%	0.091	0.834	0.095
		Rs	4.2-4.3	4	3.7
		As	1.1-1.2	1.2-1.3	1.100
		N	9994-10119	9992-10102	8986-9060
		BP	Рл	S	1929.563
RRF,%	н/в	99.708		99.987	
	ГХТ	S	258.31	264.02	258.45
		RRF, %	н/в	100.892	99.792
Дозування 5 мг + 12.5 мг					
РП	Рл	S	1913.310	1945.247	1908.390
		RSD, %	0.009	0.206	0.216
		As	1-1.1	1.0-1.1	1.1
		N	9589-9687	8535-8561	10119-10135
	ГХТ	S	522.49	526.47	519.07
		RSD,%	0.066	0.268	0.164
		Rs	4	3.8	3.6
		As	1.2-1.3	1.2-1.3	1.2
		N	9065-9123	92-9364	8446-8471
		BP	Рл	S	1945.347
RRF,%	н/в			99.393	99.621
ГХТ	S		529.23	536.12	527.96
	RRF, %		н/в	100.537	100.418
Дозування 10 мг + 12.5 мг					
РП	Рл	S	949.816	975.843	951.344
		RSD, %	0.152	0.042	0.153
		As	1	1.0-1.1	1.1
		N	9596-9686	8523-8571	10047-10188
	ГХТ	S	520.43	522.76	516.67
		RSD,%	0.077	0.284	0.048
		Rs	4	3.7-3.8	3.6
		As	1.2-1.3	1.2-1.3	1.2-1.3
		N	9112-9197	9271-9332	8471-8537
		BP	Рл	S	965.104
RRF,%	н/в			100.737	100.483
ГХТ	S		514.74	516.19	513.36
	RRF, %		н/в	99.834	100.456

Примітка. Рл – раміприл, ГХТ – гідрохлортіазид, РП – розчин порівняння, BP – випробований розчин.

Зміна відгуку за змінених умов, в порівнянні з відгуком за номінальних умов, знаходиться у межах 99.1–101.0 %. Тобто методика робасна до невеликих змін в швидкості потоку, температури термостату колонки, вмісту ацетонітрилу у рухомій фазі, рН 0.2 г/л розчину натрію гексансульфонату та концентрації натрію гексансульфонату у розчині.

При зміні швидкості потоку, як збільшенні так і зменшенні, спостерігається незначне зменшення розділення між піками. Тому обрана швидкість потоку є оптимальною.

Зміна температури термостату колонки також веде до погіршення розділення між піками. Тобто обрана температура термостату колонки є оптимальною.

Коригування водного компоненту рухомої фази (як рН так і концентрації натрію гексансульфонату) також веде до погіршення розділення між піками. Тобто концентрація натрію гексансульфонату та рН водного компоненту є оптимальними.

На основі отриманих даних було обрано наступні умови хроматографування:

- рухома фаза: розчин рН 2.7 (200 мг натрію гексансульфонату Р (або 219 мг натрію гексансульфонату моногідрату Р) розчиняють в 1000 мл води Р, доводять рН фосфорною кислотою Р до значення 2.7): ацетонітрил Р (20:80), для колонки Dionex Acclaim 120 C18;

- швидкість рухомої фази -1.2 мл/хв;
- детектування за довжини хвилі – 210 нм;
- температура колонки – 45 °С;
- об'єм інжекції – 3 мкл.

Запропоновано наступні вимоги до придатності хроматографічної системи:

- коефіцієнт симетрії піків рампірилу та гідрохлортіазиду, з хроматограми розчину порівняння, має бути в межах від 0.8 до 1.8;

- розділення між піками раміприлу та гідрохлортіазиду має бути не менше 2.0;

- відносне стандартне відхилення площ піків раміприлу або гідрохлортіазиду для 3-х паралельних інжекцій становить не більше 1.0 %.

При валідації методики досліджували діапазон застосування, правильність та прецизійність методики для 5 комерційно доступних дозувань комбінованих препаратів. Концентрації випробовуваних розчинів аналогічні як описано в розділі 4.4 (для колонки Inertsil).

Розраховували параметри лінійної регресії відповідно до рекомендацій ДФУ 2.7 п. 5.3.N1 та формул, наведених у розділі 4.4. (для колонки Inertsil).

Результати хроматографування наведено у таблицях 4.45, 4.46.

Таблиця 4.45 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для раміприлу

Розчин	C_t , мг/мл	S	S_{Av}	RSD, %	s_i	$S_i - s_i$
L1	0.024	125.85	125.50	0.27	125.95	-0.10
		125.48			125.95	-0.47
		125.18			125.95	-0.78
L2	0.049	252.74	251.86	0.33	252.25	0.48
		251.07			252.25	-1.18
		251.78			252.25	-0.47
L3	0.073	380.82	380.55	0.09	378.55	2.27
		380.17			378.55	1.62
		380.67			378.55	2.12
L4	0.097	501.86	501.41	0.16	504.85	-2.99
		500.49			504.85	-4.36
		501.88			504.85	-2.97
L5	0.122	635.93	635.83	0.01	631.15	4.78
		635.79			631.15	4.64
		635.78			631.15	4.63
L6	0.146	756.988	755.05	0.36	757.45	-0.46
		751.929			757.45	-5.52
		756.218			757.45	-1.23

Розрахунки параметрів лінійної регресії, межі виявлення та межі кількісного визначення наведено у таблиці 4.47.

Таблиця 4.46 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для гідрохлортіазиду

Розчин	C_t , мг/мл	S	S_{Av}	RSD, %	s_i	$S_i - s_i$
L1	0.06	491.46	492.36	0.16	487.98	3.48
		493.04			487.98	5.06
		492.57			487.98	4.59
L2	0.13	982.49	980.29	0.22	984.44	-1.95
		980.20			984.44	-4.24
		978.18			984.44	-6.26
L3	0.19	1498.90	1496.23	0.16	1480.90	18.00
		1494.04			1480.90	13.14
		1495.76			1480.90	14.86
L4	0.26	1955.75	1953.49	0.12	1977.36	-21.61
		1951.18			1977.36	-26.18
		1953.54			1977.36	-23.82
L5	0.32	2465.35	2470.26	0.24	2473.82	-8.47
		2476.91			2473.82	3.09
		2468.53			2473.82	-5.29
L6	0.39	2984.72	2982.14	0.17	2970.28	14.44
		2985.31			2970.28	15.03
		2976.40			2970.28	6.12

Таблиця 4.47 – Параметри лінійної регресії

Параметр		Критерій	Раміприл	Гідрохлортіазид
a		н/в	-0.35	-8.48
a , %	2.5 мг / 12.5 мг та 5 мг / 25 мг	≤ 1.0 %	0.134	0.447
	5 мг / 12.5 мг та 10 мг / 25 мг		0.067	0.445
	10 мг / 12.5		0.067	0.897
b		н/в	5191.42	7679.87
r		≥ 0.998	0.99991	0.99988
S_0		н/в	3.06	14.00
S_a			1.64	7.53
МКВ, мг/мл			0.003	0.010
МВ, мг/мл			0.001	0.003

Розраховане значення межі кількісного визначення понад 10 разів менше, ніж номінальна концентрація у випробовуваних розчинах, тобто експериментального підтвердження межі кількісного визначення проводити не потрібно.

Для дослідження правильності методики готували та аналізували 12 модельних розчинів на 4-х концентраційних рівнях, що містили плацебо та АФІ раміприлу та гідрохлортіазиду, розраховували знайдену кількість аналітів в модельних розчинах та відношення «Знайдено» / «Введено» відповідно формул, наведених у розділі 4.4 (для колонки Inertsil).

Результати хроматографування та розрахунки наведено у таблицях 4.48, 4.49.

Таблиця 4.48 – Експериментальні дані для дослідження правильності визначення раміприлу

Роз-чин	C _i , мг/мл	S	S _{Av}	RSD, %	2.5 мг / 12.5 мг та 5 мг / 25 мг		5 мг / 12.5 мг та 10 мг / 25 мг		10 мг / 12.5	
					C _m , мг/мл	Recovery, %	C _m , мг/мл	Recovery, %	C _m , мг/мл	Recovery, %
M1_1	0.031	162.02	162.22	0.17	0.03	100.06	0.031	100.36	99.90	31.14
	0.031	162.42			0.03	100.31	0.031	100.61	100.14	31.14
M1_2	0.030	155.39	155.60	0.19	0.03	99.81	0.030	100.10	99.64	29.94
	0.030	155.81			0.03	100.08	0.030	100.38	99.91	29.94
M1_3	0.030	156.79	156.64	0.14	0.03	100.71	0.030	101.01	100.54	29.94
	0.030	156.49			0.03	100.51	0.030	100.81	100.35	29.94
M2_1	0.051	260.98	261.08	0.05	0.05	98.99	0.050	99.29	98.83	50.70
	0.051	261.17			0.05	99.07	0.050	99.36	98.90	50.70
M2_2	0.052	265.31	265.34	0.02	0.05	99.07	0.051	99.37	98.91	51.50
	0.052	265.37			0.05	99.10	0.051	99.39	98.93	51.50
M2_3	0.052	267.231	267.55	0.17	0.05	99.79	0.052	100.09	99.63	51.50
	0.052	267.871			0.05	100.03	0.052	100.33	99.87	51.50
M3_1	0.098	512.45	513.05	0.17	0.10	100.35	0.099	100.65	100.19	98.21
	0.098	513.65			0.10	100.59	0.099	100.89	100.42	98.21
M3_2	0.098	511.05	510.99	0.02	0.10	100.48	0.099	100.79	100.32	97.81
	0.098	510.93			0.10	100.46	0.099	100.76	100.30	97.81
M3_3	0.101	516.86	516.41	0.12	0.10	98.41	0.100	98.71	98.25	101.01
	0.101	515.96			0.10	98.24	0.100	98.54	98.08	101.01
M4_1	0.138	703.35	703.85	0.10	0.14	98.21	0.136	98.50	98.05	137.74
	0.138	704.36			0.14	98.35	0.136	98.65	98.19	137.74
M4_2	0.140	717.01	716.00	0.20	0.14	98.69	0.138	98.98	98.53	139.73
	0.140	714.99			0.14	98.41	0.138	98.70	98.25	139.73
M4_3	0.139	717.250	717.34	0.02	0.14	99.57	0.138	99.87	99.41	138.54
	0.139	717.439			0.14	99.60	0.138	99.90	99.44	138.54

Оцінку результатів наведено у таблицях 4.50, 4.51.

Отримані результати задовольняють критерії прийнятності. Правильність методики достатня.

Таблиця 4.49 – Експериментальні дані для дослідження правильності визначення гідрохлортіазиду

Розчин	C _t , мг/мл	S	S _{Av}	RSD, %	2.5 мг / 12.5 мг та 5 мг / 25 мг		5 мг / 12.5 мг та 10 мг / 25 мг		10 мг / 12.5	
					C _m , мг/мл	Recovery, %	C _m , мг/мл	Recovery, %	C _m , мг/мл	Recovery, %
M1_1	0.078	581.61	581.70	0.02	0.08	100.38	100.74	31.11	100.42	62.22
	0.078	581.79			0.08	100.41	100.77	31.11	100.46	62.22
M1_2	0.075	558.84	559.31	0.12	0.08	100.02	100.38	30.00	100.07	60.00
	0.075	559.78			0.08	100.19	100.55	30.00	100.23	60.00
M1_3	0.075	565.95	566.57	0.15	0.08	100.76	101.12	30.16	100.81	60.31
	0.075	567.19			0.08	100.98	101.35	30.16	101.03	60.31
M2_1	0.127	947.72	948.60	0.13	0.13	100.50	100.86	50.63	100.54	101.26
	0.127	949.49			0.13	100.68	101.05	50.63	100.73	101.26
M2_2	0.123	917.77	918.74	0.15	0.12	100.15	100.51	49.20	100.19	98.41
	0.123	919.72			0.12	100.36	100.72	49.20	100.41	98.41
M2_3	0.124	927.91	928.45	0.08	0.12	100.60	100.97	49.52	100.65	99.04
	0.124	928.98			0.12	100.72	101.08	49.52	100.77	99.04
M3_1	0.250	1871.28	1873.21	0.15	0.25	100.64	101.00	99.84	100.68	199.67
	0.250	1875.14			0.25	100.84	101.21	99.84	100.89	199.67
M3_2	0.249	1871.80	1871.86	0.00	0.25	100.82	101.19	99.68	100.87	199.35
	0.249	1871.92			0.25	100.83	101.20	99.68	100.88	199.35
M3_3	0.248	1861.32	1862.31	0.07	0.25	100.90	101.27	99.04	100.95	198.08
	0.248	1863.29			0.25	101.01	101.37	99.04	101.06	198.08
M4_1	0.350	2585.74	2587.93	0.12	0.35	99.28	99.64	139.83	99.33	279.67
	0.350	2590.11			0.35	99.45	99.81	139.83	99.50	279.67
M4_2	0.349	2606.88	2605.02	0.10	0.35	100.21	100.57	139.68	100.25	279.35
	0.349	2603.15			0.35	100.06	100.43	139.68	100.11	279.35
M4_3	0.347	2588.46	2587.62	0.05	0.35	100.07	100.43	138.88	100.11	277.76
	0,347	2586,77			0,35	100,00	100,36	138,88	100,05	277,76

Таблиця 4.50 – Оцінка результатів правильності визначення раміприлу

Параметр	Критерій	Результат		
		2.5 мг / 12.5 мг та 5 мг / 25 мг	5 мг / 12.5 мг та 10 мг / 25 мг	10 мг / 12.5 мг
Мінімальне значення ступеня вилучення	≥ 98.0 %	98.210	98.505	98.049
Максимальне значення ступеня вилучення	≤ 102.0 %	100.706	101.008	100.541
Середнє значення ступенів вилучення	99.0–101.0 %	99.537	99.836	99.374

Для дослідження прецизійності 3 аналітики протягом 3-х днів готували та аналізували по 6 паралелей випробовуваних розчинів для 3-х дозувань препарату

для показника якості «Кількісне визначення» та по 10 паралелей випробовуваних розчинів для 3-х дозувань препарату для показника якості «Однорідність дозованих одиниць». Кожен аналітик використовував інші серії хроматографічних колонок, обладнання та інший вміст ацетонітрилу у рухомій фазі.

Таблиця 4.51 – Оцінка результатів правильності визначення гідрохлортіазиду

Параметр	Критерій	Результат		
		2.5 мг / 12.5 мг та 5 мг / 25 мг	5 мг / 12.5 мг та 10 мг / 25 мг	10 мг / 12.5 мг
Мінімальне значення ступеня вилучення	$\geq 98.0 \%$	99.282	99.642	99.329
Максимальне значення ступеня вилучення	$\leq 102.0 \%$	101.009	101.374	101.056
Середнє значення ступенів вилучення	99.0 – 101.0 %	100.411	100.774	100.458

Результати хроматографування та розрахунки для показника якості «Кількісне визначення» наведено в таблицях 4.52-4.57. Оцінку результатів наведено у таблицях 4.58, 4.59.

Результати хроматографування та розрахунки для показника якості «Однорідність дозованих одиниць» наведено в таблицях 4.60, 4.61. Оцінку результатів наведено у таблицях 4.62, 4.63.

Таблиця 4.52 – Результати хроматографування випробовуваних розчинів приготованих відповідно до методики кількісного визначення раміприлу для дозування 5 мг / 25 мг

Параметр	m, мг	S	RSD	X, мг/табл
1	2	3	4	5
Аналітик А (вміст ацетонітрилу 65 %)				
BP1	396.5	249.509	0.133	4.825
BP2	400.4	253.358	0.086	4.852
BP3	397.2	250.592	0.111	4.838
BP4	398.0	252.344	0.041	4.862
BP5	399.9	256.454	0.031	4.917
BP6	397.8	249.981	0.041	4.818

Продовження таблиці 4.52

1	2	3	4	5
Аналітик Б (вміст ацетонітрилу 80 %)				
BP7	400.2	248.917	0.047	4.840
BP8	400.4	250.658	0.340	4.871
BP9	400.3	248.662	0.166	4.834
BP10	399.7	249.461	0.074	4.856
BP11	399.9	250.437	0.095	4.873
BP12	400.0	249.296	0.105	4.850
Аналітик В (вміст ацетонітрилу 50 %)				
BP13	400.1	246.066	0.113	4.843
BP14	399.9	245.269	0.216	4.830
BP15	399.5	245.198	0.051	4.833
BP16	399.8	245.793	0.025	4.841
BP17	399.7	244.295	0.080	4.813
BP18	400.0	245.542	0.166	4.834

Таблиця 4.53 – Результати хроматографування випробовуваних розчинів приготованих відповідно до методики кількісного визначення раміприлу для дозування 5 мг / 12.5 мг

Параметр	m, мг	S	RSD	X, мг/табл
Аналітик А (вміст ацетонітрилу 65 %)				
BP1	449.4	503.493	0.220	4.860
BP2	449.9	506.548	0.105	4.884
BP3	444.8	505.331	0.042	4.928
BP4	449.9	509.801	0.034	4.916
BP5	447.2	508.947	0.052	4.937
BP6	445.0	504.083	0.042	4.914
Аналітик Б (вміст ацетонітрилу 80 %)				
BP7	449.4	517.424	0.155	4.893
BP8	449.9	517.340	0.254	4.887
BP9	450.0	527.594	0.135	4.982
BP10	449.9	525.500	0.513	4.964
BP11	450.0	518.664	0.097	4.898
BP12	450.1	518.250	0.107	4.893
Аналітик В (вміст ацетонітрилу 50 %)				
BP13	459.3	529.527	0.051	4.969
BP14	460.4	532.051	0.292	4.981
BP15	459.4	529.784	0.480	4.970
BP16	461.2	530.155	0.059	4.954
BP17	460.0	529.948	0.090	4.965
BP18	465.2	537.760	0.101	4.982

Таблиця 4.54 – Результати хроматографування випробовуваних розчинів приготованих відповідно до методики кількісного визначення раміприлу для дозування 10 мг / 12.5 мг

Параметр	m, мг	S	RSD	X, мг/табл
Аналітик А (вміст ацетонітрилу 65 %)				
BP1	219.4	471.425	0.253	9.495
BP2	224.0	483.110	0.019	9.531
BP3	224.9	477.566	0.042	9.384
BP4	225.0	489.007	0.024	9.604
BP5	225.2	486.915	0.132	9.555
BP6	220.0	477.760	0.482	9.597
Аналітик Б (вміст ацетонітрилу 80 %)				
BP7	501.542	0.061	9.749	501.542
BP8	498.701	0.135	9.715	498.701
BP9	488.449	0.090	9.688	488.449
BP10	493.073	0.282	9.593	493.073
BP11	482.992	0.176	9.563	482.992
BP12	500.049	0.151	9.742	500.049
Аналітик В (вміст ацетонітрилу 50 %)				
BP13	507.328	0.083	9.686	507.328
BP14	505.524	0.004	9.741	505.524
BP15	509.942	0.115	9.689	509.942
BP16	503.714	0.168	9.659	503.714
BP17	505.508	0.338	9.797	505.508
BP18	506.801	0.014	9.744	506.801

Таблиця 4.55 – Результати хроматографування випробовуваних розчинів приготованих відповідно до методики кількісного визначення гідрохлортіазиду для дозування 5 мг / 25 мг

Параметр	m, мг	S	RSD	X, мг/табл
1	2	3	4	5
Аналітик А (вміст ацетонітрилу 65 %)				
BP1	396.5	1861.800	0.087	24.814
BP2	400.4	1840.595	0.034	24.293
BP3	397.2	1832.690	0.109	24.383
BP4	398.0	1839.750	0.078	24.428
BP5	399.9	1841.510	0.012	24.335
BP6	397.8	1850.020	0.049	24.577

Продовження таблиці 4.55

1	2	3	4	5
Аналітик Б (вміст ацетонітрилу 80 %)				
BP7	400.2	1946.610	0.004	24.750
BP8	400.4	1975.590	0.281	25.106
BP9	400.3	1932.935	0.227	24.570
BP10	399.7	1939.065	0.047	24.685
BP11	399.9	1940.015	0.161	24.685
BP12	400.0	1941.390	0.056	24.696
Аналітик В (вміст ацетонітрилу 50 %)				
BP13	400.1	1824.845	0.001	24.710
BP14	399.9	1822.360	0.231	24.688
BP15	399.5	1821.515	0.111	24.702
BP16	399.8	1826.485	0.064	24.750
BP17	399.7	1816.625	0.096	24.623
BP18	400.0	1824.545	0.081	24.712

Таблиця 4.56 – Результати хроматографування випробовуваних розчинів приготованих відповідно до методики кількісного визначення гідрохлортіазиду для дозування 5 мг / 12.5 мг

Параметр	m, мг	S	RSD	X, мг/табл
Аналітик А (вміст ацетонітрилу 65 %)				
BP1	449.4	1862.205	0.260	12.597
BP2	449.9	1873.135	0.046	12.657
BP3	444.8	1850.680	0.038	12.648
BP4	449.9	1855.490	0.075	12.538
BP5	447.2	1883.595	0.061	12.804
BP6	445.0	1846.075	0.078	12.611
Аналітик Б (вміст ацетонітрилу 80 %)				
BP7	449.4	1924.915	0.069	12.729
BP8	449.9	1957.560	0.353	12.931
BP9	450.0	1919.105	0.098	12.674
BP10	449.9	1946.990	0.133	12.861
BP11	450.0	1934.570	0.333	12.776
BP12	450.1	1923.220	0.085	12.698
Аналітик В (вміст ацетонітрилу 50 %)				
BP13	459.3	1940.765	0.023	12.577
BP14	460.4	1949.545	0.193	12.603
BP15	459.4	1943.075	0.428	12.589
BP16	461.2	1943.315	0.036	12.541
BP17	460.0	1941.030	0.100	12.559
BP18	465.2	1970.005	0.003	12.604

Таблиця 4.57 – Результати хроматографування випробовуваних розчинів приготованих відповідно до методики кількісного визначення гідрохлортіазиду для дозування 10 мг / 12.5 мг

Параметр	m, мг	S	RSD	X, мг/табл
Аналітик А (вміст ацетонітрилу 65 %)				
BP1	219.4	915.682	0.305	12.623
BP2	224.0	948.308	0.001	12.804
BP3	224.9	936.862	0.039	12.599
BP4	225.0	951.355	0.045	12.788
BP5	225.2	935.518	0.130	12.564
BP6	220.0	917.295	0.254	12.611
Аналітик Б (вміст ацетонітрилу 80 %)				
BP7	225.2	960.392	0.074	12.535
BP8	224.7	975.170	0.132	12.756
BP9	220.7	960.837	0.062	12.797
BP10	225.0	981.509	0.046	12.822
BP11	221.1	961.145	0.234	12.777
BP12	224.7	964.613	0.127	12.618
Аналітик В (вміст ацетонітрилу 50 %)				
BP13	229.0	975.576	0.087	12.778
BP14	226.9	971.876	0.024	12.847
BP15	230.1	978.916	0,111	12.760
BP16	228.0	967.427	0.087	12.727
BP17	225.6	972.171	0.288	12.925
BP18	227.4	973.294	0.019	12.838

Таблиця 4.58 – Порівняння результатів для валідаційної характеристики «Прецизійність» для кількісного визначення раміприлу

Параметр	Критерій	5 мг / 25 мг			5 мг / 12.5 мг			10 мг / 12.5 мг		
		А	Б	В	А	Б	В	А	Б	В
Середнє для 6 паралелей, мг/табл	н/в	4.852	4.854	4.832	4.907	4.919	4.970	9.528	9.675	9.719
RSD для 6 паралелей, %	≤ 1.0 %	0.738	0.332	0.223	0.590	0.856	0.207	0.854	0.815	0.518
Середнє для 12 паралелей, мг/табл	н/в	4.846			4.932			9.641		
RSD для 12 паралелей, %	≤ 1.5 %	0.500			0.811			1.118		
Різниця між результатами (Δ), %	≤ 2.0 %	0.430			1.273			1.914		

Таблиця 4.59 – Порівняння результатів для валідаційної характеристики «Прецизійність» для кількісного визначення гідрохлортіазиду

Параметр	Критерій	5 мг / 25 мг			5 мг / 12.5 мг			10 мг / 12.5 мг		
		А	Б	В	А	Б	В	А	Б	В
Середнє для 6 паралелей, мг/табл	н/в	24.47	24.75	24.70	12.64	12.78	12.58	12.67	12.72	12.81
RSD для 6 паралелей, %	≤ 1.0 %	0.794	0.746	0.170	0.712	0.781	0.199	0.819	0.900	0.561
Середнє для 12 паралелей, мг/табл	н/в	24.639			12.667			12.732		
RSD для 12 паралелей, %	≤ 1.5 %	0.781			0.893			0.877		
Різниця між результатами (Δ), %	≤ 2.0 %	1.108			1.593			1.180		

Таблиця 4.60 – Результати хроматографування випробовуваних розчинів приготованих відповідно до методики однорідності дозованих одиниць раміприлу

Параметр	S	RSD	X, %	S	RSD	X, %	S	RSD	X, %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Аналітик А									
Дозування	5 мг / 25 мг			5 мг / 12.5 мг			10 мг / 12.5 мг		
BP1	257.757	0.405	99.703	501.811	0.145	96.618	506.598	0.069	97.220
BP2	252.240	0.048	97.569	505.003	0.231	97.232	493.141	0.043	94.638
BP3	257.792	0.043	99.716	504.255	0.830	97.088	492.495	0.070	94.514
BP4	257.724	0.036	99.690	508.581	0.120	97.921	502.931	0.186	96.517
BP5	254.594	0.022	98.479	509.817	0.074	98.159	493.200	0.079	94.649
BP6	257.507	0.016	99.606	517.726	0.065	99.682	505.112	0.258	96.935
BP7	260.249	0.103	100.667	508.161	0.263	97.840	492.316	0.037	94.480
BP8	253.427	0.021	98.028	509.502	0.472	98.098	493.114	0.143	94.633
BP9	258.357	0.192	99.935	513.742	0.184	98.915	493.277	0.188	94.664
BP10	252.149	0.132	97.534	515.472	0.676	99.248	496.269	0.112	95.238
Аналітик Б									
BP11	256.524	0.589	99.751	516.885	0.212	97.571	507.535	0.082	96.812
BP12	251.124	0.021	97.651	521.015	0.039	98.350	519.541	0.246	99.102
BP13	254.549	0.150	98.983	515.295	0.137	97.270	492.418	0.012	93.928
BP14	263.398	0.492	102.424	528.377	0.113	99.740	497.484	0.405	94.894
BP15	256.935	0.813	99.911	519.533	0.443	98.070	499.811	0.161	95.338
BP16	259.554	0.070	100.929	515.578	0.048	97.324	490.719	0.058	93.604
BP17	259.283	0.046	100.824	524.280	0.063	98.967	503.548	0.284	96.051
BP18	258.362	1.526	100.466	506.109	0.502	95.537	510.068	0.697	97.295
BP19	258.312	0.315	100.446	518.500	0.022	97.876	512.529	0.227	97.764
BP20	251,954	0.746	97.974	521.607	0.219	98.462	512.295	0.243	97.720
Аналітик В									
BP21	246.861	0.225	98.048	506.713	0.182	99.779	481.371	0.082	95.068

Продовження таблиці 4.60

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BP22	254.098	0.069	100.922	494.223	0.234	97.320	485.969	0.019	95.976
BP23	247.277	0.478	98.213	501.329	0.034	98.719	483.507	0.237	95.490
BP24	254.645	0.196	101.140	501.831	0.056	98.818	503.393	0.755	99.417
BP25	255.798	0.025	101.598	498.969	0.072	98.254	488.619	0.370	96.499
BP26	248.025	0.133	98.511	502.040	0.019	98.859	480.058	0.185	94.809
BP27	255.088	0.071	101.316	499.573	0.224	98.373	499.855	0.081	98.718
BP28	252.796	0.020	100.405	499.300	0.215	98.319	488.645	0.087	96.505
BP29	255.259	0.099	101.384	501.965	0.324	98.844	500.237	0.316	98.794
BP30	250.480	0.054	99.485	501.452	0.141	98.743	503.855	0.161	99.508

Таблиця 4.61 – Результати хроматографування випробовуваних розчинів приготованих відповідно до методики однорідності дозованих одиниць гідрохлортіазиду

Параметр	S	RSD	X, %	S	RSD	X, %	S	RSD	X, %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Аналітик А									
Дозування	5 мг / 25 мг			5 мг / 12.5 мг			10 мг / 12.5 мг		
BP1	1823.44	0.368	97.221	1892.81	0.197	102.153	966.29	0.439	101.534
BP2	1884.71	0.187	100.488	1914.67	0.143	103.333	978.26	0.046	102.791
BP3	1883.66	0.262	100.432	1906.32	1.197	102.882	977.31	0.094	102.691
BP4	1830.22	0.092	97.582	1923.97	0.072	103.834	996.92	0.213	104.752
BP5	1864.24	0.006	99.396	1913.51	0.134	103.270	971.14	0.063	102.043
BP6	1850.23	0.061	98.649	1877.44	0.019	101.323	967.42	0.292	101.653
BP7	1831.95	0.113	97.675	1926.57	0.302	103.975	971.10	0.123	102.039
BP8	1889.12	0.005	100.723	1884.92	0.419	101.727	977.18	0.177	102.678
BP9	1821.77	0.166	97.132	1931.96	0.117	104.266	969.11	0.183	101.829
BP10	1878.85	0.067	100.175	1915.48	0.330	103.376	974.49	0.108	102.396
Аналітик Б									
BP11	1899.80	0.538	96.617	1946.09	0.097	102.759	987.28	0.116	101.162
BP12	1963.46	0.072	99.854	2012.62	0.163	106.273	995.58	0.142	102.012
BP13	1947.70	0.005	99.053	2020.34	0.198	106.680	1022.26	0.035	104.745
BP14	1964.22	0.094	99.893	2026.55	0.127	107.008	981.53	0.175	100.573
BP15	1948.40	0.515	99.088	1956.23	0.637	103.295	1008.15	0.058	103.299
BP16	1958.81	0.021	99.618	1992.52	0.065	105.211	1018.66	0.144	104.377
BP17	1917.24	0.051	97.504	1965.60	0.169	103.790	994.82	0.016	101.934
BP18	1984.50	0.135	100.924	1960.34	0.339	103.512	1043.46	0.377	106.918
BP19	1903.52	0.175	96.806	1966.59	0.344	103.842	999.46	0.001	102.410
BP20	1973.38	0.636	100.359	1949.03	0.041	102.915	982.56	0.058	100.678
Аналітик В									
BP21	1830.06	0.017	100.011	1907.06	0.205	103.733	935.56	0.057	101.407
BP22	1811.53	0.071	98.998	1925.76	0.257	104.750	942.32	0.065	102.140
BP23	1833.42	0.363	100.195	1918.28	0.005	104.343	938.64	0.310	101.742
BP24	1814.46	0.046	99.158	1917.25	0.148	104.288	934.55	0.464	101.298

Продовження таблиці 4.61

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BP25	1819.68	0.057	99.444	1897.65	0.121	103.221	920.08	0.641	99.730
BP26	1839.06	0.024	100.503	1919.22	0.034	104.395	935.78	0.190	101.431
BP27	1816.92	0.117	99.293	1908.88	0.179	103.832	951.48	0.157	103.133
BP28	1822.74	0.052	99.611	1906.47	0.142	103.701	930.47	0.025	100.855
BP29	1819.37	0.014	99.427	1912.20	0.089	104.013	952.76	0.293	103.272
BP30	1819.66	0.012	99.443	1902.88	0.074	103.506	938.86	0.175	101.765

Таблиця 4.62 – Порівняння результатів для валідаційної характеристики «Прецизійність» для однорідності дозованих одиниць раміприлу

Параметр	Критерій	5 мг / 25 мг			5 мг / 12.5 мг			10 мг / 12.5 мг		
		А	Б	В	А	Б	В	А	Б	В
Середнє для 10 паралелей, %	н/в	99.1	99.9	100.1	98.1	97.9	98.6	95.3	96.3	97.1
RSD для 10 паралелей, %	≤ 2.0 %	1.107	1.435	1.409	0.994	1.154	0.631	1.150	1.868	1.900
Середнє для 20 паралелей, %	н/в	99.710			98.200			96.226		
RSD для 12 паралелей, %	≤ 2.5 %	1.357			0.966			1.784		
Різниця між результатами (Δ), %	≤ 3.0 %	1.009			0.686			1.730		

Таблиця 4.63 – Порівняння результатів для валідаційної характеристики «Прецизійність» для однорідності дозованих одиниць гідрохлортіазиду

Параметр	Критерій	5 мг / 25 мг			5 мг / 12.5 мг			10 мг / 12.5 мг		
		А	Б	В	А	Б	В	А	Б	В
Середнє для 10 паралелей, %	н/в	98.9	99.0	99.6	103.0	104.5	104.0	102.4	102.8	101.7
RSD для 10 паралелей, %	≤ 2.0 %	1.479	1.514	0.481	0.956	1.549	0.448	0.904	1.976	1.018
Середнє для 20 паралелей, %	н/в	99.176			103.840			102.310		
RSD для 12 паралелей, %	≤ 2.5 %	1.247			1.213			1.420		
Різниця між результатами (Δ), %	≤ 3.0 %	0.661			1.515			1.133		

Отримані результати задовольняють критерії прийнятності. Прецизійність методики є достатньою.

Розроблена аналітична методика відповідає усім дослідженим валідаційним характеристикам і може бути використана для рутинного контролю

комбінованих препаратів раміприлу з гідрохлортіазидом за показниками якості «Кількісне визначення» та «Однорідність дозованих одиниць».

4.5 Розробка та валідація методики контролю за показниками якості «Розчинення» та «Профілі розчинення» таблеток раміприлу з гідрохлортіазидом з використанням хроматографічної колонки Dionex Acclaim 120 C18 (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм)

При розробці генеричних препаратів, одним з тестів, що опосередковано показує взаємозамінність оригінального та генеричного препарату *in vitro* є дослідження профілів розчинення (Biowaiver) [90]. Оскільки такі дослідження досить об'ємні та потребують дослідження великої кількості зразків, то важливою є розробка не лише простих у виконанні, а й швидких методів.

Нами проводились дослідження для комбінація раміприлу (інгібітор АПФ) та гідрохлортіазиду (діуретик). Ця комбінація є добре вивченою, широко застосовується для корекції тиску та не втрачає своєї актуальності уже протягом понад 30 років [91, 92]. У фармакопеї США (USP) описано методики для визначення розчинення для монопрепаратів раміприлу та гідрохлортіазиду, для комбінованого препарату монографія відсутня. Для гідрохлортіазиду запропоновано використовувати спектрофотометричну методику, що не застосовно в даному випадку, оскільки наявність гідрохлортиазиду в комбінованому препараті буде заважати визначенню раміприлу. Для визначення раміприлу запропоновано використовувати метод ВЕРХ, однак тривалість хроматографування випробовуваних розчинів за цією методикою перевищує 10 хв. До того ж, для обох діючих речовин працездатність методики перевірялась лише для 0.1 М розчину кислоти хлористоводневої.

Одночасне визначення раміприлу та гідрохлортіазиду описано у ряді публікацій, однак можливість використання методики для різних середовищ розчинення показано лише в [93]. До того ж, методики валідували в вузькому діапазоні, що дозволяло аналізувати лише одне дозування препарату, тоді як

відповідно [94] на фармацевтичному ринку України зареєстровано 5 різних дозувань препарату.

У всіх досліджених публікаціях використовували колонку заповнену октадецилсилільним сорбентом. Відповідно до [93, 95, 28] в якості буферного компоненту використовували розчин натрію перхлорату концентрацією від 12 г/л до 14 г/л, в якості органічного компоненту – ацетонітрил. Тривалість 1 інжекції відповідно [95] становила близько 20 хв, відповідно [93, 28] – близько 10 хв, що є досить тривалим. Відповідно [27] в якості буферного компоненту використовували 0.01 М розчин калію дигідрофосфату, в якості органічного компоненту використовували суміш метанолу з ацетонітрилом. Тривалість 1 інжекції становила близько 5 хв. Однак дана методика була розроблена для кількісного визначення та специфічність для середовищ розчинення не була перевірена. Також рухома фаза містила 80 % органічного компоненту.

Мета нашого дослідження – розробити аналітичну методику для одночасного визначення раміприлу та гідрохлортіазиду при дослідженні профілів розчинення, що може бути застосована для 5 різних дозувань препарату [96, 97]. Перевіряли можливість використання умов хроматографування, підібраних для кількісного визначення, для контролю розчинення та профілів розчинення. В якості середовища для профілів розчинення використовували середовище з кислотою хлористоводневою рН 1.2, ацетатний буферний розчин рН 4.5 та фосфатний буферний розчин рН 6.8. В якості середовища для розчинення використовували 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої та воду. Для усіх середовищ, окрім ацетатного буферного розчину рН 4.5, вміст ацетонітрилу у рухомій фазі 80 % забезпечував гарне розділення між піками аналітів та між бланковими піками і піком гідрохлортіазиду. Для ацетатного буферного розчину рН 4.5 спостерігалась інтерференція піку гідрохлортіазиду з піком ацетату. Достатнє розділення між піком гідрохлортіазиду та бланковим піком забезпечувалось при вмісті ацетонітрилу у рухомій фазі 50 %. Тому контроль за показником «Розчинення» можливо проводити при вмісті

ацетонітрилу в рухомій фазі 80 %, в той час як при дослідженні профілів розчинення вміст ацетонітрилу потрібно зменшити до 80 %

Досліджували робасність методики за обраного співвідношення рухомих фаз. Для кожного з варіантів співвідношення фаз досліджували вплив наступних факторів:

- зміна швидкості потоку (± 0.1 мл/хв);
- зміна температури термостату колонки (± 5 °C);
- зміна рН 0.2 г/л розчину натрію гексансульфонату (± 0.2);
- зміна концентрації натрію гексансульфонату у розчині (± 0.1 г/л).

Вплив вмісту ацетонітрилу у рухомій фазі на відтворення методики досліджували в діапазоні від 48 % до 82 %. Оскільки профіль хроматограм для 0.1 М хлористоводневої кислоти та середовища з кислотою хлористоводневою рН 1.2 подібні, а для фосфатного буферного розчину рН 6.8 не виявлено додаткових бланкових піків, то при дослідженні робасності для співвідношення фаз 50 : 50 аналізували випробовуваний розчин, приготований в 0.1 М хлористоводневій кислоті, ацетатному буферному розчині рН 4.5 та воді. При дослідженні робасності для співвідношення фаз 20 : 80 аналізували випробовуваний розчин, приготований в 0.1 М хлористоводневій кислоті та воді.

Результати хроматографування та розрахунків наведено у таблицях 4.64-4.68.

Таблиця 4.64 – Результати дослідження впливу варіювання умов хроматографування на відтворення методики при вмісті ацетонітрилу у рухомій фазі 50 %

Розчин	Аналіт	Параметр	Умови хроматографування				
			номінальні	+ 0.1, мл/хв	- 0.1, мл/хв	+ 5, °C	- 5, °C
1	2	3	4	5	6	7	8
РП	ГХТ	S	194.565	179.869	212.951	194.021	194.508
		RSD. %	0.084	0.212	0.049	0.195	0.113
		As	1.1	1.0-1.1	1.0-1.1	1.0-1.1	1
		N	12111-12399	10638-10662	13074-13307	11690-11752	11871-11976

Продовження таблиці 4.64

1	2	3	4	5	6	7	8
	Рл	S	24.553	22.692	26.819	24.358	24.532
		RSD.%	1.325	1.236	0.385	0.238	0.363
		Rs	11.3-11.4	10.5-10.6	11.3-11.4	11.7-11.8	10.0-10.1
		As	1.0	1.0	1.0-1.1	1.0-1.1	1.0-1.1
		N	7264-7469	6433-6678	7391-7580	8016-8224	5854-6012
BP (0.1 M HCl)	ГХТ	S	203.960	187.517	222.143	202.083	204.752
		RRF.%	н/в	99.449	99.511	99.357	100.418
	Рл	S	25.237	23.150	27.342	25.165	25.143
		RRF. %	н/в	99.253	99.187	100.514	99.714
BP (DM pH4.5)	ГХТ	S	202.209	185.414	221.773	202.110	201.757
		RRF.%	н/в	99.186	100.206	100.231	99.806
	Рл	S	25.338	23.198	27.553	25.135	25.123
		RRF. %	н/в	99.060	99.552	99.995	99.236
BP (W)	ГХТ	S	198.610	183.702	217.220	198.212	198.467
		RRF.%	н/в	100.051	99.927	100.079	99.957
	Рл	S	24.433	22.559	26.920	24.462	24.628
		RRF. %	н/в	99.902	100.868	100.920	100.884

Примітка. Рл – раміприл, ГХТ – гідрохлортіазид, РП – розчин порівняння, BP – випробовуваний розчин, 0.1 M HCl – 0.1 M розчин кислоти хлористоводневої, AsN – ацетонітрил, DM pH1.2 – середовище з кислотою хлористоводневою pH 1.2, DM pH4.5 – ацетатний буферний розчин pH 4.5, DM pH6.8 – фосфатний буферний розчин pH 6.8, W – вода.

Таблиця 4.65 – Результати дослідження впливу варіювання приготування рухомої фази А на відтворення методики при вмісті ацетонітрилу у рухомій фазі 50 %

Розчин	Аналіт	Параметр	Умови хроматографування				
			номінальні	+ 0.01, г/л	- 0.01, г/л	+ 0.2, pH	- 0.2, pH
1	2	3	4	5	6	7	8
РП	ГХТ	S	194.565	194.423	193.859	195.425	195.026
		RSD, %	0.084	0.091	0.086	0.104	0.138
		As	1.1	1.0-1.1	1.0-1.1	1.0-1.1	1.0-1.1
		N	12111-12399	12000-12108	11811-11970	11909-12053	11919-12139
	Рл	S	24.553	24.588	24.481	24.995	24.716
		RSD,%	1.325	0.235	0.464	1.752	0.387
		Rs	11.3-11.4	11.0-11.1	10.8-10.9	11.0-11.1	11.1
		As	1.0	1.0-1.1	1.0	1.0-1.1	1.0
		N	7264-7469	7029-7208	6849-7148	5772-5903	9452-9481
BP (0.1 M HCl)	ГХТ	S	203.960	203.273	202.752	204.277	202.909
		RRF,%	н/в	99.736	99.770	99.715	99.249
	Рл	S	25.237	25.060	25.189	25.659	25.229
		RRF, %	н/в	99.156	100.101	99.875	99.307

Продовження таблиці 4.65

1	2	3	4	5	6	7	8
BP (DM pH4.5)	ГХТ	S	202.209	203.104	203.464	202.853	203.905
		RRF,%	н/в	100.516	100.987	99.877	100.600
	Рл	S	25.338	25.519	25.281	26.050	25.332
		RRF, %	н/в	100.573	100.067	100.993	99.316
BP (W)	ГХТ	S	198.610	198.677	198.833	199.077	198.390
		RRF,%	н/в	100.107	100.477	99.794	99.653
	Рл	S	24.433	24.413	24.559	25.058	24.760
		RRF, %	н/в	99.777	100.811	100.743	100.668

Примітка. Рл – раміприл, ГХТ – гідрохлортіазид, РП – розчин порівняння, BP – випробовуваний розчин, 0.1 М НСІ – 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої, АсN – ацетонітрил, DM pH1.2 – середовище з кислотою хлористоводневою pH 1.2, DM pH4.5 – ацетатний буферний розчин pH 4.5, DM pH6.8 – фосфатний буферний розчин pH 6.8, W – вода.

Таблиця 4.66 – Результати дослідження впливу зміни вмісту ацетонітрилу на відтворення методики

Розчин	Аналіт	Пара-метр	Вміст ацетонітрилу				
			50, %	48, %	65, %	80, %	8,2 %
РП	ГХТ	S	194.565	194.314	197.465	200.140	199.301
		RSD, %	0.084	0.110	0.016	0.035	0.053
		As	1.1	1.0-1.1	1.0-1.1	1.0	1.0-1.1
		N	12111-12399	11882-12131	10327-10444	9804-9817	9152-9218
	Рл	S	24.553	24.223	25.737	25.866	26.562
		RSD,%	1.325	0.491	0.658	0.023	0.443
		Rs	11.3-11.4	11.9-12.0	5.8	5.5	4.3-4.4
		As	1.0	1.0-1.1	1.0-1.1	0.9	1.0
		N	7264-7469	6413-6677	8861-8914	9345-9411	8213-8355
BP (0.1 М НСІ)	ГХТ	S	203.960	203.853	208.641	210.326	207.923
		RRF,%	н/в	100.077	100.793	100.249	99.521
	Рл	S	25.237	25.145	26.557	26.514	27.196
		RRF, %	н/в	100.995	100.388	99.725	99.614
BP (DM pH4.5)	ГХТ	S	202.209	200.756	449.823	н/в	
		RRF,%	н/в	99.410	219.188		
	Рл	S	25.338	24.890	26.432		
		RRF, %	н/в	99.570	99.518		
BP (W)	ГХТ	S	198.610	198.340	201.652	205.433	204.856
		RRF,%	н/в	99.993	100.041	100.554	100.694
	Рл	S	24.433	24.053	25.602	25.747	26.423
		RRF, %	н/в	99.787	99.964	100.029	99.965

Примітка. Рл – раміприл, ГХТ – гідрохлортіазид, РП – розчин порівняння, BP – випробовуваний розчин, 0.1 М НСІ – 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої, АсN – ацетонітрил, DM pH1.2 – середовище з кислотою хлористоводневою pH 1.2, DM pH4.5 – ацетатний буферний розчин pH 4.5, DM pH6.8 – фосфатний буферний розчин pH 6.8, W – вода.

Таблиця 4.67 – Результати дослідження впливу варіювання умов хроматографування на відтворення методики при вмісті ацетонітрилу у рухомій фазі 80 %

Розчин	Аналіт	Параметр	Умови хроматографування				
			номінальні	+ 0.1, мл/хв	- 0.1, мл/хв	+ 5, °C	- 5, °C
РП	ГХТ	S	194.565	217.242	183.617	198.764	199.182
		RSD, %	0.084	0.082	0.062	0.090	0.131
		As	1.1	1.0-1.1	1.0-1.1	1.0-1.1	1.0
		N	12111-12399	10625-10705	8423-8479	9258-9551	9494-9591
	Рл	S	24.553	28.978	24.322	26.169	26.533
		RSD, %	1.325	0.139	0.389	0.830	0.524
		Rs	11.3-11.4	4.8	4.2-4.3	4.4-4.5	4.2
		As	1.0	0.9-1.0	0.9-1.0	1.0	0.9-1.0
		N	7264-7469	9698-9868	8133-8399	9056-9288	8222-8416
	ВР (0,1 М НСІ)	ГХТ	S	203.960	228.452	194.278	210.222
RRF, %			н/в	100.316	100.932	100.893	100.762
Рл		S	25.237	29.610	24.807	26.987	27.098
		RRF, %	н/в	99.411	99.229	100.329	99.362
ВР (W)	ГХТ	S	198.610	223.268	187.335	203.805	204.444
		RRF, %	н/в	100.681	99.947	100.448	100.552
	Рл	S	24.433	28.394	24.422	26.041	26.327
		RRF, %	н/в	98.464	100.906	99.998	99.709

Примітка. Рл – раміприл, ГХТ – гідрохлортіазид, РП – розчин порівняння, ВР – випробований розчин, 0.1 М НСІ – 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої, АсN – ацетонітрил, DM pH1.2 – середовище з кислотою хлористоводневою pH 1.2, DM pH4.5 – ацетатний буферний розчин pH 4.5, DM pH6.8 – фосфатний буферний розчин pH 6.8, W – вода.

Таблиця 4.68 – Результати дослідження впливу варіювання приготування рухомої фази А на відтворення методики при вмісті ацетонітрилу у рухомій фазі 80 %

Розчин	Аналіт	Параметр	Умови хроматографування				
			номінальні	+ 0.01 г/л	- 0.01 г/л	+ 0.2 pH	- 0.2 pH
1	2	3	4	5	6	7	8
РП	ГХТ	S	194.565	199.762	199.762	202.251	202.515
		RSD, %	0.084	0.087	0.087	0.094	0.686
		As	1.1	1.0-1.1	1.0-1.1	1.0	1.0-1.1
		N	12111-12399	9678-9777	9660-9727	9730-9767	9651-9709
	Рл	S	24.553	26.895	26.815	25.354	27.652
		RSD,%	1.325	0.187	0.423	0.574	0.421
		Rs	11.3-11.4	4.7-4.8	4.9-5.0	5.5-5.7	4.6
		As	1.0	0.9-1.0	0.9	0.9-1.0	0.9
		N	7264-7469	8907-8997	8359-8837	8919-9331	9253-9508
	ВР (0,1 М НСІ)	ГХТ	S	203.960	208.210	207.988	210.403
RRF,%			н/в	99.428	99.395	99.239	99.224
Рл		S	25.237	27.455	27.294	25.891	28.443
		RRF, %	н/в	99.313	99.028	99.353	100.073

Продовження таблиці 4.68

1	2	3	4	5	6	7	8
ВР (W)	ГХТ	S	198.610	205.770	205.566	207.439	208.546
		RRF,%	н/в	100.910	100.884	100.476	100.881
	Рл	S	24.433	26.961	26.429	25.002	27.370
		RRF, %	н/в	100.734	99.044	99.095	99.466

Примітка. Рл – раміприл, ГХТ – гідрохлортіазид, РП – розчин порівняння, ВР – випробований розчин, 0.1 М НСІ – 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої, АсN – ацетонітрил, DM pH1.2 – середовище з кислотою хлористоводневою pH 1.2, DM pH4.5 – ацетатний буферний розчин pH 4.5, DM pH6.8 – фосфатний буферний розчин pH 6.8, W – вода.

Підвищення вмісту ацетонітрилу у рухомій фазі до 65 % критично впливає на розділення піків гідрохлортіазиду та ацетату, тому для ацетатного буферного розчину pH 4.5 збільшення вмісту ацетонітрилу у рухомій фазі є не припустимим. Інші незначні зміни умов хроматографування та коригування приготування рухомої фази А не мають значимого впливу на відтворення методики

На основі отриманих даних було обрано наступні умови хроматографування для показника якості «Розчинення»:

- рухома фаза: розчин pH 2.7 (200 мг натрію гексансульфонату Р (або 219 мг натрію гексансульфонату моногідрату Р) розчиняють в 1000 мл води Р, доводять pH фосфорною кислотою Р до значення 2.7): ацетонітрил Р (20:80), для колонки Dionex Acclaim 120 C18;

- швидкість рухомої фази 1.2 мл/хв;
- детектування за довжини хвилі 210 нм;
- температура колонки 45 °С;
- об'єм інжекції 3 мкл.

Для дослідження профілів розчинення було запропоновано наступні умови хроматографування:

- рухома фаза: розчин pH 2.7 (200 мг натрію гексансульфонату Р (або 219 мг натрію гексансульфонату моногідрату Р) розчиняють в 1000 мл води Р, доводять pH фосфорною кислотою Р до значення 2.7): ацетонітрил Р (50:50), для колонки Dionex Acclaim 120 C18 (для усіх середовищ розчинення окрім

ацетатного буферного розчину рН 4.5 вміст ацетонітрилу може бути збільшений до 80 %);

- швидкість рухомої фази 1.2 мл/хв;
- детектування за довжини хвилі 210 нм;
- температура колонки 45 °С;
- об'єм інжекції 3 мкл.

Запропоновано наступні вимоги до придатності хроматографічної системи:

- коефіцієнт симетрії піків раміприлу та гідрохлортіазиду, з хроматограми розчину порівняння, має бути в межах від 0.8 до 1.8;
- розділення між піками раміприлу та гідрохлортіазиду має бути не менше 2.0;
- відносне стандартне відхилення площ піків раміприлу або гідрохлортіазиду для 3-х паралельних інжекцій становить не більше 2.0 %;
- розділення між піком ацетату та гідрохлоротіазидом, з хроматограми випробовуваного розчину, приготованого з використанням ацетатного буферного розчину рН 4.5, має бути не менше 1.5.

При валідації методики досліджували діапазон застосування, правильність та прецизійність методики для 5 комерційно доступних дозувань комбінованих препаратів. Для приготування випробовуваних розчинів використовували наступні умови розчинення:

- прилад з лопаттю;
- об'єм середовища розчинення 500 мл;
- швидкість обертання лопаті 75 об/хв;
- час розчинення 30 хв.

Концентрації випробовуваних розчинів наведено у таблиці 4.69.

Розраховували параметри лінійної регресії відповідно до рекомендацій ДФУ 2.7 п. 5.3.N1 та формул, наведених у розділі (для колонки Inertsil).

Результати хроматографування наведено у таблицях 4.70-4.81.

Таблиця 4.69 – Концентрації випробовуваних розчинів та досліджені діапазони застосування

Дозування	Концентрація у ВР, мкг/мл		Досліджений діапазон, мкг/мл		Досліджений діапазон, %	
	Рл	ГХТ	Рл	ГХТ	Рл	ГХТ
2.5 мг / 12.5 мг	5	25	0.2 – 29.8	0.5 – 74.4	4 – 596	2 – 298
5 мг / 25 мг	10	50			2 – 298	1 – 149
5 мг / 12.5 мг	10	25			2 – 298	2 – 298
10 мг / 25 мг	20	50			1 – 149	1 – 149
10 мг / 12.5 мг	20	25			1 – 149	2 – 298

Таблиця 4.70 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для раміприлу для 0.1 М НСІ (вміст ацетонітрилу 50 %)

Розчин	C_t , мкг/мл	S	s_i	$S_i - s_i$
L3-1	0.199	1.01	0.85	0.16
L3-2	0.199	1.06	0.85	0.21
L3-2	0.199	1.00	0.85	0.15
L4	0.497	2.56	2.35	0.21
L5	0.993	4.86	4.84	0.02
L6	2.483	12.66	12.32	0.33
L7	4.965	24.28	24.79	-0.52
L8	9.930	49.44	49.73	-0.29
L9	14.895	74.06	74.67	-0.60
L10	19.860	98.423	99.61	-1.18
L11	24.825	126.162	124.54	1.62
L12	29.790	149.372	149.48	-0.11

Таблиця 4.71 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для раміприлу для DM pH1.2 (вміст ацетонітрилу 50 %)

Розчин	C_t , мкг/мл	S	s_i	$S_i - s_i$
L3-1	0.199	1.01	0.98	0.03
L3-2	0.199	1.00	0.98	0.03
L3-2	0.199	1.02	0.98	0.05
L4	0.497	2.54	2.47	0.07
L5	0.993	4.81	4.97	-0.16
L6	2.483	12.56	12.46	0.10
L7	4.965	24.79	24.94	-0.14
L8	9.930	49.03	49.89	-0.86
L9	14.895	75.82	74.85	0.97
L10	19.860	99.797	99.81	-0.01
L11	24.825	125.379	124.77	0.61
L12	29.790	149.052	149.73	-0.68

Таблиця 4.72 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для раміприлу для DM pH4.5 (вміст ацетонітрилу 50 %)

Розчин	C_t , мкг/мл	S	s_i	$S_i - s_i$
L3-1	0.199	1.02	0.94	0.08
L3-2	0.199	1.05	0.94	0.10
L3-2	0.199	1.00	0.94	0.06
L4	0.497	2.45	2.44	0.02
L5	0.993	5.07	4.93	0.14
L6	2.483	12.53	12.41	0.12
L7	4.965	24.88	24.88	-0.01
L8	9.930	48.62	49.82	-1.20
L9	14.895	75.15	74.76	0.39
L10	19.860	99.763	99.70	0.07
L11	24.825	125.191	124.64	0.55
L12	29.790	149.261	149.58	-0.31

Таблиця 4.73 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для раміприлу для DM pH 6.8 (вміст ацетонітрилу 50 %)

Розчин	C_t , мкг/мл	S	s_i	$S_i - s_i$
L3-1	0.199	0.94	0.88	0.06
L3-2	0.199	1.01	0.88	0.13
L3-2	0.199	1.01	0.88	0.13
L4	0.497	2.46	2.38	0.09
L5	0.993	5.10	4.88	0.22
L6	2.483	12.26	12.37	-0.11
L7	4.965	24.50	24.86	-0.36
L8	9.930	49.15	49.84	-0.69
L9	14.895	75.98	74.82	1.16
L10	19.860	98.737	99.80	-1.06
L11	24.825	124.874	124.78	0.10
L12	29.790	150.092	149.76	0.34

Таблиця 4.74 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для раміприлу для 0.1 М HCl (вміст ацетонітрилу 80 %)

Розчин	C_t , мкг/мл	S	s_i	$S_i - s_i$
1	2	3	4	5
L3-1	0.199	1.05	1.13	-0.08
L3-2	0.199	1.06	1.13	-0.07
L3-2	0.199	1.01	1.13	-0.12
L4	0.497	2.53	2.64	-0.11
L5	0.993	5.19	5.14	0.05

Продовження таблиці 4.74

1	2	3	4	5
L6	2.483	12.64	12.66	-0.03
L7	4.965	25.19	25.20	0.00
L8	9.930	49.71	50.26	-0.55
L9	14.895	76.18	75.32	0.86
L10	19.860	99.975	100.39	-0.41
L11	24.825	128.079	125.45	2.63
L12	29.790	148.361	150.52	-2.15

Таблиця 4.75 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для раміприлу для води (вміст ацетонітрилу 80 %)

Розчин	С _т , мкг/мл	S	S _{Av}	RSD, %	s _i	S _i – s _i
L3	0.199	1.06	1.08	1.87	0.63	0.43
	0.199	1.08			0.63	0.46
	0.199	1.10			0.63	0.47
L4	0.497	2.58	2.61	1.21	2.23	0.36
	0.497	2.64			2.23	0.41
	0.497	2.59			2.23	0.36
L5	0.993	5.22	5.23	0.21	4.90	0.32
	0.993	5.24			4.90	0.34
	0.993	5.22			4.90	0.32
L6	2.483	13.32	13.19	0.91	12.91	0.41
	2.483	13.09			12.91	0.18
	2.483	13.15			12.91	0.24
L7	4.965	26.08	26.25	1.12	26.27	-0.19
	4.965	26.08			26.27	-0.19
	4.965	26.59			26.27	0.32
L8	9.930	52.38	52.46	0.17	52.98	-0.60
	9.930	52.56			52.98	-0.42
	9.930	52.45			52.98	-0.53
L9	14.895	77.19	77.18	0.10	79.70	-2.51
	14.895	77.11			79.70	-2.58
	14.895	77.26			79.70	-2.44
L10	19.860	106.05	106.02	0.28	106.41	-0.36
	19.860	105.71			106.41	-0.70
	19.860	106.30			106.41	-0.11
L11	24.825	135.43	135.27	0.18	133.12	2.31
	24.825	134.98			133.12	1.86
	24.825	135.40			133.12	2.28
L12	29.790	159.87	159.69	0.21	159.83	0.04
	29.790	159.90			159.83	0.07
	29.790	159.30			159.83	-0.53

Таблиця 4.76 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для гідрохлортіазиду для 0.1 М НСІ (вміст ацетонітрилу 50 %)

Розчин	C_t , мкг/мл	S	s_i	$S_i - s_i$
L3-1	0.496	4.06	4.32	-0.26
L3-2	0.496	4.08	4.32	-0.24
L3-2	0.496	4.03	4.32	-0.29
L4	1.241	9.87	10.25	-0.38
L5	2.481	19.92	20.14	-0.22
L6	6.203	49.98	49.79	0.19
L7	12.407	99.86	99.21	0.64
L8	24.813	202.96	198.06	4.90
L9	37.220	293.44	296.90	-3.46
L10	49.626	398.305	395.75	2.56
L11	62.033	496.662	494.59	2.07
L12	74.439	590.010	593.44	-3.43

Таблиця 4.77 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для гідрохлортіазиду для DM pH 1.2 (вміст ацетонітрилу 50 %)

Розчин	C_t , мкг/мл	S	s_i	$S_i - s_i$
L3-1	0.496	3.93	4.04	-0.11
L3-2	0.496	3.86	4.04	-0.18
L3-2	0.496	3.82	4.04	-0.22
L4	1.241	9.70	9.94	-0.24
L5	2.481	19.71	19.77	-0.07
L6	6.203	50.21	49.28	0.94
L7	12.407	99.08	98.45	0.63
L8	24.813	197.53	196.80	0.73
L9	37.220	293.70	295.15	-1.45
L10	49.626	392.502	393.50	-1.00
L11	62.033	493.982	491.85	2.13
L12	74.439	589.391	590.20	-0.81

Таблиця 4.78 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для гідрохлортіазиду для DM pH 4.5 (вміст ацетонітрилу 50 %)

Розчин	C_t , мкг/мл	S	s_i	$S_i - s_i$
1	2	3	4	5
L3-1	0.496	3.82	4.47	-0.65
L3-2	0.496	3.86	4.47	-0.61
L3-2	0.496	3.88	4.47	-0.60
L4	1.241	10.02	10.36	-0.34

Продовження таблиці 4.78

1	2	3	4	5
L5	2.481	20.29	20.18	0.11
L6	6.203	50.33	49.62	0.71
L7	12.407	101.51	98.69	2.82
L8	24.813	199.49	196.83	2.66
L9	37.220	294.67	294.98	-0.31
L10	49.626	395.059	393.12	1.94
L11	62.033	492.346	491.26	1.08
L12	74.439	585.974	589.41	-3.43

Таблиця 4.79 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для гідрохлортіазиду для DM pH 6.8 (вміст ацетонітрилу 50 %)

Розчин	C_t , мкг/мл	S	s_i	$S_i - s_i$
L3-1	0.496	3.87	4.28	-0.41
L3-2	0.496	4.03	4.28	-0.25
L3-2	0.496	4.07	4.28	-0.21
L4	1.241	9.95	10.19	-0.24
L5	2.481	20.23	20.05	0.18
L6	6.203	50.34	49.60	0.75
L7	12.407	101.22	98.85	2.37
L8	24.813	198.15	197.36	0.79
L9	37.220	294.49	295.86	-1.37
L10	49.626	394.040	394.37	-0.33
L11	62.033	496.830	492.87	3.96
L12	74.439	588.268	591.38	-3.11

Таблиця 4.80 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для гідрохлортіазиду для 0.1 М HCl (вміст ацетонітрилу 80 %)

Розчин	C_t , мкг/мл	S	s_i	$S_i - s_i$
L3-1	0.496	4.19	4.24	-0.05
L3-2	0.496	4.08	4.24	-0.16
L3-2	0.496	4.13	4.24	-0.10
L4	1.241	9.96	10.34	-0.38
L5	2.481	20.84	20.52	0.32
L6	6.203	51.12	51.05	0.06
L7	12.407	101.91	101.94	-0.02
L8	24.813	205.42	203.71	1.71
L9	37.220	306.79	305.48	1.30
L10	49.626	403.224	407.26	-4.03
L11	62.033	513.464	509.03	4.43
L12	74.439	608.579	610.81	-2.23

Таблиця 4.81 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для раміприлу для води (вміст ацетонітрилу 80 %)

Розчин	C_i , мкг/мл	S	S_{Av}	RSD, %	s_i	$S_i - s_i$
L3	0.496	4.19	4.14	3.83	3.73	0.46
	0.496	3.96			3.73	0.23
	0.496	4.27			3.73	0.54
L4	1.241	10.42	10.36	0.59	10.06	0.36
	1.241	10.35			10.06	0.29
	1.241	10.30			10.06	0.24
L5	2.481	20.69	20.92	1.61	20.60	0.09
	2.481	21.31			20.60	0.71
	2.481	20.77			20.60	0.16
L6	6.203	50.87	51.21	0.57	52.24	-1.37
	6.203	51.36			52.24	-0.88
	6.203	51.39			52.24	-0.85
L7	12.407	102.06	102.11	0.12	104.97	-2.91
	12.407	102.03			104.97	-2.95
	12.407	102.25			104.97	-2.72
L8	24.813	210.07	210.91	0.35	210.43	-0.36
	24.813	211.31			210.43	0.88
	24.813	211.36			210.43	0.92
L9	37.220	318.84	318.87	0.11	315.90	2.94
	37.220	319.24			315.90	3.34
	37.220	318.53			315.90	2.63
L10	49.626	421.46	422.63	0.29	421.36	0.10
	49.626	423.89			421.36	2.53
	49.626	422.55			421.36	1.20
L11	62.033	527.42	527.42	0.04	526.82	0.60
	62.033	527.65			526.82	0.83
	62.033	527.18			526.82	0.36
L12	74.439	628.41	629.83	0.24	632.28	-3.87
	74.439	631.39			632.28	-0.89
	74.439	629.70			632.28	-2.58

Розрахунки параметрів лінійної регресії наведено у таблицях 4.82-4.84.

Для розрахунку МВ та МКВ розраховували параметри калібрувальної прямої для розчинів L3-L7 (5 точок з концентрацією найближчою до межі

кількісного визначення). Розраховані параметри, а також МВ та МКВ наведено в таблицях 4.85-4.87.

Таблиця 4.82 – Параметри лінійної регресії для раміприлу (вміст ацетонітрилу 50 %)

Параметр		Критерій	0.1 М НСІ	DM pH 1.2	DM pH 4.5	DM pH 6.8
a		н/в	-0.15	-0.02	-0.06	-0.12
a . %	2.5 мг / 12.5 мг	≤ 3.0 %	0.588	0.093	0.227	0.484
	5 мг / 25 мг		0.294	0.047	0.114	0.242
	5 мг / 12.5 мг		0.296	0.047	0.114	0.243
	10 мг / 25 мг		0.146	0.023	0.057	0.120
	10 мг / 12.5 мг		0.147	0.023	0.057	0.121
b		н/в	5.02	5.03	5.02	5.03
r		≥ 0.995	0.99992	0.99996	0.99997	0.99995

Таблиця 4.83 – Параметри лінійної регресії для гідрохлортіазиду (вміст ацетонітрилу 50 %)

Параметр		Критерій	0.1 М НСІ	DM pH 1.2	DM pH 4.5	DM pH 6.8
a		н/в	0.37	0.10	0.55	0.34
a . %	2.5 мг / 12.5 мг	≤ 3.0 %	0.183	0.050	0.273	0.172
	5 мг / 25 мг		0.092	0.025	0.137	0.086
	5 мг / 12.5 мг		0.184	0.051	0.274	0.172
	10 мг / 25 мг		0.092	0.025	0.136	0.086
	10 мг / 12.5 мг		0.182	0.050	0.272	0.171
b		н/в	7.94	7.92	7.91	7.94
r		≥ 0.995	0.99995	0.99999	0.99997	0.99997

Таблиця 4.84 – Параметри лінійної регресії для раміприлу та гідрохлортіазиду (вміст ацетонітрилу 80 %)

Параметр	Критерій	Раміприл		Гідрохлортіазид		
		0.1 М НСІ	W	0.1 М НСІ	W	
a		н/в	0.13	-0.44	0.16	-0.49
a . %	2.5 мг / 12.5 мг	≤ 3.0 %	0.518	1.687	0.081	0.233
	5 мг / 25 мг		0.260	0.842	0.041	0.117
	5 мг / 12.5 мг		0.261	0.848	0.080	0.234
	10 мг / 25 мг		0.130	0.420	0.041	0.116
	10 мг / 12.5 мг		0.129	0.421	0.080	0.234
b		н/в	5.05	5.38	8.20	8.5
r		≥ 0.995	0.99980	0.99980	0.99997	0.99997

Таблиця 4.85 – Розрахунок МВ та МКВ для раміприлу (вміст ацетонітрилу 50 %)

Параметр	0.1 М НСІ	DM pH 1.2	DM pH 4.5	DM pH 6.8
b	4.90	5.00	5.01	4.93
S ₀	0.20	0.10	0.05	0.08
S _a	0.10	0.05	0.03	0.04
МКВ, мкг/мл	0.20	0.10	0.05	0.08
МВ, мкг/мл	0.07	0.03	0.02	0.03

Таблиця 4.86 – Розрахунок МВ та МКВ для гідрохлортіазиду (вміст ацетонітрилу 50 %)

Параметр	0.1 М НСІ	DM pH 1.2	DM pH 4.5	DM pH 6.8
b	8.01	7.91	8.20	8.16
S ₀	0.07	0.08	0.08	0.07
S _a	0.03	0.03	0.03	0.03
QL, мкг/мл	0.03	0.04	0.04	0.03
DL, мкг/мл	0.01	0.01	0.01	0.01

Таблиця 4.87 – Розрахунок МВ та МКВ для раміприлу та гідрохлортіазиду (вміст ацетонітрилу 80 %)

Параметр	Раміприл		Гідрохлортіазид	
	0.1 М НСІ	W	0.1 М НСІ	W
b	5.07	5.29	8.34	8.21
S ₀	0.06	0.13	0.14	0.26
S _a	0.03	0.05	0.06	0.10
МКВ, мкг/мл	0.06	0.09	0.07	0.12
МВ, мкг/мл	0.02	0.03	0.02	0.04

Розраховане значення МКВ понад 10 разів менше, ніж номінальна концентрація у випробовуваних розчинах, тобто експериментального підтвердження МКВ проводити не потрібно.

Для дослідження правильності методики готували та аналізували 10 модельних розчинів, що містили відому концентрацію гідрохлортіазиду у розчині плацебо. Розчини готували для всіх середовищ розчинення. Розраховували знайдену концентрацію аналітів в модельних розчинах та відношення «Знайдено» / «Введено» відповідно формул наведених для колонки Inertsil.

Результати хроматографування та розрахунки наведено у таблицях 4.88-4.99.

Таблиця 4.88 – Розрахунок правильності визначення раміприлу для 0.1 М НСІ (вміст ацетонітрилу 50 %)

Роз-чин	C _t , мг/мл	2.5 мг / 12.5 мг		5 мг / 25 мг		5 мг / 12.5 мг		10 мг / 25 мг		10 мг / 12.5 мг	
		C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %
L3-1	0.199	0.20	102.40	0.204	102.51	0.20	103.05	0.20	101.98	0.20	102.56
L3-2	0.199	0.21	106.77	0.212	106.89	0.21	107.45	0.21	106.33	0.21	106.93
L3-2	0.199	0.20	101.14	0.201	101.25	0.20	101.78	0.20	100.72	0.20	101.29
L4	0.497	0.51	103.44	0.514	103.55	0.52	104.10	0.51	103.01	0.51	103.60
L5	0.993	0.97	98.14	0.976	98.25	0.98	98.77	0.97	97.73	0.98	98.29
L6	2.483	2.54	102.27	2.542	102.38	2.55	102.92	2.53	101.84	2.54	102.42
L7	4.965	4.87	98.07	4.875	98.18	4.90	98.70	4.85	97.67	4.88	98.22
L8	9.930	9.92	99.87	9.928	99.98	9.98	100.51	9.88	99.46	9.93	100.02
L9	14.895	14.86	99.74	14.872	99.85	14.95	100.37	14.79	99.33	14.88	99.89
L10	19.860	19.74	99.41	19.763	99.51	19.87	100.04	19.66	98.99	19.77	99.56
L11	24.825	25.31	101.94	25.333	102.05	25.47	102.59	25.20	101.52	25.34	102.09
L12	29.790	29.96	100.58	29.994	100.68	30.15	101.22	29.84	100.16	30.01	100.73

Таблиця 4.89 – Розрахунок правильності визначення раміприлу для DM pH 1.2 (вміст ацетонітрилу 50 %)

Роз-чин	C _t , мг/мл	2.5 мг / 12.5 мг		5 мг / 25 мг		5 мг / 12.5 мг		10 мг / 25 мг		10 мг / 12.5 мг	
		C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %
L3-1	0.199	0.20	101.66	0.202	101.77	0.20	102.31	0.20	101.24	0.20	101.81
L3-2	0.199	0.20	101.21	0.201	101.32	0.20	101.85	0.20	100.79	0.20	101.36
L3-2	0.199	0.20	103.05	0.205	103.16	0.21	103.70	0.20	102.62	0.20	103.20
L4	0.497	0.51	102.72	0.511	102.83	0.51	103.38	0.51	102.30	0.51	102.88
L5	0.993	0.96	97.18	0.966	97.28	0.97	97.80	0.96	96.78	0.97	97.33
L6	2.483	2.52	101.47	2.522	101.58	2.54	102.12	2.51	101.05	2.52	101.63
L7	4.965	4.97	100.16	4.979	100.27	5.00	100.80	4.95	99.75	4.98	100.32
L8	9.930	9.83	99.04	9.846	99.15	9.90	99.67	9.79	98.63	9.85	99.19
L9	14.895	15.21	102.10	15.225	102.21	15.30	102.75	15.15	101.68	15.23	102.26
L10	19.860	20.02	100.79	20.039	100.90	20.14	101.43	19.93	100.38	20.05	100.95
L11	24.825	25.15	101.31	25.176	101.41	25.31	101.95	25.04	100.89	25.19	101.46
L12	29.790	29.90	100.36	29.930	100.47	30.09	101.00	29.77	99.95	29.94	100.51

Таблиця 4.90 – Розрахунок правильності визначення раміприлу для DM pH 4.5 (вміст ацетонітрилу 50 %)

Роз-чин	C _t , мг/мл	2.5 мг / 12.5 мг		5 мг / 25 мг		5 мг / 12.5 мг		10 мг / 25 мг		10 мг / 12.5 мг	
		C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %
L3-1	0.199	0.20	102.87	0.205	102.98	0.21	103.52	0.20	102.44	0.20	103.03
L3-2	0.199	0.21	105.62	0.210	105.73	0.21	106.29	0.21	105.18	0.21	105.78
L3-2	0.199	0.20	100.77	0.200	100.87	0.20	101.41	0.20	100.35	0.20	100.92
L4	0.497	0.49	99.17	0.493	99.28	0.50	99.81	0.49	98.76	0.49	99.32
L5	0.993	1.02	102.45	1.018	102.57	1.02	103.11	1.01	102.03	1.02	102.61
L6	2.483	2.51	101.22	2.516	101.33	2.53	101.87	2.50	100.80	2.52	101.38
L7	4.965	4.99	100.50	4.995	100.61	5.02	101.14	4.97	100.09	5.00	100.65
L8	9.930	9.75	98.21	9.763	98.32	9.81	98.84	9.71	97.81	9.77	98.36
L9	14.895	15.07	101.20	15.090	101.31	15.17	101.84	15.01	100.78	15.10	101.35
L10	19.860	20.01	100.76	20.033	100.87	20.14	101.40	19.93	100.34	20.04	100.91
L11	24.825	25.11	101.15	25.138	101.26	25.27	101.80	25.01	100.73	25.15	101.31
L12	29.790	29.94	100.50	29.972	100.61	30.13	101.14	29.82	100.09	29.98	100.65

Таблиця 4.91 – Розрахунок правильності визначення раміприлу для DM pH 6.8 (вміст ацетонітрилу 50 %)

Роз-чин	C _t , мг/мл	2.5 мг / 12.5 мг		5 мг / 25 мг		5 мг / 12.5 мг		10 мг / 25 мг		10 мг / 12.5 мг	
		C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %
L3-1	0.199	0.19	94.47	0.188	94.57	0.19	95.07	0.19	94.08	0.19	94.62
L3-2	0.199	0.20	102.08	0.203	102.19	0.20	102.73	0.20	101.66	0.20	102.23
L3-2	0.199	0.20	101.99	0.203	102.10	0.20	102.64	0.20	101.57	0.20	102.14
L4	0.497	0.49	99.57	0.495	99.68	0.50	100.20	0.49	99.16	0.50	99.72
L5	0.993	1.02	103.01	1.024	103.12	1.03	103.66	1.02	102.58	1.02	103.16
L6	2.483	2.46	99.07	2.462	99.18	2.48	99.70	2.45	98.66	2.46	99.22
L7	4.965	4.91	98.96	4.919	99.07	4.94	99.59	4.89	98.55	4.92	99.11
L8	9.930	9.86	99.28	9.869	99.38	9.92	99.91	9.82	98.87	9.87	99.43
L9	14.895	15.24	102.31	15.256	102.42	15.34	102.96	15.18	101.89	15.26	102.47
L10	19.860	19.80	99.72	19.826	99.83	19.93	100.36	19.72	99.31	19.83	99.87
L11	24.825	25.05	100.90	25.075	101.01	25.21	101.54	24.94	100.48	25.09	101.05
L12	29.790	30.11	101.06	30.139	101.17	30.30	101.70	29.98	100.64	30.15	101.21

Таблиця 4.92 – Розрахунок правильності визначення рампірилу для 0.1 М НСІ (вміст ацетонітрилу 80 %)

Розчин	C _t , мг/мл	2.5 мг / 12.5 мг		5 мг / 25 мг		5 мг / 12.5 мг		10 мг / 25 мг		10 мг / 12.5 мг	
		C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %
L3-1	0.199	0.21	104.24	0.208	104.54	0.21	104.97	0.21	104.35	0.21	103.88
L3-2	0.199	0.21	105.56	0.210	105.86	0.21	106.29	0.21	105.67	0.21	105.19
L3-2	0.199	0.20	100.10	0.199	100.39	0.20	100.79	0.20	100.20	0.20	99.75
L4	0.497	0.50	100.33	0.500	100.62	0.50	101.02	0.50	100.43	0.50	99.98
L5	0.993	1.02	102.98	1.026	103.28	1.03	103.70	1.02	103.09	1.02	102.63
L6	2.483	2.49	100.22	2.495	100.51	2.51	100.91	2.49	100.32	2.48	99.87
L7	4.965	4.96	99.92	4.975	100.21	5.00	100.61	4.97	100.02	4.94	99.57
L8	9.930	9.79	98.56	9.816	98.85	9.86	99.25	9.80	98.67	9.75	98.22
L9	14.895	15.00	100.70	15.043	100.99	15.10	101.40	15.02	100.81	14.95	100.35
L10	19.860	19.69	99.12	19.742	99.41	19.82	99.81	19.71	99.22	19.62	98.78
L11	24.825	25.22	101.59	25.292	101.88	25.39	102.29	25.25	101.69	25.13	101.23
L12	29.790	29.21	98.06	29.297	98.34	29.42	98.74	29.24	98.16	29.11	97.72

Таблиця 4.93 – Розрахунок правильності визначення рампірилу для води (вміст ацетонітрилу 80 %)

Розчин	C _t , мкг/мл	2.5 мг / 12.5 мг		5 мг / 25 мг		5 мг / 12.5 мг		10 мг / 25 мг		10 мг / 12.5 мг	
		C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %
1	2	3		4	5	6	7	8	9	10	11
L3	0.199	0.20	101.68	0.201	101.45	0.20	102.21	0.20	101.31	0.20	101.58
	0.199	0.21	103.99	0.206	103.75	0.21	104.54	0.21	103.62	0.21	103.89
	0.199	0.21	105.54	0.209	105.30	0.21	106.09	0.21	105.16	0.21	105.44
L4	0.497	0.49	99.21	0.491	98.98	0.50	99.73	0.49	98.85	0.49	99.11
	0.497	0.50	101.45	0.503	101.22	0.51	101.99	0.50	101.09	0.50	101.35
	0.497	0.49	99.53	0.493	99.30	0.50	100.05	0.49	99.17	0.49	99.43
L5	0.993	0.99	100.17	0.992	99.95	1.00	100.70	0.99	99.81	0.99	100.08
	0.993	1.00	100.55	0.996	100.32	1.00	101.08	0.99	100.19	1.00	100.45
	0.993	1.00	100.21	0.993	99.98	1.00	100.74	0.99	99.85	0.99	100.11
L6	2.483	2.54	102.31	2.534	102.07	2.55	102.84	2.53	101.94	2.54	102.21
	2.483	2.50	100.53	2.490	100.30	2.51	101.06	2.49	100.17	2.49	100.43
	2.483	2.51	100.97	2.501	100.74	2.52	101.50	2.50	100.60	2.50	100.87
L7	4.965	4.97	100.13	4.960	99.90	5.00	100.65	4.95	99.77	4.97	100.03
	4.965	4.97	100.13	4.960	99.90	5.00	100.66	4.95	99.77	4.97	100.03
	4.965	5.07	102.09	5.057	101.86	5.10	102.63	5.05	101.72	5.06	101.99
L8	9.930	9.98	100.55	9.962	100.32	10.04	101.08	9.95	100.19	9.98	100.46
	9.930	10.02	100.90	9.996	100.67	10.07	101.43	9.98	100.54	10.01	100.80
	9.930	10.00	100.69	9.975	100.46	10.05	101.22	9.96	100.32	9.99	100.59

Продовження таблиці 4.93

1	2	3		4	5	6	7	8	9	10	11
L9	14.895	14.71	98.78	14.680	98.56	14.79	99.30	14.66	98.42	14.70	98.68
	14.895	14.70	98.68	14.666	98.46	14.78	99.20	14.65	98.33	14.68	98.59
	14.895	14.73	98.87	14.694	98.65	14.80	99.39	14.67	98.52	14.71	98.78
L10	19.860	20.21	101.79	20.169	101.55	20.32	102.32	20.14	101.42	20.20	101.69
	19.860	20.15	101.47	20.105	101.24	20.26	102.00	20.08	101.10	20.13	101.37
	19.860	20.26	102.03	20.217	101.80	20.37	102.57	20.19	101.66	20.24	101.93
L11	24.825	25.82	103.99	25.757	103.76	25.95	104.54	25.72	103.62	25.79	103.89
	24.825	25.73	103.65	25.672	103.41	25.87	104.19	25.64	103.28	25.71	103.55
	24.825	25.81	103.97	25.751	103.73	25.95	104.51	25.72	103.59	25.78	103.87
L12	29.790	30.48	102.30	30.406	102.07	30.64	102.84	30.37	101.93	30.45	102.20
	29.790	30.48	102.32	30.411	102.08	30.64	102.86	30.37	101.95	30.45	102.22
	29.790	30.37	101.93	30.297	101.70	30.53	102.47	30.26	101.57	30.34	101.84

Таблиця 4.94 – Розрахунок правильності визначення гідрохлортіазиду для 0.1 М НСІ (вміст ацетонітрилу 50 %)

Роз-чин	C _t , мг/мл	2.5 мг / 12.5 мг		5 мг / 25 мг		5 мг / 12.5 мг		10 мг / 25 мг		10 мг / 12.5 мг	
		C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %
L3-1	0.496	0.51	101.94	0.509	102.49	0.51	102.44	0.51	101.99	0.50	101.53
L3-2	0.496	0.51	102.45	0.511	103.00	0.51	102.95	0.51	102.49	0.51	102.04
L3-2	0.496	0.50	101.19	0.505	101.74	0.50	101.68	0.50	101.23	0.50	100.78
L4	1.241	1.23	99.20	1.237	99.74	1.24	99.69	1.23	99.24	1.23	98.81
L5	2.481	2.48	100.08	2.497	100.62	2.50	100.57	2.48	100.12	2.47	99.68
L6	6.203	6.23	100.46	6.266	101.01	6.26	100.96	6.23	100.50	6.21	100.06
L7	12.407	12.45	100.36	12.519	100.90	12.51	100.85	12.46	100.40	12.40	99.96
L8	24.813	25.31	101.99	25.444	102.54	25.43	102.49	25.32	102.03	25.21	101.58
L9	37.220	36.59	98.31	36.787	98.84	36.77	98.79	36.60	98.35	36.44	97.91
L10	49.626	49.67	100.08	49.934	100.62	49.91	100.57	49.69	100.12	49.47	99.68
L11	62.033	61.93	99.83	62.264	100.37	62.23	100.32	61.96	99.87	61.68	99.43
L12	74.439	73.57	98.83	73.967	99.37	73.93	99.32	73.60	98.87	73.27	98.43

Таблиця 4.95 – Розрахунок правильності визначення гідрохлортіазиду для DM pH 1.2 (вміст ацетонітрилу 50 %)

Роз-чин	C _t , мг/мл	2.5 мг / 12.5 мг		5 мг / 25 мг		5 мг / 12.5 мг		10 мг / 25 мг		10 мг / 12.5 мг	
		C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L3-1	0.496	0.49	98.73	0.493	99.26	0.49	99.21	0.49	98.77	0.49	98.33
L3-2	0.496	0.48	96.92	0.484	97.44	0.48	97.40	0.48	96.96	0.48	96.53
L3-2	0.496	0.48	95.87	0.478	96.39	0.48	96.34	0.48	95.91	0.47	95.49

Продовження таблиці 4.95

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L4	1.241	1.21	97.49	1.216	98.02	1.22	97.97	1.21	97.53	1.20	97.10
L5	2.481	2.46	99.03	2.470	99.56	2.47	99.51	2.46	99.07	2.45	98.63
L6	6.203	6.26	100.93	6.295	101.47	6.29	101.42	6.26	100.97	6.24	100.52
L7	12.407	12.36	99.58	12.422	100.12	12.42	100.07	12.36	99.63	12.31	99.18
L8	24.813	24.63	99.26	24.764	99.80	24.75	99.75	24.64	99.30	24.53	98.86
L9	37.220	36.62	98.39	36.820	98.93	36.80	98.88	36.64	98.43	36.47	98.00
L10	49.626	48.94	98.62	49.206	99.15	49.18	99.10	48.96	98.66	48.74	98.22
L11	62.033	61.60	99.30	61.928	99.83	61.90	99.78	61.62	99.34	61.35	98.90
L12	74.439	73.49	98.73	73.889	99.26	73.85	99.21	73.52	98.77	73.20	98.33

Таблиця 4.96 – Розрахунок правильності визначення гідрохлортіазиду для DM pH 4.5 (вміст ацетонітрилу 50 %)

Роз-чин	C _t , МГ/МЛ	2.5 МГ / 12.5 МГ		5 МГ / 25 МГ		5 МГ / 12.5 МГ		10 МГ / 25 МГ		10 МГ / 12.5 МГ	
		C _m , МКГ/МЛ	Reco- very, %	C _m , МКГ/М Л	Reco- very, %	C _m , МКГ/М Л	Reco- very, %	C _m , МКГ/М Л	Reco- very, %	C _m , МКГ/М Л	Reco- very, %
L3-1	0.496	0.48	95.97	0.479	96.49	0.48	96.44	0.48	96.01	0.47	95.59
L3-2	0.496	0.48	97.11	0.485	97.63	0.48	97.58	0.48	97.15	0.48	96.72
L3-2	0.496	0.48	97.38	0.486	97.91	0.49	97.86	0.48	97.42	0.48	96.99
L4	1.241	1.25	100.75	1.257	101.29	1.26	101.24	1.25	100.79	1.24	100.34
L5	2.481	2.53	101.96	2.543	102.51	2.54	102.45	2.53	102.00	2.52	101.55
L6	6.203	6.28	101.17	6.309	101.71	6.31	101.66	6.28	101.21	6.25	100.76
L7	12.407	12.66	102.02	12.726	102.57	12.72	102.52	12.66	102.06	12.61	101.61
L8	24.813	24.88	100.25	25.009	100.79	25.00	100.74	24.89	100.29	24.78	99.85
L9	37.220	36.74	98.72	36.942	99.25	36.92	99.20	36.76	98.76	36.60	98.32
L10	49.626	49.26	99.26	49.527	99.80	49.50	99.75	49.28	99.30	49.06	98.86
L11	62.033	61.39	98.97	61.723	99.50	61.69	99.45	61.42	99.01	61.14	98.57
L12	74.439	73.07	98.16	73.461	98.69	73.42	98.64	73.10	98.20	72.77	97.76

Таблиця 4.97 – Розрахунок правильності визначення гідрохлортіазиду для DM pH 6.8 (вміст ацетонітрилу 50 %)

Роз-чин	C _t , МГ/МЛ	2.5 МГ / 12.5 МГ		5 МГ / 25 МГ		5 МГ / 12.5 МГ		10 МГ / 25 МГ		10 МГ / 12.5 МГ	
		C _m , МКГ/МЛ	Reco- very, %	C _m , МКГ/М Л	Reco- very, %	C _m , МКГ/М Л	Reco- very, %	C _m , МКГ/М Л	Reco- very, %	C _m , МКГ/М Л	Reco- very, %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L3-1	0.496	0.48	97.27	0.485	97.80	0.49	97.75	0.48	97.31	0.48	96.88
L3-2	0.496	0.50	101.30	0.505	101.85	0.51	101.80	0.50	101.34	0.50	100.89
L3-2	0.496	0.51	102.31	0.510	102.87	0.51	102.81	0.51	102.35	0.51	101.90
L4	1.241	1.24	100.05	1.248	100.59	1.25	100.54	1.24	100.09	1.24	99.64
L5	2.481	2.52	101.64	2.536	102.18	2.53	102.13	2.52	101.68	2.51	101.23
L6	6.203	6.28	101.19	6.311	101.74	6.31	101.69	6.28	101.23	6.25	100.79

Продовження таблиці 4.97

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L7	12.407	12.62	101.73	12.689	102.28	12.68	102.23	12.63	101.77	12.57	101.32
L8	24.813	24.71	99.58	24.841	100.11	24.83	100.06	24.72	99.62	24.61	99.17
L9	37.220	36.72	98.66	36.919	99.19	36.90	99.14	36.74	98.70	36.57	98.26
L10	49.626	49.13	99.01	49.399	99.54	49.37	99.49	49.15	99.05	48.94	98.61
L11	62.033	61.95	99.87	62.285	100.41	62.25	100.36	61.98	99.91	61.70	99.47
L12	74.439	73.35	98.54	73.748	99.07	73.71	99.02	73.38	98.58	73.06	98.14

Таблиця 4.98 – Розрахунок правильності визначення гідрохлортіазиду для 0.1 М НСІ (вміст ацетонітрилу 80 %)

Роз-чин	C _t , мг/мл	2.5 мг / 12.5 мг		5 мг / 25 мг		5 мг / 12.5 мг		10 мг / 25 мг		10 мг / 12.5 мг	
		C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %
L3-1	0.496	0.51	103.66	0.521	104.94	0.51	103.16	0.52	104.26	0.51	102.68
L3-2	0.496	0.50	100.99	0.507	102.23	0.50	100.50	0.50	101.57	0.50	100.04
L3-2	0.496	0.51	102.27	0.514	103.52	0.51	101.77	0.51	102.86	0.50	101.30
L4	1.241	1.22	98.63	1.239	99.84	1.22	98.16	1.23	99.20	1.21	97.70
L5	2.481	2.56	103.18	2.592	104.45	2.55	102.68	2.58	103.78	2.54	102.21
L6	6.203	6.28	101.25	6.358	102.49	6.25	100.76	6.32	101.84	6.22	100.29
L7	12.407	12.52	100.93	12.676	102.18	12.46	100.45	12.60	101.52	12.40	99.98
L8	24.813	25.24	101.72	25.551	102.98	25.12	101.23	25.39	102.31	25.00	100.76
L9	37.220	37.70	101.28	38.159	102.52	37.51	100.79	37.91	101.87	37.34	100.32
L10	49.626	49.55	99.84	50.155	101.06	49.31	99.36	49.83	100.42	49.08	98.90
L11	62.033	63.09	101.71	63.867	102.96	62.79	101.22	63.46	102.30	62.50	100.75
L12	74.439	74.78	100.45	75.697	101.69	74.42	99.97	75.21	101.04	74.07	99.51

Таблиця 4.99 – Розрахунок правильності визначення гідрохлортіазиду для води (вміст ацетонітрилу 80 %)

Роз-чин	C _t , мкг/мл	2.5 мг / 12.5 мг		5 мг / 25 мг		5 мг / 12.5 мг		10 мг / 25 мг		10 мг / 12.5 мг	
		C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L3	0.496	0.50	100.75	0.503	101.44	0.50	101.25	0.50	100.59	0.50	101.04
	0.496	0.47	95.34	0.476	95.99	0.48	95.81	0.47	95.19	0.47	95.61
	0.496	0.51	102.70	0.513	103.40	0.51	103.20	0.51	102.54	0.51	102.99
L4	1.241	1.24	100.30	1.253	100.99	1.25	100.79	1.24	100.14	1.25	100.58
	1.241	1.24	99.62	1.244	100.30	1.24	100.11	1.23	99.46	1.24	99.90
	1.241	1.23	99.14	1.238	99.82	1.24	99.63	1.23	98.98	1.23	99.42
L5	2.481	2.47	99.58	2.488	100.26	2.48	100.07	2.47	99.42	2.48	99.86
	2.481	2.54	102.56	2.562	103.26	2.56	103.06	2.54	102.40	2.55	102.85
	2.481	2.48	99.95	2.497	100.64	2.49	100.44	2.48	99.79	2.49	100.23

Продовження таблиці 4.99

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L6	6.203	6.07	97.93	6.117	98.60	6.10	98.41	6.07	97.78	6.09	98.21
	6.203	6.13	98.87	6.175	99.55	6.16	99.36	6.12	98.71	6.15	99.15
	6.203	6.14	98.93	6.179	99.61	6.17	99.42	6.13	98.77	6.15	99.21
L7	12.407	12.19	98.24	12.272	98.91	12.25	98.72	12.17	98.08	12.22	98.52
	12.407	12.18	98.21	12.268	98.88	12.24	98.69	12.16	98.05	12.22	98.48
	12.407	12.21	98.42	12.295	99.10	12.27	98.91	12.19	98.27	12.25	98.70
L8	24.813	25.09	101.10	25.259	101.80	25.21	101.60	25.05	100.94	25.16	101.39
	24.813	25.24	101.70	25.408	102.40	25.36	102.20	25.20	101.54	25.31	101.99
	24.813	25.24	101.72	25.414	102.42	25.36	102.22	25.20	101.56	25.31	102.01
L9	37.220	38.08	102.30	38.337	103.00	38.26	102.80	38.02	102.14	38.18	102.59
	37.220	38.12	102.43	38.385	103.13	38.31	102.93	38.06	102.27	38.23	102.72
	37.220	38.04	102.20	38.300	102.90	38.23	102.70	37.98	102.04	38.15	102.49
L10	49.626	50.33	101.42	50.676	102.12	50.58	101.92	50.25	101.26	50.47	101.71
	49.626	50.62	102.00	50.969	102.71	50.87	102.51	50.54	101.84	50.76	102.29
	49.626	50.46	101.68	50.808	102.38	50.71	102.18	50.38	101.52	50.60	101.97
L11	62.033	62.98	101.53	63.417	102.23	63.29	102.03	62.88	101.37	63.16	101.82
	62.033	63.01	101.58	63.445	102.28	63.32	102.08	62.91	101.42	63.19	101.87
	62.033	62.96	101.49	63.388	102.19	63.27	101.99	62.86	101.33	63.13	101.78
L12	74.439	75.05	100.81	75.560	101.51	75.41	101.31	74.93	100.65	75.26	101.10
	74.439	75.40	101.29	75.919	101.99	75.77	101.79	75.28	101.13	75.61	101.58
	74.439	75.20	101.02	75.715	101.71	75.57	101.52	75.08	100.86	75.41	101.31

Оцінку результатів наведено у таблицях 4.100, 4.101.

Таблиця 4.100 – Оцінка правильності визначення раміприлу

Параметр	Критерій	Результат					
		2.5 мг / 12.5 мг	5 мг / 25 мг	5 мг / 12.5 мг	10 мг / 25 мг	10 мг / 12.5 мг	
1	2	3	4	5	6	7	
0.1 М НСІ (вміст ацетонітрилу 50 %)							
Мінімальне значення ступеню вилучення	≤ 25 %	≥ 90.0 %	98.1	98.2	98.8	97.7	98.2
	> 25 %	≥ 95.0 %	98.1	98.2	98.7	99.0	99.6
Максимальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≤ 110.0 %	106.8	106.9	107.5	106.3	106.9
	> 25 %	≤ 105.0 %	102.3	102.0	102.6	101.5	102.1
Середнє значення ступенів вилучення	≤ 25 %	95.0–105.0 %	102.4	102.5	103.0	101.3	101.9
	> 25 %	97.0–103.0 %	100.3	100.0	100.6	99.9	100.5
DM pH 1.2 (вміст ацетонітрилу 50 %)							
Мінімальне значення ступеню вилучення	≤ 25 %	≥ 90.0 %	97.2	97.3	97.8	96.8	97.3
	> 25 %	≥ 95.0 %	99.0	103.2	99.77	98.6	99.2
Максимальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≤ 110.0 %	103.0	99.1	103.7	102.6	103.2
	> 25 %	≤ 105.0 %	102.1	102.2	102.8	101.7	102.3
Середнє значення ступенів вилучення	≤ 25 %	95.0–105.0 %	101.2	101.3	101.9	100.6	101.2
	> 25 %	97.0–103.0 %	100.7	100.7	101.3	100.3	100.9

Продовження таблиці 4.100

1	2	3	4	5	6	7	
DM pH 4.5 (вміст ацетонітрилу 50 %)							
Мінімальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≥ 90.0 %	99.2	99.3	99.8	98.8	99.3
	> 25 %	≥95.0 %	98.2	98.3	98.8	97.8	98.4
Максимальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≤ 110.0 %	105.6	105.7	106.3	105.2	105.8
	> 25 %	≤105.0 %	101.2	101.3	101.8	100.8	101.4
Середнє значення ступенів вилучення	≤ 25 %	95.0–105.0 %	102.2	102.1	102.7	101.4	102.0
	> 25 %	97.0–103.0 %	100.5	100.5	101.0	99.9	100.5
DM pH 6.8 (вміст ацетонітрилу 50 %)							
Мінімальне значення ступеню вилучення	≤ 25 %	≥ 90.0 %	94.5	94.6	95.1	94.1	94.6
	> 25 %	≥95.0 %	99.0	99.1	99.6	98.9	99.4
Максимальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≤ 110.0 %	103.0	103.1	103.7	102.6	103.2
	> 25 %	≤105.0 %	102.3	102.4	103.0	101.9	102.5
Середнє значення ступенів вилучення	≤ 25 %	95.0–105.0 %	100.2	100.1	100.7	99.5	100.0
	> 25 %	97.0–103.0 %	100.2	100.5	101.0	100.2	100.8
0.1 M HCl (вміст ацетонітрилу 80 %)							
Мінімальне значення ступеню вилучення	≤ 25 %	≥ 90.0 %	100.1	100.4	100.8	100.0	99.6
	> 25 %	≥95.0 %	98.1	98.3	98.7	98.2	97.7
Максимальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≤ 110.0 %	105.6	105.9	106.3	105.77	105.2
	> 25 %	≤105.0 %	101.6	101.9	102.3	101.7	101.2
Середнє значення ступенів вилучення	≤ 25 %	95.0–105.0 %	102.6	102.5	102.9	102.0	101.6
	> 25 %	97.0–103.0 %	99.7	99.9	100.4	99.7	99.3
Вода (вміст ацетонітрилу 80 %)							
Мінімальне значення ступеню вилучення	≤ 25 %	≥ 90.0 %	99.2	99.0	99.7	98.9	99.1
	> 25 %	≥95.0 %	98.7	98.5	99.2	98.3	98.6
Максимальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≤ 110.0 %	105.5	105.3	106.1	105.2	105.4
	> 25 %	≤105.0 %	104.0	103.8	104.5	103.6	103.9
Середнє значення ступенів вилучення	≤ 25 %	95.0–105.0 %	101.4	101.1	101.9	100.9	101.1
	> 25 %	97.0–103.0 %	101.3	101.1	101.9	101.1	101.4

Таблиця 4.101 – Оцінка правильності визначення гідрохлортіазиду

Параметр	Критерій	Результат					
		2.5 мг / 12.5 мг	5 мг / 25 мг	5 мг / 12.5 мг	10 мг / 25 мг	10 мг / 12.5 мг	
1	2	3	4	5	6	7	
0.1 M HCl (вміст ацетонітрилу 50 %)							
Мінімальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≥ 90.0 %	93.5	94.0	94.0	93.6	93.1
	> 25 %	≥95.0 %	98.3	98.8	98.8	98.3	97.9
Максимальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≤ 110.0 %	104.2	104.8	104.7	104.3	103.8
	> 25 %	≤105.0 %	102.0	102.5	102.5	102.0	101.6
Середнє значення ступенів вилучення	≤ 25 %	95.0–105.0 %	100.3	100.8	100.7	100.3	99.9
	> 25 %	97.0–103.0 %	99.9	100.3	100.4	99.8	99.5
DM pH 1.2 (вміст ацетонітрилу 50 %)							
Мінімальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≥ 90.0 %	95.9	96.4	96.3	95.9	95.5
	> 25 %	≥95.0 %	98.4	98.9	98.9	98.4	98.0
Максимальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≤ 110.0 %	104.5	105.1	105.0	104.5	104.1
	> 25 %	≤105.0 %	99.6	99.8	100.1	99.3	99.2

Продовження таблиці 4.101

1		2	3	4	5	6	7
Середнє значення ступенів вилучення	≤ 25 %	95.0–105.0 %	99.6	100.2	100.1	99.7	99.2
	> 25 %	97.0–103.0 %	99.0	99.4	99.5	98.9	98.6
DM pH 4.5 (вміст ацетонітрилу 50 %)							
Мінімальне значення ступеню вилучення	≤ 25 %	≥ 90.0 %	95.6	96.1	96.1	95.7	95.2
	> 25 %	≥95.0 %	102.0	98.4	98.6	98.2	97.8
Максимальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≤ 110.0 %	98.2	102.6	102.5	102.1	101.5
	> 25 %	≤105.0 %	102.0	100.8	102.5	100.3	101.6
Середнє значення ступенів вилучення	≤ 25 %	95.0–105.0 %	98.2	99.0	98.7	98.5	97.8
	> 25 %	97.0–103.0 %	99.6	99.6	100.1	99.1	99.2
DM pH 6.8 (вміст ацетонітрилу 50 %)							
Мінімальне значення ступеню вилучення	≤ 25 %	≥ 90.0 %	95.2	94.7	95.7	95.3	94.9
	> 25 %	≥95.0 %	98.5	99.1	99.0	98.6	98.1
Максимальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≤ 110.0 %	102.3	102.9	102.8	102.4	101.9
	> 25 %	≤105.0 %	101.7	100.4	102.2	99.9	101.3
Середнє значення ступенів вилучення	≤ 25 %	95.0–105.0 %	99.3	100.2	99.7	99.5	98.9
	> 25 %	97.0–103.0 %	99.6	99.7	100.1	99.2	99.2
0.1 M HCl (вміст ацетонітрилу 80 %)							
Мінімальне значення ступеню вилучення	≤ 25 %	≥ 90.0 %	98.6	99.8	98.2	99.2	97.7
	> 25 %	≥95.0 %	99.8	101.1	99.4	100.4	98.9
Максимальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≤ 110.0 %	105.3	106.6	104.8	105.9	104.3
	> 25 %	≤105.0 %	101.7	103.0	101.2	102.3	100.8
Середнє значення ступенів вилучення	≤ 25 %	95.0–105.0 %	101.9	103.1	101.4	102.4	100.9
	> 25 %	97.0–103.0 %	101.0	102.2	100.5	101.6	100.0
Вода (вміст ацетонітрилу 80 %)							
Мінімальне значення ступеню вилучення	≤ 25 %	≥ 90.0 %	95.3	96.0	95.8	95.2	95.6
	> 25 %	≥95.0 %	98.2	101.5	98.7	100.7	98.5
Максимальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≤ 110.0 %	102.7	103.4	103.2	102.5	103.0
	> 25 %	≤105.0 %	102.4	103.1	102.9	102.3	102.7
Середнє значення ступенів вилучення	≤ 25 %	95.0–105.0 %	99.6	100.1	100.1	99.2	99.9
	> 25 %	97.0–103.0 %	101.1	102.3	101.6	101.5	101.4

Отримані результати задовольняють критерії прийнятності. Правильність методики достатня.

Для дослідження прецизійності розраховували RSD між ступенями вилучення аналітів, розрахованих при дослідженні правильності. Результати наведено у таблицях 4.102, 4.103.

Також було досліджено гомогенність розподілу зразку в ємності для розчинення. Для цього готували проводили розчинення препарату та відбирали 6 аліквот з різних місць ємності для розчинення. Результати хроматографування та розрахунки наведено в таблицях 4.104, 4.105.

Таблиця 4.102 – Оцінка прецизійності визначення раміприлу

Параметр	Критерій		Результат				
			2.5 мг / 12.5 мг	5 мг / 25 мг	5 мг / 12.5 мг	10 мг / 25 мг	10 мг / 12.5 мг
0.1 М НСІ (вміст ацетонітрилу 50 %)							
RSD між ступенями вилучення	≤ 25 %	≤ 10.0 %	3.086	2.761	2.761	2.995	2.995
	> 25 %	≤ 5.0 %	1.462	1.283	1.283	1.004	1.004
DM pH 1.2 (вміст ацетонітрилу 50 %)							
RSD між ступенями вилучення	≤ 25 %	≤ 10.0 %	2.323	2.081	2.081	1.942	1.942
	> 25 %	≤ 5.0 %	0.998	1.039	1.039	1.132	1.132
DM pH 4.5 (вміст ацетонітрилу 50 %)							
RSD між ступенями вилучення	≤ 25 %	≤ 10.0 %	2.367	2.155	2.155	2.050	2.050
	> 25 %	≤ 5.0 %	1.054	1.104	1.104	1.232	1.232
DM pH 6.8 (вміст ацетонітрилу 50 %)							
RSD між ступенями вилучення	≤ 25 %	≤ 10.0 %	3.450	3.127	3.127	2.888	2.888
	> 25 %	≤ 5.0 %	1.261	1.270	1.270	1.190	1.190
0.1 М НСІ (вміст ацетонітрилу 80 %)							
Мінімальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≥ 90.0 %	2.337	2.312	2.312	2.286	2.286
	> 25 %	≥ 95.0 %	1.240	1.340	1.340	1.492	1.492
Вода (вміст ацетонітрилу 80 %)							
RSD між ступенями вилучення	≤ 25 %	≤ 10.0 %	2.098	1.824	1.824	1.689	1.689
	> 25 %	≤ 5.0 %	1.534	1.634	1.634	1.725	1.725

Таблиця 4.103 – Оцінка прецизійності визначення гідрохлортіазиду

Параметр	Критерій		Результат				
			2.5 мг / 12.5 мг	5 мг / 25 мг	5 мг / 12.5 мг	10 мг / 25 мг	10 мг / 12.5 мг
0,1 М НСІ (вміст ацетонітрилу 50 %)							
RSD між ступенями вилучення	≤ 25 %	≤ 10.0 %	3.240	3.102	3.240	3.102	3.240
	> 25 %	≤ 5.0 %	1.290	1.421	1.290	1.421	1.290
DM pH1.2 (вміст ацетонітрилу 50 %)							
RSD між ступенями вилучення	≤ 25 %	≤ 10.0 %	2.704	2.589	2.704	2.589	2.704
	> 25 %	≤ 5.0 %	0.470	0.406	0.470	0.406	0.470
DM pH4.5 (вміст ацетонітрилу 50 %)							
RSD між ступенями вилучення	≤ 25 %	≤ 10.0 %	2.210	2.371	2.210	2.371	2.371
	> 25 %	≤ 5.0 %	1.395	0.782	1.395	0.782	0.782
DM pH6.8 (вміст ацетонітрилу 50 %)							
RSD між ступенями вилучення	≤ 25 %	≤ 10.0 %	2.578	2.558	2.578	2.558	2.578
	> 25 %	≤ 5.0 %	1.184	0.581	1.184	0.581	1.184
0,1 М НСІ (вміст ацетонітрилу 80 %)							
Мінімальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≥ 90.0 %	2.067	1.997	2.067	1.997	2.067
	> 25 %	≥ 95.0 %	0.735	0.821	0.735	0.821	0.735
Вода (вміст ацетонітрилу 80 %)							
RSD між ступенями вилучення	≤ 25 %	≤ 10.0 %	1.971	1.840	1.971	1.840	1.971
	> 25 %	≤ 5.0 %	1.333	0.461	1.333	0.461	1.333

Таблиця 4.104 – Результати дослідження гомогенності розподілу раміприлу в ємності для розчинення

Параметр	РП1	BP1	BP2	BP3	BP4	BP5	BP6
0.1 М НСІ (вміст ацетонітрилу 50 %)							
S	25.050	25.911	26.048	26.361	25.749	25.998	26.212
RSD, %	0.363	0.450	0.391	1.382	0.619	0.574	0.574
X, %	н/в	101.891	102.429	103.660	101.254	102.233	103.076
DM pH1.2 (вміст ацетонітрилу 50 %)							
S	25.185	25.575	25.317	25.253	25.694	25.236	25.011
RSD, %	0.483	0.087	0.637	0.939	0.368	0.189	0.712
X, %	н/в	100.030	99.018	98.771	100.493	98.702	97.825
DM pH 4.5 (вміст ацетонітрилу 50 %)							
S	25.093	25.970	26.071	25.866	25.661	25.938	25.868
RSD, %	1.520	1.594	0.171	0.929	0.052	2.196	0.806
X, %	н/в	101.950	102.346	101.543	100.737	101.824	101.550
DM pH6.8 (вміст ацетонітрилу 50 %)							
S	25.257	25.412	25.606	25.262	25.753	25.578	25.321
RSD, %	0.809	0.413	1.705	2.052	0.677	0.897	0.621
X, %	н/в	99.109	99.867	98.525	100.441	99.756	98.756
Вода (вміст ацетонітрилу 50 %)							
S	25.234	25.319	25.552	25.240	25.208	25.126	25.507
RSD, %	1.240	1.926	0.434	1.018	0.049	0.704	0.036
X, %	н/в	98.836	99.743	98.528	98.404	98.083	99.568
0,1 М НСІ (вміст ацетонітрилу 80 %)							
S	25.150	25.346	25.721	25.591	25.695	25.827	26.090
RSD, %	0.840	1.588	1.523	0.851	0.885	0.996	1.134
X, %	н/в	99.274	100.740	100.233	100.638	101.156	102.187
Вода (вміст ацетонітрилу 80 %)							
S	25.434	25.190	25.285	25.272	25.080	25.334	25.255
RSD, %	0.564	0.801	0.209	0.673	0.874	0.485	0.475
X, %	н/в	97.560	97.930	97.878	97.137	98.120	97.815

Таблиця 4.105 – Результати дослідження гомогенності розподілу гідрохлортіазиду в ємності для розчинення

Параметр	РП1	BP1	BP2	BP3	BP4	BP5	BP6
1	2	3	4	5	6	7	8
0,1 М НСІ (вміст ацетонітрилу 50 %)							
S	195.574	207.576	207.410	207.240	207.753	208.016	207.847
RSD, %	0.199	0.076	0.081	0.073	0.006	0.093	0.040
X, %	н/в	105.818	105.734	105.647	105.909	106.043	105.956
DM pH1.2 (вміст ацетонітрилу 50 %)							
S	195.412	201.659	201.821	201.707	201.678	201.605	201.652
RSD, %	0.229	0.191	0.227	0.062	0.152	0.083	0.110
X, %	н/в	102.887	102.970	102.912	102.897	102.859	102.883

Продовження таблиці 4.105

1	2	3	4	5	6	7	8
DM pH4.5 (вміст ацетонітрилу 50 %)							
S	195.394	205.532	205.359	204.875	205.314	205.294	204.928
RSD, %	0.242	0.381	0.096	0.329	0.101	0.187	0.079
X, %	н/в	104.873	104.785	104.538	104.762	104.751	104.565
DM pH6.8 (вміст ацетонітрилу 50 %)							
S	195.595	202.699	202.052	202.144	202.129	202.912	203.008
RSD, %	0.199	0.005	0.328	0.256	0.082	0.214	0.067
X, %	н/в	103.321	102.991	103.038	103.030	103.429	103.478
Вода (вміст ацетонітрилу 50 %)							
S	195.434	200.086	201.143	199.755	200.859	200.240	200.062
RSD, %	0.097	0.164	0.109	0.273	0.086	0.175	0.084
X, %	н/в	102.073	102.612	101.904	102.467	102.151	102.061
0,1 М HCl (вміст ацетонітрилу 80 %)							
S	199.255	209.300	208.561	209.182	210.427	210.115	210.151
RSD, %	0.210	0.174	0.026	0.115	0.068	0.258	0.033
X, %	н/в	104.726	104.356	104.667	105.290	105.134	105.152
Вода (вміст ацетонітрилу 80 %)							
S	198.871	203.560	203.684	203.654	204.547	203.417	204.156
RSD, %	0.160	0.390	0.189	0.085	0.159	0.043	0.214
X, %	н/в	102.051	102.112	102.098	102.545	101.979	102.349

Оцінку результатів наведено у таблиці 4.106.

Таблиця 4.106 – Оцінка результатів дослідження гомогенності розподілу раміприлу та гідрохлортіазиду в ємності для розчинення

Параметр	Критерій	50 % AcN					80 % AcN	
		0,1 М HCl	DM pH1.2	DM pH4.5	DM pH6.8	W	0,1 М HCl	W
RSD між паралельними вимірюваннями, %	Рл	0.833	0.978	0.532	0.738	0.672	0.960	0.355
	ГХТ	0.139	0.037	0.0126	0.213	0.265	0.344	0.210

Отримані результати задовольняють критерії прийнятності. Прецизійність методики є достатньою.

Розроблена аналітична методика відповідає усім дослідженим валідаційним характеристикам та може бути використана для рутинного контролю комбінованих препаратів раміприлу з гідрохлортіазидом за показниками якості «Розчинення» та для дослідження профілів розчинення.

4.6 Розробка та валідація методики контролю за показниками якості «Розчинення» та «Профілі розчинення» таблеток раміприлу з гідрохлортіазидом з використанням хроматографічної колонки Inertsil ODS-3 (150 мм x 4.6 мм, 3 мкм)

Перевіряли можливість використання умов хроматографування, підібраних для кількісного визначення, для контролю розчинення та профілів розчинення. Найбільш критичним для даної методики виявилось середовище з кислотою хлористоводневою рН 1.2. При дослідженні випробовуваного розчину, приготованого з цим середовищем, при співвідношенні рухомих фаз 50:50 пік раміприлу інтерферував з піками розчинника. При зменшенні вмісту ацетонітрилу у рухомій фазі, для забезпечення розділення раміприлу з бланковим піком, погіршувалось розділення між піками раміприлу та гідрохлортіазиду. При зменшенні вмісту ацетонітрилу понад 40 % збільшувалась ширина піку раміприлу, що може ускладнити інтегрування та значно зменшує чутливість методики. Тому вирішено підібрати умови градієнтного елюювання з початковим співвідношенням рухомих фаз 70:30. Приклади хроматограм, отриманих за різних умов хроматографування наведено на рис. 4.16. Підібрана програма градієнту забезпечувала надійне розділення раміприлу та гідрохлортіазиду між собою, а також з піками розчинника. Ефективність хроматографічної системи за піком раміприлу збільшилась у 20 разів порівняно з ізократичним елююванням (з 1000 до 22 000 теоретичних тарілок).

Досліджували робасність методики за обраного співвідношення рухомих фаз. Досліджували вплив наступних факторів:

- зміна швидкості потоку (± 0.05 мл/хв);
- зміна температури термостату колонки (± 5 °C);
- початкове співвідношення рухомих фаз в програмі градієнту (± 1 %)
- зміна рН 0.2 г/л розчину натрію гексансульфонату (± 0.2);
- зміна концентрації натрію гексансульфонату у розчині (± 0.1 г/л).

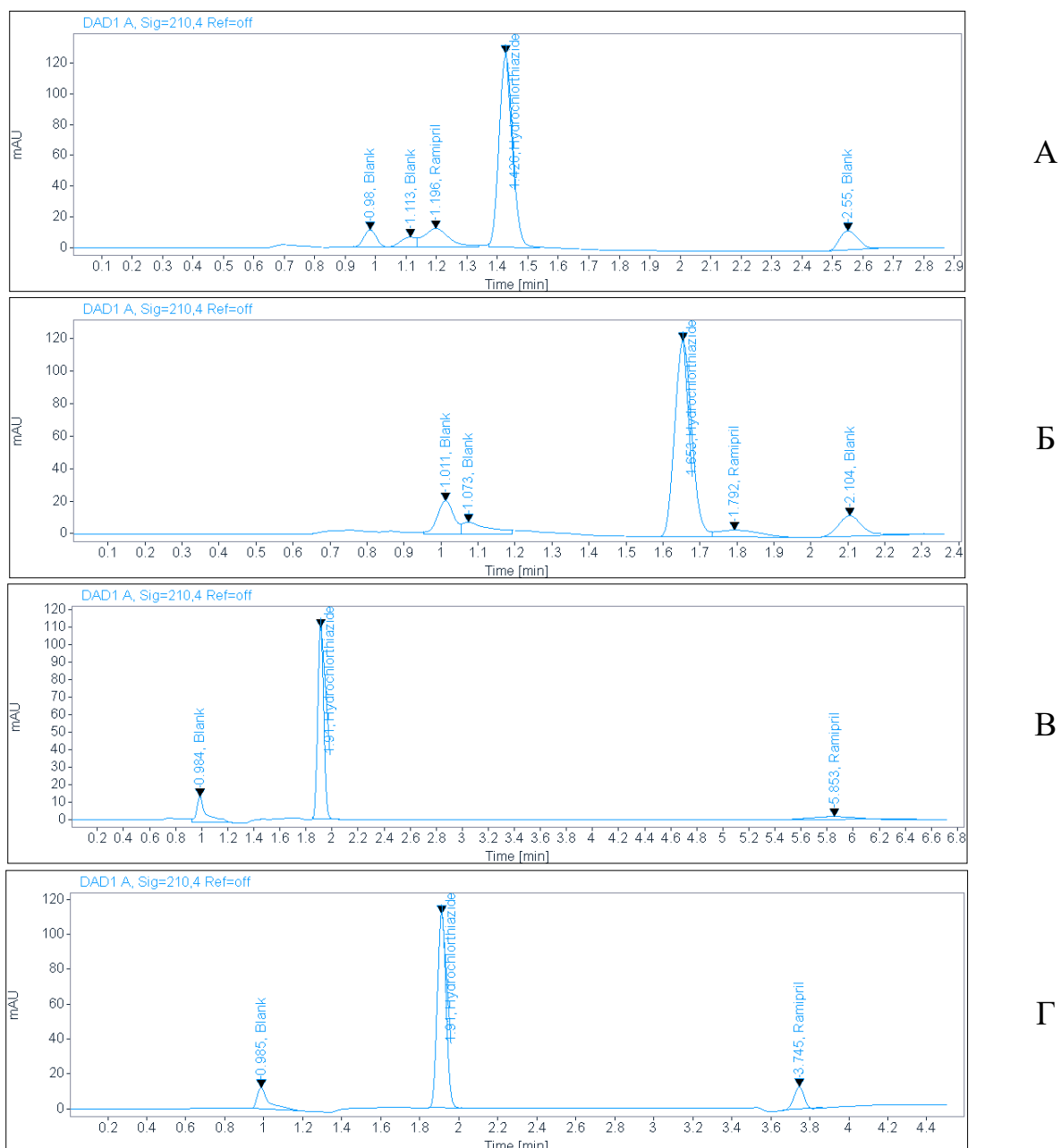


Рисунок 4.16 – Приклад хроматограми випробовуваного розчину за різних умов хроматографування: А – Відношення МР(А) : МР(В) 50:50; Б – Відношення МР(А) : МР(В) 60:40; В – Відношення МР(А) : МР(В) 70:30; Г – градієнтне елюювання

Найкритичнішим виявилось розділення з бланковими піками для середовища з кислотою хлористоводневою рН 1.2, то для приготування випробовуваних розчинів для дослідження робасності використовували саме її.

Результати хроматографування та розрахунків наведено у таблицях 4.107-4.109.

Таблиця 4.107 – Результати дослідження впливу варіювання умов хроматографування на відтворення методики

Розчин	Аналіт	Параметр	Умови хроматографування				
			номінальні	+ 0.05, мл/хв	- 0.05, мл/хв	+ 5, °C	- 5, °C
Дозування 2.5 мг + 12.5 мг							
РП	ГХТ	S	347.663	357.171	329.886	345.613	343.398
		RSD, %	0.360	0.068	0.295	0.142	0.129
		As	1.1	1.0-1.1	1.0	1.0-1.1	1.0
		N	7702-7786	8024-8152	7430-7538	7176-7236	8341-8381
	Рл	S	47.426	49.772	45.343	43.982	50.171
		RSD.%	0.774	1.173	0.469	0.721	0.420
		Rs	19.9-20.1	19.7-19.9	20.2-20.3	21.6-21.8	18.4-18.5
		As	1.0	1.0	1.0	0.9	1.7-1.8
ВР	ГХТ	S	349.374	362.891	337.101	348.327	349.927
		RRF.%	н/в	101.104	101.687	100.292	101.402
	Рл	S	48.952	52.067	46.347	45.291	51.364
		RRF. %	н/в	101.351	99.029	99.768	99.188
	Примітка. Рл – раміприл, ГХТ – гідрохлортіазид, РП – розчин порівняння, ВР – випробовуваний розчин.						

Таблиця 4.108 – Результати дослідження впливу варіювання приготування рухомої фази А на відтворення методики

Розчин	Аналіт	Параметр	Умови хроматографування				
			номінальні	+ 0.01, г/л	- 0.01, г/л	+ 0.2, рН	- 0.2, рН
Дозування 2.5 мг + 12.5 мг							
РП	ГХТ	S	347.663	341.619	346.517	348.175	344.140
		RSD, %	0.360	0.143	0.560	1.482	0.309
		As	1.1	1.0-1.1	1.1	1.0-1.1	1.0-1.1
		N	7702-7786	7028-7515	6917-7157	7110-7369	7297-7540
	Рл	S	47.426	40.906	42.172	43.108	47.098
		RSD.%	0.774	1.516	0.825	1.282	1.205
		Rs	19.9-20.1	20.3-20.4	20.4-20.6	19.1-20.0	21.0
		As	1.0	1.0-1.1	1.0-1.1	1.0-1.5	1.2-1.3
ВР	ГХТ	S	349.374	340.841	350.375	345.711	347.271
		RRF.%	н/в	99.284	100.618	98.806	100.416
	Рл	S	48.952	41.614	43.964	44.933	47.974
		RRF. %	н/в	98.560	100.999	100.985	98.687
	Примітка. Рл – раміприл, ГХТ – гідрохлортіазид, РП – розчин порівняння, ВР – випробовуваний розчин.						

Таблиця 4.109 – Результати дослідження впливу зміни вмісту ацетонітрилу на відтворення методики

Розчин	Аналіт	Параметр	Умови хроматографування		
			номінальні	+ 1, % AcN	- 1, % AcN
Дозування 2.5 мг + 12.5 мг					
РП	ГХТ	S	347.663	346.184	344.100
		RSD. %	0.360	0.594	0.055
		As	1.1	1.0	1.0
		N	7702-7786	7399-7456	8007-8065
	Рл	S	47.426	43.954	49.884
		RSD.%	0.774	0.514	0.121
		Rs	19.9-20.1	20.8-21.0	19.4-19.3
		As	1.0	1.0-1.1	0.9-1.5
		N	23262-23881	26519-27241	21870-22484
	ВР	ГХТ	S	349.374	349.848
RRF.%			н/в	100.564	101.298
Рл		S	48.952	45.244	51.156
		RRF. %	н/в	99.727	99.356
Примітка. Рл – раміприл, ГХТ – гідрохлортіазид, РП – розчин порівняння, ВР – випробовуваний розчин.					

Незначні зміни умов хроматографування, коригування приготування рухомої фази А та вмісту ацетонітрилу для початкового співвідношення фаз не мають значимого впливу на відтворення методики.

На основі отриманих даних обрано наступні умови хроматографування для показника якості «Розчинення» та дослідження профілів розчинення:

- рухома фаза А: розчин рН 2.7 (200 мг натрію гексансульфонату Р (або 219 мг натрію гексансульфонату моногідрату Р) розчиняють в 1000 мл води Р. доводять рН фосфорною кислотою Р до значення 2.7);

- рухома фаза Б: ацетонітрил Р;
- режим елюювання градієнтний за програмою відповідно таблиці 2.12;
- швидкість рухомої фази 1.4 мл/хв;
- детектування за довжини хвилі 210 нм;
- температура колонки 45 °С;
- об'єм інжекції 3 мкл.

Запропоновано наступні вимоги до придатності хроматографічної системи:

- коефіцієнт симетрії піків раміприлу та гідрохлортіазиду. з хроматограми розчину порівняння має бути в межах від 0.8 до 1.8;

- відносне стандартне відхилення площ піків раміприлу або гідрохлортіазиду для 3-х паралельних інжекцій становить не більше 2.0 %;

При валідації методики досліджували діапазон застосування. правильність та прецизійність методики для 5 комерційно доступних дозувань комбінованих препаратів. Для приготування випробовуваних розчинів використовували наступні умови розчинення:

- прилад з лопаттю;
- об'єм середовища розчинення 500 мл;
- швидкість обертання лопаті 75 об/хв;
- час розчинення 30 хв.

Концентрації випробовуваних розчинів наведено у розділі 4.6 (для колонки Acclaim).

Розраховували параметри лінійної регресії відповідно до рекомендацій ДФУ 2.7 п. 5.3.N1 наведених у розділі 4.4.

Результати хроматографування наведено у таблицях 4.110-4.119.

Таблиця 4.110 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для раміприлу для 0.1 М НСІ

Розчин	C_t , мкг/мл	S	s_i	$S_i - s_i$
L3	0.249	0.923	0.819	0.105
L4	0.499	1.949	1.787	0.162
L5	0.998	3.774	3.724	0.050
L6	2.494	9.494	9.535	-0.040
L7	4.988	18.939	19.219	-0.281
L8	9.976	37.550	38.589	-1.039
L9	14.964	59.027	57.958	1.069
L10	19.952	77.980	77.328	0.652
L11	24.940	96.097	96.697	-0.600
L12	29.928	115.989	116.066	-0.077

Таблиця 4.111 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для раміприлу для DM pH 1.2

Розчин	C_t , мкг/мл	S	s_i	$S_i - s_i$
L3	0.249	1.023	0.969	0.054
L4	0.499	2.011	1.943	0.068
L5	0.998	3.941	3.890	0.051
L6	2.494	9.503	9.732	-0.228
L7	4.988	19.482	19.468	0.014
L8	9.976	38.227	38.940	-0.713
L9	14.964	58.928	58.411	0.516
L10	19.952	78.828	77.883	0.945
L11	24.940	96.936	97.355	-0.419
L12	29.928	116.540	116.827	-0.287

Таблиця 4.112 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для раміприлу для DM pH 4.5

Розчин	C_t , мкг/мл	S	s_i	$S_i - s_i$
L3	0.249	0.979	0.922	0.057
L4	0.499	1.974	1.898	0.076
L5	0.998	3.866	3.851	0.015
L6	2.494	9.684	9.710	-0.025
L7	4.988	19.850	19.473	0.376
L8	9.976	39.497	39.001	0.495
L9	14.964	58.084	58.529	-0.446
L10	19.952	75.946	78.057	-2.111
L11	24.940	98.548	97.585	0.963
L12	29.928	117.713	117.113	0.600

Таблиця 4.113 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для раміприлу для DM pH 6.8

Розчин	C_t , мкг/мл	S	s_i	$S_i - s_i$
L3	0.249	0.996	0.893	0.103
L4	0.499	1.914	1.883	0.031
L5	0.998	3.902	3.862	0.040
L6	2.494	9.824	9.799	0.025
L7	4.988	19.659	19.694	-0.035
L8	9.976	39.107	39.483	-0.376
L9	14.964	59.575	59.273	0.303
L10	19.952	79.089	79.062	0.026
L11	24.940	98.408	98.852	-0.444
L12	29.928	118.969	118.642	0.327

Таблиця 4.114 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для рампірилу для води

Розчин	C_i , мкг/мл	S	s_i	$S_i - s_i$
L3	0.199	0.881	1.001	-0.120
L4	0.497	2.130	2.271	-0.141
L5	0.993	4.393	4.387	0.006
L6	2.483	10.669	10.737	-0.068
L7	4.965	21.598	21.319	0.279
L8	9.930	42.727	42.484	0.243
L9	14.895	63.471	63.648	-0.177
L10	19.860	85.413	84.813	0.600
L11	24.825	104.829	105.977	-1.149
L12	29.790	127.669	127.142	0.527

Таблиця 4.115 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для гідрохлортіазиду для 0.1 М HCl

Розчин	C_i , мкг/мл	S	s_i	$S_i - s_i$
L3	0.624	1.882	2.322	-0.440
L4	1.247	4.049	4.357	-0.309
L5	2.494	8.119	8.428	-0.309
L6	6.235	19.662	20.641	-0.979
L7	12.470	41.051	40.995	0.056
L8	24.941	81.693	81.703	-0.010
L9	37.411	125.913	122.411	3.502
L10	49.882	165.126	163.120	2.006
L11	62.352	202.316	203.828	-1.512
L12	74.823	242.803	244.536	-1.733

Таблиця 4.116 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для гідрохлортіазиду для DM pH 1.2

Розчин	C_i , мкг/мл	S	s_i	$S_i - s_i$
L3	0.624	2.188	2.474	-0.287
L4	1.247	4.161	4.501	-0.340
L5	2.494	8.292	8.556	-0.264
L6	6.235	19.671	20.718	-1.048
L7	12.470	41.148	40.990	0.158
L8	24.941	82.082	81.532	0.550
L9	37.411	124.189	122.075	2.114
L10	49.882	165.172	162.618	2.554
L11	62.352	202.311	203.161	-0.850
L12	74.823	241.548	243.703	-2.155

Таблиця 4.117 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для гідрохлортіазиду для DM pH 4.5

Розчин	C_t , мкг/мл	S	s_i	$S_i - s_i$
L3	0.624	1.914	2.029	-0.115
L4	1.247	4.212	4.056	0.156
L5	2.494	8.256	8.109	0.146
L6	6.235	20.099	20.270	-0.171
L7	12.470	40.619	40.538	0.082
L8	24.941	81.920	81.073	0.847
L9	37.411	121.873	121.609	0.264
L10	49.882	158.831	162.144	-3.313
L11	62.352	204.583	202.680	1.903
L12	74.823	243.417	243.215	0.202

Таблиця 4.118 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для гідрохлортіазиду для DM pH 6.8

Розчин	C_t , мкг/мл	S	s_i	$S_i - s_i$
L3	0.624	2.119	2.543	-0.424
L4	1.247	4.215	4.577	-0.362
L5	2.494	8.511	8.645	-0.134
L6	6.235	20.344	20.848	-0.504
L7	12.470	42.274	41.187	1.088
L8	24.941	82.245	81.864	0.382
L9	37.411	123.899	122.541	1.358
L10	49.882	163.757	163.218	0.539
L11	62.352	202.812	203.895	-1.083
L12	74.823	244.185	244.572	-0.387

Таблиця 4.119 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для гідрохлортіазиду для води

Розчин	C_t , мкг/мл	S	s_i	$S_i - s_i$
L3	0.498	3.715	0.520	104.435
L4	1.246	9.041	1.267	101.674
L5	2.491	17.973	2.518	101.059
L6	6.228	44.249	6.199	99.524
L7	12.457	89.734	12.570	100.913
L8	24.913	181.027	25.359	101.790
L9	37.370	266.892	37.387	100.048
L10	49.826	357.234	50.043	100.435
L11	62.283	449.925	63.027	101.196
L12	74.739	535.829	75.061	100.431

Розрахунки параметрів лінійної регресії наведено у таблицях 4.120, 4.121.

Таблиця 4.120 – Параметри лінійної регресії для раміприлу

Параметр		Крите- рій	0.1 М HCl	DM pH1.2	DM pH4.5	DM pH6.8	W
a		н/в	-0.15	-0.004	-0.05	-0.02	0.15
a , %	2.5 мг / 12.5 мг	≤ 3.0 %	0.785	0.022	0.278	0.488	0,725
	5 мг / 25 мг		0.396	0.011	0.139	0.244	0,362
	5 мг / 12.5 мг		0.396	0.011	0.139	0.244	0,363
	10 мг / 25 мг		0.196	0.006	0.070	0.122	0,182
	10 мг / 12.5 мг		0.196	0.006	0.070	0.121	0,181
b		н/в	3.88	3.90	3.92	9.97	4.26
r		≥ 0.995	0.99990	0.99994	0.99981	0.99998	0.99994

Таблиця 4.121 – Параметри лінійної регресії для гідрохлортіазиду

Параметр		Крите- рій	0.1 М HCl	DM pH1.2	DM pH4.5	DM pH6.8	W
a		н/в	0.29	0.45	0.002	0.51	0.13
a , %	2.5 мг / 12.5 мг	≤ 3.0 %	0.353	0.546	0.003	0.612	0.074
	5 мг / 25 мг		0.175	0.272	0.001	0.306	0.037
	5 мг / 12.5 мг		0.353	0.548	0.003	0.612	0.074
	10 мг / 25 мг		0.175	0.272	0.001	0.307	0.037
	10 мг / 12.5		0.351	0.546	0.003	0.614	0.074
b		н/в	3.26	3.25	3.25	3.26	7.18
r		≥ 0.995	0.99985	0.99988	0.99990	0.99996	0.99998

Для розрахунку МВ та МКВ розраховували параметри калібрувальної прямої для розчинів L3-L7 (5 точок з концентрацією найближчою до МКВ). Розраховані параметри, а також МВ та МКВ наведено в таблицях 4.122, 4.123.

Розраховане значення МКВ понад 10 разів менше ніж номінальна концентрація у випробовуваних розчинах, тобто експериментального підтвердження МКВ проводити не потрібно.

Таблиця 4.122 – Розрахунок МВ та МКВ для раміприлу

Параметр	0.1 М НСІ	DM pH1.2	DM pH4.5	DM pH6.8	W
b	3.80	3.88	3.98	3.98	4.34
S ₀	0.04	0.14	0.12	0.03	0.08
S _a	0.02	0.09	0.08	0.02	0.08
МКВ, мкг/мл	0.063	0.227	0.192	0.046	0.125
МВ, мкг/мл	0.032	0.115	0.098	0.023	0.064

Таблиця 4.123 – Розрахунок МВ та МКВ для гідрохлортіазиду

Параметр	0.1 М НСІ	DM pH1.2	DM pH4.5	DM pH6.8	W
b	3.15	3.13	3.22	3.25	7.07
S ₀	0.15	0.19	0.16	0.17	0.09
S _a	0.09	0.12	0.10	0.11	0.07
МКВ, мкг/мл	0.296	0.378	0.305	0.328	0.100
МВ, мкг/мл	0.154	0.197	0.159	0.171	0.043

Для дослідження правильності методики готували та аналізували 10 модельних розчинів, що містили відому концентрацію гідрохлортіазиду у розчині плацебо. Розчини готували для всіх середовищ розчинення. Розраховували знайдену концентрацію аналітів в модельних розчинах та відношення «Знайдено» / «Введено» відповідно формул, наведених у розділі 4.4.

Результати хроматографування та розрахунки наведено у таблицях 4.124-4.133.

Таблиця 4.124 – Розрахунок правильності визначення раміприлу для 0.1 М НСІ

Розчин	C _t , мкг/мл	2.5 мг / 12.5 мг		5 мг / 25 мг		5 мг / 12.5 мг		10 мг / 25 мг		10 мг / 12.5 мг	
		C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L3	0.249	0.24	96.87	0.24	97.68	0.24	97.68	0.24	96.98	0.24	96.35
L4	0.499	0.51	102.26	0.51	103.12	0.51	103.13	0.51	102.39	0.51	101.71
L5	0.998	0.99	99.01	1.00	99.84	1.00	99.84	0.99	99.13	0.98	98.48
L6	2.494	2.48	99.63	2.51	100.46	2.51	100.46	2.49	99.75	2.47	99.09

Продовження таблиці 4.124

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L7	4.988	4.96	99.36	5.00	100.19	5.00	100.20	4.96	99.48	4.93	98.83
L8	9.976	9.83	98.50	9.91	99.33	9.91	99.33	9.84	98.62	9.77	97.97
L9	14.964	15.45	103.23	15.58	104.09	15.58	104.10	15.47	103.35	15.36	102.67
L10	19.952	20.41	102.28	20.58	103.14	20.58	103.14	20.43	102.40	20.30	101.73
L11	24.940	25.15	100.84	25.36	101.68	25.36	101.68	25.18	100.96	25.01	100.29
L12	29.928	30.35	101.42	30.61	102.27	30.61	102.28	30.39	101.55	30.19	100.88

Таблиця 4.125 – Розрахунок правильності визначення раміприлу для DM pH 1.2

Розчин	С _т , мг/мл	2.5 мг / 12.5 мг		5 мг / 25 мг		5 мг / 12.5 мг		10 мг / 25 мг		10 мг / 12.5 мг	
		С _м , мкг/мл	Recovery, %	С _м , мкг/м л	Recovery, %	С _м , мкг/м л	Recovery, %	С _м , мкг/м л	Recovery, %	С _м , мкг/м л	Recovery, %
L3	0.249	0.26	105.26	0.26	105.01	0.26	104.74	0.26	105.36	0.26	105.76
L4	0.499	0.52	103.43	0.51	103.19	0.51	102.93	0.52	103.54	0.52	103.93
L5	0.998	1.01	101.37	1.01	101.13	1.01	100.87	1.01	101.47	1.02	101.85
L6	2.494	2.44	97.77	2.43	97.53	2.43	97.29	2.44	97.87	2.45	98.24
L7	4.988	5.00	100.21	4.99	99.97	4.97	99.72	5.00	100.31	5.02	100.69
L8	9.976	9.81	98.32	9.78	98.08	9.76	97.84	9.82	98.42	9.86	98.79
L9	14.964	15.12	101.04	15.08	100.80	15.05	100.54	15.13	101.14	15.19	101.52
L10	19.952	20.22	101.37	20.18	101.13	20.13	100.87	20.25	101.47	20.32	101.86
L11	24.940	24.87	99.72	24.81	99.49	24.75	99.24	24.90	99.83	24.99	100.20
L12	29.928	29.90	99.91	29.83	99.67	29.75	99.42	29.93	100.01	30.04	100.39

Таблиця 4.126 – Розрахунок правильності визначення раміприлу для DM pH 4.5

Розчин	С _т , мг/мл	2.5 мг / 12.5 мг		5 мг / 25 мг		5 мг / 12.5 мг		10 мг / 25 мг		10 мг / 12.5 мг	
		С _м , мкг/мл	Recovery, %	С _м , мкг/м л	Recovery, %	С _м , мкг/м л	Recovery, %	С _м , мкг/м л	Recovery, %	С _м , мкг/м л	Recovery, %
L3	0.249	0.25	100.38	0.25	99.93	0.25	100.13	0.25	100.45	0.25	100.50
L4	0.499	0.50	101.22	0.50	100.76	0.50	100.96	0.51	101.28	0.51	101.34
L5	0.998	0.99	99.11	0.98	98.67	0.99	98.86	0.99	99.18	0.99	99.23
L6	2.494	2.48	99.30	2.47	98.85	2.47	99.05	2.48	99.36	2.48	99.42
L7	4.988	5.08	101.77	5.05	101.31	5.06	101.51	5.08	101.83	5.08	101.89
L8	9.976	10.10	101.25	10.05	100.79	10.07	100.99	10.11	101.31	10.11	101.37
L9	14.964	14.85	99.26	14.79	98.82	14.82	99.01	14.86	99.33	14.87	99.38
L10	19.952	19.42	97.34	19.33	96.90	19.37	97.10	19.43	97.40	19.44	97.46
L11	24.940	25.20	101.05	25.09	100.59	25.14	100.79	25.22	101.11	25.23	101.17
L12	29.928	30.10	100.58	29.97	100.13	30.03	100.33	30.12	100.65	30.14	100.70

Таблиця 4.127 – Розрахунок правильності визначення раміприлу для ДМ рН 6.8

Розчин	C _t , МГ/МЛ	2.5 МГ / 12.5 МГ		5 МГ / 25 МГ		5 МГ / 12.5 МГ		10 МГ / 25 МГ		10 МГ / 12.5 МГ	
		C _m , МКГ/МЛ	Reco- very, %	C _m , МКГ/М Л	Reco- very, %	C _m , МКГ/М Л	Reco- very, %	C _m , МКГ/М Л	Reco- very, %	C _m , МКГ/М Л	Reco- very, %
L3	0.249	0.25	101.57	0.25	101.43	0.25	101.45	0.25	101.24	0.25	100.59
L4	0.499	0.49	97.59	0.49	97.45	0.49	97.47	0.49	97.28	0.48	96.65
L5	0.998	0.99	99.47	0.99	99.33	0.99	99.35	0.99	99.15	0.98	98.51
L6	2.494	2.50	100.18	2.49	100.03	2.50	100.05	2.49	99.86	2.47	99.21
L7	4.988	5.00	100.24	4.99	100.09	4.99	100.11	4.98	99.91	4.95	99.27
L8	9.976	9.95	99.70	9.93	99.55	9.93	99.57	9.91	99.38	9.85	98.74
L9	14.964	15.15	101.26	15.13	101.11	15.13	101.13	15.10	100.93	15.01	100.28
L10	19.952	20.11	100.82	20.09	100.67	20.09	100.69	20.05	100.49	19.92	99.84
L11	24.940	25.03	100.35	24.99	100.21	25.00	100.23	24.95	100.03	24.79	99.39
L12	29.928	30.26	101.10	30.21	100.95	30.22	100.97	30.16	100.77	29.97	100.13

Таблиця 4.128 – Розрахунок правильності визначення раміприлу для води

Розчин	C _t , МГ/МЛ	2.5 МГ / 12.5 МГ		5 МГ / 25 МГ		5 МГ / 12.5 МГ		10 МГ / 25 МГ		10 МГ / 12.5 МГ	
		C _m , МКГ/МЛ	Reco- very, %	C _m , МКГ/М Л	Reco- very, %	C _m , МКГ/М Л	Reco- very, %	C _m , МКГ/М Л	Reco- very, %	C _m , МКГ/М Л	Reco- very, %
L3	0.199	0.21	104.10	0.21	103.94	0.21	104.31	0.21	104.76	0.21	103.80
L4	0.497	0.50	100.64	0.50	100.48	0.50	100.84	0.50	101.28	0.50	100.35
L5	0.993	1.03	103.78	1.03	103.62	1.03	103.99	1.04	104.44	1.03	103.49
L6	2.483	2.50	100.82	2.50	100.67	2.51	101.03	2.52	101.47	2.50	100.54
L7	4.965	5.07	102.05	5.06	101.89	5.08	102.26	5.10	102.70	5.05	101.76
L8	9.930	10.02	100.94	10.01	100.79	10.04	101.15	10.09	101.58	9.99	100.65
L9	14.895	14.89	99.97	14.87	99.81	14.92	100.17	14.98	100.60	14.85	99.68
L10	19.860	20.04	100.89	20.01	100.74	20.08	101.10	20.16	101.54	19.98	100.61
L11	24.825	24.59	99.06	24.55	98.91	24.64	99.26	24.75	99.69	24.52	98.78
L12	29.790	29.95	100.54	29.90	100.38	30.01	100.74	30.14	101.18	29.87	100.25

Таблиця 4.129 – Розрахунок правильності визначення гідрохлортіазиду для 0.1 М НСІ

Розчин	C _t , МГ/МЛ	2.5 МГ / 12.5 МГ		5 МГ / 25 МГ		5 МГ / 12.5 МГ		10 МГ / 25 МГ		10 МГ / 12.5 МГ	
		C _m , МКГ/МЛ	Reco- very, %	C _m , МКГ/М Л	Reco- very, %	C _m , МКГ/М Л	Reco- very, %	C _m , МКГ/М Л	Reco- very, %	C _m , МКГ/М Л	Reco- very, %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L3	0.624	0.58	93.00	0.58	92.40	0.58	92.82	0.58	92.41	0.58	92.39
L4	1.247	1.25	100.02	1.24	99.37	1.24	99.82	1.24	99.38	1.24	99.36
L5	2.494	2.50	100.28	2.49	99.64	2.50	100.08	2.49	99.64	2.48	99.62

Продовження таблиці 4.129

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L6	6.235	6.06	97.14	6.02	96.52	6.05	96.95	6.02	96.52	6.02	96.50
L7	12.470	12.65	101.41	12.57	100.76	12.62	101.21	12.57	100.76	12.56	100.74
L8	24.941	25.17	100.91	25.01	100.26	25.12	100.70	25.01	100.26	25.00	100.24
L9	37.411	38.79	103.68	38.54	103.02	38.71	103.48	38.54	103.02	38.53	103.00
L10	49.882	50.87	101.98	50.54	101.32	50.77	101.78	50.54	101.33	50.53	101.31
L11	62.352	62.33	99.96	61.93	99.32	62.20	99.76	61.93	99.32	61.92	99.30
L12	74.823	74.80	99.97	74.32	99.33	74.65	99.77	74.32	99.33	74.31	99.31

Таблиця 4.130 – Розрахунок правильності визначення гідрохлортіазиду для DM pH 1.2

Розчин	C _t , мг/мл	2.5 мг / 12.5 мг		5 мг / 25 мг		5 мг / 12.5 мг		10 мг / 25 мг		10 мг / 12.5 мг	
		C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %
L3	0.624	0.67	107.13	0.67	106.91	0.67	107.55	0.67	106.89	0.67	107.11
L4	1.247	1.27	101.89	1.27	101.68	1.28	102.29	1.27	101.66	1.27	101.87
L5	2.494	2.53	101.51	2.53	101.31	2.54	101.91	2.53	101.28	2.53	101.49
L6	6.235	6.01	96.33	5.99	96.14	6.03	96.71	5.99	96.11	6.01	96.31
L7	12.470	12.56	100.75	12.54	100.55	12.61	101.15	12.54	100.53	12.56	100.73
L8	24.941	25.06	100.49	25.01	100.29	25.16	100.89	25.01	100.26	25.06	100.47
L9	37.411	37.92	101.36	37.84	101.16	38.07	101.76	37.83	101.13	37.91	101.34
L10	49.882	50.43	101.11	50.33	100.90	50.63	101.51	50.32	100.88	50.43	101.09
L11	62.352	61.78	99.07	61.65	98.87	62.02	99.47	61.64	98.85	61.76	99.06
L12	74.823	73.76	98.57	73.61	98.37	74.05	98.96	73.59	98.35	73.74	98.56

Таблиця 4.131 – Розрахунок правильності визначення гідрохлортіазиду для DM pH 4.5

Розчин	C _t , мг/мл	2.5 мг / 12.5 мг		5 мг / 25 мг		5 мг / 12.5 мг		10 мг / 25 мг		10 мг / 12.5 мг	
		C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %
L3	0.624	0.59	94.38	0.59	95.31	0.59	94.64	0.59	95.04	0.59	94.48
L4	1.247	1.29	103.83	1.31	104.86	1.30	104.12	1.30	104.56	1.30	103.94
L5	2.494	2.54	101.76	2.56	102.77	2.55	102.05	2.56	102.48	2.54	101.87
L6	6.235	6.18	99.10	6.24	100.08	6.20	99.38	6.22	99.80	6.19	99.20
L7	12.470	12.49	100.14	12.61	101.13	12.52	100.42	12.58	100.85	12.50	100.24
L8	24.941	25.19	100.98	25.43	101.98	25.26	101.26	25.36	101.69	25.21	101.08
L9	37.411	37.47	100.15	37.84	101.14	37.57	100.43	37.73	100.86	37.51	100.26
L10	49.882	48.83	97.89	49.31	98.86	48.97	98.17	49.17	98.58	48.88	97.99
L11	62.352	62.90	100.87	63.52	101.87	63.07	101.16	63.34	101.58	62.96	100.98
L12	74.823	74.84	100.02	75.58	101.01	75.05	100.30	75.36	100.72	74.91	100.12

Таблиця 4.132 – Розрахунок правильності визначення гідрохлортіазиду для DM pH 6.8

Розчин	C _t , МГ/МЛ	2.5 МГ / 12.5 МГ		5 МГ / 25 МГ		5 МГ / 12.5 МГ		10 МГ / 25 МГ		10 МГ / 12.5 МГ	
		C _m , МКГ/МЛ	Recovery, %	C _m , МКГ/М Л	Recovery, %	C _m , МКГ/М Л	Recovery, %	C _m , МКГ/М Л	Recovery, %	C _m , МКГ/М Л	Recovery, %
L3	0.624	0.64	102.15	0.64	102.01	0.64	102.06	0.64	102.31	0.64	102.42
L4	1.247	1.27	101.59	1.27	101.45	1.27	101.50	1.27	101.75	1.27	101.86
L5	2.494	2.56	102.55	2.55	102.42	2.56	102.47	2.56	102.72	2.56	102.83
L6	6.235	6.11	98.06	6.11	97.92	6.11	97.97	6.12	98.21	6.13	98.32
L7	12.470	12.70	101.88	12.69	101.74	12.69	101.79	12.73	102.04	12.74	102.15
L8	24.941	24.72	99.10	24.68	98.97	24.70	99.02	24.76	99.26	24.78	99.37
L9	37.411	37.24	99.53	37.19	99.40	37.20	99.44	37.30	99.69	37.33	99.79
L10	49.882	49.21	98.66	49.15	98.53	49.17	98.58	49.29	98.82	49.34	98.92
L11	62.352	60.95	97.75	60.87	97.62	60.90	97.67	61.05	97.91	61.11	98.01
L12	74.823	73.38	98.08	73.29	97.95	73.32	97.99	73.50	98.24	73.58	98.34

Таблиця 4.133 – Розрахунок правильності визначення гідрохлортіазиду для ВОДИ

Розчин	C _t , МГ/МЛ	2.5 МГ / 12.5 МГ		5 МГ / 25 МГ		5 МГ / 12.5 МГ		10 МГ / 25 МГ		10 МГ / 12.5 МГ	
		C _m , МКГ/МЛ	Recovery, %	C _m , МКГ/М Л	Recovery, %	C _m , МКГ/М Л	Recovery, %	C _m , МКГ/М Л	Recovery, %	C _m , МКГ/М Л	Recovery, %
L3	0.498	0.52	104.44	0.52	105.24	0.52	103.99	0.52	104.31	0.52	104.29
L4	1.246	1.27	101.67	1.28	102.46	1.26	101.24	1.26	101.55	1.26	101.53
L5	2.491	2.52	101.06	2.54	101.84	2.51	100.63	2.51	100.94	2.51	100.91
L6	6.228	6.20	99.52	6.25	100.29	6.17	99.10	6.19	99.40	6.19	99.38
L7	12.457	12.57	100.91	12.67	101.69	12.52	100.48	12.56	100.79	12.55	100.77
L8	24.913	25.36	101.79	25.55	102.57	25.25	101.35	25.33	101.67	25.32	101.64
L9	37.370	37.39	100.05	37.68	100.82	37.23	99.62	37.34	99.93	37.33	99.90
L10	49.826	50.04	100.44	50.43	101.21	49.83	100.00	49.98	100.31	49.97	100.29
L11	62.283	63.03	101.20	63.51	101.97	62.76	100.76	62.95	101.07	62.94	101.05
L12	74.739	75.06	100.43	75.64	101.20	74.74	100.00	74.97	100.31	74.95	100.29

Оцінку результатів наведено у таблицях 4.134, 4.135.

Таблиця 4.134 – Оцінка правильності визначення раміприлу

Параметр	Критерій	Результат					
		2.5 МГ / 12.5 МГ	5 МГ / 25 МГ	5 МГ / 12.5 МГ	10 МГ / 25 МГ	10 МГ / 12.5 МГ	
1	2	3	4	5	6	7	
0.1 М НСІ							
Мінімальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≥ 90.0 %	96.9	97.7	97.7	97.0	96.3
	> 25 %	≥ 95.0 %	98.5	99.3	99.3	98.6	98.0
Максимальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≤ 110.0 %	102.3	103.1	103.1	102.4	101.7
	> 25 %	≤ 105.0 %	103.2	104.1	104.1	103.4	102.7

Продовження таблиці 4.134

1		2	3	4	5	6	7
Середнє значення ступенів вилучення	≤ 25 %	95.0–105.0 %	99.4	100.3	100.3	99.5	98.9
	> 25 %	97.0–103.0 %	100.8	101.8	101.8	101.4	100.7
DM pH 1.2							
Мінімальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≥ 90.0 %	96.3	96.1	96.7	96.1	96.3
	> 25 %	≥95.0 %	98.6	98.4	99.0	98.4	98.6
Максимальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≤ 110.0 %	107.1	106.9	107.6	106.9	107.1
	> 25 %	≤105.0 %	101.4	101.2	101.8	101.1	101.3
Середнє значення ступенів вилучення	≤ 25 %	95.0–105.0 %	101.7	101.3	102.1	101.3	101.7
	> 25 %	97.0–103.0 %	100.2	99.9	100.6	99.9	100.2
DM pH 4.5							
Мінімальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≥ 90.0 %	99.1	98.7	98.9	99.2	99.2
	> 25 %	≥95.0 %	97.3	96.9	97.1	97.4	97.5
Максимальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≤ 110.0 %	101.2	100.8	101.0	101.8	101.9
	> 25 %	≤105.0 %	101.8	101.3	101.5	101.3	101.4
Середнє значення ступенів вилучення	≤ 25 %	95.0–105.0 %	100.2	99.6	99.7	100.4	100.5
	> 25 %	97.0–103.0 %	100.1	99.8	100.0	100.0	100.0
DM pH 6.8							
Мінімальне значення ступеню вилучення	≤ 25 %	≥ 90.0 %	97.6	97.5	97.5	97.3	96.7
	> 25 %	≥95.0 %	99.7	99.6	99.6	99.4	98.7
Максимальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≤ 110.0 %	101.6	101.4	101.4	101.2	100.6
	> 25 %	≤105.0 %	101.3	101.1	101.1	100.9	100.3
Середнє значення ступенів вилучення	≤ 25 %	95.0–105.0 %	99.5	99.6	99.6	99.5	98.8
	> 25 %	97.0–103.0 %	100.5	100.4	100.5	100.3	99.7
Вода							
Мінімальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≥ 90.0 %	100.6	100.5	100.8	101.3	100.4
	> 25 %	≥95.0 %	99.1	98.9	99.3	99.7	98.8
Максимальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≤ 110.0 %	104.1	103.9	104.3	104.8	103.8
	> 25 %	≤105.0 %	102.1	101.9	102.3	101.6	100.7
Середнє значення ступенів вилучення	≤ 25 %	95.0–105.0 %	102.8	102.2	102.5	102.9	102.0
	> 25 %	97.0–103.0 %	100.6	100.4	100.8	100.9	100.0

Таблиця 4.135 – Оцінка правильності визначення гідрохлортіазиду

Параметр	Критерій	Результат					
		2.5 мг / 12.5 мг	5 мг / 25 мг	5 мг / 12.5 мг	10 мг / 25 мг	10 мг / 12.5 мг	
1	2	3	4	5	6	7	
0.1 M HCl							
Мінімальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≥ 90.0 %	93.0	92.4	92.8	92.4	92.4
	> 25 %	≥95.0 %	100.0	99.3	99.8	99.3	99.3
Максимальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≤ 110.0 %	100.3	100.8	100.1	100.8	99.6
	> 25 %	≤105.0 %	103.7	103.0	103.5	103.0	103.0
Середнє значення ступенів вилучення	≤ 25 %	95.0–105.0 %	97.6	97.7	97.4	97.7	97.0
	> 25 %	97.0–103.0 %	101.3	100.6	101.1	100.7	100.6

Продовження таблиці 4.135

1	2	3	4	5	6	7	
DM pH 1.2							
Мінімальне значення ступеню вилучення	≤ 25 %	≥ 90.0 %	96.3	96.1	96.7	96.1	96.3
	> 25 %	≥95.0 %	98.6	98.4	99.0	98.4	98.6
Максимальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≤ 110.0 %	107.1	106.9	107.6	106.9	107.1
	> 25 %	≤105.0 %	101.4	101.2	101.8	101.1	101.3
Середнє значення ступенів вилучення	≤ 25 %	95.0–105.0 %	101.7	101.3	102.1	101.3	101.7
	> 25 %	97.0–103.0 %	100.2	99.9	100.6	99.9	100.2
DM pH 4.5							
Мінімальне значення ступеню вилучення	≤ 25 %	≥ 90.0 %	94.4	95.3	94.6	95.0	94.5
	> 25 %	≥95.0 %	97.9	98.9	98.2	98.6	98.0
Максимальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≤ 110.0 %	103.8	104.9	104.1	104.6	103.9
	> 25 %	≤105.0 %	101.0	102.0	101.3	101.7	101.1
Середнє значення ступенів вилучення	≤ 25 %	95.0–105.0 %	99.8	100.8	100.0	100.5	99.9
	> 25 %	97.0–103.0 %	100.0	101.0	100.3	100.7	100.1
DM pH 6.8							
Мінімальне значення ступеню вилучення	≤ 25 %	≥ 90.0 %	98.1	97.9	98.0	98.2	98.3
	> 25 %	≥95.0 %	97.8	97.6	97.7	97.9	98.0
Максимальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≤ 110.0 %	102.6	102.4	102.5	102.7	102.8
	> 25 %	≤105.0 %	101.9	99.4	101.8	99.7	102.1
Середнє значення ступенів вилучення	≤ 25 %	95.0–105.0 %	101.1	101.1	101.0	101.4	101.4
	> 25 %	97.0–103.0 %	99.2	98.5	99.1	98.8	99.4
Вода							
Мінімальне значення ступеню вилучення	≤ 25 %	≥ 90.0 %	99.5	100.3	99.1	99.4	99.4
	> 25 %	≥95.0 %	100.0	100.8	99.6	99.9	99.9
Максимальне значення ступеня вилучення	≤ 25 %	≤ 110.0 %	104.4	105.2	104.0	104.3	104.3
	> 25 %	≤105.0 %	101.8	102.6	101.4	101.7	101.6
Середнє значення ступенів вилучення	≤ 25 %	95.0–105.0 %	101.7	102.3	101.2	101.4	101.5
	> 25 %	97.0–103.0 %	100.8	101.6	100.4	100.7	100.7

Отримані результати задовольняють критерії прийнятності. Правильність методики достатня.

Для дослідження прецизійності розраховували RSD між ступенями вилучення аналітів, розрахованих при дослідженні правильності. Результати наведено у таблицях 4.136, 4.137.

Також досліджено гомогенність розподілу зразку в ємності для розчинення. Для цього готували проводили розчинення препарату та відбирали 6 аліквот з різних місць ємності для розчинення. Результати хроматографування та розрахунки наведено в таблицях 4.138-4.143.

Таблиця 4.136 – Оцінка прецизійності визначення раміприлу

Параметр	Критерій	Результат					
		2.5 мг / 12.5 мг	5 мг / 25 мг	5 мг / 12.5 мг	10 мг / 25 мг	10 мг / 12.5 мг	
0.1 М НСІ							
RSD між ступенями вилучення, %	≤ 25 %	≤ 10.0 %	2.735	2.235	2.235	1.936	1.936
	> 25 %	≤ 5.0 %	1.680	1.756	1.756	1.761	1.761
DM pH 1.2							
RSD між ступенями вилучення, %	≤ 25 %	≤ 10.0 %	1.883	3.152	3.152	2.845	2.845
	> 25 %	≤ 5.0 %	1.327	1.082	1.082	1.208	1.208
DM pH 4.5							
RSD між ступенями вилучення, %	≤ 25 %	≤ 10.0 %	1.059	0.985	0.985	1.158	1.158
	> 25 %	≤ 5.0 %	1.536	1.638	1.638	1.626	1.626
DM pH 6.8							
RSD між ступенями вилучення, %	≤ 25 %	≤ 10.0 %	2.000	1.661	1.661	1.457	1.457
	> 25 %	≤ 5.0 %	0.554	0.584	0.584	0.626	0.626
Вода							
RSD між ступенями вилучення, %	≤ 25 %	≤ 10.0 %	1.860	1.816	1.816	1.579	1.579
	> 25 %	≤ 5.0 %	0.919	1.002	1.002	0.782	0.782

Таблиця 4.137 – Оцінка прецизійності визначення гідрохлортіазиду

Параметр	Критерій	Результат					
		2.5 мг / 12.5 мг	5 мг / 25 мг	5 мг / 12.5 мг	10 мг / 25 мг	10 мг / 12.5 мг	
0.1 М НСІ							
RSD між ступенями вилучення, %	≤ 25 %	≤ 10.0 %	2.018	1.782	2.018	1.782	2.018
	> 25 %	≤ 5.0 %	0.625	0.696	0.625	0.696	0.625
DM pH 1.2							
RSD між ступенями вилучення, %	≤ 25 %	≤ 10.0 %	4.338	3.788	4.338	3.788	4.338
	> 25 %	≤ 5.0 %	1.135	1.237	1.135	1.237	1.135
DM pH 4.5							
RSD між ступенями вилучення, %	≤ 25 %	≤ 10.0 %	4.091	3.544	4.091	3.544	4.091
	> 25 %	≤ 5.0 %	1.114	1.244	1.114	1.244	1.114
DM pH 6.8							
RSD між ступенями вилучення, %	≤ 25 %	≤ 10.0 %	2.037	1.795	2.037	1.795	2.037
	> 25 %	≤ 5.0 %	1.491	0.736	1.491	0.736	1.491
Вода							
RSD між ступенями вилучення, %	≤ 25 %	≤ 10.0 %	3.468	3.445	3.468	3.445	3.468
	> 25 %	≤ 5.0 %	1.388	1.551	1.388	1.551	1.388

Таблиця 4.138 – Результати дослідження гомогенності розподілу раміприлу в ємності для розчинення для дозування 2.5 мг+ 12.5 мг

Параметр	РП1	ВР1	ВР2	ВР3	ВР4	ВР5	ВР6
1	2	3	4	5	6	7	8
0.1 М НСІ							
S	20.076	20.326	20.232	20.374	20.332	20.413	20.306
RSD, %	0.110	1.016	0.240	0.047	0.731	0.795	0.781
X, %	н/в	99.734	99.272	99.969	99.761	100.158	99.633

Продовження таблиці 4.138

1	2	3	4	5	6	7	8
DM pH 1.2							
S	20.455	20.040	20.043	20.365	20.088	19.745	20.077
RSD, %	0.993	0.164	0.484	1.586	0.406	0.005	0.734
X, %	н/в	96.507	96.522	98.074	96.739	95.089	96.686
DM pH 4.5							
S	20.561	20.684	20.763	20.896	20.806	20.739	20.833
RSD, %	0.696	0.359	0.238	0.386	0.484	1.411	0.684
X, %	н/в	99.095	99.473	100.107	99.678	99.356	99.808
DM pH 6.8							
S	20.801	20.360	20.483	20.309	20.629	20.231	20.470
RSD, %	0.169	0.404	0.357	0.229	0.486	1.077	0.307
X, %	н/в	96.416	97.001	96.175	97.693	95.806	96.939
Вода							
S	20.820	20.125	20.349	20.318	20.363	20.383	20.266
RSD, %	0.721	0.271	1.085	0.406	0.059	0.718	0.784
X, %	н/в	95.219	96.278	96.131	96.345	96.437	95.887

Таблиця 4.139 – Результати дослідження гомогенності розподілу гідрохлортіазиду в ємності для розчинення для дозування 2.5 мг+ 12.5 мг

Параметр	РП1	ВР1	ВР2	ВР3	ВР4	ВР5	ВР6
0.1 М HCl							
S	170.585	180.037	180.200	180.832	180.310	180.142	179.907
RSD, %	0.163	0.141	0.242	0.077	0.135	0.117	0.049
X, %	н/в	105.224	105.319	105.689	105.384	105.285	105.148
DM pH 1.2							
S	169.968	174.762	175.036	175.351	175.153	174.269	174.710
RSD, %	0.285	0.231	0.271	0.369	0.042	0.084	0.358
X, %	н/в	102.512	102.673	102.858	102.742	102.223	102.482
DM pH 4.5							
S	170.677	179.705	179.880	180.571	179.726	179.898	179.833
RSD, %	0.268	0.125	0.050	0.149	0.007	0.055	0.117
X, %	н/в	104.973	105.075	105.479	104.985	105.086	105.048
DM pH 6.8							
S	171.375	174.459	174.882	174.911	175.204	175.331	175.476
RSD, %	0.233	0.167	0.036	0.238	0.237	0.482	0.187
X, %	н/в	101.494	101.740	101.757	101.927	102.002	102.086
Вода							
S	171.698	173.654	173.321	173.181	172.978	173.680	173.238
RSD, %	0.091	0.269	0.185	0.196	0.148	0.173	0.253
X, %	н/в	100.836	100.642	100.561	100.443	100.850	100.594

Таблиця 4.140 – Результати дослідження гомогенності розподілу раміприлу в ємності для розчинення для дозування 5 мг+ 25 мг

Параметр	РП1	BP1	BP2	BP3	BP4	BP5	BP6
0.1 M HCl							
S	40.532	35.374	35.568	35.584	35.496	35.638	35.888
RSD, %	0.793	0.160	0.028	0.494	0.162	0.378	0.079
X, %	н/в	85.971	86.440	86.481	86.267	86.611	87.218
DM pH 1.2							
S	40.354	41.894	39.373	39.101	39.112	39.242	39.121
RSD, %	0.232	2.613	0.136	0.779	0.167	0.377	0.161
X, %	н/в	102.264	96.111	95.448	95.473	95.791	95.496
DM pH 4.5							
S	40.789	39.527	39.103	40.497	39.675	39.728	39.929
RSD, %	0.211	0.307	0.310	0.538	0.207	0.537	0.330
X, %	н/в	95.458	94.434	97.802	95.817	95.944	96.429
DM pH 6.8							
S	40.642	42.540	42.625	42.514	42.214	42.256	42.448
RSD, %	1.361	0.389	0.026	0.100	0.238	0.297	0.450
X, %	н/в	103.106	103.313	103.044	102.315	102.419	102.883
Вода							
S	40.622	39.343	39.742	39.886	40.298	39.971	39.917
RSD, %	0.524	0.658	0.600	0.115	1.622	0.246	0.395
X, %	н/в	96.175	97.149	97.503	98.508	97.710	97.578

Таблиця 4.141 – Результати дослідження гомогенності розподілу гідрохлортіазиду в ємності для розчинення для дозування 5 мг+ 25 мг

Параметр	РП1	BP1	BP2	BP3	BP4	BP5	BP6
0.1 M HCl							
S	213.843	200.528	201.312	200.394	200.569	200.173	199.901
RSD, %	0.737	0.145	0.070	0.183	0.036	0.088	0.133
X, %	н/в	93.492	93.857	93.429	93.511	93.326	93.200
DM pH 1.2							
S	212.228	217.299	217.913	217.684	217.325	217.725	217.984
RSD, %	0.213	0.185	0.233	0.097	0.044	0.006	0.088
X, %	н/в	102.082	102.371	102.263	102.094	102.282	102.404
DM pH 4.5							
S	212.247	216.585	214.805	220.172	216.004	216.695	217.597
RSD, %	0.062	0.007	0.035	0.007	0.053	0.289	0.269
X, %	н/в	101.737	100.901	103.422	101.464	101.789	102.213
DM pH 6.8							
S	212.240	218.110	221.559	221.623	219.046	219.343	218.630
RSD, %	0.185	0.001	0.385	0.174	0.082	0.093	0.018
X, %	н/в	102.457	104.077	104.108	102.897	103.036	102.701
Вода							
S	195.361	189.098	187.071	189.751	189.586	189.562	189.091
RSD, %	0.179	0.258	0.132	0.094	0.038	0.078	0.071
X, %	н/в	96.890	95.851	97.224	97.140	97.127	96.886

Таблиця 4.142 – Результати дослідження гомогенності розподілу раміприлу в ємності для розчинення для дозування 10 мг+ 12.5 мг

Параметр	РП1	ВР1	ВР2	ВР3	ВР4	ВР5	ВР6
0.1 М НСІ							
S	76.970	78.035	78.070	77.680	77.888	77.831	77.765
RSD, %	0.219	0.358	0.087	0.149	0.045	0.076	0.324
X, %	н/в	99.869	99.913	99.414	99.681	99.607	99.524
DM pH 1.2							
S	76.893	82.800	83.695	83.093	82.613	82.802	83.231
RSD, %	0.327	0.101	0.224	0.151	0.145	0.288	0.250
X, %	н/в	106.074	107.220	106.448	105.834	106.075	106.626
DM pH 4.5							
S	76.917	72.238	73.552	72.479	72.426	72.755	72.136
RSD, %	0.241	0.224	0.015	0.096	0.094	1.066	0.532
X, %	н/в	92.514	94.196	92.823	92.755	93.176	92.382
DM pH 6.8							
S	76.867	83.024	83.351	82.991	82.341	82.151	82.148
RSD, %	0.122	0.258	0.328	0.067	0.325	0.090	0.206
X, %	н/в	106.396	106.816	106.355	105.521	105.278	105.274
Вода							
S	75.099	72.731	73.357	73.142	72.867	72.781	73.623
RSD, %	0.660	0.077	0.369	0.341	0.179	0.221	0.218
X, %	н/в	96.169	96.996	96.711	96.349	96.235	97.348

Таблиця 4.143 – Результати дослідження гомогенності розподілу гідрохлортіазиду в ємності для розчинення для дозування 10 мг+ 12.5 мг

Параметр	РП1	ВР1	ВР2	ВР3	ВР4	ВР5	ВР6
0.1 М НСІ							
S	101.181	84.441	84.873	84.361	84.371	83.693	83.872
RSD, %	0.170	0.048	0.286	0.129	0.074	0.062	0.526
X, %	н/в	83.205	83.631	83.127	83.136	82.468	82.645
DM pH 1.2							
S	101.333	98.927	102.365	100.261	98.960	99.137	101.075
RSD, %	0.084	0.061	0.047	0.323	0.010	0.256	0.164
X, %	н/в	97.332	100.715	98.645	97.365	97.539	99.446
DM pH 4.5							
S	101.538	94.143	96.613	93.400	93.004	92.273	92.088
RSD, %	0.093	0.272	0.055	0.073	0.172	0.100	0.466
X, %	н/в	92.439	94.864	91.710	91.320	90.603	90.422
DM pH 6.8							
S	101.015	95.030	95.295	95.297	94.450	94.056	93.548
RSD, %	0.246	0.003	0.120	0.040	0.254	0.269	0.078
X, %	н/в	93.793	94.054	94.056	93.220	92.831	92.330
Вода							
S	110.469	106.668	106.281	106.403	106.540	106.493	106.288
RSD, %	0.486	0.095	0.263	0.129	0.127	0.234	0.068
X, %	н/в	96.655	96.304	96.415	96.538	96.496	96.311

Оцінку результатів наведено у таблиці 4.144.

Таблиця 4.144 – Оцінка результатів дослідження гомогенності розподілу раміприлу та гідрохлортіазиду в ємності для розчинення

Параметр		Крите- рій	0.1 М HCl	DM pH 1.2	DM pH 4.5	DM pH 6.8	W
Дозування 2.5 мг + 12.5 мг							
RSD між паралельними вимірюваннями, %	Рл	≤ 3.0 %	0.303	0.982	0.358	0.699	0.469
	ГХТ		0.179	0.220	0.178	0.211	0.159
Дозування 5 мг + 25 мг							
RSD між паралельними вимірюваннями, %	Рл	≤ 3.0 %	0.481	2.797	1.161	0.387	0.784
	ГХТ		0.238	0.133	0.837	0.687	0.527
Дозування 10 мг + 12.5 мг							
RSD між паралельними вимірюваннями, %	Рл	≤ 3.0 %	0.195	0.471	0.708	0.627	0.486
	ГХТ		0.504	1.392	1.776	0.759	0.142

Отримані результати задовольняють критерії прийнятності. Прецизійність методики є достатньою.

Розроблена аналітична методика відповідає усім дослідженим валідаційним характеристикам та може бути використана для рутинного контролю комбінованих препаратів раміприлу з гідрохлортіазидом за показниками якості «Розчинення» та для дослідження профілів розчинення.

Висновки до розділу 4

1. Розроблена ВЕРХ методика придатна для одночасного контролю вмісту домішок раміприлу та гідрохлортіазиду у комбінованому препараті. Також дана методика дозволяє оцінювати якість препарату впродовж терміну придатності. Зразки аналізували на рідинному хроматографі з діодноматричним детектором Agilent 1260. Використовували колонку Inertsil ODS-3 (4.6 мм × 150 мм, 3 мкм); рухома фаза А – 0.2 г/л розчин натрію гексансульфонату (рН 2.7); рухома фаза Б: ацетонітрил; швидкість рухомої фази 1.5 мл/хв; довжина хвилі детектування – 210 нм; температура колонки – 45 °С, градієнтний режим елюювання. Нами попередньо розроблено ВЕРХ методику визначення раміприлу в таблетках, яку ми апробували в наших дослідженнях для вивчення профілів деградації. При

- дії стресових факторів на плацебо препарату жодних додаткових піків не виявлено. Найбільш значний вплив на деградацію як раміприлу, так і гідрохлортіазиду має розчин лугу. Оскільки раміприл є нестійким у лужному середовищі, то склад препарату та розчинники, які використовують при приготуванні зразків, не повинні містити лужних компонентів. Продукти деградації гідрохлортіазиду мають часи утримування від 2 хв до 5 хв, раміприлу від 10 хв до 20 хв. Розроблена методика може забезпечити одночасне визначення домішок раміприлу та гідрохлортіазиду при контролі стабільності комбінованого препарату.
2. Розроблено та валідовано аналітичні методики визначення раміприлу та гідрохлортіазиду у промивних водах методом УВЕРХ з МС детектуванням. Зразки аналізували на рідинних хроматографах з МС детектором (Agilent 6420 та Waters Xevo TQD ACQUITY). Використовували колонку Kinetex C18 (2.1 мм × 30 мм, 1.7 мкм); рухома фаза – 0.1 % розчин мурашиної кислоти в деіонізованій воді – ацетонітрил (співвідношення 73:27 для визначення раміприлу та 91.5:8.5 для визначення гідрохлортіазиду); швидкість рухомої фази 0.4 мл/хв для визначення раміприлу та 0.35 мл/хв для визначення гідрохлортіазиду; температура колонки 45 °С для визначення раміприлу та 40 °С для визначення гідрохлортіазиду, режим іонізації – електроспрей у позитивному режимі; параметри детектування – режим реєстрації дочірнього іону 417 → 234 m/z для визначення раміприлу та 298 → 281 m/z для визначення гідрохлортіазиду. Чутливість методик підтверджено на рівні 0.0026 мкг/мл. Методики можна застосовувати в діапазоні концентрацій 0.0026–0.0255 мкг/мл. Запропоновані методики можуть бути використані для контролю очищення обладнання як монопрепаратів, так і комбінованого препарату.
 3. Розроблено та валідовано методики контролю за показниками якості «Кількісне визначення» та «Однорідність дозованих одиниць» комбінованих таблеток раміприлу з гідрохлортіазидом з використанням

хроматографічних колонок Inertsil ODS-3 (150 мм x 4.6 мм, 3 мкм) та Dionex Acclaim 120 C18 (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм). Вміст ацетонітрилу в рухомій фазі мав більш суттєвий вплив на час утримування раміприлу, ніж гідрохлортіазиду. При зменшенні вмісту ацетонітрилу до 40 % змінюється порядок виходу піків. Також при зменшенні вмісту ацетонітрилу значно збільшується ширина піку раміприлу, що негативно впливає на розділення між піками та ускладнює інтегрування піку раміприлу. Тому збільшено вміст ацетонітрилу в рухомій фазі до 53 %. Хоча за цих умов спостерігалось чисельне зменшення ефективності хроматографічної системи, за рахунок зменшення часу утримування піків, однак розділення між піками було достатнє та ширина піку раміприлу була вдвічі менша. Окрім того, час хроматографування скорочувався в 2 рази. Тому обрано співвідношення 0.2 г/л розчину натрію гексансульфонату (рН 2.7) : ацетонітрилу 47:53 для колонки Inertsil ODS-3. З використанням хроматографічної колонки Dionex Acclaim 120 C18 (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм) при зменшенні вмісту ацетонітрилу зменшувалася ширина піку раміприлу і, відповідно, збільшувалася кількість тарілок розрахована за цим піком. Час утримування раміприлу зменшувався, що призводило до зменшення коефіцієнту розділення між піками. Оптимальним обрано вміст ацетонітрилу у рухомій фазі 80 %. Це дозволило зменшити тривалість інжектування на 2 хв разом зі збереженням гарного розділення між основними піками. Збільшення вмісту ацетонітрилу до 90 % призводило до зменшення кількості теоретичних тарілок за піком раміприлу без суттєвого зменшення часу хроматографування, тому було недоцільним. За необхідності, вміст ацетонітрилу у рухомій фазі може бути зменшений. При валідації методик досліджували діапазон застосування, правильність та прецизійність методики для п'яти комерційно доступних дозувань комбінованих препаратів. Методики були лінійними в діапазоні концентрацій 0.024–0.146 мг/мл для раміприлу та 0.06–0.39 мг/мл для гідрохлортіазиду.

4. Розроблено та валідовано методики контролю за показниками якості «Розчинення» та «Профілі розчинення» комбінованих таблеток раміприлу з гідрохлортіазидом з використанням хроматографічних колонок Inertsil ODS-3 (150 мм x 4.6 мм, 3 мкм) та Dionex Acclaim 120 C18 (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм) та градієнтного (для обох колонок) або ізократичного елюювання (для колонки Dionex Acclaim 120 C18, співвідношення 80:20). В якості середовища для профілів розчинення використовували середовище з кислотою хлористоводневою рН 1.2, ацетатний буферний розчин рН 4.5 та фосфатний буферний розчин рН 6.8. В якості середовища для розчинення використовували 0.1 М розчин кислоти хлористоводневої та воду. Для усіх середовищ, окрім ацетатного буферного розчину рН 4.5, вміст ацетонітрилу у рухомій фазі 80 % забезпечував гарне розділення між піками аналітів та між бланковими піками і піком гідрохлортіазиду. Для ацетатного буферного розчину рН 4.5 спостерігалась інтерференція піку гідрохлортіазиду з піком ацетату. Достатнє розділення між піком гідрохлортіазиду та бланковим піком забезпечувалось при вмісті ацетонітрилу у рухомій фазі 50 %. Тому контроль за показником «Розчинення» можливо проводити при вмісті ацетонітрилу в рухомій фазі 80 %, тоді як при дослідженні профілів розчинення вміст ацетонітрилу потрібно зменшити до 80 % на колонці Dionex Acclaim 120 C18 (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм). Перевіряли можливість використання умов хроматографування на колоонці Inertsil ODS-3 (150 мм x 4.6 мм, 3 мкм), підібраних для кількісного визначення, для контролю розчинення та профілів розчинення. Найбільш критичним для даної методики виявилось середовище з кислотою хлористоводневою рН 1.2. При дослідженні випробовуваного розчину, приготованого з цим середовищем, при співвідношенні рухомих фаз 50:50 пік раміприлу інтерферував з піками розчинника. При зменшенні вмісту ацетонітрилу у рухомій фазі, для забезпечення розділення раміприлу з бланковим піком, погіршувалось розділення між піками раміприлу та гідрохлортіазиду. При зменшенні вмісту ацетонітрилу понад 40 % збільшувалась ширина піку раміприлу, що

може ускладнити інтегрування та значно зменшує чутливість методики. Тому вирішено підібрати умови градієнтного елюювання з початковим співвідношенням рухомих фаз 70:30. При валідації методик досліджували діапазон застосування, правильність та прецизійність методики для п'яти комерційно доступних дозувань комбінованих препаратів. Методики були лінійними в діапазоні концентрацій 0.2–5.0 мкг/мл для раміприлу та 0.5–12.0 мкг/мл для гідрохлортіазиду.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в наукових працях автора [96, 97, 103, 104, 108].

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне та експериментальне вирішення актуального наукового завдання, що полягає в розробці методик контролю якості лікарських форм раміприлу за показниками «Кількісне визначення», «Супровідні домішки», «Розчинення», «Однорідність дозованих одиниць».

1. Проведено критичний аналіз оригінальних наукових публікацій, що дозволяє узагальнити інформацію щодо цілей, завдань, особливостей досліджень, ускладнень, які виникають під час розробки методик контролю якості лікарських форм раміприлу. Існуючі методики не висвітлюють сучасних підходів до розробки методик контролю якості лікарських форм раміприлу, які передбачають розробку методик супровідних домішок раміприлу в таблетках, методик визначення раміприлу для проведення тестів «Розчинення», «Кількісне визначення», «Однорідність дозованих одиниць». Фіксовані комбінації раміприлу та гідрохлортіазиду широко представлені на фармацевтичному ринку України та світу, проте їх аналітична розробка не описана в достатній мірі і потребує ґрунтовного вивчення.
2. Під час розробки методик контролю якості таблеток раміприлу ми зосередилися на виборі селективної, простої та «зеленої» рухомої фази та хроматографічної колонки для досягнення експрес-відтворюваних результатів. З використанням хроматографічних колонок Inertsil ODS-3 (150 мм x 4.6 мм, 3 мкм) та Acclaim 120 C18 (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм) досягнуто відмінного розділення за короткий час аналізу. Обрано ацетонітрил та іон-парний реагент натрію гексансульфонат як компоненти рухомої фази, що дозволило отримати «зелений» аналіз. Усі три розроблені ВЕРХ методики за показниками «Супровідні домішки», «Розчинення», «Кількісне визначення» передбачали використання однієї і тієї ж рухомої фази, що складалася з 0.2 г/л розчину натрію гексансульфонату (рН 2.7) та

ацетонітрилу. ВЕРХ методика визначення супровідних домішок раміприлу в таблетках передбачала використання градієнтного елюювання, а ВЕРХ методика кількісного визначення раміприлу в таблетках та для проведення тесту «Розчинення» ізократичне елюювання (50:50). Простота ВЕРХ методик є зручною для використання хіміками, тому запропоновані методики можуть бути широко використані для цілей рутинного фармацевтичного аналізу. Крім того, ВЕРХ методики були експресними (час аналізу супровідних домішок становив близько 25 хв, кількісне визначення – 4.5 хв) та «зеленими».

3. Розроблено дві прості, експресні, економічно доступні, альтернативні спектрофотометричні методики визначення раміприлу в таблетках за реакцією з БФС та КЧ. Підбрано оптимальні умови пробопідготовки та кількісного визначення, які забезпечують правильний, прецизійний, швидкий та «зелений» аналіз раміприлу в таблетках. Аналітичні методики були лінійними в діапазоні концентрацій 1.99-5.96 мкг/мл (для БФС) та 0.42-5.44 мкг/мл (для КЧ). Розроблені два спектрофотометричні методики можуть бути використані як альтернативні методики для рутинного аналізу таблеток раміприлу.
4. Розроблена ВЕРХ методика придатна для одночасного контролю вмісту домішок раміприлу та гідрохлортіазиду у комбінованому препараті. Також дана методика дозволяє оцінювати якість препарату впродовж терміну придатності. Нами попередньо розроблено ВЕРХ методику визначення раміприлу в таблетках, яку ми апробували в наших дослідженнях для вивчення профілів деградації. Використовували колонку Inertsil ODS-3 (4.6 мм × 150 мм, 3 мкм); рухома фаза А – 0.2 г/л розчин натрію гексансульфонату (рН 2.7); рухома фаза Б: ацетонітрил; швидкість рухомої фази 1.5 мл/хв; довжина хвилі детектування – 210 нм; температура колонки – 45 °С, градієнтний режим елюювання. При дії стресових факторів на плацебо препарату жодних додаткових піків не виявлено. Найбільш значний вплив на деградацію як раміприлу, так і гідрохлортіазиду має розчин луку.

Оскільки раміприл є нестійким у лужному середовищі, то склад препарату та розчинники, які використовують при приготуванні зразків, не повинні містити лужних компонентів. Продукти деградації гідрохлортіазиду мають часи утримування від 2 до 5 хв, раміприлу від 10 до 20 хв.

5. Розроблено та валідовано аналітичні методики визначення раміприлу та гідрохлортіазиду у промивних водах методом УВЕРХ з МС детектуванням. Використовували колонку Kinetex C18 (2.1 мм × 30 мм, 1.7 мкм); рухоми фазу – 0.1 % розчин мурашиної кислоти в деіонізованій воді – ацетонітрил (співвідношення 73:27 для визначення раміприлу та 91.5:8.5 для визначення гідрохлортіазиду); швидкість рухоми фазу 0.4 мл/хв для визначення раміприлу та 0.35 мл/хв для визначення гідрохлортіазиду; температура колонки 45 °С для визначення раміприлу та 40 °С для визначення гідрохлортіазиду, режим іонізації – електроспрей у позитивному режимі; параметри детектування – режим реєстрації дочірнього іону 417 → 234 m/z для визначення раміприлу та 298 → 281 m/z для визначення гідрохлортіазиду. Чутливість методик підтверджено на рівні 0.0026 мкг/мл. Методики можна застосовувати в діапазоні концентрацій 0.0026–0.0255 мкг/мл. Запропоновані методики можуть бути використані для контролю очищення обладнання як монопрепаратів, так і комбінованого препарату.
6. Розроблено та валідовано методики контролю за показниками якості «Кількісне визначення» та «Однорідність дозованих одиниць» комбінованих таблеток раміприлу з гідрохлортіазидом з використанням хроматографічних колонок Inertsil ODS-3 (150 мм x 4.6 мм, 3 мкм) та Dionex Acclaim 120 C18 (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм). Для проведення досліджень з розробки методик контролю за показниками якості «Кількісне визначення» та «Однорідність дозованих одиниць» комбінованих таблеток раміприлу з гідрохлортіазидом п'яти різних дозувань використовували ізократичне елюювання та рухоми фазу – розчин рН 2.7 та ацетонітрил Р у співвідношенні 47:53 для колонки Inertsil ODS-3 та 20:80 для колонки

Dionex Acclaim 120 C18. Методики були лінійними в діапазоні концентрацій 0.024–0.146 мг/мл для раміприлу та 0.06–0.39 мг/мл для гідрохлортіазиду. Розроблені аналітичні методики відповідають усім дослідженим валідаційним характеристикам та можуть бути використані для рутинного контролю комбінованих препаратів раміприлу з гідрохлортіазидом за показниками якості «Кількісне визначення» та «Однорідність дозованих одиниць».

7. Розроблено та валідовано методики контролю за показниками якості «Розчинення» та «Профілі розчинення» комбінованих таблеток раміприлу з гідрохлортіазидом з використанням хроматографічних колонок Inertsil ODS-3 (150 мм x 4.6 мм, 3 мкм) та Dionex Acclaim 120 C18 (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм) та градієнтного (для обох колонок) або ізократичного елюювання (для колонки Dionex Acclaim 120 C18, співвідношення 80:20). Експериментально підібрано умови градієнтного елюювання з початковим співвідношенням рухомих фаз 70:30. При валідації методик досліджували діапазон застосування, правильність та прецизійність методики для п'яти комерційно доступних дозувань комбінованих препаратів. Методики були лінійними в діапазоні концентрацій 0.2–5.0 мкг/мл для раміприлу та 0.5–12.0 мкг/мл для гідрохлортіазиду. Розроблені методики відповідають усім дослідженим валідаційним характеристикам та можуть бути використані для рутинного контролю комбінованих препаратів раміприлу з гідрохлортіазидом за показниками якості «Розчинення» та для дослідження профілів розчинення.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Cardiovascular Diseases (CVDs). Available from: https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_3 (accessed on 22 March 2023)
2. Ramipril. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ramipril> (accessed on 14 March 2023)
3. European Pharmacopoeia. European Pharmacopoeia. 11 ed. 2022. Available from: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph.-eur.-11th-edition> (accessed on 22 March 2023)
4. Chicago. The United States Pharmacopeia. The National Formulary. Rockville, Md.: United States Pharmacopeial Convention, Inc.; 2021. <https://www.uspnf.com> (accessed on 22 March 2023)
5. Al-Majed AA, Belal F, Al-Warthan AA. Spectrophotometric determination of ramipril (a novel ACE inhibitor) in dosage forms. Spectroscopy Letters. 2001;34(2):211-20.
6. Rahman N, Ahmad Y, Azmi SNH. Kinetic spectrophotometric method for the determination of ramipril in pharmaceutical formulations. AAPS PharmSciTech. 2005;6(3):E543-51.
7. Afieroho OE, Okorie O, Okonkwo TJN. A Spectrophotometric method for the determination of ramipril in solid dosage forms. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2012;11(2):275-9.
8. Kumar M, Jindal M, Bhatt S, Pandurangan A, Malik A, Kaushik V, et al. Simultaneous estimation of amlodipine besylate and ramipril in tablets dosage form by UV spectrophotometric method. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2019;11(2):667-70.
9. Patel AB, Jadav HM, Vyas AJ, Patel AI, Patel NK, Chudasama A. Simultaneous determination of ramipril and amlodipine besylate in tablet dosage form by first order derivative spectrophotometric method. Chem Methodol. 2020;4(4):467-76.
10. Attala K, Elsonbaty A. Smart UV spectrophotometric methods based on simple mathematical filtration for the simultaneous determination of celecoxib and

- ramipril in their pharmaceutical mixtures with amlodipine: A comparative statistical study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2021;244:118853.
11. Hisham E. Abdellatef. Spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for the determination of ramipril in its pure and dosage form. *Spectrochimica Acta Part A*. 2007;66(3):701-6.
 12. Elsonbaty A, Serag A, Abdulwahab S, Hassan WS, Eissa MS. Analysis of quinary therapy targeting multiple cardiovascular diseases using UV spectrophotometry and chemometric tools. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2020;238:118415.
 13. El-Awady MI, El-Brashy AM, Abdallah NA, Ibrahim FA. Multicomponent spectrophotometric determination of a ternary mixture of widely-prescribed cardiovascular drugs by four different methods. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2023;295:122573.
 14. Dai SY, Qiu ST, Wu W, Fu CM. Development and validation of an rp-hplc method for simultaneous determination of Ramipril and Amlodipine in tablets. *J Pharm Anal*. 2013;3(6):440-6.
 15. Kumar AM, Kumar PV, Nasare M, Rao V, Parasad VVL, Diwan VP. Isocratic RP-HPLC estimation of Ramipril and Amlodipine in pharmaceutical dosage form. *J Adv Pharm Educ Res*. 2012;2(3):137-45.
 16. Patel J, Patel M. RP-HPLC method development and validation for the simultaneous estimation of ramipril and amlodipine besylate in capsule dosage form. *J Chem Pharm Res*. 2014;6(6):725-33.
 17. Rajput PS, Kaur A, Gill NK, Mittal K, Sarma GS. Simultaneous estimation of ramipril and amlodipine in bulk and tablet dosage form by RP-HPLC method. *J Appl Pharm Sci*. 2012;2(7):160-5.
 18. Dheeravath SN, Ramadevi K, Saraswathi Z, Maniklal D, Bhagawan D. RP-HPLC method development for simultaneous determination of the drugs Ramipril and Amlodipine. *IJSR*. 2013;2(2):4-7.

19. Panchal HJ, Suhagia BN, Patel NJ, Rathod IS, Patel BH. Simultaneous estimation of Atorvastatin Calcium, Ramipril and Aspirin in capsule dosage form by RP-LC. *Chromatographia*. 2009;69(1):91-5.
20. De Diego M, Godoy G, Mennickent S, Olivares M, Godoy R. Stress degradation studies of ramipril by a validated stability-indicating liquid chromatographic method. *J Chil Chem Soc*. 2010;55(4):450-3.
21. Elshanawane AA, Mostafa SM, Elgawish MS. Application of a validated, stability-indicating LC method to stress degradation studies of Ramipril and Moexipril. *HCl Chromatographia*. 2008;67(7):567-73.
22. Patole SM, Khodke AS, Potale LV, Damle MC. A validated HPLC method for analysis of atorvastatin calcium, ramipril and aspirin as the bulk drug and in combined capsule dosage forms. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2010;4(3):40-5.
23. Sharma R, Khanna S, Mishra GP. Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of Ramipril, aspirin and Atorvastatin in pharmaceutical preparations. *E-J Chem*. 2012;9(4):2177-84.
24. Rao KS, Srinivas K. RP-HPLC method for the determination of Losartan Potassium and Ramipril in combined dosage form. *Indian J Pharm Sci*. 2010;72(1):108-11.
25. Zuromska-Witek B, Stolarczyk M, Szlósarczyk M, Kielar S, Hubicka U. Simple, Accurate and Multianalyte Determination of Thirteen Active Pharmaceutical Ingredients in Polypills by HPLC-DAD. *Chemosensors*. 2023;11(1):25.
26. Belal F, Al-Zaagi IA, Gadkariem EA, Abounassif MA. A stability-indicating LC method for the simultaneous determination of ramipril and hydrochlorothiazide in dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2001;24(3):335-42.
27. Alahmad SI, Elfataty HM, Mabrouk MM, Hammad SF, Mansour FR. Development and Validation of Novel RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Ramipril, Hydrochlorothiazide and bisoprolol in Ternary Combinations. *Der Pharma Chemica*. 2017;9(20):70-5.

28. Raut PV, Padwal SL, Bachute MT, Polshettiwar SA. Development and Validation of RP-HPLC Chromatographic Dissolution Method for the Simultaneous Estimation of Ramipril and Hydrochlorothiazide from Solid Dosage Formulation. *Journal of Pharmaceutical Research International*. 2021;33(42B):203-17.
29. Kumar BK, Kumar TS, Kumar AS, Rao PV. Development and Validation of RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Ramipril, Telmisartan and Hydrochlorothiazide in Pharmaceutical Dosage Forms. *Journal of Pharmacy Research*. 2011;4(10):3306-8.
30. Patel B, Jangid AG, Suhagia BN, Desai N. Challenges in Simultaneous Determination of Hydrochlorothiazide and Ramipril in Human Plasma: Application to a Bioequivalence Study. *Journal of Chromatographic Science*. 2018;56(10):867-78.
31. Patel JR, Pethani TM, Vachhani AN, Sheth NR, Dudhrejiya AV. Development and validation of bioanalytical method for simultaneous estimation of ramipril and hydrochlorothiazide in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2014;970:53-9.
32. Gupta VK, Jain R, Lukram O, Agarwal S, Dwivedi A. Simultaneous determination of ramipril, ramiprilat and telmisartan in human plasma using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta*. 2011;83(3):709-16.
33. Gałuszka A, Migaszewski Z, Konieczka P, Namieśnik J. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2012;37:61-72.
34. Pena-Pereira F, Wojnowski W, Tobiszewski M. AGREE–Analytical GREENness Metric Approach and Software. *Anal Chem*. 2020;92(14):10076-82.
35. Płotka-Wasyłka J, Wojnowski W. Complementary green analytical procedure index (ComplexGAPI) and software. *The Royal Society of Chemistry*. 2021;23(2):8657-65.
36. Державна фармакопея України. 2-е вид. Доповнення 4. Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»; 2020. с. 123-236.

37. Snyder RL, Kirckland J, Dolan WJ. Introduction to Modern Liquid Chromatography. 3rd ed. John Willey & Sons; 2009. 960 c.
38. ICH Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2 (R1). Geneva; 2005. Available from: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines> (accessed on 22 March 2023).
39. Typlynska K, Kondratova Y, Logoyda L. Development of methods of quality control of the tablets «Ramipril». Sci Pharm. 2023;91(2):21.
40. Typlynska K, Logoyda L. Development of the HPLC method for the determination of related substances in ramipril tablets. In: MOL2NET'22, Conference on Molecular, Biomedical & Computational Sciences and Engineering, 8th ed. congress CHEMBIOMOL-08: Chem. Biol., Org. Chem., Med. Chem., Pharm. Ind., & Mol. Biol. Congress; 2022 December 28. Paris, France-Galveston, USA; 2022. Available from: <https://sciforum.net/paper/view/13919>
41. Typlynska K. Development of the HPLC method for the routine determination of ramipril in tablets. В: Матеріали XXVII конгресу студентів та молодих учених Майбутнє за наукою; 2023 квіт. 10-12; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2023. с. 177.
42. Типлинська КВ, Логойда ЛС. Валідація методики контролю якості таблеток Раміприлу за показником «розчинення». В: Матеріали XV Всеукраїнської наукової конференції студентів та аспірантів Хімічні Каразінські читання – 2023; 2023 квіт. 24-26; Харків. Харків; 2023. с. 84.
43. Монайкіна ЮВ. Застосування сульфоталеїнових барвників у спектрофотометричному аналізі лікарських засобів [дисертація]. Запоріжжя: Запорізький державний медичний університет; 2011. 177 с.
44. Жук ЮМ, Васюк СО. Застосування сульфоталеїнових барвників в аналізі бета-адреноблокаторів. Український науково-медичний молодіжний журнал. 2013;4(74):322-3.

45. Жук ЮМ, Васюк СО, Кейтлін ІМ. Спектрофотометричне визначення бісопрололу за реакцією з тимоловим синім. Запорізький медичний журнал. 2012;72(3):62-4.
46. Basavaiah K, Chandrashekar U, Prameela H, Nagegowda P. Quantitative determination of propranolol with bromate and methyl orange. Acta Ciencia Indica. Chemistry. 2003;29:25-30.
47. Лебідь ЮМ. Спектрофотометричне визначення сальбутамолу в аерозолі за реакцією з бромкрезоловим зеленим. Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики. 2011;XXIV(2):90-2.
48. Panainte AD, Bibire N, Tantar G, Mihaipostu M, Madalina V, Vasile D. A New Method for the Assay of Bisoprolol Using Bromocresol Green. Rev Chim (Bucharest). 2014;65(8):916-20.
49. Бурлака ЮВ, Тарханова ОО, Васюк СО. Спектрофотометричне визначення цефтриаксону. Запорізький медичний журнал. 2009;6:93-4.
50. Бурлака ЮВ, Портна КП, Тарханова ОО, Васюк СО. Спектрофотометричне визначення деяких цефалоспоринів за реакцією з крезоловим червоним. Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики. 2010;XXIII(4):17-9.
51. Бурлака ЮВ, Тарханова ОО, Васюк СО, Кейтлін ІМ. Спектрофотометричне визначення клотримазолу у лікарських формах. Запорізький медичний журнал. 2010;4:63-6.
52. Бурлака ЮВ, Тарханова ОО, Васюк СО, Кейтлін ІМ. Визначення флуконазолу в лікарських формах за реакцією з бромтимоловим синім. Фармацевтичний журнал. 2010;3:69-75.
53. Prashanth KN, Basavaiah K, Raghu MS. Rapid and Sensitive Spectrophotometric Measurement of Non-Specific Beta Blocker Propranolol Hydrochloride Using Three Sulphonphthalein Dyes In Pure Form, Pharmaceuticals and Human Urine. Chemical Sciences Journal. 2012;2012:CSJ-80.

54. Cardoso SG, Ieggli CV, Pomblum SC. Spectrophotometric determination of carvedilol in pharmaceutical formulations through charge-transfer and ion-pair complexation reactions. *Pharmazie*. 2007;62(1):34-7.
55. Liu S, Zhang Z, Liu Q, Luo H, Zheng W. Spectrophotometric determination of vitamin B1 in a pharmaceutical formulation using triphenylmethane acid dyes. *J Pharm Biomed Anal*. 2002;30(3):685-94.
56. Aydogmus Z, Barla A. Spectrophotometric determination of doxazosin mesylate in tablets by ion-pair and charge-transfer complexation reactions. *J AOAC Int*. 2009;92(1):1231-37.
57. Ramesh KC, Gowda BG, Melwanki MB, Seetharamappa J, Keshavayya J. Extractive spectrophotometric determination of antiallergic drugs in pharmaceutical formulations using bromopyrogallol red and bromothymol blue. *Anal Sci*. 2001;17(9):1101-3.
58. Erk N. Spectrophotometric determination of indinavir in bulk and pharmaceutical formulations using bromocresol purple and bromothymol blue. *Pharmazie*. 2004;59(3):183-6.
59. Gowda BG, Melwanki MB, Seetharamappa J. Extractive spectrophotometric determination of ceterizine in pharmaceutical preparations. *J Pharm Biomed Anal*. 2001;25(5-6):1021-6.
60. El-Didamoni AM. Extractive spectrophotometric methods for the determination of oxememazine hydrochloride in bulk and pharmaceutical formulations using bromocresol green, bromocresol purple and bromophenol blue. *Arch Pharm*. 2005;338(4):190-7.
61. Rahman N, Hejaz Azmi SN. Extractive spectrophotometric methods for determination of diltiazem HCl in pharmaceutical formulations using bromothymol blue, bromophenol blue and bromocresol green. *J Pharm Biomed Anal*. 2000;24(1):33-41.
62. Rahman N, Khan NA, Azmi SNH. Extractive spectrophotometric methods for the determination of nifedipine in pharmaceutical formulations using bromocresol

- green, bromophenol blue, bromothymol blue and eriochrome black T. *II Farmaco*. 2004;59(1):47-54.
63. Ashour S, Chenna MF, Bayram R. Spectrophotometric determination of alfuzosin HCL in pharmaceutical formulations with some sulphonephthalein dyes. *Int J Biomed Sci*. 2006;2(3):273-9.
64. Suslu I, Tamer A. Spectrophotometric determination of enoxacin as ion-pairs with bromophenol blue and bromocresol purple in bulk and pharmaceutical dosage form. *J Pharm Biomed Anal*. 2002;29(3):545-54.
65. Marona HR, Schapoval EE. Spectrophotometric determination of sparfloxacin in Pharmaceutical formulations using bromothimol blue. *J Pharm Biomed Anal*. 2001;26(3):501-4.
66. Ashour S, Al-Khalil R. Simple extractive colorimetric determination of levofloxacin by acid-dye complexation methods in pharmaceutical preparations. *Farmaco*. 2005 Sep;60(9):771-5.
67. Amin AS, El-Fetouh Gouda AA, El-Sheikh R, Zahran F. Spectrophotometric determination of gatifloxacin in pure form and in pharmaceutical formulation. *Spectrochim. Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2007;67(5):1306-12.
68. Mostafa S, El-Sadek M, Alla EA. Spectrophotometric determination of enrofloxacin and pefloxacin through ion-pair complex formation. *J Pharm Biomed Anal*. 2002;28(1):173-80.
69. Nour El-Dien FA, Mohamed GG, Mohamed NA. Spectrophotometric determination of trazodone, amineptine and amitriptyline hydrochlorides trough ion-pair formation using methyl orange and bromocresol green reagents. *Spectrochim. Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2006;65(1):20-6.
70. Ulu ST, Aydogmus Z. A new spectrophotometric method for the determination of tianeptine in tablets using ion-pair reagents. *Chem Pharm Bull*. 2008;56(12):1635-8.
71. Shulyak N, Protsyk S, Kucher T, Kryskiw L, Poliak O, Zarivna N, Logoyda L. Development of the spectrophotometric method for the determination of

- atorvastatin in tablets by using bromothymol blue. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022;4(38):89-97.
72. Shulyak N, Protsyk S, Kucher T, Kryskiw L, Poliak O, Mosula L, Logoyda L. Development of the Spectrophotometric Method for the Determination of Atorvastatin Calcium in Tablets by using Bromophenol Blue. *Methods and objects of chemical analysis*. 2022;17(3):111-7.
73. 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;68(4):851-8.
74. Horyn M, Kucher T, Kryskiw L, Poliak O, Zarivna N, Peleshok K, Logoyda L. Development of the spectrophotometric method for the determination of metoprolol tartrate in tablets by using bromocresol green. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022;5(39):55-63.
75. Horyn M, Kryskiw L, Kucher T, Poliak O, Zarivna N, Zahrychuk H, Korobko D, Peleshok K, Logoyda L. Development of the spectrophotometric method for the determination of metoprolol in tablets by using bromophenol blue. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022;6(40):36-42.
76. Horyn M, Piponski M, Melnyk O, Ivanchuk I, Susla O, Grytsyshyn L, Korobko D, Logoyda L. Development of the Spectrophotometric Method for the Determination of Metoprolol in Tablets by using Bromothymol Blue. *Methods and objects of chemical analysis*. 2023;18(2):63-69.
77. Kryskiw L, Horyn M, Kucher T, Zarivna N, Poliak O, Logoyda L. Novel eco-friendly spectrophotometric determination of lercanidipine hydrochloride in tablets using methyl red. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2024;3(49):47-53.
78. Halka L, Kucher T, Kryskiw L, Piponski M, Horyn M, Poliak O, Zarivna N, Logoyda L. Full green assay of rosuvastatin utilizing sulphophtalein dyes: application to tablet analysis. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2024;3(49):4-13.

79. Vinay KB, Revanassiddappa HD, Rajendraprasad N, Ramesh PJ, Xavier CM, Basavaiah K. Use of two sulfonphthalein dyes in the extraction-free spectrophotometric assay of tramadol in dosage forms and in spiked human urine based on ion-pair reaction. *Drug Testing and Analysis*. 2012;4(2):116-22.
80. Prashanth KN, Basavaiah K, Vinay KB. Sensitive and selective spectrophotometric assay of rizatriptan benzoate in pharmaceuticals using three sulphonphthalein dyes. *Arabian J Chem*. 2016;9:971-80.
81. Al-Shwaiyat MKEA, Galkina K, Sidorova LP, Zhuk LP, Matorina KV, Chernyavskaya AYU, et al. Use in pharmaceutical analysis of ionic association complexes formed between sulphonphthalein dyes and nitrogen-containing compounds in medium of organic solvents. *Journal of Chemistry and Technologies*. 2023;31(4):713-26.
82. Тишлинська К, Горин М. Розробка та валідація спектрофотометричної методики визначення раміприлу в таблетках за реакцією з бромкрезоловим зеленим. В: Матеріали XXVIII конгресу студентів та молодих учених Майбутнє за наукою; 2024 квіт. 8-10; Тернопіль. Тернопіль; 2024. с. 211.
83. Bromophenol Blue. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bromophenol-Blue#section=2D-Structure>
84. Cresol red. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cresol-red>
85. Green Solvent Selection Tool. Available from: <https://green-solvent-tool.herokuapp.com/>
86. Typlynska K, Horyn M, Kucher T, Kryskiw L, Logoyda L. Two masterful alternative spectrophotometric methods for the determination of ramipril in tablets. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2024;2(48):44-52.
87. Typlynska K, Horyn M, Kucher T, Kryskiw L, Logoyda L. Two alternative spectrophotometric methods for the determination of ramipril in tablets. В: Матеріали підсумкової LXVII науково-практичної конференції Здобутки

- клінічної та експериментальної медицини; 2024 черв. 13-14; Тернопіль. Тернопіль; 2024. с. 219-220.
88. Global report on hypertension: the race against a silent killer. World Health Organization; 2023. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240081062> (accessed on 25 March 2024).
89. Guideline for the pharmacological treatment of hypertension in adults: summary. World Health Organization; 2022. Available from: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/356108/9789240050969-eng.pdf?sequence=1> (accessed on 25 March 2024).
90. Biopharmaceutics classification system-based biowaivers (M9). ICH harmonised guideline. Available from: https://database.ich.org/sites/default/files/M9_Guideline_Step4_2019_11_16.pdf (accessed on 25 March 2024).
91. Bhushan B, Gupta S, Khajuria V, Kumar D, La M, Kumar D, et al. Comparative Efficacy and Safety of Triple Therapy (Ramipril, Telmisartan, Hydrochlorothiazide) Vs Dual Anti Hypertensive Therapy (Ramipril or Telmisartan, Hydrochlorothiazide) in Stage 2 Hypertensive Patients. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2014;8(8):25-8.
92. Heidbreder D, Froer KL, Bauer B, Cairns V, Breitstadt A. Efficacy and Safety of Ramipril in Combination with Hydrochlorothiazide Results of a Long-Term Study. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1991;18(2):169-73.
93. Zaid AN, Ghanem M, Maqboul L, Zaid H, Mahasne A. Biowaiver eligibility of a lower strength Ramipril/Hydrochlorothiazide immediate release tablets using a new validated HPLC analytical method. *Drug Research*. 2016;66(10):539-46.
94. Державний реєстр лікарських засобів України. Available from: <http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&atscode=C09BA0> (accessed on 25 March 2024).

95. Nagavi JB, Anantharaju PG. Analytical RP-HPLC method development and validation for the simultaneous estimation of ramipril and hydrochlorothiazide in tablet dosage form. *American Journal of PharmTech Research*. 2014;4(4):349-65.
96. Типлинська КВ, Логойда ЛС. Розробка і валідація методики визначення раміприлу та гідрохлортіазиду для вивчення профілів розчинення. *Медична та клінічна хімія*. 2024;(1):124-33.
97. Типлинська КВ, Логойда ЛС. Валідація методики одночасного визначення раміприлу та гідрохлортіазиду для вивчення профілів розчинення. В: *Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку»*; 2024 квіт. 9-12; Одеса. Одеса; 2024. с. 236-238.
98. Lakshmi KS, Sivasubramanian L. A stability indicating HPLC method for the simultaneous determination of valsartan and ramipril in binary combination. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 2010;55(2):223-6.
99. Latha YBM, Sankar DG. Stability indicating rp-hplc method for determination of ramipril in pure and pharmaceutical formulation. *Asian J Pharm Clin Res*. 2013;6(8):158-61.
100. Mahajan AA, Thaker AK, Mohanraj K. LC, LC-MS/MS studies for the identification and characterization of degradation products of hydrochlorothiazide and establishment of mechanistic approach towards degradation. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2012;23(3):445-52.
101. Bhagwate S, Gaikwad N. Stability indicating HPLC method for the determination of hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage form. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2013;3(2):088-92.
102. Rao AL, Varma D, Dinda SC. Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous Determination of telmisartan and hydrochlorothiazide in Pharmaceutical dosage form. *Int Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*. 2012;2(3):382-91.

103. Типлинська КВ, Логойда ЛС. Дослідження профілів деградації раміприлу та гідрохлортіазиду як етап розробки методів визначення вмісту домішок у комбінованому препараті. Медична та клінічна хімія. 2023;(4):14-20.
104. Типлинська КВ, Логойда ЛС. Дослідження деградації раміприлу у монопрепараті та в комбінації раміприлу з гідрохлортіазидом. В: Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 25-річчю фармацевтичного факультету Національного медичного університету імені О. О. Богомольця, Фармацевтична освіта, наука та практика: стан, проблеми, перспективи розвитку; 2023 груд. 19-20; Київ. Київ; 2023. с. 405.
105. Resto W, Hernandez D, Rey R. Cleaning validation 2: development and validation of an ion chromatographic method for the detection of traces of CIP-100 detergent. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007;44(1):265-9.
106. Bubric Z, Urleb U, Kreft K. The application of atomic absorption spectrometry for the determination of residual active pharmaceutical ingredients in cleaning validation samples. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2011;37(3):281-9.
107. Kolodsick KJ, Phillips H, Feng J, Kingsmill CA. Enhancing Drug development by Applying LC-MS-MS for Cleaning Validation in Manufacturing Equipment. *Pharmaceutical Technology*. 2006;30(2):56-72.
108. Typlynska K, Kondratova Y, Horyn M, Logoyda L. Ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry methods for the determination of the residual quantities of ramipril and hydrochlorothiazide for controlling the cleaning of equipment. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2024;4:35-43.
109. Szpot P, Buszewicz G. Determination of ramipril in human plasma and its fragmentation by UPLC-Q-TOF-MS with positive electrospray ionization. *Acta Pharmaceutica*. 2015;65(2):159-69.
110. Sahu PK, Ramiseti NR, Cecchi T, Swain S, Patro CS, Panda J. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018;147:590-611.

111. Hibbert DB. Experimental design in chromatography: a tutorial review. *J Chromatogr B*. 2012;910:2-13.
112. Napolitano-Tabares PI, Negrín-Santamaría I, Gutiérrez-Serpa A, Pino V. Recent efforts to increase greenness in chromatography. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. 2021;32:100536.
113. Płotka J, Tobiszewski M, Sulej AM, Kupaska M, Górecki T, Namieśnik J. Green chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2013;1307:1-20.
114. Cecchi T. *Ion-Pair Chromatography and Related Techniques*. CRC Press Taylor & Francis Group LLC, Boca Raton FL; 2009. 215 p.
115. Kazakevich YV, Lobrutto R. *HPLC for pharmaceutical scientists*. John Wiley & Sons; 2007. p. 206-228.
116. Ahuja S, Dong MW. *Handbooh of pharmaceutical analysis by HPLC*. Amsterdam: Elsevier scince; 2005. 679 p.
117. Sadek PC. *The HPLC Solvent Guide*. Second ed. New York: Wiley & Sons; 2002. 664 p.
118. Khan I, Mulpuri K, Das B, Mohiuddin MD, Rahman MHUr. Analytical Techniques (Chromatography, Spectroscopy, Electrophoresis) In Pharmaceutical Analysis: A Review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Nano Sciences*. 2015;4(1):19-27.
119. Kupiec T. Quality control Analytical Methods: high-performance liquid chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. 2004;8(3):233-7.
120. Ahuja S. High Pressure Liquid Chromatography. In: Ahuja S, Jespersen N. (eds.). *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier; 2006. Chapter 15. p. 486-559.
121. Atole D, Deokate U. Insight into baseline troubles and problem resolutions in high-performance liquid chromatography. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2020;13(7):35-8.
122. Eswarudu MM, Eswaraiah MC, Kumar KP, Sudhakar K. Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC): A Preeminent Technique in Pharmaceutical Analysis. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2012;5(12):1484-9.

123. Patil VP, Tathe RD, Devdhe SJ, Angadi SS, Kale SH. Ultra-performance liquid chromatography: A review. *International Research Journal of Pharmacy*. 2011;2(6):39-44.
124. Anagha SP. A Review On Ultra Performance Liquid Chromatography. *Asian Journal of Pharmaceutical Technology and Innovation*. 2015;3(10):86-96.
125. Srivastava B. Ultra-performance liquid chromatography (UPLC): A chromatography technique. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*. 2010;2(1):19-25.
126. Sharath CS, Priyanka G, Dhanalakshmi K, Nagarjun R. Switch from HPLC to UPLC: A novel achievement in liquid chromatography technique – A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2013;21(1):237-46.
127. Kumar A, Saini G, Nair A, Sharma R. UPLC: A preeminent technique in pharmaceutical analysis. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*. 2012;69(3):1-381.
128. Deore S, Saudagar R. A review on ultra-performance liquid chromatography (UPLC): a chromatography technique. *International Journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences*. 2016;5(3):223.
129. Novakova L, Matysova L, Solich P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*. 2006;8(3):908-18.
130. Chawla G, Ranjan C. Principle, Instrumentation, and Applications of UPLC: A Novel Technique of Liquid Chromatography. *Open Chemistry Journal*. 2016;3:1-16.
131. Roge AB, Firke SN, Dhane RM, Gunjkar VJ, Vadvalkar SM. Novel achievement of HPLC: UPLC. *International Journal of PharmaTech Research*. 2011;3(3):1423-9.
132. Swetha SR, Bhavya SK, Mounika C. A Review on Comparative study of HPLC and UPLC. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2020;13(3):1570-4.

133. Gaikwad PV, Sawant SD, Ghante MR, Munot NM. Ultra-Performance Liquid Chromatography: A recent novel development in HPLC. *International Journal of Comprehensive Pharmacy*. 2010;2(08):1-3.
134. Gumułka P, Zandarek J, Dąbrowska M, Starek M. UPLC Technique in Pharmacy – An Important Tool of the Modern Analyst. *Processes*. 2022;10(12):2498.
135. Ganesh V, Poorna Basuri P, Sahini K, Nalini CN. Retention behaviour of analytes in reversed-phase high-performance liquid chromatography – A review. *Biomed Chromatogr*. 2023;37(7):e5482.
136. Moldoveanu SC, David V. Solvents, buffers, and additives used in the Mobile phase. In: *Selection of the HPLC method in chemical analysis*. 2017. p. 393-450.
137. Espinoza S, Bosch E, Roses M. Retention of ionizable compounds in HPLC. 14. Acid-base pK values in acetonitrile-water mobile phases. *J Chromatogr A*. 2002;964(1-2):55-66.

ДОДАТОК А

Список публікацій здобувача:

1. Typlynska K, Kondratova Y, Horyn M, Logoyda L. Ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry methods for the determination of the residual quantities of ramipril and hydrochlorothiazide for controlling the cleaning of equipment. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2024;4:35-43. **(SCOPUS, Q3)**
2. Typlynska K, Kondratova Y, Logoyda L. Development of methods of quality control of the tablets «Ramipril». *Sci Pharm*. 2023;91(2):21. **(SCOPUS, Q2)**
3. Типлинська КВ, Логойда ЛС. Дослідження профілів деградації раміприлу та гідрохлортіазиду як етап розробки методів визначення вмісту домішок у комбінованому препараті. *Медична та клінічна хімія*. 2023;(4):14-20.
4. Типлинська КВ, Логойда ЛС. Розробка і валідація методики визначення раміприлу та гідрохлортіазиду для вивчення профілів розчинення. *Медична та клінічна хімія*. 2024;(1):124-33.
5. Typlynska K, Horyn M, Kucher T, Kryskiw L, Logoyda L. Two masterful alternative spectrophotometric methods for the determination of ramipril in tablets. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2024;2(48):44-52. **(SCOPUS, Q3)**
6. Typlynska K, Logoyda L. Development of the HPLC method for the determination of related substances in ramipril tablets. In: *MOL2NET'22, Conference on Molecular, Biomedical & Computational Sciences and Engineering, 8th ed. congress CHEMBIOMOL-08: Chem. Biol., Org. Chem., Med. Chem., Pharm. Ind., & Mol. Biol. Congress; 2022 December 28. Paris, France-Galveston, USA; 2022. Available from: <https://sciforum.net/paper/view/1391>.*
7. Typlynska K. Development of the HPLC method for the routine determination of ramipril in tablets. В: *Матеріали XXVII конгресу студентів та молодих учених Майбутнє за наукою; 2023 квіт. 10-12; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2023. с. 177.*
8. Типлинська КВ, Логойда ЛС. Валідація методики контролю якості таблеток Раміприлу за показником «розчинення». В: *Матеріали XV*

Всеукраїнської наукової конференції студентів та аспірантів Хімічні Каразінські читання – 2023; 2023 квіт. 24-26; Харків. Харків; 2023. с. 84.

9. Типлинська КВ, Логойда ЛС. Дослідження деградації раміприлу у монопрепараті та в комбінації раміприлу з гідрохлортіазидом. В: Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 25-річчю фармацевтичного факультету Національного медичного університету імені О. О. Богомольця, Фармацевтична освіта, наука та практика: стан, проблеми, перспективи розвитку; 2023 груд. 19-20; Київ. Київ; 2023. с. 405.

10. Типлинська К, Горин М. Розробка та валідація спектрофотометричної методики визначення раміприлу в таблетках за реакцією з бромкрезоловим зеленим. В: Матеріали XXVIII конгресу студентів та молодих учених Майбутнє за наукою; 2024 квіт. 8-10; Тернопіль. Тернопіль; 2024. с. 211.

11. Typlynska K, Horyn M, Kucher T, Kryskiw L, Logoyda L. Two alternative spectrophotometric methods for the determination of ramipril in tablets. В: Матеріали підсумкової LXVII науково-практичної конференції Здобутки клінічної та експериментальної медицини; 2024 черв. 13-14; Тернопіль. Тернопіль; 2024. с. 219-220.

12. Типлинська КВ, Логойда ЛС. Валідація методики одночасного визначення раміприлу та гідрохлортіазиду для вивчення профілів розчинення. В: Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку»; 2024 квіт. 9-12; Одеса. Одеса; 2024. с. 236-238.

ДОДАТОК Б

Відомості про апробацію результатів дисертації:

- Міжнародна конференція MOL2NET'22, Conference on Molecular, Biomedical & Computational Sciences and Engineering, 8th ed. congress CHEMBIOMOL-08: Chem. Biol., Organic Chemistry, Medicinal Chemistry, Pharmaceutical Industry, & Molecular Biology Congress (Paris, France-Galveston, USA, December 24, 2022) – *постерна доповідь та публікація*;
- XXVII конгрес студентів та молодих учених «Майбутнє за наукою» (м. Тернопіль, 10-12 квітня 2023 р.) – *публікація*;
- XXVIII конгрес студентів та молодих учених «Майбутнє за наукою» (м. Тернопіль, 8-10 квітня 2024 р.) – *публікація*;
- XV Всеукраїнська наукова конференція студентів та аспірантів «Хімічні Каразінські читання – 2023» (м. Харків, 24–26 квітня 2023 р.) – *публікація*;
- Науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 25-річчю фармацевтичного факультету Національного медичного університету імені О. О. Богомольця «Фармацевтична освіта, наука та практика: стан, проблеми, перспективи розвитку» (м.Київ, 19-20 грудня 2023 р.) – *усна доповідь та публікація*;
- LXVII науково-практична конференція «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (м. Тернопіль, 13-14 черв. 2024 р.) – *публікація*;
- Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку» (м.Одеса, 9-12 квітня 2024 р.) – *публікація*.

ДОДАТОК В.1



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Найменування пропозиції для впровадження:** Альтернативні спектрофотометричні методики визначення раміприлу в таблетках за реакціями з бромфеноловим синім та крезоловим червоним
- 2. Установа, автори:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, 46001, м. Тернопіль, Майдан Волі, 1, кафедра фармацевтичної хімії, Типлинська К. В., д.фарм.н., професор Логойда Л. С.
- 3. Джерела інформації:** Typlynska K., Horyn M., Kucher T., Kryskiw L., Logoyda L. Two masterful alternative spectrophotometric methods for the determination of ramipril in tablets // ScienceRise: Pharmaceutical Science. – 2024. - Vol. 2 (48). – P. 44-52.
- 4. Ефективність впровадження:** Запропоновані спектрофотометричні методики визначення раміприлу характеризується простотою у виконанні та експресністю.
- 5. Пропозиції:** розроблені методики може бути використані при здійсненні контролю якості лікарських засобів на основі раміприлу

Відповідальний за впровадження:

Завідувач лабораторії з контролю якості лікарських засобів та медичної продукції Державної служби з лікарських засобів та контролю за наркотиками у Тернопільській області

Марія ТКАЧ

« 10 » серпня 2024 року

ДОДАТОК В.2




2024 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** РОЗРОБКА МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ТАБЛЕТОК РАМІПРИЛУ
2. **Установа, автори:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, 46001, м. Тернопіль, Майдан Волі, 1, кафедра фармацевтичної хімії, Типлинська К. В., д.фарм.н., професор Логойда Л. С.
3. **Джерела інформації:**
Туplynska K., Kondratova Y., Logoyda L. Development of methods of quality control of the tablets «Ramipril» // Sci. Pharm. - 2023. - Vol. 91. - 21.
4. **Ефективність впровадження:** розроблені методики контролю якості таблеток раміприлу для цілей рутинного фармацевтичного аналізу
5. **Термін впровадження:** 01.06.2024-10.07.2024 р.
6. **Новизна результатів науково-технічної розробки:** розроблені методики хроматографічного визначення раміприлу в таблетках для впровадження у фармацевтичне виробництво при рутинному контролі якості лікарських засобів

«10» липня 2024 р.

Відповідальний за впровадження: *начальник ВКел*
Кудзельська і.ю.


ДОДАТОК В.3



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** РОЗРОБКА МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ТАБЛЕТОК РАМИПРИЛУ З ГІДРОХЛОРТІАЗИДОМ
2. **Установа, автори:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, 46001, м. Тернопіль, Майдан Волі, 1, кафедра фармацевтичної хімії, Типлинська К. В., д.фарм.н., професор Логойда Л. С.
3. **Джерела інформації:**
 1. Typlynska K. V., Logoyda L. S. Study of the degradation profiles of ramipril and hydrochlorothiazide as a stage in the development of method for determination impurities in the combined dosage form // Medical and Clinical Chemistry. – 2023. – Vol . 4. – P. 14-20.
 2. Типлинська К. В., Логойда Л.С. Розробка і валідація методики визначення раміприлу та гідрохлортіазиду для вивчення профілів розчинення // Медична та клінічна хімія. - 2024.-№ 1.- С.124-133.
4. **Ефективність впровадження:** розроблені методики контролю якості таблеток раміприлу з гідрохлортіазидом для цілей рутинного фармацевтичного аналізу
5. **Термін впровадження:** 01.06.2024-10.07.2024 р.
6. **Новизна результатів науково-технічної розробки:** розроблені методики хроматографічного визначення раміприлу з гідрохлортіазидом в таблетках для впровадження у фармацевтичне виробництво при рутинному контролі якості лікарських засобів

«10» *листопада* 2024 р.

Відповідальний за впровадження: *нагальницька ВКел*

Кузьменко І.Ю.