

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

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ДРУЧОК Мар'яна Іванівна

УДК 615.7:543.544.5

ДИСЕРТАЦІЯ
ВИКОРИСТАННЯ ХАОТРОПНИХ СОЛЕЙ ЯК СУЧАСНОГО
ПІДХОДУ У РІДИННІЙ ХРОМАТОГРАФІЇ ДЛЯ
ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ

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

_____ М. І. Дручок

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

Тернопіль – 2026

АНОТАЦІЯ

Дручок М. І. Використання хаотропних солей як сучасного підходу у рідинній хроматографії для фармацевтичного аналізу. – 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, 2026.

Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України, Тернопіль, 2026.

У дисертаційній роботі наведено теоретичне та експериментальне вирішення актуального наукового завдання, що полягає у застосуванні хаотропних солей у рідинній хроматографії як сучасного підходу для покращення ефективності фармацевтичного аналізу, зокрема шляхом підвищення утримування та селективності, отримання симетричних піків, спрощення хроматографічних умов, скорочення часу аналізу та створення експресних, точних, економічно ефективних і екологічно безпечних методик визначення АФІ і їх супровідних речовин.

Представлено позитивну роль хаотропних солей у розробці швидких, простих, «зелених» та економічно ефективних методів обернено-фазової високо-ефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Включення сильних хаотропних солей до складу рухомої фази під час хроматографічного визначення показало значне спрощення методики та скорочення часу аналізу. Проведено та представлено два окремі експерименти з використанням різних наборів змінних параметрів: перший – із застосуванням найсильнішого хаотропного аніона PF_6^- , який взаємодіє з аналітом цисплатином та алкілзв'язаними обернено-фазовими колонками C18 і C8; другий – із застосуванням хаотропного аніона ClO_4^- , що взаємодіє з аналітом феніраміном і феніл-

зв'язаною стаціонарною фазою. Отримані результати підтвердили високу придатність і ефективність використання цих солей у розробці аналітичних методів контролю лікарських засобів. Проведені дослідження продемонстрували переваги застосування різних хаотропних солей для регулювання сили взаємодій між аналітами та зв'язаними лігандами. Це дало змогу розробити методики, особливо для аналізу полярних молекул із слабким утримуванням, які елюють близько до мертвого об'єму або мертвого часу колонок. Запропонований підхід дозволяє уникнути використання іон-парних реагентів, а також необхідності формування іонних пар і застосування окремих колонок для іон-парної хроматографії. Це робить методики більш універсальними та придатними для повної валідації аналізу складних і проблемних молекулярних структур, таких фенірамін із його супровідними речовинами. Загальний економічний ефект продемонстровано через зменшення часу аналізу, споживання органічних розчинників, тривалості експлуатації обладнання та трудових витрат. Запропонована методика є лінійною у діапазоні концентрацій 5–30 мкг/мл з $R^2 > 0.999$ для феніраміну малеату та 0.025–0.5 мкг/мл з $R^2 > 0.9997$ для визначення цисплатину. Усі параметри валідації відповідали критеріям прийнятності щодо лінійності, правильності та прецизійності, робасності. Загальний ефект від застосування хаотропних агентів проявляється у забезпеченні «зеленого» аналізу за наявності супровідних речовин із формуванням симетричних піків для запропонованих методик ВЕРХ.

Провідні Фармакопеї світу регламентують проводити хроматографічне визначення карбоплатину з використанням аміно-пропільної хроматографічної колонки (клас L8). Ми у своїй роботі пропонуємо застосування солей хаотропних аніонів у складі рухомої фази на хроматографічній колонці C18 (Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм) як перспективний підхід для розробки ВЕРХ методик карбоплатину в лікарських засобах, що дасть змогу покращити утримування та форму піка. Важливою

перевагою застосування солей хаотропних аніонів у складі рухомої фази є покращення симетрії піків та їх утримування, а також скорочення часу аналізу. Це можна досягнути використанням низьких кількостей ацетонітрилу (ACN) (5-10 %) та високих кількостей буферного розчину 40-50 мМ одного з найсильніших хаотропів за теорією Гофмейстера KPF_6 (рН 2.3-2.5) в складі рухомої фази на колонках C18 або C8. Встановлено оптимальні хроматографічні умови визначення карбоплатину в лікарському засобі: хроматографічна колонка Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм), рухома фаза – 5 % ACN та 95 % буферний розчин KPF_6 (40 мМ) рН 2.43, температура колонки – 30° С, детектування за довжини хвилі 195 нм, швидкість потоку – 0.6 мл/хв. Лінійність вивчали в діапазоні 15-90 мкг/мл та розраховували рівняння регресії ($y=10148x + 56213$) з коефіцієнтом кореляції ($R^2=0.9986$). Розроблено експресну, просту, відтворювану та «зелену» ВЕРХ методику визначення карбоплатину в лікарських засобах з використанням солей хаотропних аніонів. Запропонована ВЕРХ методика дає змогу провести хроматографування та кількісне визначення карбоплатину на C18 октадецилсилільній колонці та без застосовування іон-парних реагентів.

Розроблено методику обернено-фазової ВЕРХ одночасного визначення надзвичайно полярних молекул цисплатину та карбоплатину, які не мають УФ-абсорбції, в модельній суміші з використанням солей хаотропних аніонів. Хаотропні агенти покращують утримування основних молекул в кислотних рухомих фазах на колонах з оберненою фазою та покращують форму піків і симетрії. Хаотропні аніони, які збільшують взаємодію між основним N-вмісним аналітом і алкільними ланцюгами лігандів з оберненою фазою, такими як C-8 та C-18, часто використовуються для підвищення та покращення ефективності методик ВЕРХ. Експериментально встановлені оптимальні хроматографічні умови: рухома фаза – 40 мМ буферний розчин KPF_6 (рН 2.4) та ACN (95:5), хроматографічна колонка – Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм), температура колонки – 30 °С, швидкість потоку – 0.4 мл/хв, довжина хвилі

детектування – 210 нм. Лінійність оцінювали за допомогою п'яти рівнів кожного з досліджуваних препаратів, де концентрація варіювалася в діапазоні 20–100 мкг/мл. Запропонована ВЕРХ методика є екологічною, що підтверджено найсучаснішими метриками для вивчення «зеленості» (AGREE, MoGAPI, комплекс MoGAPI, AGSA, CaFRI та CACI).

Провідні Фармакопеї світу регламентують проведення хроматографічного визначення еналаприлу в субстанції градієнтним елююванням (на 30 хв) з використання хроматографічної колонки 4.1 мм × 15 см, 5 мкм класу L21, температури 70 °С, швидкості потоку 1.5 мл/хв та в таблетках на колонці класу L7, температури 50 °С, швидкості потоку 2.0 мл/хв з використанням ізократичного елюювання ACN та буфером (розчином натрію дигідрогенфосфату у воді, доведений кислотою фосфорною до рН 2.2) (250:750). Ми пропонуємо застосування солей хаотропних аніонів у складі рухомої фази на хроматографічній колонці C18 як перспективний підхід для отримання симетричного піку еналаприлу, який елюється не близько мертвого об'єму. Використання солей хаотропних аніонів у рухомій фазі під час ВЕРХ визначення еналаприлу дало змогу скоротити час аналізу (проте не проводити його визначення близько мертвого об'єму) та покращити симетрію піка еналаприлу. В процесі проведених експериментальних досліджень встановлено оптимальні хроматографічні умови для проведення кількісного визначення еналаприлу в таблетках: хроматографічна колонка Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм), рухома фаза – 2 % ACN та 98 % буферний розчин KPF₆ 40 мМ рН 2.43, температура колонки – 30 °С, детектування за довжини хвилі 210 нм. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 40-120 мкг/мл. Рівняння регресії $y=14166x - 9589.2$, коефіцієнт кореляції $R^2 = 0.9972$. Сучасними інструментами вивчення зеленості AGREE (бал 0,74), MoGAPI (бал 81), Complex MoGAPI (бал 81), AGSA (бал 77,78), CaFRI (бал 82) та CACI (бал 79) підтверджено, що запропонована ВЕРХ методика є «зеленою».

Аналіз каптоприлу за допомогою обернено-фазової рідинної хроматографії не є складним завданням, проте через пролінову структуру каптоприл може елююватися близько мертвого об'єму, що створює проблеми у проведенні кількісного визначення. Другою проблемою є схильність піка каптоприлу до деформації із хвостовим ефектом та давати несиметричний пік. Ми у своїй роботі пропонуємо застосування солей хаотропних аніонів у складі рухомої фази на колонці C18 як перспективний підхід до ефективної аналітичної розробки, що дасть змогу покращити утримування та форму піка каптоприлу. За умов рухомої фази ACN–вода, PF_6^- проявляє найбільше утримування і є найліофільнішим іоном у серії Гоффмейстера. В результаті проведених численних експериментальних досліджень встановлено оптимальні хроматографічні умови визначення каптоприлу в таблетках: хроматографічна колонка Zorbax SB-C18 (150 x 4.6 мм 3.5 мкм), рухома фаза – 30 % ACN та 70 % буферний розчин рН 2.10 (0.25 % KPF_6 , 0.1 % HClO_4 , 0.1 % KH_2PO_4), температура колонки – 40° С, детектування за довжини хвилі 200 нм, швидкість потоку – 1.0 мл/хв, розчинник – рухома фаза. Лінійність аналітичної методики вивчали в діапазоні 40-120 мкг/мл методом найменших квадратів та розраховували рівняння регресії ($y=12096x-45214$) з коефіцієнтом кореляції ($R^2=0.9998$). Найсучаснішими інструментами вивчення зеленості AGREE (бал 0.72), MoGAPI (бал 81), Complex MoGAPI (бал 81), AGSA (бал 73.61), CaFRI (бал 74) та CASI (бал 82) встановлено, що запропонована ВЕРХ методика є екологічно безпечною. Запропонована ВЕРХ методика дає змогу провести кількісне визначення каптоприлу в таблетках з отриманням симетричного піку, який не елююється близько мертвого об'єму. Окрім того, розроблена ВЕРХ методика може бути використана для аналізу супровідних домішок.

Розроблені ВЕРХ методики визначення феніраміну, карбоплатину та цисплатину, каптоприлу та еналаприлу в лікарських засобах можуть

застосовуватися як у рутинному фармацевтичному аналізі, так і при тестуванні незалежними лабораторіями.

Ключові слова: фармацевтичний аналіз, хаотропні солі, феніраміну малеат, карбоплатин, цисплатин, еналаприл, каптоприл, лікарські засоби, валідація, високоефективна рідинна хроматографія.

ANNOTATION

Druchok M. I. Use of Chaotropic Salts as a Modern Approach in Liquid Chromatography for Pharmaceutical Analysis. – 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, 2026.

I. Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, city of Ternopil, 2026.

In the dissertation, a theoretical and experimental solution to an important scientific problem is presented, which involves the application of chaotropic salts in liquid chromatography as a modern approach to improving the efficiency of pharmaceutical analysis, particularly by enhancing retention and selectivity, obtaining symmetrical peaks, simplifying chromatographic conditions, reducing analysis time, and developing rapid, accurate, cost-effective, and environmentally safe methods for the determination of active pharmaceutical ingredients (APIs) and their related substances.

The beneficial role of chaotropic salts in the development of rapid, simple, green, and cost-effective reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) methods is demonstrated. The inclusion of strong chaotropic salts in the mobile phase during chromatographic determination significantly simplified the analytical procedures and reduced analysis time.

Two independent experiments using different sets of variables were performed and presented. The first experiment involved the strongest chaotropic anion PF_6^- , interacting with the analyte cisplatin on alkyl-bonded reversed-phase columns C18 and C8. The second experiment involved the chaotropic anion ClO_4^- , interacting with the analyte pheniramine on a phenyl-bonded stationary phase. The obtained results confirmed the high applicability and effectiveness of these salts in the development of analytical methods for pharmaceutical quality control.

The conducted studies demonstrated the advantages of using various chaotropic salts to regulate the strength of interactions between analytes and bonded ligands. This enabled the development of analytical methods particularly suitable for highly polar molecules with weak retention, which typically elute near the void volume or void time of chromatographic columns. The proposed approach eliminates the need for ion-pairing reagents and specialized columns for ion-pair chromatography. Consequently, the developed methods become more universal and suitable for full validation of analyses involving complex molecular structures, such as pheniramine and its related substances.

The overall economic benefit was demonstrated through reduced analysis time, decreased consumption of organic solvents, prolonged equipment lifetime, and reduced labor costs. The proposed method showed linearity within the concentration range 5–30 $\mu\text{g/mL}$ with $R^2 > 0.999$ for pheniramine maleate and 0.025–0.5 $\mu\text{g/mL}$ with $R^2 > 0.9997$ for cisplatin determination. All validation parameters met the acceptance criteria for linearity, accuracy, precision, and robustness. The overall effect of using chaotropic agents is expressed in enabling green analysis in the presence of related substances with symmetrical peak formation for the proposed HPLC methods.

Leading pharmacopoeias of the world regulate the chromatographic determination of carboplatin using an aminopropyl chromatographic column (class L8). In this work, the use of chaotropic anion salts in the mobile phase on a C18 column (Luna C18, $100 \times 4.6 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$) is proposed as a promising approach for

developing HPLC methods for carboplatin in pharmaceutical formulations, allowing improvement of both retention and peak shape. An important advantage of using chaotropic anion salts in the mobile phase is the improvement of peak symmetry and retention, as well as a reduction in analysis time. This can be achieved by using low amounts of acetonitrile (ACN) (5–10 %) and high concentrations of buffer solution (40–50 mM) of one of the strongest chaotropes according to the Hofmeister series, KPF_6 (pH 2.3–2.5) in the mobile phase on C18 or C8 columns.

Optimal chromatographic conditions for carboplatin determination in pharmaceutical dosage forms were experimentally established: Luna C18 column (100 × 4.6 mm, 3 μm), mobile phase consisting of 5 % ACN and 95 % KPF_6 buffer solution (40 mM) pH 2.43, column temperature 30 °C, detection wavelength 195 nm, and flow rate 0.6 mL/min. Linearity was studied in the concentration range 15–90 $\mu\text{g/mL}$, and the regression equation ($y = 10148x + 56213$) with a correlation coefficient $R^2 = 0.9986$ was obtained. A rapid, simple, reproducible, and green HPLC method for carboplatin determination in pharmaceutical preparations using chaotropic anion salts was developed. The proposed method enables chromatographic separation and quantitative determination of carboplatin on a C18 octadecylsilane column without the use of ion-pairing reagents.

A reversed-phase HPLC method for the simultaneous determination of highly polar molecules cisplatin and carboplatin, which exhibit weak UV absorption, in a model mixture using chaotropic anion salts was also developed. Chaotropic agents improve the retention of basic molecules in acidic mobile phases on reversed-phase columns and enhance peak shape and symmetry. Chaotropic anions increase interactions between basic nitrogen-containing analytes and alkyl chains of reversed-phase ligands such as C8 and C18, thereby improving HPLC separation efficiency.

The experimentally established optimal chromatographic conditions were: mobile phase consisting of 40 mM KPF_6 buffer (pH 2.4) and ACN (95:5), Luna C18 column (100 × 4.6 mm, 3 μm), column temperature 30 °C, flow rate 0.4 mL/min,

and detection wavelength 210 nm. Linearity was evaluated at five concentration levels in the range 20–100 µg/mL. The proposed HPLC method was shown to be environmentally friendly, as confirmed by modern greenness metrics AGREE, MoGAPI, Complex MoGAPI, AGSA, CaFRI, and CACI.

Leading pharmacopoeias regulate chromatographic determination of enalapril using gradient elution with analysis time up to 30 minutes. In this work, the use of chaotropic anion salts in the mobile phase on a C18 column is proposed as a promising approach for obtaining symmetrical enalapril peaks without elution near the void volume. The use of chaotropic salts allowed shortening the analysis time and improving peak symmetry.

Optimal chromatographic conditions for enalapril determination in tablets were established: Luna C18 column (100 × 4.6 mm, 3 µm), mobile phase consisting of 2 % ACN and 98 % KPF₆ buffer (40 mM) pH 2.43, column temperature 30 °C, and detection wavelength 210 nm. The method was linear within the range 40–120 µg/mL, with regression equation $y = 14166x - 9589.2$ and correlation coefficient $R^2 = 0.9972$. Greenness assessment using AGREE (0.74), MoGAPI (81), Complex MoGAPI (81), AGSA (77.78), CaFRI (82), and CACI (79) confirmed that the proposed HPLC method is environmentally friendly.

The analysis of captopril by reversed-phase liquid chromatography is generally straightforward; however, due to its proline structure, captopril may elute close to the void volume, complicating quantitative determination. Another challenge is the tendency of the captopril peak to exhibit tailing and asymmetry. The application of chaotropic anion salts in the mobile phase on a C18 column was proposed as a promising analytical approach to improve retention and peak shape.

Experimental studies established optimal chromatographic conditions for captopril determination in tablets: Zorbax SB-C18 column (150 × 4.6 mm, 3.5 µm), mobile phase consisting of 30 % ACN and 70 % buffer solution (pH 2.10) containing 0.25 % KPF₆, 0.1 % HClO₄, and 0.1 % KH₂PO₄, column temperature 40 °C, detection wavelength 200 nm, and flow rate 1.0 mL/min. Linearity was evaluated in

the concentration range 40–120 µg/mL using the least squares method with regression equation $y = 12096x - 45214$ and correlation coefficient $R^2 = 0.9998$.

Modern greenness assessment tools AGREE (0.72), MoGAPI (81), Complex MoGAPI (81), AGSA (73.61), CaFRI (74), and CACI (82) confirmed that the proposed HPLC method is environmentally safe. The developed HPLC method enables quantitative determination of captopril in tablets with symmetrical peaks that do not elute near the void volume, and it may also be applied for the analysis of related impurities.

The developed HPLC methods for the determination of pheniramine, carboplatin, cisplatin, captopril, and enalapril in pharmaceutical preparations can be applied both in routine pharmaceutical analysis and in independent laboratory testing.

Key words: Pharmaceutical analysis, chaotropic salts, pheniramine maleate, carboplatin, cisplatin, enalapril, captopril, pharmaceutical preparations (medicinal products), validation, high-performance liquid chromatography (HPLC)

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні результати дисертації:

1. Druchok M, Piponski M, Horyn M, Zarivna N, Logoyda L. The usage of salts of chaotropic anions for the development of HPLC method for the simultaneous determination of cisplatin and carboplatin in model mixture. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2025;5(57):29-36. doi: 10.15587/2519-4852.2025.341476. **(SCOPUS, Q3)** *(Здобувач розробила концепцію і дизайн дослідження, провела експеримент, аналіз та інтерпретацію даних, написала статтю; Piponski M., Horyn M., Zarivna N., Logoyda L. провели консультування щодо дизайну, мети, завдань та редагування статті).*

2. Дручок МІ, Логойда ЛС. Розробка ВЕРХ-методики визначення карбоплатину в лікарських засобах із використанням солей хаотропних

аніонів. Медична та клінічна хімія. 2025;27(3):57-67. doi: 10.11603/mcch.2410-681X.2025.i3.15694. *(Здобувач 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).*

3. Дручок МІ, Логойда ЛС. Розробка ВЕРХ-методики визначення еналаприлу в таблетках з використанням солей хаотропних аніонів. Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2025;18(3):244-252. doi: 10.14739/2409-2932.2025.3.340923. *(Здобувач 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. Piponski M, Druchok M, Horyn M, Zarivna N, Despodov I, Beneta A, Stojanovski K, Shulyak N, Dmytriv M, Logoyda L. Impact of chaotropic salts on separation simplification on liquid chromatographic determination of cisplatin, pheniramine and their related compound. *BMC Chemistry*. 2026; 20: 59. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13065-026-01755-8>. **(SCOPUS, Q2)** *(Здобувач розробила концепцію і дизайн дослідження, провела експеримент, аналіз та інтерпретацію даних, написала статтю; Piponski M., Horyn M., Zarivna N., Despodov I., Beneta A., Stojanovski K., Shulyak N., Dmytriv M., Logoyda L. провели консультування щодо дизайну, мети, завдань та редагування статті).*

5. Дручок МІ, Логойда ЛС. Розробка методики високоефективної рідинної хроматографії для визначення каптоприлу в таблетках з використанням солей хаотропних аніонів. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2026;(4):56-66. doi: 10.11603/1811-2471.2025.v.i4.15776. *(Здобувач 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).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

6. Druchok M, Piponski M, Logoyda L. Chaotrop role benefits in development and improvement of simple HPLC methods: two isolated studies in the determination of two distinct drugs and dosage forms of pheniramine maleate and cisplatin with their related compounds. В: Матеріали LXVIII підсумкової науково-практичної конференції Здобутки клінічної та експериментальної медицини; 2025 черв. 12-13; Тернопіль. Тернопіль: ТНМУ; 2025. с. 291. *(Здобувач розробила концепцію і дизайн дослідження, провела експеримент, аналіз та інтерпретацію даних, написала тези; Piponski M., Logoyda L. провели консультування щодо дизайну, мети, завдань та редагування тез).*

7. Дручок М, Логойда Л. Використання солей хаотропних аніонів для розробки ВЕРХ методики одночасного визначення цисплатини та карбоплатини в модельній суміші. В: Матеріали XV Всеукраїнської конференції молодих вчених, студентів та аспірантів з актуальних питань хімії; 2025 жовт. 7-10; Харків. Харків; 2025. с. 35. *(Здобувач 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)*

8. Дручок М, Логойда Л. Розробка ВЕРХ методики визначення еналаприлу в таблетках з використанням солей хаотропних аніонів. В: Матеріали Міжнародної internet-конференції Modern chemistry of medicines; 2025 листоп. 7; Харків. Харків; 2025. с. 111. *(Здобувач 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. Дручок М. Розробка ВЕРХ методики визначення карбоплатину в лікарських засобах з використанням солей хаотропних аніонів. В: Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю Досягнення та перспективи розвитку медицини та фармації. Погляд молодих вчених; 2025 листоп. 5-6; Чернівці. Чернівці; 2025. с. 80. *(Здобувач 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	18
ВСТУП	19
РОЗДІЛ 1 ЗАСТОСУВАННЯ СОЛЕЙ ХАОТРОПНИХ АНІОНІВ У АНАЛІТИЧНІЙ РОЗРОБЦІ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	25
1.1 Огляд хроматографічних методик визначення феніраміну малеату в лікарських засобах	25
1.2 Огляд хроматографічних методик визначення цисплатину в лікарських засобах	30
1.3 Огляд хроматографічних методик визначення карбоплатину в лікарських засобах	34
1.4 Огляд хроматографічних методик визначення еналаприлу в лікарських засобах	37
1.5 Огляд хроматографічних методик визначення каптоприлу в лікарських засобах	40
1.6 Застосування хаотропного ефекту в рідинній хроматографії	43
Висновки до розділу 1	49
РОЗДІЛ 2 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ОБ’ЄКТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА МОДЕЛЮВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ	51
2.1 Методологія дослідження	51
2.2 Об’єкти дослідження	52
2.3 Характеристика методик дослідження	53
2.3.1 ВЕРХ методика кількісного визначення феніраміну малеату в лікарських засобах	54
2.3.2 ВЕРХ методика кількісного визначення цисплатину в лікарських засобах	54

2.3.3	ВЕРХ методика кількісного визначення карбоплатину в лікарських засобах	55
2.3.4	ВЕРХ методика одночасного визначення карбоплатину та цисплатину в модельній суміші	56
2.3.5	ВЕРХ методика кількісного визначення еналаприлу в лікарських засобах	57
2.3.6	ВЕРХ методика кількісного визначення каптоприлу в лікарських засобах	57
РОЗДІЛ 3 РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ ВЕРХ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ФЕНІРАМІНУ МАЛЕАТУ В ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ		59
	Висновки до розділу 3	70
РОЗДІЛ 4 РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ ВЕРХ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЦИСПЛАТИНУ ТА КАРБОПЛАТИНУ В ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ		73
4.1	Розробка та валідація ВЕРХ методики кількісного визначення цисплатину в лікарських засобах	73
4.2	Розробка та валідація ВЕРХ методики кількісного визначення карбоплатину в лікарських засобах	84
4.3	Розробка та валідація ВЕРХ методики одночасного визначення цисплатину та карбоплатину в лікарських засобах	96
	Висновки до розділу 4	108
РОЗДІЛ 5 РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ ВЕРХ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЕНАЛАПРИЛУ МАЛЕАТУ ТА КАПТОПРИЛУ В ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ		112
5.1	Розробка та валідація ВЕРХ методики кількісного визначення еналаприлу малеату в лікарських засобах	112

5.2 Розробка та валідація ВЕРХ методики кількісного визначення каптоприлу в лікарських засобах	124
Висновки до розділу 5	136
ВИСНОВКИ	139
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	144
ДОДАТКИ	163

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФІ	– активний фармацевтичний інгредієнт
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
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 Стьюдента
x, y	– поточні координати в рівнянні лінійної залежності

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Протягом останнього десятиліття широке застосування іон-парної хроматографії для аналізу білків, пептидів та лікарських речовин спонукало хіміків-хроматографів досліджувати нові підходи до рухомих фаз. Це пов'язано з тим, що традиційні іон-парні реагенти зазвичай несумісні з поєднанням рідинної хроматографії з мас-спектрометрією і мають властивість сильно адсорбуватися на стаціонарній фазі, що може погіршувати початкові характеристики хроматографічної колонки. У зв'язку з цим хаотропні солі привернули значну увагу як перспективна альтернатива іон-парним реагентам, оскільки вони можуть імітувати їхню дію, підвищуючи утримування аналітів із протилежним зарядом. Водночас кількість теоретичних досліджень, присвячених моделюванню процесів утримування за наявності хаотропних добавок у хроматографічних системах, залишається обмеженою, причому більшість із них ґрунтується на стехіометричному підході.

Представленні в науковій літературі дослідження демонструють корисну роль хаотропних аніонів у розробці та оптимізації ВЕРХ методик для визначення активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) з основними властивостями. Підтверджено, що наявність хаотропів у рухомій фазі під час ВЕРХ розділення підсилює взаємодію між аналітом і гідрофобними алкільними лігандами, що призводить до збільшення часу утримування. Ці властивості особливо важливі при створенні методів для високополярних аналітів із використанням колонок із обернено-фазовими сорбентами. Збільшення часу утримування забезпечує більш ефективне та селективне розділення полярних структур, що містять атоми Нітрогену. Відмова від використання іон-парних реагентів дозволяє зберегти колонку в початковому стані, що підвищує економічну ефективність методу. Еквілібрація відбувається швидше з хаотропними солями і є дешевшою, забезпечуючи нові

корисні профілі селективності. Другим помітним ефектом використання хаотропних солей/аніонів для розділення N-вмісних молекул є покращення симетрії піків, що є важливою характеристикою, оскільки підвищує точність, селективність та ефективність розділення. Усі ці корисні властивості хаотропів для N-вмісних молекул були продемонстровані та проілюстровані у нашій роботі, що призвело до розроблення нових методик кількісного визначення АФІ та супровідних речовин.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана згідно з планами науково-дослідної роботи Тернопільського національного медичного університет імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України «Розробка і валідація аналітичних та біоаналітичних методик визначення лікарських засобів; ідентифікація оригінальних функціональних похідних теофіліну з антирадикальними властивостями» (номер державної реєстрації 0124U000057).

Мета дослідження: розробити та науково обґрунтувати застосування хаотропних солей у рідинній хроматографії як сучасного підходу для покращення ефективності фармацевтичного аналізу, зокрема шляхом підвищення утримування та селективності, отримання симетричних піків, спрощення хроматографічних умов, скорочення часу аналізу та створення швидких, точних, економічно ефективних і екологічно безпечних методів визначення АФІ і їх супровідних речовин.

Завдання дослідження:

- провести критичний аналіз наукової літератури щодо застосування хаотропних солей у рідинній хроматографії для аналізу АФІ та їх супровідних речовин;
- дослідити вплив хаотропних аніонів на процеси утримування, селективність та симетрію піків полярних і N-вмісних сполук у обернено-фазовій рідинній хроматографії;

- обґрунтувати вибір оптимальних хроматографічних умов (склад рухомої фази, тип стаціонарної фази, швидкість потоку, температура колонки, довжина хвилі детектування) для подальшої розробки ВЕРХ методик;
- провалідувати аналітичні методики за показниками лінійність, правильність, прецизійність, робастність;
- оцінити екологічність аналітичних методик із використанням сучасних інструментів;
- порівняти ефективність запропонованих методик із традиційними хроматографічними підходами та визначити їх переваги для фармацевтичного аналізу;
- запровадити розроблені валідовані аналітичні методики у роботу лабораторії Державної служби з лікарських засобів та контролю ша наркотиками.

Об'єкт дослідження – обґрунтування підходів до використання хаотропних солей як сучасного підходу рідинної хроматографії для цілей фармацевтичного аналізу та розробка швидких, точних, економічно ефективних і екологічно безпечних методик визначення АФІ і їх супровідних речовин.

Предмет дослідження – розробка швидких, точних, економічно ефективних і екологічно безпечних методик визначення АФІ і їх супровідних речовин.

Методи дослідження: високоефективна рідинна хроматографія з діодноматричним детектуванням (ВЕРХ-ДМД); методи моделювання аналізу та візуалізації багатомірних даних – методи валідації, регресійний та кореляційний аналіз, методи визначення впливу аналітичної методики на навколишнє середовище.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше науково обґрунтовано доцільність застосування хаотропних солей як модифікаторів

рухомої фази в обернено-фазовій ВЕРХ для цілей фармацевтичного аналізу. Встановлено закономірності впливу хаотропних аніонів на утримування, селективність та симетрію піків полярних і нітрогенвмісних аналітів у системах ВЕРХ із алкіл-зв'язаними стаціонарними фазами (С18, С8). Розроблено методики ВЕРХ із використанням хаотропних солей для визначення АФІ (феніраміну малеату, цисплатину та карбоплатину, еналаприлу та каптоприлу) та їх супровідних речовин, що дозволяють проводити аналіз без застосування іон-парних реагентів. Показано, що введення хаотропних солей до складу рухомої фази сприяє підвищенню утримування слабо ретенуваних полярних сполук, покращенню форми піків та селективності розділення. Доведено можливість створення швидких, простих, економічно ефективних та екологічно безпечних («зелених») методик ВЕРХ для цілей фармацевтичного аналізу, що забезпечують належні аналітичні характеристики та відповідають сучасним вимогам «зеленої» аналітичної хімії.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено методики ВЕРХ із використанням хаотропних солей, які можуть бути застосовані для кількісного визначення АФІ (феніраміну малеату, цисплатину та карбоплатину, еналаприлу та каптоприлу) та їх супровідних речовин в лікарських засобах. Запропоновані методики характеризуються простотою виконання, скороченим часом аналізу та зменшеним споживанням органічних розчинників («зеленість»), що підвищує їх економічну ефективність та придатність для рутинного лабораторного контролю. Використання хаотропних солей у складі рухомої фази дозволяє відмовитися від застосування іон-парних реагентів та спеціалізованих колонок, що спрощує методики та знижує витрати на проведення аналізу. Запропонований підхід є важливим для теорії хроматографії. Наше дослідження відкриває перспективи для подальшого застосування хаотропного ефекту з метою покращення розділення в інших подібних аналітичних задачах. Окрім того, в роботі

використані сучасні інструменти оцінки «зеленості», що можуть слугувати прикладом для оцінки «зеленості» інших розроблених методик.

Розроблені ВЕРХ методики можуть застосовуватися атестованими лабораторіями та були впроваджені в практику роботи Державної служби з лікарських засобів та контролю за наркотиками в Тернопільській області (акт впровадження від 03.03.2026 р.).

Особистий внесок здобувача. Безпосередньо автором проведено патентно-інформаційний пошук та аналіз сучасного стану досліджень за темою дисертаційної роботи. Разом з науковим керівником визначено мету, завдання та методики експериментальних досліджень. Автором самостійно розроблено ВЕРХ методики визначення феніраміну малеату, цисплатину та карбоплатину, еналаприлу та каптоприлу в лікарських засобах. 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 LXVIII підсумковій науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (м. Тернопіль, 12-13 червня 2025 року), XV Всеукраїнській конференції молодих вчених, студентів та аспірантів з актуальних питань хімії, на базі НТК «Інститут монокристалів» НАН України (м. Харків, 7-10 жовтня 2025 року), міжнародній internet-конференції «Modern chemistry of medicines» (м. Харків, 7 листопада 2025 року), всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною

участю «Досягнення та перспективи розвитку медицини та фармації. Погляд молодих вчених» (м. Чернівці, 5-6 листопада 2025 року).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 9 наукових праць, із них 5 статей (2 – у фахових наукових виданнях, що індексуються наукометричною базою *Scopus*, 3 – у фахових виданнях України категорії Б), 4 публікації в матеріалах вітчизняних і міжнародних конференцій.

Обсяг та структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 166 сторінках, складається з анотації, вступу, п'яти розділів, висновків, списку використаних джерел, що містить 136 найменувань (7 кирилицею та 129 латиною), додатків. Робота ілюстрована 25 таблицями, 56 рисунками. Список використаних джерел і додатки викладено на 22 сторінках.

РОЗДІЛ 1

ЗАСТОСУВАННЯ СОЛЕЙ ХАОТРОПНИХ АНІОНІВ У АНАЛІТИЧНІЙ РОЗРОБЦІ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Огляд хроматографічних методик визначення феніраміну малеату в лікарських засобах

Феніраміну малеат, (3RS)-N,N-диметил-3-феніл-3-(піридин-2-іл)пропан-1-амін (Z)-бутендіоат (рис. 1.1), є блокатором H₁-гістамінових рецепторів, має десенсибілізуючу дію, що проявляється зменшенням запальної реакції слизових оболонок верхніх дихальних шляхів. Фенірамін малеат є водорозчинною молекулою з LogP 3.58 та pKa=9.4 [1].

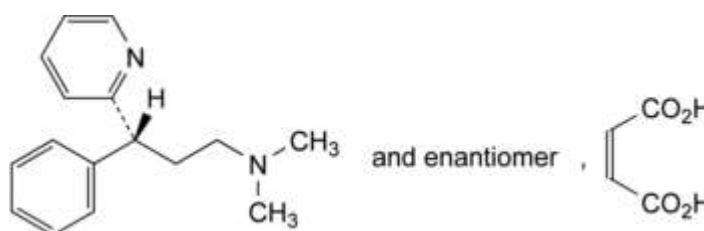


Рисунок 1.1 – Структурна формула феніраміну малеату



Монографії феніраміну малеату Британської фармакопеї (BP) [2] та Європейській фармакопеї [3] (Ph.Eur.) для визначення супровідних домішок використовували ту саму колонку C18 300x3.9 мм з частками 10 мкм, але з градієнтним елююванням рухомої фази, що складалася з гептансульфонату як іон-парного реагента, з рН, скоригованим кислотою фосфорною до 2.5, та ацетонітрилом (ACN) за довжини хвилі детектування 265 нм. Згідно з зазначеними фармакопеями, кількісне визначення феніраміну малеату як АФІ здійснюється потенціометричним титруванням. Державна фармакопея України (ДФУ) регламентує визначення феніраміну малеату такою же

методикою як і Ph.Eur [4]. Американська фармакопея (USP) не має монографії на феніраміну малеат. Що стосується доступних методів кількісного визначення феніраміну малеату у лікарських формах та біологічних матрицях, у науковій літературі можна знайти аналітичні методики, однак мало публікацій, які б стосувалися одночасного визначення феніраміну малеату та супровідних речовин [5-11].

Вченими Caglar H. та Buyuktuncel E. розроблено методику обернено-фазової ВЕРХ одночасного визначення псевдоефедрину гідрохлориду, феніраміну малеату, ацетамінофену, гуайфенезину, піріламіну малеату, хлорфеніраміну малеату, трипролідину гідрохлориду, декстрометорфану гідроброміду, димедрину гідрохлориду у лікарських засобах з використанням хроматографічної колонки Nucleodur gravity C18 (250 x 4.0 мм, 5 мкм) та ізократичним елююванням рухомою фазою, що складалася з суміші метанолу та буфера (38:62) (час хроматографування – 37.9 хв) [6]. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 0.5–250 мкг/мл для феніраміну малеату.

Єгипетськими вченими Khadiga M. Kelani et al. розроблено та валідовано просту методику обернено-фазової ВЕРХ відповідно до настанов ІСН для одночасного визначення нафазоліну гідрохлориду і феніраміну малеату разом із трьома їх домішками. Хроматографічне розділення проводили на колонці Hypersil ODS (5 мкм, 250 × 4.6 мм) в ізократичному режимі з використанням рухомої фази фосфатний буфер рН 6.0 : АСН (70:30, об./об.) при швидкості потоку 1.0 мл/хв та УФ-детектуванні за довжини хвилі 260 нм. Запропонована методика продемонструвала лінійність у діапазонах концентрацій 5.00–45.00 мкг/мл для нафазоліну гідрохлориду і домішки В нафазоліну гідрохлориду та 10,00–110,00 мкг/мл, 10–70 мкг/мл і 10–120 мкг/мл для феніраміну малеату та домішок А і В феніраміну малеату відповідно, з коефіцієнтами кореляції >0.999 для всіх п'яти зазначених аналітів. ВЕРХ методику валідовано на зразках водянистої вологи ока кролика відповідно до

настанов FDA щодо біоаналітичної валідації. Розроблену методику застосовано для аналізу двох лікарських засобів разом із їхніми домішками та у збагачених зразках водянистої вологи [7].

Тією самою науковою групою роком пізніше запропоновано нову ТШХ-методику із денситометричним детектуванням для одночасного кількісного визначення нафазоліну гідрохлориду, феніраміну малеату та трьох їхніх офіційних домішок, а саме домішки В нафазоліну та домішок А і В феніраміну. Хроматографічне розділення проводили на алюмінієвих пластинах із силікагелем F254 як нерухомою фазою, використовуючи як рухому фазу суміш метанол : етилацетат : 33.0% аміак (2.0 : 8.0 : 1.0). Пластини аналізували за довжини хвилі 260.0 нм. Валідацію методики здійснювали відповідно до настанов ІСН. Лінійність спостерігалася в діапазонах 2.0–50.0 мкг/зона для нафазоліну, 10.0–110.0 мкг/зона для феніраміну, 0.1–10.0 мкг/зона для домішки В нафазоліну та 2.0–50.0 мкг/зона для обох домішок феніраміну. Методику застосовано для одночасного визначення нафазоліну гідрохлориду та феніраміну малеату в очних краплях Naphcon-A®. Екологічність методики оцінено та порівняно з раніше описаним ВЕРХ-методиками за допомогою інструменту оцінки впливу на довкілля, здоров'я та безпеку. Розроблене методика має значні переваги над описаним раніше — є простою, селективною, економічно вигідною та експресною для аналізу п'яти зазначених аналітів [8].

Вчені Makhdoom H. S. et al. кількісно визначали феніламін у біологічних зразках двадцяти наркозалежних людей віком 16–50 років під час комплексного токсикологічного скринінгу методом газової хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням у режимі позитивної електронної іонізації. Фенірамін екстрагували з біологічних зразків методом твердофазної екстракції, а для кількісного визначення застосовували рідинну хроматографію з тандемною мас-спектрометрією (ВЕР-МС/МС). Хроматографічне розділення проводили на колонці Poroshell 120 EC-18 (2.1

мм × 50 мм × 2.7 мкм) із використанням рухомої фази вода–АСN з 0.1 % мурашиною кислотою в режимі градієнтного елюювання при швидкості потоку 500 мкл/хв. Методика продемонструвала відмінну лінійність у діапазонах 2–1000 нг/мл у крові, сечі; 2–1000 нг/мг у волоссі та 5–1000 нг/мг у нігтях (коефіцієнт лінійності ≥ 0.985). Час утримування феніраміну становив (3.0 ± 0.1) хв. Концентрації феніраміну в зразках людей, котрі зловживають наркотиками, становили: 23–480 нг/мл у крові, 72–735 нг/мл у сечі, 25–379 нг/мл у ротовій рідині, 10–170 нг/мг у волоссі та 8–86 нг/мг у нігтях. Альтернативні біологічні зразки мають важливе значення у клінічній та судово-медичній практиці [9].

Науковцями з Тунісу Louhaichi M. R. et al. розроблено та валідовано нову просту, експресну ВЕРХ методику одночасного визначення псевдоефедрину, феніраміну, гуайфенезину, піріламіну, хлорфеніраміну та декстрометорфану в лікарських засобах для симптоматичного лікування кашлю та застуди. Розділення цих сполук досягали впродовж 13 хв на колонці Kromasil C18 з використанням ізократичної рухомої фази, що складалася з MeOH та дигідрофосфатного буфера з рН 3 (45:55, об./об.). Аналіз проводили при швидкості потоку 1 мл/хв та довжині хвилі детектування 220 нм. Лінійна залежність між концентрацією та відгуком спостерігалася в діапазоні 5–50 мкг/мл для псевдоефедрину, феніраміну та хлорфеніраміну і 50–600 мкг/мл для гуайфенезину, піріламіну, декстрометорфану, метилпарабену та бензоату натрію, з коефіцієнтами кореляції понад 0.998. Запропоновану ВЕРХ методику успішно застосовано для рутинного аналізу вказаних аналітів в лікарських формах. Наявність консервантів (бензоату натрію та метилпарабену) й інших допоміжних речовин не спричиняла суттєвих перешкод під час визначення цих аналітів [10].

Бельгійськими вченими Deconinck E. et al. розроблено та валідовано УВЕРХ методику ідентифікації та кількісного визначення лікарських засобів, що містять парацетамол та/або ацетилсаліцилову кислоту в комбінації з

антигістамінними засобами (фенілефрином, феніраміну малеатом, дифенгідраміном, прометазином) та/або іншими АФІ, такими як сульфат хініну, кофеїн або кодеїну фосфат з використанням колонки Waters Acquity ВЕН С18 (2 мм × 100 мм, 1,7 мкм) та градієнтного елюювання, де як водну фазу застосовували ацетатно-амонійний буфер із рН 4.0, а як органічний модифікатор – MeOH. Запропонована методика забезпечує експресну та надійну ідентифікацію й кількісне визначення вказаних лікарських засобів, що дозволяє скоротити час аналізу та зменшити навантаження на лабораторії з контролю якості лікарських засобів [11].

Ще у 1978 році вченими Charles G. Eckhart та Thomas McCorkle у своєму виданні «Analytical Profiles of Drug Substances» представлено розділ «Chlorpheniramine Maleate». Хлорфеніраміну малеат є рацемічною сумішшю оптичних ізомерів. В цій роботі описано також методики ВЕРХ для аналізу хлорфеніраміну малеату. Такі роботи є цікавими в історичному аспекті розвитку інструментальних методів аналізу. Вже у 1978 році описано застосування хроматографічних колонок Zorbax CN, Zipsax SCX, Corsil C18, Corsil phenyl та рухомих фаз – 50-90 % ACN та 50-10 % 0.1 % амонію карбонату рН 8.5-8.9, 60-80 % ACN та 40-20 % 0.1 % амонію ацетату рН 7.4-7.6 та інші підходи до компонентів рухомої фази [12].

Незважаючи на наявність невеликої кількості аналітичних методик для визначення феніраміну малеату в лікарських формах і біологічних матрицях, залишається потреба у сучасних, експресних, екологічнобезпечних та економічно доступних, без-іонпарних ізократичних ВЕРХ методиках, адаптованих саме для контролю якості АФІ та профілю домішок в лікарських засобах. Такий підхід дозволить підвищити ефективність контролю якості, гармонізувати методики та зменшити аналітичне навантаження на лабораторії.

1.2 Огляд хроматографічних методик визначення цисплатину в лікарських засобах

Цисплатин, також відомий як цисплатина або цис-діаміндихлороплатина(II) (рис. 1.2), — протипухлинний лікарський засіб на основі платини, який застосовується для лікування різних типів раку, зокрема сарком, деяких карцином (наприклад, дрібноклітинного раку легень та раку яєчників), лімфом і герміногенних пухлин. Він був першим представником цього класу препаратів, до якого згодом також увійшли карбоплатин та оксаліплатин. Цисплатин є невеликою водорозчинною молекулою з $\log P = -2.19$ та $pK_a = 5.06$ [13].

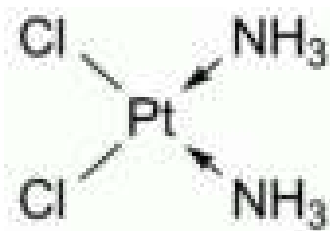


Рисунок 1.2 – Структурна формула цисплатину



Хроматографічне визначення цисплатину та супровідних речовин є надзвичайно складним завданням через його неорганічну будову: центральний атом платини координований двома атомами хлору та двома аміногрупами. Така структура зумовлює виражені амфотерні властивості молекули з наявністю як кислотних, так і основних характеристик. Монографія ВР на ін'єкційний цисплатин описує ізократичну ВЕРХ-методику із використанням колонки Superspher B (C8 або L7) 250 × 4 мм, 4 мкм. У складі рухомої фази застосовують два протилежно заряджені іон-парні реагенти — октансульфонову кислоту та гідрогенсульфат тетрабутиламонію, з коригуванням рН до 5.9 та УФ-детектуванням за довжини хвилі 210 нм [2]. Інша методика, наведена у ВР, передбачає використання колонки LiChrosorb

NH_2 (250×4.6 мм, 10 мкм) із рухомою фазою 90 % ACN та 10 % води з детектуванням за довжини хвилі 220 нм. Такий підхід є дещо нетиповим для розділення сильно іоногенної амфотерної молекули в небуферованій рухомій фазі, особливо на амінопропільній колонці, що відзначається складністю у роботі [2]. Згідно з монографією USP, кількісне визначення цисплатину в ін'єкційній лікарській формі проводять на колонці L8 (NH_2 -пропіл) розміром 300×4 мм, 5 мкм [14]. Для аналізу супровідних речовин використовують колонку 250×4.6 мм, 5–10 мкм, зазвичай сильний аніонообмінник (SAX, L14), з рухомою фазою, що містить 0.4 г/л амонію сульфату (рН 5.9), та УФ-детектуванням за довжини хвилі 209 нм. Визначення цисплатину в ін'єкційній лікарській формі також здійснювали на колонці C8 (L7) 250×4.6 мм, 5 мкм (октилсиланова обернено-фазова колонка) із буфером рН 5.9 та додаванням двох протилежно заряджених катіонного й аніонного іон-парних алкільних реагентів. Ph.Eur. монографія на цисплатину визначення супровідних домішок та АФІ проводити такою ж методикою, що і попередньо згадані фармакопеї [3]. Разом із тим, низка аналітичних методик, описаних у науковій літературі, має певні обмеження та недоліки, зокрема незадовільну форму хроматографічних піків, наявність нетипових або складних етапів виконання, а також незручні та менш надійні процедури детектування [15–34].

Вченими Zhao Z. et al. описано чутливу методику для визначення цисплатини та деяких його можливих метаболітів. Метод поєднує обернено-фазову іон-парну рідинну хроматографію з мас-спектрометрією з індуктивно зв'язаною плазмою (ICP-MS) для платин-специфічного детектування. Досліджено умови розділення продуктів гідролізу цисплатину та продуктів його взаємодії з метіоніном, цистеїном і глутатіоном з використанням натрію додецилсульфату або гептансульфонату як іон-парного реагента. Межа виявлення (МВ) для цисплатину становила 0,1 нг, що відповідає концентраційній МВ 1 нг/мл при об'ємі інжекції 100 мкл. Проведені

дослідження ще у 1993 році продемонстрували ефективність використання методу для вивчення метаболізму цисплатину [15].

Пакистанськими науковцями Nayat M. et al. розроблено просту та відтворювану спектрофотометричну методику для кількісного визначення цисплатину, карбоплатину та оксаліплатину у субстанції та ін'єкційних лікарських формах. Метод ґрунтується на реакції досліджуваних аналітів із 1,10-фенантроліном за наявності заліза(III) хлориду, внаслідок чого утворюється червоний комплекс із максимумом поглинання за довжини хвилі 510 нм. Підпорядкування закону Бугера–Ламберта–Бера в таких діапазонах: цисплатин - 0.25–6.0 мкг, карбоплатин - 7.5–180 мкг, оксаліплатин – 0.5–12.0 мкг [18].

Більшість описаних у літературі методів містять етапи, що ставлять під сумнів їх практичну придатність через наявність малоприйнятних, нераціональних або складних рішень. Серед таких підходів – дериватизація з подальшим електрохімічним детектуванням [15], іон-парна хроматографія з ВЕРХ-МС визначенням [16], спеціалізовані методики з електрохімічним детектуванням [17], УФ-спектрофотометрія для субстанції з попередньою дериватизацією [18, 19], складні комбінації ВЕРХ-МС + ІСР [20]. Окремі роботи використовують детектування за довжини хвилі 254 нм на колонці С18 з елюванням 70 % органічного розчинника і 30 % води [21, 24], іон-парну хроматографію на колонці С18 з детектуванням за довжини хвилі 310 нм [22], застосування ВЕРХ-МС [23] або іон-парний реагент SDS на колонці С18 з отриманням асиметричних піків [25]. Однією з ранніх робіт є стаття Riley (1982), де застосовано низькоефективну колонку С18 із детектуванням за довжини хвилі 280 нм та цитратним буфером з іон-парним реагентом цетилпіридинію хлоридом [26]; як і очікувалося для того періоду, спостерігалися широкі піки та низька роздільна здатність. Серед новіших публікацій варто відзначити огляд Zahednedzhad F. et al. [27], що коротко узагальнює застосовані аналітичні підходи. У роботі Schmedes A. V. et al. [28]

описано ще одну ВЕРХ-МС методику із використанням HILIC-колонки (Amide-RP Ascentis Supelco) з градієнтним елююванням ACN та 0.1 % мурашиною кислотою для аналізу плазми та діалізату; подібно складним є підхід, наведений у роботі Jain A. P. et al. [29]. Цікавою, проте неповною виглядає публікація Narikimalli A., Galla, R. [30], де використано колонку RP-Phenyl X-Bridge з ізократичним елююванням 40 % ACN та 60 % 0,1 % трифтороцтової кислоти (TFA). Автори зазначають застосування ДМД детектора, однак не вказують довжину хвилі вимірювання та інтегрування. У 2025 році з'явилася оглядова стаття Zhang Z. et al. [31], де аналітичні методики для цисплатину, інкапсульованого в наномедичних формах, коротко класифіковані та фактично узагальнюють уже відомі підходи. Наступна публікація Bondu V. K. et al. [32] щодо одночасного визначення цисплатину та гемцитабіну містить суперечливі параметри ВЕРХ-УФ методу: детектування за довжини хвилі 252 нм, колонка 125 × 4 мм C18 та рухома фаза 70 % MeOH і 30 % натрію ацетату. Цікавим є підхід Kato R. et al. [33], який запропонував нову ВЕРХ-УФ методику із колонкою на основі нафтилетильної групи, зв'язаної з силікагелем (π NAP). В роботі застосовували 100 мМ NaClO₄ з ACN, однак не було достатньо обґрунтовано вибір саме цієї солі та її роль у посиленні хотропних взаємодій реорганізованої молекули цисплатину. Серед рідкісних нехроматографічних методів визначення цисплатину варто згадати іоноселективний електродний підхід, представлений у найновішій роботі Jacobs A. I. et al. [34], де застосовано бор-доповані алмазні тонкоплівкові електроди з проточно-інжекційним аналізом та іоноексклюзивною хроматографією з амперометричним детектуванням.

Представлені у науковій літературі методики визначення цисплатину характеризуються складністю, використанням іон-парних реагентів, недостатньою селективністю, невиправдано складними параметрами, обмеженою придатністю для сучасного рутинного фармацевтичного аналізу.

Це підтверджує актуальність розробки простої, робасної, без-іон-парної, ізократичної ВЕРХ-ДМД методики для контролю якості цисплатину.

1.3 Огляд хроматографічних методик визначення карбоплатину в лікарських засобах

Карбоплатин, (SP-4-2)-діамін[циклобутан-1,1-ди(карбоксилато-кО)(2-)]платина, є хіміотерапевтичним засобом, який використовується для лікування різних видів раку, включаючи саркому, деякі карциноми, лімфоми та гермінативні пухлини [35]. Карбоплатин є гідрофільною сполукою з $\log P = -0.7$, $pK_a = 3.5-4.0$, менш реакційно здатним порівняно з цисплатином, стабільнішим у водних розчинах завдяки біциклічному дикарбоксилатному ліганду. Таке низьке значення $\log P$ свідчить про слабе утримування на класичній C18 колонці, ризик дуже малого часу утримування (вихід у мертвому об'ємі) та погану роздільну здатність від полярних домішок, тому фармакопейні монографії пропонують використання амінопропільної (NH_2) колонки. Провідні Фармакопеї світу (Європейська, Британська та США) регламентують проводити хроматографічне визначення з використанням рухомої фази – АСN та вода (87:13), аміно-пропільної хроматографічної колонки (клас L8), детектування – за довжини хвилі 230 нм, швидкість потоку – 2.0 мл/хв [2, 3].

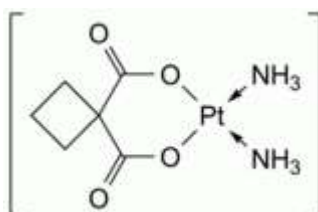


Рисунок 1.3 – Структурна формула карбоплатину



В науковій літературі описано декілька статей, що стосуються розробки аналітичних методик лікарських засобів на основі платини в різних матрицях з використанням різних підходів (спектрофотометрія, ВЕРХ з використання іон-парних реагентів, амінопропільних колонок та інш.), проте такі методики мають певні недоліки [18, 36-38]. Спектрофотометричну методику описали у розділі 1.2 [17].

Вченими Mittal A. et al. розроблено обернено-фазові ВЕРХ-методику для одночасного визначення паклітакселу та карбоплатину разом в амфіфільній полімерній матриці. Усі методики були розроблені з використанням обернено-фазової ВЕРХ на колонці C18 з рухомою фазою вода-ACN. Для аналізу карбоплатину застосовували ізократичний режим, тоді як для індивідуального визначення паклітакселу та для одночасного аналізу обох препаратів — градієнтний режим елюювання. Швидкість потоку становила 1 мл/хв, детектування проводили за довжини хвилі 227 нм. За умов індивідуального аналізу карбоплатин елюювався через 4.3 хв, а паклітаксел — через 10.5 хв. При одночасному аналізі час утримування карбоплатину становив 4 хв, паклітакселу — 18 хв. Калібрувальні криві для кожного аналіту в досліджуваному діапазоні концентрацій були лінійними ($r^2 > 0,9995$). Дослідження стабільності показало, що обидва препарати залишаються стабільними впродовж періоду дослідження [36].

Науковцями Rama Devi. P та Rambabu K. розроблено просту, селективну, валідовану ізократичну методику ВЕРХ для кількісного визначення карбоплатину та доцетакселу. Хроматографічне розділення здійснювали на колонці Symmetry C18 (150 × 4.6 мм, 3.5 мкм) в ізократичному режимі з використанням рухомої фази ACN : 0,1% фосфорна кислота (40:60). Швидкість потоку становила 1 мл/хв, довжина хвилі детектування — 225 нм (ДМД-детектор). Запропонована методика є експресною, простою, придатною для кількісного аналізу [37].

У 2023 р. вченими Muhammad Ahsan Hafiz et al. представлено розробку гідрогелевого носія для наноспоншів з карбоплатином, спрямованого на шийку матки: дослідження *in vitro* та *ex vivo*, де визначення вивільнення карбоплатину проводили методом ВЕРХ [38]. Ізократичний ВЕРХ-аналіз проводили з використанням колонки Shim-pack C18 (250 мм × 4.6 мм, 5 мкм), температуру 25 °С, при швидкості потоку 1 мл/хв та довжині хвилі детектування 229 нм. Рухома фаза складалася з MeOH та суміші 0.001 М кислоти сірчаної і 0.02 М натрію сульфату у співвідношенні 10:90. У даній методиці приготовані наносфери карбоплатину (у кількості, еквівалентній 10 мг діючої речовини) диспергували в 1 мл дихлорметану та піддавали ультразвуковій обробці в ультразвуковій бані впродовж 30 хв. Отриманий залишок повторно диспергували в 1 мл рухомої фази, перемішували на вортексі протягом 5 хв і центрифугували при 8000 об/хв впродовж 15 хв. Надосадову рідину використовували для аналізу методом ВЕРХ, тобто складною в запропонованій методиці є пробопідготовка. Автори використовували ВЕРХ методику, яка описана в роботі [39].

У 2021 р пакистанські науковці Hafiz A. M. et al. досліджували наногубки для інкапсуляції карбоплатину із застосуванням підходу Quality by Design (QbD), використовуючи описану вище ВЕРХ методику [39]. Ефективність інкапсуляції карбоплатину в наногубки становила $(56.27 \pm 2.52) \%$. Пролонговане вивільнення карбоплатину – 79.03 % та 95.94 % протягом 12 год при рН 4.5 і 6.8 відповідно – свідчить про те, що наногубки можуть бути перспективними носіями для контрольованого вивільнення гідрофільних терапевтичних агентів.

Незважаючи на наявність валідованих аналітичних методик для визначення карбоплатину, більшість із них або орієнтовані на конкретні матриці, або містять технологічні обмеження. Це підтверджує актуальність розробки більш універсальної, простої, екологічної та робасної ВЕРХ-методики, придатної для аналізу як субстанції, так і лікарських форм карбоплатину.

1.4 Огляд хроматографічних методик визначення еналаприлу в лікарських засобах

Еналаприл — антигіпертензивний засіб з групи інгібіторів ангіотензинперетворювального ферменту (АПФ) [40]. В медичній практиці застосовується еналаприлу малеат, (2S)-1-[(2S)-2-[[[1S)-1-(етоксикарбоніл)-3-фенілпропіл]аміно]пропаноїл]піролідин-2-карбонова кислота гідроген (Z)-бутендіоат (рис. 1.4). Еналаприлу малеат є водорозчинною молекулою $\log P = 0.19$ та $pK_a = 3.61$ (карбоксильна група), 5.1 (вторинний амін) [40].

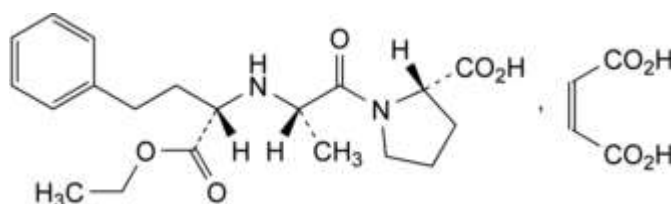


Рисунок 1.4 – Структурна формула еналаприлу малеату



Провідні фармакопеї світу регламентують проведення хроматографічного визначення супровідних речовин еналаприлу малеату в субстанції методом ВЕРХ градієнтним елюювання (на 30 хв) з використання хроматографічної колонки 4.1 мм × 15 см, 5 мкм класу L21 (сополімер стиролу–дивінілбензену), температури 70 °С, швидкості потоку 1.5 мл/хв, кількісне визначення – алкаліметрія, та в таблетках на колонці класу L7, температури 50 °С, швидкості потоку 2.0 мл/хв з використанням ізократичного елюювання АСN та буфером (розчином натрію дигідрогенфосфату у воді, доведений кислотою фосфорною до рН 2.2) (250:750) [3]. ДФУ регламентує визначення еналаприлу малеату такою же методикою як і Ph.Eur [4].

В науковій літературі вченими запропоновано ВЕРХ методики визначення еналаприлу в лікарських засобах, проте такі методики мають недоліки [41-49].

Вченими Manindra M. et al. валідовано методику ВЕРХ для аналізу еналаприлу малеату в лікарській формі з використанням колонки Hypersil MOS, 5 мкм (250 мм × 4.6 мм) та рухомої фази, що складалася з буферного розчину та АСН (40:60) при швидкості потоку 1.5 мл/хв. Температуру колонки підтримували на рівні 65 °С, детектування здійснювали за довжині хвилі 215 нм. Об'єм інжекції становив 50 мкл, час аналізу – 25 хв. Валідована методика відповідала критеріям за всіма параметрами валідації [41].

Науковцем Al-Momani F. розроблено ВЕРХ методику для визначення гідрохлортіазиду та еналаприлу малеату у таблетках з використанням колонки Supelcosil LC-8 (5 мкм, 150 мм × 4.6 мм) та рухомої фази, що складалася з 3.0 мМ тетрабутиламонію гідрогенсульфату у суміші АСН/вода/триетиламін (ТЕА) (14 : 85.6 : 6.4, об./об.), з коригуванням рН до 4.1 кислотою оцтовою льодяною. Детектування здійснювали за довжини хвилі 220 нм. Методику оцінено за показниками лінійності, правильності, прецизійності та специфічності [42].

Вченим Chaudhari V. G. розроблено методику ВЕРХ для одночасного визначення амлодипіну безилату та еналаприлу малеату в комбінованому лікарському засобі з використанням колонки Phenomenex C18 (5 мкм, 250 мм × 4.6 мм) та рухомої фази, що складалася з MeOH : АСН : води (40:50:10, об./об./об.), швидкість потоку становила 1.0 мл/хв. Методика була лінійною у діапазоні 0.5–6.0 мкг/мл для еналаприлу малеату та 0.5–8.0 мкг/мл для амлодипіну безилату. Запропонована методика може бути використана для контролю якості при виробництві субстанції та готових лікарських форм [44].

Sultana N. et al. розроблено та валідовано методику ВЕРХ для одночасного визначення еналаприлу за наявності статинів (розувастатину, аторвастатину та симвастатину) у субстанції та лікарських формах. Хроматографічне розділення проводили з використанням колонки Purospher Star C18 (5 мкм, 250 × 4.6 мм) та ізократичної рухомої фази АСН : вода (60:40,

об./об.) з коригуванням рН до 2.8. УФ-детектування здійснювали за довжини хвилі 230 нм. Еналаприл та статини розділялися менш ніж за 10 хв із відмінною роздільною здатністю, мінімальним хвостуванням піків і без інтерференції з боку допоміжних речовин. Методика була лінійною у діапазоні 2.5–100 мкг/мл для еналаприлу (коефіцієнт кореляції 0.9995) та 0.625–25 мкг/мл для статинів (коефіцієнт кореляції 0.9990; між- та внутрішньоденний CV < 2.0 %). Запропонована методика може бути застосована для кількісного визначення еналаприлу та статинів як окремо, так і в комбінації у субстанції та лікарських формах [45].

Tajerzadeh H. та Namidi M. A. розроблено методику ВЕРХ для визначення еналаприлату. Рухома фаза, що складалася з води–АСН–фосфорної кислоти (85 % м/об.) (90:10:1, об./об./об.) з рН 2.8, відрегульованим додаванням концентрованого розчину NaOH, зі швидкістю потоку 0.7 мл/хв. Розділення здійснювали на колонці Shodex C18 (Shodex Rspak, D18-613) Детектування проводили за довжини хвилі 215 нм. Методика була лінійною у діапазоні концентрацій 1–200 мкг/мл та селективною щодо розділення піків еналаприлату та еналаприлу малеату [47].

Uslu B. та Ozden T. розроблено дві градієнтні методику ВЕРХ та УВЕРХ для одночасного визначення еналаприлу малеату та гідрохлортіазиду у лікарських формах. Хроматографічне розділення проводили на колонках Waters μ -Bondapak C18 (300 \times 3.9 мм, 10 мкм) і Waters Acquity BEH C18 (100 \times 2.1 мм, 1.7 мкм): для системи ВЕРХ протягом 5.30 хв, а для системи УВЕРХ — за короткий час утримування 1.95 хв відповідно. Лінійна залежність спостерігалась у діапазоні концентрацій 0.270–399 мкг/мл для еналаприлу та 0.260–399 мкг/мл для гідрохлортіазиду для системи ВЕРХ, а також 0.270–399 мкг/мл для еналаприлу і 0.065–249 мкг/мл для гідрохлортіазиду для системи УВЕРХ. Запропоновані методику були валідовані відповідно до рекомендацій ІСН щодо прецизійності, правильності та лінійності. Також проведено дослідження прискореної деградації для обох аналітів у зразках

субстанцій з метою підтвердження специфічності та стабільність-індикаторної здатності методик ВЕРХ [48].

Вченими Pironski M. et al. запропоновано ВЕРХ методику одночасного визначення еналаприлу та бісопрололу в лікарських формах із використанням сильних хаотропних перхлорат-аніонів у складі рухомої фази. Методика забезпечує відмінну симетрію піків із часом елюювання 4.7 та 5.2 хв відповідно. Рухома фаза складалася з MeOH та розведеної хлорної кислоти, які подавалися зі швидкістю потоку 1 мл/хв через колонку Zorbax Rx C8 (250 × 4.6 мм, 5 мкм), термостатовану при 42 °С. Детектування – за довжини хвилі 214 нм. Наявність перхлорат-аніонів показала важливу роль у формуванні форми піків та вигляду хроматограми завдяки вираженим хаотропним властивостям цих аніонів щодо молекул, які містять атоми Нітрогену в структурі аналітів, в умовах кислого рН середовища. Лінійність була підтверджена у робочому діапазоні 20–200 мкг/мл для бісопрололу та 20–200 мкг/мл для еналаприлу. Запропонована методика одночасного ВЕРХ визначення бісопрололу та еналаприлу у таблетках є простою для застосування в контролі якості великої кількості зразків за короткий час, що робить його придатним для рутинного аналізу [49].

Основними недоліками відомих ВЕРХ методик є тривалий час аналізу, складний склад рухомої фази, необхідність високих температур, недостатня симетрія піків, елюювання близько мертвого об'єму, неекологічність та складність використання в рутинному фармацевтичному аналізі.

1.5 Огляд хроматографічних методик визначення каптоприлу в лікарських засобах

Каптоприл, (2S)-1-[(2S)-2-метил-3-сульфанілпропаноїл]піролідин-2-карбонова кислота (рис. 1.5), є синтетичним інгібітором АПФ швидкої дії, що

широко застосовується для лікування артеріальної гіпертензії. Каптоприл є водорозчинною молекулою $\log P = 0.34$, $pK_{a1} = 3.7$; $pK_{a2} = 9.8$ [50].

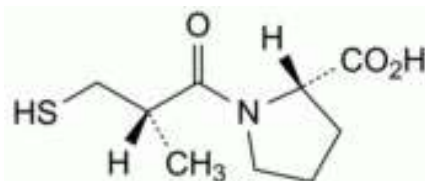


Рисунок 1.5 – Структурна формула каптоприлу



Ph.Eur регламентує проведення кількісного визначення каптоприлу в субстанції методом прямої йодометрії, в супровідні домішки – методом рідинної хроматографії з використанням октадецилсилільної колонки та градієнтного елюювання рухомої фази А (розчин кислоти фосфорної) та В (фосфорна кислота- ацетонітрил (ACN) - вода (0.08:50:50), температура 50 °С. Градієнтне елюювання запрограмоване на 45 хв, що не є експресним та незручним для рутинних лабораторій [3]. Ph.Eur також регламентує проводити кількісне визначення каптоприлу в таблетках методом рідинної хроматографії. Методика ідентична як і для визначення каптоприлу дисульфіді (супровідної домішки, нормування 3.0 %) – пропонується застосування октадецилсилільної колонки, ендкетованої (5 мкм), ізократичне елюювання рухомою фазою – фосфорна кислота концентрована – вода – MeOH (0.5:450:550), детектування спектрофотометрично за довжини хвилі 220 нм [3]. ДФУ регламентує визначення каптоприлу такою же методикою як і Ph.Eur [4].

В науковій літературі описано ряд ВЕРХ методик визначення каптоприлу та супровідних речовин в таблетках, проте вони мають певні недоліки у зв'язку з часом їх розробки (несиметричні піки, неекспресність, незеленість та інші) [51-55].

Leanpolchareanchai J. та Suksiriworapong J. провалідовано методику ВЕРХ, яка регламентована USP, визначення каптоприлу в рідких лікарських

формах для педіатричних пацієнтів з використанням рухомої фази складалася з 47 % MeOH та 53 % води, що містила 0.1 % фосфорної кислоти. Час утримування каптоприлу та дисульфиду каптоприлу становив відповідно 5.1–5.4 хв та 12.2–12.9 хв. Лінійність методики спостерігалася в діапазоні концентрацій 0.75–20 мкг/мл, R^2 становив 0.9995. Дослідження стрес-деградації показало, що система ВЕРХ здатна чітко відокремлювати пік каптоприлу від продуктів деградації та допоміжних речовин, тому ВЕРХ методика може бути використана для дослідження хімічної стабільності екстемпоральних препаратів каптоприлу [52].

Вченими Sultan N. et al. розроблено та валідовано ВЕРХ методику для одночасного визначення каптоприлу разом з антагоністами H_2 -рецепторів, такими як циметидином, ранітидином і фамотидином, з використанням колонки Purospher Star C18 (5 мкм, 25×0.46 см) та рухомої фази – суміш MeOH та води (60:40, об./об.), при рН 3.0 ± 0.02 , корегованому фосфорною кислотою. Швидкість потоку становила 0.8 мл/хв при кімнатній температурі. Детектування проводили за довжини хвилі 225 нм. Час утримування становив: для каптоприлу – 5.2 хв, для ранітидину та фамотидину – 2.5 хв, для циметидину – 2.7 хв. Проведено *in vitro* дослідження взаємодії каптоприлу з широко застосовуваними антагоністами H_2 -рецепторів при 37 °С з використанням валідованого методу. Отримані результати показали, що антагоністи H_2 -рецепторів можуть зв'язуватися з каптоприлом, що спричиняє значні зміни в біодоступності лікарського засобу [53].

Вченими Parapov S. et al. розроблено та валідовано ВЕРХ методику для визначення каптоприлу в лікарських формах з використанням колонки LiChrosorb® RP-18 (10 мкм, 250×4 мм) та рухомої фази, що складалася з MeOH та води (60:40, об./об.), при цьому рН доводили до 3.0 85 % фосфорною кислотою. Детектування проводили за довжини хвилі 220 нм, швидкість потоку становила 2 мл/хв, а температуру колонки підтримували на рівні 30 °С. Час утримування становив 8 хв. Запропонована методика є селективною,

прецизійною та правильною, тому може бути застосована для аналізу лікарських форм на основі каптоприлу при проведенні контролю якості [54].

Вченими Sultana N. et al. розроблено та валідовано ВЕРХ методику для визначення каптоприлу за наявності нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП) у лікарських формах та сироватці крові людини. Хроматографічне розділення проводили на колонці Purospher Star C18 (5 мкм, 25 × 0.46 см) з використанням рухомої фази MeOH: вода (80:20, об./об.), рН якої регулювали до 2.8 фосфорною кислотою. Швидкість потоку становила 1.0 мл/хв, а детектування здійснювали за довжині хвилі 227 нм. Запропонована методика є експресною, правильною, селективною, чутливою та відтворюваною [55].

Підсумовуючи, для частини представлених у науковій літературі ВЕРХ методик характерні несиметричні піки, недостатня експресність, значне споживання органічних розчинників, а відповідно недостатня «зеленість». Деякі методики потребують високих концентрацій органічної фази або специфічних умов (низький рН, підвищена температура), що може ускладнювати їх застосування та зменшувати ресурс хроматографічних колонок. Тому, незважаючи на наявність валідованих ВЕРХ методик, актуальним залишається розроблення більш експресних, економічних та екологічно безпечних ВЕРХ-методик визначення каптоприлу з відмінними параметрами придатності хроматографічної системи, придатних для рутинного фармацевтичного аналізу та контролю якості лікарських засобів.

1.6 Застосування хаотропного ефекту в рідинній хроматографії

На сьогодні рідинна хроматографія є найпоширенішим методом фармацевтичного аналізу, який застосовується для ідентифікації, кількісного визначення АФІ, супровідних речовин [56-75]. Розуміння механізмів, які лежать в основі розділення речовин в обернено-фазовій рідинній хроматографії, є важливим для прогнозування характеру елюювання

компонентів у ВЕРХ. На ефективність утримування та селективність аналітів впливають фізико-хімічні властивості речовин, зокрема значення $\log P$ та pK_a , а також параметри хроматографічної системи – рН рухомої фази, концентрація буферного розчину, вміст органічного модифікатора та наявність різних добавок до рухомої фази [76, 77].

Franz Hofmeister у 1888 році під час дослідження осадження білків солями відкрив ряд Hofmeister series (ряд Гофмейстера) – порядок іонів (солей) за їх здатністю впливати на структуру води, розчинність молекул, стабільність білків та гідрофобні взаємодії у водних розчинах. Іони розташовані у певному порядку залежно від того, наскільки вони стабілізують (космотропні іони) або руйнують структуру води (хаотропні іони). В обернено-фазовій ВЕРХ хаотропні іони можуть змінювати утримування полярних або основних сполук, покращувати симетрію хроматографічних піків, підвищувати селективність розділення аналітів. У хаотропній ВЕРХ як добавки до рухомої фази використовують солі, що містять такі аніони, як перхлорат (ClO_4^-), гексафлуорофосфат (PF_6^-), трифлуороацетат (CF_3COO^-) [78-85].

Вченими Susanne Moelbert et al. у 2004 році опубліковано статтю про космотропи та хаотропи: моделювання преференційного виключення, зв'язування та стабільності агрегатів. Додавання космотропних косолвентів до водних розчинів сприяє агрегації гідрофобних частинок розчиненої речовини, тоді як хаотропні косолвенти, навпаки, зменшують стабільність таких агрегатів і перешкоджають їх утворенню. Механізм цих процесів пояснюється за допомогою модифікованої двостанової моделі Мюллера–Лі–Граціано, яка описує взаємодії у трикомпонентній системі вода–косолвент–розчинена речовина для малих частинок. Відповідно до цієї моделі, основна дія космотропних сполук полягає у посиленні впорядкованості структури води. У результаті виникає преференційне виключення молекул косолвенту із сольватаційної оболонки гідрофобних частинок, а також часткове витіснення

самих гідрофобних частинок із розчину, що призводить до підвищення стабільності агрегатів. На відміну від них, хаотропні речовини порушують структуру води, що сприяє кращій сольватації гідрофобних частинок і, відповідно, зменшує їх схильність до агрегації. За допомогою комп'ютерного моделювання методом Монте-Карло на молекулярному рівні показано процеси вибіркового виключення або зв'язування молекул косолвенту в сольватаційній оболонці гідрофобних частинок. Це, у свою чергу, може посилювати або пригнічувати утворення агрегатів. Вплив косолвентів, які змінюють структуру води, на гідрофобні взаємодії продемонстровано на прикладах: космотропного ефекту хлориду натрію та хаотропного ефекту сечовини [83].

У роботі Т. Сесчі та Р. Пассамонті описано сучасний стан теорії та представлено першу спробу пояснення механізму утримування за наявності хаотропних реагентів у ВЕРХ. Запропоновану модель було перевірено для типових позитивно та негативно заряджених аналітів, а також для іонних рідин, цвітеріонних і нейтральних сполук [86-89].

Вченими Jelena Čolović et al. вивчено фактори, що впливають на поведінку утримування різних за структурою основних лікарських речовин у системах ВЕРХ з хаотропними добавками. Авторами досліджено вплив трьох факторів: значення рН водної фази, концентрації натрію гексафлуорофосфату та вмісту АСН в рухомій фазі. Структурна відповідність молекули аналіту структурі електричного подвійного шару може розглядатися як ключовий фактор, що визначає характер утримування. Завдяки структурній різноманітності досліджених аналітів та хорошій прогностичній здатності, розроблена вченими модель може бути корисним інструментом для прогнозування поведінки утримування у дослідженій хроматографічній системі [90].

Один із вчених, котрий зробив великий внесок у розвиток сучасної рідинної хроматографії [56], Kazakevich Y. V. також провів численні

дослідження з вивчення впливу хаотропних солей на утримування аналітів, симетрії піків на C18 колонках [91-94].

Вченими I. L. Kazakevich та N. H. Snow досліджено адсорбційну поведінку гексафлуорофосфату амонію на чотирьох колонках, заповнених адсорбентами з різною здатністю до дисперсійних взаємодій, використовуючи фронтальну хроматографію з детектуванням методом ВЕРХ-МС у негативному режимі іонізації ESI. Ізотерми адсорбції гексафлуорофосфат-аніону (PF_6^-) визначали в сумішах ACN/вода та MeOH/вода. Встановлено, що адсорбція PF_6^- зростає зі збільшенням вмісту ACN в елюенті в діапазоні 0–15 % ACN. Подальше підвищення концентрації ACN призводить до експоненційного зменшення адсорбції PF_6^- . MeOH спричиняє поступове зниження адсорбції PF_6^- зі збільшенням концентрації органічного розчинника у рухомій фазі [95].

Увага вчених [96-120] приділена застосуванню хаотропних солей для аналізу лікарських речовин і їх домішок. Дослідження показали, що хаотропні аніони здатні істотно впливати на механізм утримування аналітів, змінюючи гідрофобні, електростатичні та дисперсійні взаємодії між молекулами аналітів і стаціонарною фазою. Такі підходи до компонентів рухомої фази підвищують утримування полярних та основних сполук, покращують форму піків і селективність розділення.

Точний механізм взаємодії між сильними хаотропними солями та молекулами, що містять атоми Нітрогену, у кислому середовищі рН досі остаточно не з'ясований. Теорія взаємодії між аналітом і лігандами C-18 або C-8 припускає, що хаотропні катіони сприяють кращому експонуванню прихованих гідрофобних ділянок молекул на їхній поверхні, тим самим посилюючи гідрофобні взаємодії між основним N-вмісним аналітом і алкільно зв'язаною стаціонарною фазою. Сумарним ефектом цих взаємодій є збільшення часу утримування та ємності утримування розділюваних молекул. Доведено, що ці взаємодії є більш інтенсивними, коли в рухомій фазі

використовується ACN, який, імовірно, утворює товстіший багаточаровий шар на стаціонарній фазі, ніж MeOH. Іншою важливою особливістю участі хаотропних солей, зокрема хаотропних аніонів, у C18 або C8 розділенні N-вмісних молекул є покращення симетрії піків. Найкращими умовами прояву хаотропного ефекту для основних N-вмісних молекул є кислий рН середовища для протонування атомів Нітрогену, наявність 10–40 % ACN у рухомій фазі та низька концентрація або відсутність інших буферних солей. Дослідження впливу ліпофільних іонів на утримування іонних аналітів в обернено-фазовій ВЕРХ призвели до розроблення ще однієї можливої теорії їхнього впливу на хроматографічне утримування основних сполук [56]. Контрольоване порушення сольватаційної оболонки дозволяє контролювати утримування аналіту. Наявність протиіонів поблизу іонного сольватованого аналіту призводить до порушення його сольватаційної оболонки; цей ефект відомий як хаотропний контроль утримування іонних сполук в обернено-фазовій ВЕРХ. Протианіони, які мають менш локалізований заряд, високу поляризованість і нижчий ступінь гідратації, проявляють значний вплив на утримування протонованих основних аналітів і відомі як хаотропні іони. Хаотропні іони змінюють структуру води у напрямку більшого безладу. Тому сольватаційна оболонка основних аналітів може порушуватися внаслідок взаємодії іонів із хаотропними аніонами. Зі збільшенням концентрації протианіона сольватація протонованого основного аналіту зменшується. Первинна оболонка молекул води навколо основних аналітів порушується, що знижує їх сольватацію. Зменшення сольватації аналіту підвищує його гідрофобність і призводить до посилення взаємодії з гідрофобною стаціонарною фазою та збільшення утримування основних аналітів. Хаотропний ефект залежить від концентрації вільного протианіона, а не від концентрації протонів у розчині при $\text{pH} < \text{pK}_a$ основного аналіту. Це означає, що зміна утримування протонованого основного аналіту може спостерігатися зі збільшенням концентрації протианіона при додаванні солі за сталого рН. Утримування основних молекул

зростає при зміні рН рухомої фази та збільшенні концентрації хаотропних протианіонів. Отриманий ефект для утримування основного аналіту є дуже подібним, якщо обидві залежності представити як функцію концентрації вільних хаотропних протианіонів. Практично для будь-якого використаного протианіона можливе порушення сольватаційної оболонки основного аналіту, і ступінь цього порушення залежить від хаотропної природи аніона. Хаотропна активність протианіонів визначається їх здатністю дестабілізувати або порушувати структуру води. Навіть низька концентрація протианіона в рухомій фазі спричиняє значне початкове порушення сольватаційної оболонки, що призводить до істотного збільшення утримування аналіту, тоді як у зоні високих концентрацій спостерігається ефект насичення (вище 50 мМ). Логічно, що за високої концентрації протианіонів, коли всі сольватаційні оболонки повністю порушені, подальше збільшення їх концентрації не спричиняє додаткового зростання утримування. Як було показано вище, хаотропний ефект пов'язаний із впливом протианіона кислотного модифікатора на сольватацію аналіту і є незалежним від рН рухомої фази, за умови повного протонування основного аналіту. Взаємодія аналіту з протианіоном спричиняє порушення його сольватаційної оболонки, що впливає на гідрофобність. Збільшення гідрофобності аналіту призводить до відповідного збільшення його утримування. Цей процес має межу «насичення», коли концентрація протианіона достатньо висока для ефективного порушення сольватації всіх молекул аналіту. Подальше збільшення концентрації протианіона не має помітного впливу на утримування аналіту. Встановлено, що хаотропна теорія застосовна у багатьох випадках, коли малі неорганічні іони використовуються для зміни утримування основних речовин. Результати детальних досліджень показали, що гідрофобність аналіту та, відповідно, його характеристики утримування у повністю розчиненому стані повинні бути практично незалежними від типу використаного протианіона. Однак експериментальні результати показали, що

використання різних протианіонів призводить до різних меж утримування повністю розчиненого аналіту, що свідчить про появу ефекту іонної пари або іонної асоціації. Отже, можна зробити висновок, що у впливі хаотропних іонів на утримування основних аналітів можуть брати участь три окремі процеси:

1. класичне утворення іонної пари між основним аналітом і хаотропним протианіоном;
2. порушення сольватаційної оболонки аналіту хаотропним протианіоном та збільшення його гідрофобності;
3. адсорбція ліофільних протианіонів на поверхні стаціонарної фази, що вводить електростатичну складову у загальний механізм гідрофобного утримування аналіту.

Останній механізм ґрунтується на відкритті, що суміш вода/ACN утворює товстий адсорбований шар на поверхні гідрофобної зв'язаної фази, тоді як MeOH адсорбується з води, утворюючи класичний мономолекулярний адсорбований шар. Товстий адсорбований шар ACN створює сприятливе середовище для адсорбції ліпофільних іонів на стаціонарній фазі, додаючи електростатичний компонент до механізму утримування. У випадку MeOH в рухомій фазі, де формується тонкий мономолекулярний адсорбований шар, значного впливу на адсорбцію іонів не спостерігається. Умови рухомої фази ACN/вода з іоном PF_6^- забезпечують найбільше утримування, оскільки це найбільш ліпофільний іон у ряду Гофмейстера. Цей іон має найвищий ступінь делокалізації заряду та найвищу поляризованість, що сприяє можливим дисперсійним (або ван-дер-ваальсовим) взаємодіям. Ці властивості дозволяють йому взаємодіяти з ACN. Інші аніони мають подібні властивості, але їх здатність до дисперсійних взаємодій нижча, ніж у PF_6^- . При концентрації ACN до 20 % (v/v) усі іони демонструють максимальне утримування.

Висновки до розділу 1

1. У науковій літературі описано аналітичні методики визначення феніраміну малеату, препаратів платини (карбоплатину та цисплатину)

та інгібіторів АПФ, однак багато з них мають певні недоліки. До основних недоліків відомих ВЕРХ-методик належать тривалий час аналізу, складний склад рухомої фази, необхідність використання підвищених температур, недостатня симетрія хроматографічних піків, елюювання аналітів поблизу мертвого об'єму колонки, недостатня екологічність та обмежена придатність для рутинного фармацевтичного аналізу.

2. Використання хаотропних добавок до рухомої фази є перспективним підходом у розробці ВЕРХ-методик, оскільки дозволяє підвищити селективність, ефективність і передбачуваність хроматографічного розділення різних аналітів, що є важливим для задач фармацевтичного аналізу.
3. Таким чином, розробка сучасних аналітичних методик є актуальною та має важливе практичне значення для впровадження у рутинну практику фармацевтичного контролю якості.

РОЗДІЛ 2

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ОБ'ЄКТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА МОДЕЛЮВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ

2.1 Методологія дослідження

Враховуючи вище зазначені проблеми в розділі 1, над вирішенням яких ми запланували працювати, наведено дизайн експерименту (рис. 2.1). Введення солей хаотропних аніонів до складу рухомої фази дасть змогу змінювати утримування полярних або основних сполук, покращувати симетрію хроматографічних піків, підвищувати селективність розділення аналітів, тому об'єктами для дослідження обрано саме такі аналіти, які мали цю наукову потребу (фенірамін малеат, карбоплатин та цисплатин, каптоприл та еналаприл). На цьому і було заплановано проведення трьох етапів дослідження.

Методологія розробки методики ВЕРХ із застосуванням солей хаотропних аніонів включає:

1. Вивчення рекомендацій BP, USP та Ph. Eur., а також аналіз наукової літератури.
2. Аналіз попередніх досліджень, що підтверджують можливість використання солей хаотропних аніонів у ВЕРХ-аналізі досліджуваних аналітів.
3. Вибір оптимальних хроматографічних умов та розробку методики ВЕРХ (склад рухомої фази, тип і температура колонки, швидкість потоку, детектування).
4. Застосування запропонованої методики ВЕРХ для аналізу лікарської форми/модельної суміші.
5. Валідацію аналітичної методики (лінійність, правильність та прецизійність, робасність).

6. Оцінку «зеленості» розробленої методики ВЕРХ.

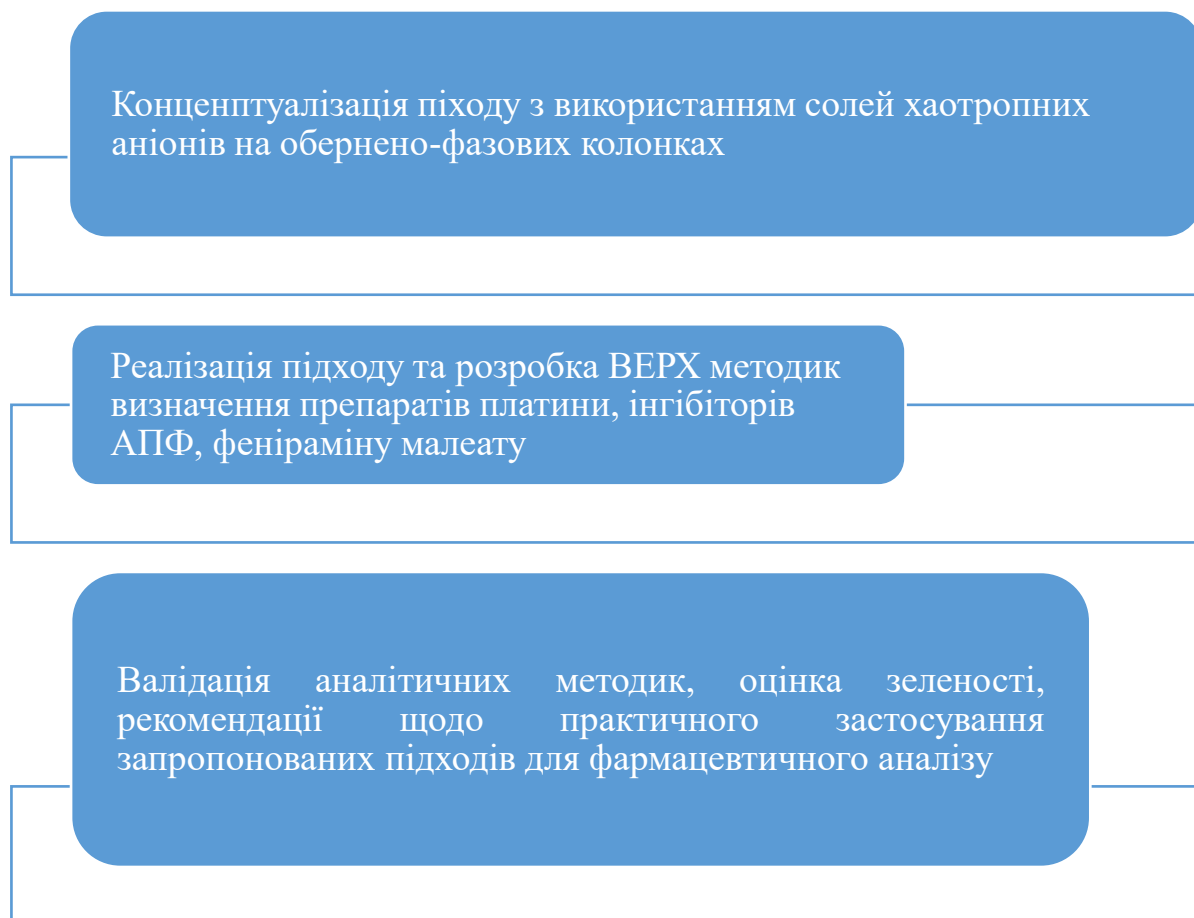


Рисунок 2.1 – Дизайн експерименту

2.2 Об'єкти дослідження

Фізико-хімічні властивості об'єктів наведено у розділі 1. При виконанні дослідження використовували фармакопейні стандартні зразки (ФСЗ) феніраміну малеату та його домішок, карбоплатну та цисплатину, еналаприлу та каптоприлу ("Sigma-Aldrich" ($\geq 99\%$, ВЕРХ)). Використані лікарські форми: цисплатин "Ebeve" (102964, 0,5 мг/мл, Австрія), карбоплатин «Ebeve» (10 мг/мл, Австрія), Gala Health (гранули для приготування перорального розчину 500 мг/200 мг/25 мг: парацетамол/аскорбінова кислота/фенірамін, Galafarm-Skopje, Північна Македонія), таблетки «Енап» (NN7668, 20 мг,

KRKA, Словенія), таблетки «Каптоприл» (0115384, 25 мг, ПАТ «Київмедпрепарат», ARTERIUM).

Усі використані реагенти: ацетонітрил (ACN), метанол (MeOH), 85 % м/об фосфорна кислота (o-Н₃PO₄), гексафторфосфат калію (KPF₆), дигідрофосфат калію (KH₂PO₄), перхлорат натрію (NaClO₄) мали якість ВЕРХ градієнту та були придбані у Merck Darmstadt, Німеччина.

Демінералізована вода чистоти ВЕРХ була отримана за допомогою системи Merck Millipore UV-Simplicity, яка забезпечує якісну провідність 0,05 μ S.

2.3 Характеристика методик дослідження

У роботі застосовували рідинний хроматограф Shimadzu LC-2050С 3D з діодно-матричним детектором (ДМД), для отримання хроматограм та інтегрування результатів – програмне забезпечення LabSolutions. Інше аналітичне обладнання: ваги аналітичні електронні лабораторні «RAD WAG AS 200/С»; ультразвукова баня (Elmasonic Easy 40 Н, Germany), рН метр (Mettler-Toledo, model LE438, Switherland).

Хроматографічні колонки: Agilent Zorbax Eclipse Bonus C18 (150 × 4.6 мм; 3.5 мкм), Zorbax SB-C18 (150 x 4.6 мм 3.5 мкм) (Agilent, США), Nucleosil Nucleodur C18 (250 × 4.6 мм; 3 мкм) (Macherey-Nagel, Німеччина), Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl (100 × 4.6 мм; 3 мкм), Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм) — (Phenomenex Company, США); LiChrospher 100 (250 × 4 мм) C-8e 5 мкм та Shim-Pack C18 GIST (250 × 4 мм) C-8e 5 мкм — (Merck Darmstadt, Німеччина).

Взяття наважок ФСЗ, лікарських форм, 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 кількісного визначення феніраміну малеату в лікарських засобах

Випробувальний розчин

Розчиняли 20.0 мг АФІ феніраміну/порошку, еквів. 20.0 мг феніраміну у суміші розчинників і доводили об'єм до 20.0 мл тією ж сумішшю розчинників (рухомою фазою), отримуючи випробувальний розчин з концентрацією 1 мг/мл. Під час розробки методики використовували суміш Imp A та Imp B (розглядалися як споріднена домішка A та споріднена домішка B), які розчиняли та доводили до концентрації 0.2 % від концентрації випробувального розчину, приблизно по 2 мкг/мл кожного з трьох аналітів.

Приготування розчину порівняння.

Готували розчин, що містив 1 мкг/мл стандартного зразка феніраміну та 2.0 мкг/мл домішок A і B у розчиннику.

Хроматографічні умови

Хроматографування проводили на рідинному хроматографі за таких умов:

- колонка Phenomenex Luna Hexyl-Phenyl (100 × 4.6 мм, 3 мкм);
- швидкість потоку: 1.0 мл/хв;
- довжина хвилі детектування: 210 нм;
- температура колонки: 30 °С;
- об'єм інжекції: 2 мкл;
- режим елюювання — ізократичний;
- рухома фаза: 25 % ACN та 75 % 0.07 % (v/v) H₃PO₄.

2.3.2 ВЕРХ методика кількісного визначення цисплатину в лікарських засобах

Випробуваний розчин

Розчин 0.05 % (м/об) цисплатину в 0.9 % NaCl, що відповідає концентрації 0.5 мг/мл, для якого згідно з ВР 2024 передбачено об'єм інжекції

20 мкл. У нашому дослідженні лінійності використовували розчин, розведений у два рази, до концентрації 0.25 мг/мл цисплатину.

Для визначення супровідних речовин використовували суміш стандартних розчинів, розведених до концентрацій 0.001–0.0015 % домішки А, 0.001 % домішки В та 1 мкг/мл цисплатину в одному флаконі, розбавлену 0.9 % розчином NaCl. У початковій методиці детектування в УФ-діпазоні проводили за довжини хвилі 210 нм, тоді як у нашому дослідженні моніторинг здійснювали з використанням повного УФ-спектра 190–400 нм із зменшеними об'ємами інжекції.

Приготування еталонного розчину

Приготовлено розчин, що містив 0.5 мкг/мл ФСЗ цисплатину та 1.0 мкг/мл домішок А і В у відповідному розчиннику.

Хроматографічні умови

Хроматографування проводили на рідинному хроматографі за таких умов:

- колонка Nucleosil Nucleodur C18 (250 × 4.6 мм, 3 мкм);
- швидкість потоку 1.0 мл/хв;
- детектування за довжини хвилі 210 нм;
- температура колонки 30 °С;
- об'єм інжекції 2 мкл;
- режим елюювання – ізократичний, рухома фаза: 10 % ACN та 90 % буферу KPF₆ з рН 2.8.

2.3.3 ВЕРХ методика кількісного визначення карбоплатину в лікарських засобах

Хроматографічні умови

Ізократичне хроматографічне розділення проводили:

- колонці Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм);

- рухома фаза складалася з буфера 40 мМ KPF_6 (рН 2.43) та АСН (95:5). Рухома фаза була дегазована ультразвуком перед використанням;
- температура колонки – 30° С;
- швидкість потоку рухомої фази – 0.6 мл/хв;
- об'єм інжекції – 5 мкл;
- УФ-детектування проводилася за довжини хвилі 195 нм.

Приготування стандартних робочих розчинів

Розчиняли субстанцію в суміші розчинників і розводили сумішшю розчинників, рухомою фазою, до мітки, в результаті чого отримали тестовий розчин з концентрацією 0.1 мг/мл. Криві калібрування були побудовані в координатах залежності площ піків та концентрації аналізованої речовини в мкг/мл (діапазон – 15-90).

2.3.4 ВЕРХ методика одночасного визначення карбоплатину та цисплатину в модельній суміші

Хроматографічні умови

Ізократичне хроматографічне розділення проводили:

колонці Luna C18(2) (100 × 4.6 мм, 3 мкм);

при температурі (30 ± 2) °С;

рухома фаза складалася з 40 мМ буфера KPF_6 (рН 2.4) та АСН у співвідношенні 95:5. Перед використанням рухому фазу дегазували ультразвуком;

швидкість потоку становила 0.5 мл/хв;

об'єм інжекції – 5 мкл;

УФ-детектування проводили за довжини хвилі 210 нм, загальний час аналізу становив 5 хв.

Процедура приготування стандартних вихідних розчинів

Речовину розчиняли в суміші розчинників і доводили об'єм тією ж сумішшю розчинників або рухомою фазою до отримання тестового розчину з концентрацією 0.1 мг/мл. Калібрувальні криві будували в координатах залежності площі піків від концентрації аналіту (мкг/мл) у діапазоні 20–100 мкг/мл.

2.3.5 ВЕРХ методика кількісного визначення еналаприлу в лікарських засобах

Хроматографічні умови

Хроматографування проводили:

- ізократичним елююванням на хроматографічній колонці Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм) рухомою фазою – буферний розчин 40 мМ KPF_6 (рН 2.43) і ACN (98:2);
- температура колонки – 30° С;
- швидкість потоку рухомої фази – 0.6 мл/хв;
- об'єм інжекції – 5 мкл;
- УФ-детектування – за довжини хвилі 210 нм.

Приготування робочих розчинів

Розчиняють ФСЗ еналаприлу малеату та порошок розтертих таблеток у воді для хроматографії, в результаті чого отримують випробовувані розчини з концентрацією 0.6 мг/мл. Калібрувальні криві побудовано в діапазоні 40–120 мкг/мл.

2.3.6 ВЕРХ методика кількісного визначення каптоприлу в лікарських засобах

Хроматографічні умови

Ізократичне хроматографічне розділення проводили:

- на колонці Zorbax SB-C18 (150 x 4.6 мм 3.5 мкм);

- рухома фаза складалася з буферного розчину рН 2.10 (0.25 % KPF_6 , 0.1 % $HClO_4$, 0.1 % KH_2PO_4) та ACN (70:30). Рухому фазу дегазовано ультразвуком перед використанням;
- температура колонки – 40° С;
- швидкість потоку рухомої фази – 1.0 мл/хв;
- об'єм інжекції – 5 мкл;
- детектування за довжини хвилі 200 нм.

Приготування стандартних робочих розчинів

Розчиняли субстанцію/порошок розтертих таблеток еквівалентний 25 мг каптоприлу в суміші розчинників і розводять сумішню розчинників, рухомою фазою, в результаті чого отримували тестовий розчин з концентрацією 0.1 мг/мл. Побудовано криві калібрування в діапазоні концентрацій 20-100 мкг/мл.

РОЗДІЛ 3

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ ВЕРХ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ФЕНІРАМІНУ МАЛЕАТУ В ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ

Важливим та цікавим прикладом використання хаотропів при розробці методик ВЕРХ для аналітів, що містять атоми Нітрогену, було дослідження феніраміну та його супровідних речовин Imp A і Imp B. У цьому випадку використаний хаотропний агент (NaClO_4) був слабшим за KPF_6 і в ряду хаотропних аніонів розташовується безпосередньо після нього. У даному експерименті перевіряли його ефективність для органічних молекул, що містять карбоновий скелет із основними значеннями pK_a . Зазвичай такі молекули є досить основними (pK_a приблизно 9.12–9.47), тому в методах ВЕРХ для їх визначення потрібне високе значення pH рухомої фази – щонайменше 10.5–11 – для їх нейтралізації та відщеплення протонів H^+ , або, що найчастіше застосовується, використання аніонних іон-парних реагентів для утримування, розділення та корекції піків, схильних до сильного хвостування. Такі методики повинні містити невелику кількість органічного модифікатора та характеризуватися високим відсотком вторинних міжмолекулярних взаємодій аналітів із уже дисоційованими SiO^- -групами, або ці групи повинні бути заблоковані чи замасковані алкільними ланцюгами іон-парних реагентів. Це вимагає використання ВЕРХ-колонок найвищої якості — з максимальною ендкепованістю та деактивованою матрицею, стабільних при високих значеннях pH (до $\text{pH} \approx 11$ і більше). Такі колонки відомі як найбільш дорогі. У цьому дослідницькому випадку комбінація слабшої гідрофобної стаціонарної фази, модифікованої фенільним лігандом, повинна була посилити взаємодії з феніраміном та його супровідними речовинами, що містять карбоновий скелет, за наявності дещо слабшого хаотропного аніона ClO_4^- із хаотропної солі NaClO_4 . Для подолання зазначених труднощів при створенні нового підходу до визначення та кількісного аналізу феніраміну і

його супровідних речовин у лікарських формах ми вирішили випробувати другу за силою сіль у ряду Гофмейстера — натрій перхлорат (NaClO_4). Аніон перхлорату займає друге місце за здатністю взаємодіяти з молекулами та порушувати їхню водну сольватаційну оболонку, що підсилює взаємодію прихованих гідрофобних ділянок основних молекул феніраміну і призводить до збільшення їх утримування в кислому середовищі рухомої фази. Для порівняння ефективності запропонованого підходу, що ґрунтується на наявності хаотропів, ми розпочали з порівняння з монографіями USP та BP 2025 щодо супровідних речовин феніраміну. У цих монографіях використовується градієнтне елюювання на колонці C18 (300×3.9 мм, 10 мкм) з рухомою фазою $\text{pH} = 2.5$, що містить іон-парний реагент гептансульфонат. За цих фармакопейних умов ми застосували прямий метод до підготовленого зразка лікарської форми. На рис. 3.1 представлені хроматограми ФСЗ феніраміну та його супровідних речовин Imp A і Imp B.

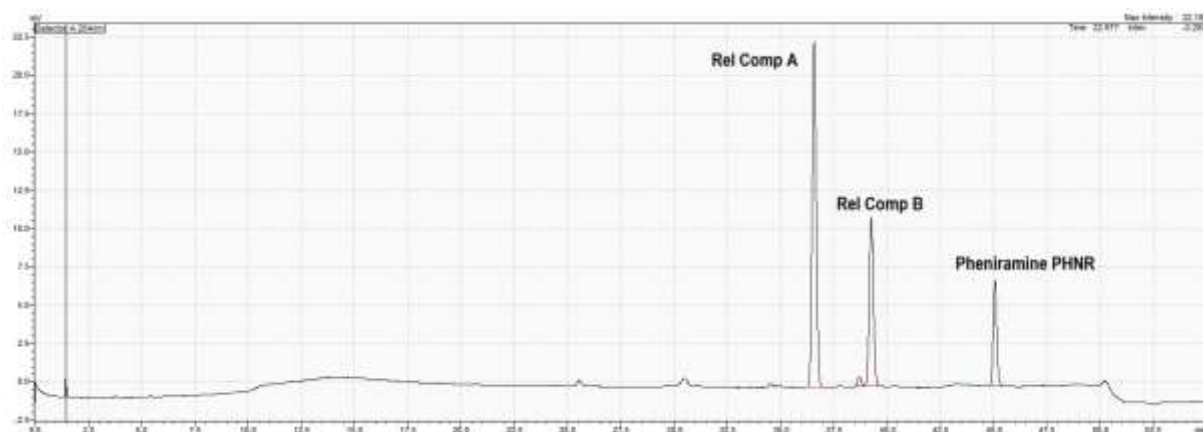


Рисунок 3.1 – Хроматограми супровідних речовин А (перший пік), В (другий пік) та С — феніраміну (третій пік) у дещо модифікованому методі ВР 2025 (початкові умови: 2 % АСН і 98 % буферу впродовж 2 хв; далі збільшення до 38 % АСН впродовж 37 хв при 62 % 75 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $\text{pH} = 2.5$; детектування при $\text{UV} = 265$ нм, швидкість потоку — 1.2 мл/хв; колонка ShimPack C18 GIST 250×4.6 мм, 5 мкм)

Як видно з рис. 3.1, методика починається з низького вмісту органічного модифікатора – 2 % ACN (ізократично протягом 2 хв), після чого протягом 37 хв концентрація зростає до 38%. Хроматограма стандартів демонструє надмірно високе розділення між Imp A та Imp B і не показує Imp C, яка зазвичай елююється найближче до феніраміну з відносним часом утримування 0.9 згідно з монографіями. У цій хроматограмі Imp C була відсутня через відсутність відповідного стандарту. На рис. 3.2 показано зразок лікарської форми, що містить супровідні речовини Imp A і Imp B. Цей рисунок ілюструє розділення та визначення феніраміну і його супровідних речовин у реальному зразку протизастудного препарату, що містить аскорбінову кислоту, парацетамол і кофеїн, із елюванням при 10 % ACN, яке через 8 хв підвищується до 20% протягом 2 хв на колонці Shimpack C18 GISS (250 × 4.6 мм, 5 мкм).

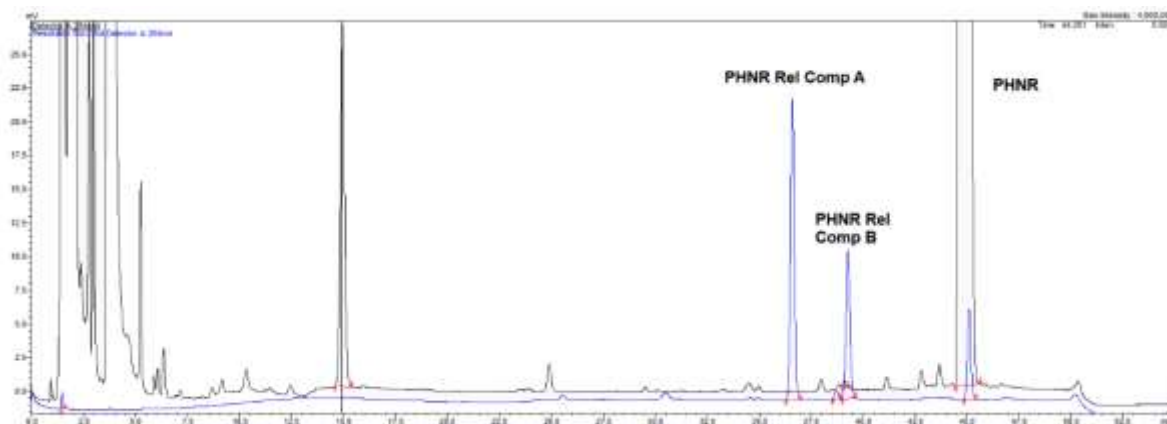


Рисунок 3.2 – Хроматограми феніраміну та його супровідних речовин Imp A і Imp B у реальному зразку протизастудного препарату з одноступеневим градієнтним підвищенням вмісту ACN від 2 % до 38 % протягом 37 хв (як найбільш гідрофобна група молекул, ці піки елюються наприкінці хроматограми; також можлива ідентифікація та візуалізація молекули Imp C як піка, що елюється безпосередньо перед феніраміном)

Як видно з хроматограми, пік безпосередньо перед основним піком феніраміну, ймовірно, відповідає Imp C. Після нього елюювання Imp D не було чітко встановлено, окрім останнього піка перед падінням базової лінії на початку повторної еквілібрації. Заміна колонки C18 (250 мм) на колонку з фенільним лігандом Luna Hexyl-Phenyl (100 × 4.6 мм, 3 мкм) з рухомою фазою, що містить хаотропні аніони перхлорату, дала результати, показані на рис. 3.3.

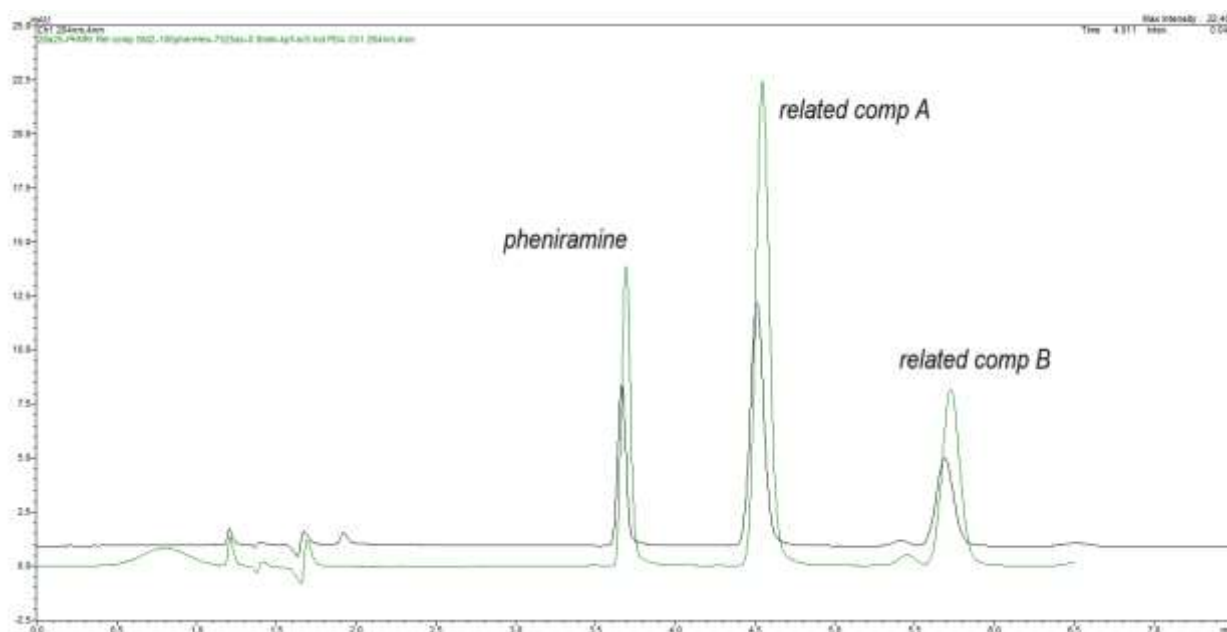


Рисунок 3.3 – Хроматограми суміші стандартів феніраміну та його основних супровідних речовин, розділених на колонці Phenomenex Luna Hexyl-Phenyl (100 × 4.6 мм, 3 мкм) з рухомою фазою 25 % ACN та 75 % 0.07 % (v/v) о-Н₃PO₄ і 0.3 % NaClO₄, рН 2.5, при об'ємах інжекції 3 мкл і 5 мкл; концентрація всіх компонентів становила приблизно 0.025 мг/мл

Першою помітною проблемою хроматограми є велика кількість речовин, навіть при інжекції 1 мкл розчину зразка, що призводить до зміщення часу утримування ідентичних компонентів порівняно з хроматограмою стандартів феніраміну та його супровідних речовин. Сумарна кількість інжекттованих і по-різному утримуваних речовин трьох АФІ (аскорбінової кислоти, парацетамолу та кофеїну) займає більшість доступних активних

центрів взаємодії лігандів на хроматографічній матриці, залишаючи значно менше місць для взаємодії аналіту. Наслідком такого перевантаження колонки є значне зміщення всіх піків у бік раннішого елюювання.

Нашою метою було перевірити придатність представника хаотропних аніонів ряду Гофмейстера ClO_4^- для забезпечення достатнього утримування, розділення та симетрії піків феніраміну і його супровідних речовин. Як зазначалося раніше, хвостування піків основних сполук також зменшується при використанні хаотропних агентів. На рис. 3.4 показано порівняння складу двох зразків. Спостерігається виражена нелінійна поведінка хроматографічної системи (верхній рисунок ілюструє порівняння двох інжекцій суміші стандартів феніраміну об'ємом 3 і 5 мкл та 0.5 мкл розчину зразка таблетки; зміщення t_R внаслідок ефекту перевантаження колонки є значним і добре помітним).

Загальний висновок із цих хроматограм полягає в тому, що високополярні основні молекули, такі як фенірамін і його супровідні речовини, можуть ефективно утримуватися, розділятися та визначатися за допомогою хаотропного аніона ClO_4^- у поєднанні з колонкою з фенільним лігандом. Це дозволяє повністю визначати та кількісно аналізувати ці сполуки за різних концентрацій зразків, що вводяться на колонки з різним геометричним об'ємом (100×4.6 мм — 1.661 мл, 250×4.6 мм — 4.15 мл). Також необхідно враховувати додаткове розведення через значно більшу компресію пікових зон при використанні частинок 3 мкм порівняно з 5 мкм. Загальну ситуацію цих розширень показано на рис. 3.5.

Рисунок 3.5 демонструє проблему великої різниці у кількості інжектваного зразка, що призводить до сильно нелінійної залежності сигналу детектора від концентрації зразка. Як додаткове зауваження слід зазначити значно більшу місткість колонок із алкільними фазами C18 і C8 порівняно з фенільними фазами щодо навантаження матеріалу на грам сорбенту.

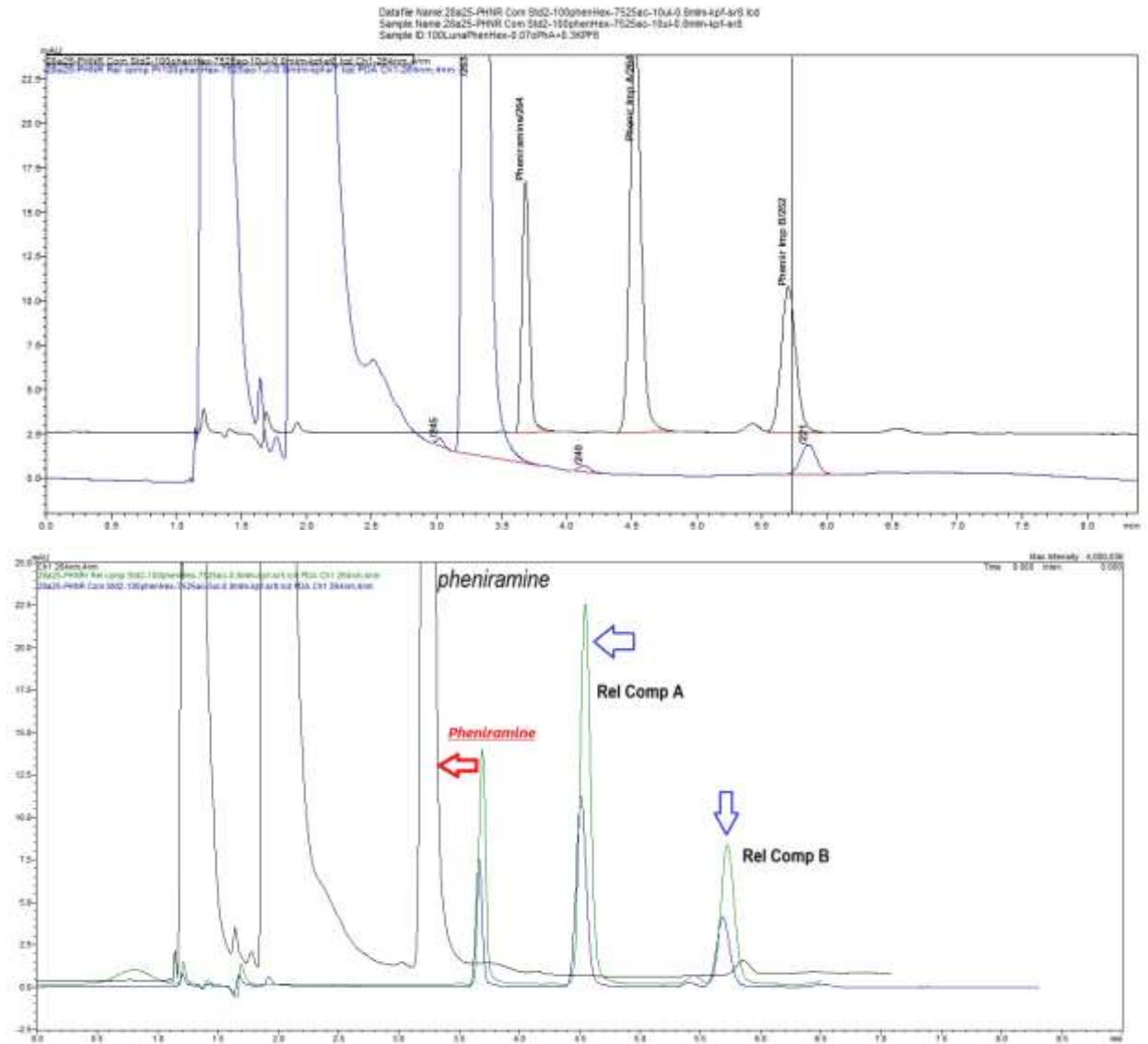


Рисунок 3.4 – Хроматограма реального зразка протизастудного препарату з накладеною хроматограмою суміші стандартів феніраміну та його супровідних речовин А і В, отримана на колонці Phenomenex Luna Hexyl-Phenyl (100 × 4.6 мм, 3 мкм) з рухомою фазою 25 % ACN і 75 % 0.07 % (v/v) H_3PO_4 при швидкості потоку 0.8 мл/хв та температурі 40 °С

Підсумовуючи порівняння методик, слід зазначити, що фармакопейна методика має тривалість аналізу близько 40 хв (разом із повторною еквілібрацією), тоді як запропонована нами методика триває приблизно 7 хв, тобто майже у 6 разів швидше та економічніше, що також робить його більш екологічно а екологічно вигіднішим. Аналітичні параметри методики ВЕРХ

для визначення феніраміну на колонці Phenomenex Luna Hexyl-Phenyl (100 × 4.6 мм, 3 мкм) з рухомою фазою 25 % ACN та 75 % 0,07 % (v/v) H₃PO₄ наведено в таблиці 3.1. Запропонована методика є лінійною у діапазоні концентрацій 5–30 мкг/мл з R² > 0.999 (рис. 3.6). Усі параметри валідації відповідали критеріям прийнятності щодо лінійності, правильності та прецизійності [121].

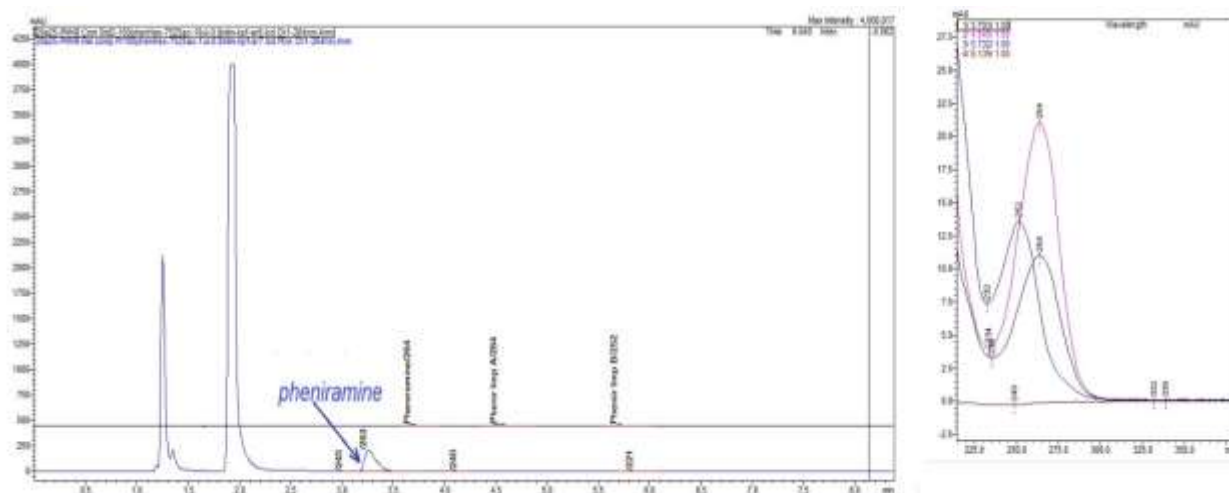


Рисунок 3.5 – Накладені хроматограми по всій осі Y, отримані на невеликій колонці Luna Hexyl-Phenyl (100 × 4.6 мм, 3 мкм) для суміші стандартів феніраміну та зразків таблеток протизастудного препарату, підготовлених для інжекції на колонці C18 (250 × 4.6 мм, 5 мкм)

Таблиця 3.1 – Аналітичні параметри ВЕРХ методики для визначення феніраміну на колонці Phenomenex Luna Hexyl-Phenyl (100 × 4.6 мм, 3 мкм) з рухомою фазою 25 % ACN та 75 % 0.07 % (v/v) H₃PO₄

Параметр	Критерії прийнятності	Аналіт (Фенірамін / Imp A / Imp B)
1	2	3
Селективність (індекс чистоти піка)	Відсутність інтерференції < 1.00	0.994 / 0.995 / 0.992
Роздільна здатність (Resolution)	2.0<	R1=6.358 ; R2=6.356

Продовження таблиці 3.1

1	2	3
Коефіцієнт утримування (Capacity factor) ($t_0 = 2,1$ хв — мертвий час)	1–10	PHNR=2.5; ImpA=3.5; ImpB=4.7
Фактор асиметрії (Tailing factor)	0.8–1.5	$tF1 = 1.103$; $tF2 = 1.119$; $tF3 = 1.098$
Число теоретичних тарілок (NTP/column)	>5000/column	NTP1=18739; NTP2=12803 ; NTP3=11830
Діапазон лінійності, мкг/мл	-	5 – 30
Коефіцієнт детермінації	0.999	0.9999
Вільний член (y-intercept), %	2.0	-1.36
Правильність (Accuracy), %	98 -102	101.2
Відновлення (Recovery), %	97-102	100.95
Повторюваність системи (System repeatability), %	RSD 2.0	0.232
Повторюваність методу (Method repeatability), %	RSD 2.0	0.41
Проміжна прецизійність (Intermediate precision), %	RSD 3.0	1.21
Чутливість (виражена як МВ і МКВ) $МВ = (3.3 \times s_{y.x}) / \text{slope}$ $МКВ = (10 \times s_{y.x}) / \text{slope}$	$МВ = (3.3 \times s_{y.x}) / \text{slope}$ $МКВ = (10 \times s_{y.x}) / \text{slope}$	$МВ \approx 0.2767$ мкг/мл $МКВ = 0.8384$ мкг/мл

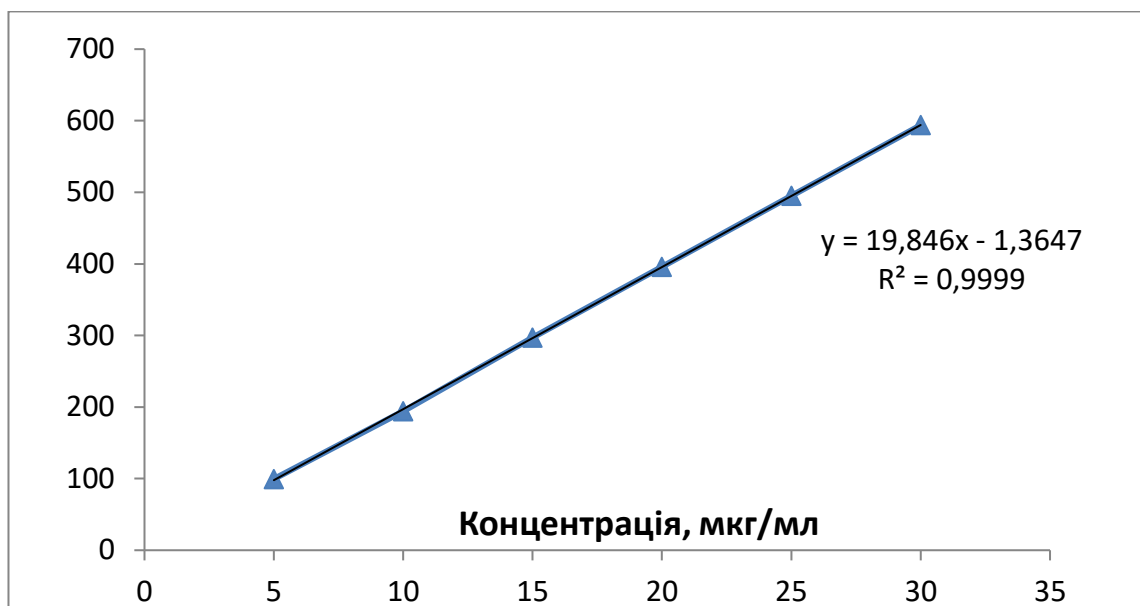


Рисунок 3.6 – Крива лінійності відгуку для феніраміну, отримана на колонці Luna Hexyl-Phenyl (100 × 4.6 мм, 5 мкм) з використанням рухомої фази 25 % ACN і 75 % 0,07 % (об./об.) H_3PO_4 при швидкості потоку 0.8 мл/хв і температурі 40 °C

Робасність методики досліджували на етапі розробки ВЕРХ-методики. Порівняння запропонованої методики з існуючими експериментальними методами, описаними у науковій літературі, наведено в таблиці 3.2, що демонструє експресний, «зелений» аналіз за наявності супровідних речовин і симетричні піки [122, 123].

Принципи «зеленої» аналітичної хімії (Green Analytical Chemistry, GAC) були ретельно враховані під час розробки методики [124-129]. Це чітко проявляється у виборі хроматографічного аналізу, використанні ACN, H_3PO_4 , NaClO_4 , а також у відсутності стадії дериватизації. Ці переваги відрізняють запропоновану нами методику від раніше описаних методик ВЕРХ, які ґрунтувалися на використанні більш небезпечних розчинників. Крім того, у раніше описаних методиках не враховувалися потенційні ризики для лабораторного персоналу та забруднення довкілля, що виникають унаслідок використання небезпечних розчинників і реагентів. Також у деяких методиках спостерігається надмірно тривалий час утримування.

Таблиця 3.2 – Порівняння між запропонованими ВЕРХ методиками та існуючими експериментальними методиками, описаними в науковій літературі

Методика	Лікарська форма/матриця	Рухома фаза	Колонка	Діапазон лінійності, мкг/мл	Коментарі
[6]	проти кашльові та протизастудні лікарські засоби	MeOH:буфер (38:62, v/v)	Nucleodur gravity C18 (250 x 4.0 мм, 5мкм)	0.5–250	Аналіз — близько 40 хв через комбіновані лікарські форми; деякі піки не відповідають параметрам придатності системи
[7]	очні краплі та біологічна рідина (водяниста волога ока кролика)	фосфатний буфер pH 6.0: ACN (70 : 30, v/v)	Hypersil ODS (5 мм, 250-4.6 мм i.d.)	10.00-110.00	Аналіз — близько 28 хв через комбіновані лікарські форми
Розроблена методика	порошок	25 % ACN та 75 % 0.07 % v/v H ₃ PO ₄	Phenomenex Luna Hexyl-Phenyl (100x4.6 мм 3 мкм)	5–30	Швидкий «зелений» аналіз за наявності супровідних речовин, симетричні піки

Для підтвердження відповідності розробленого підходу принципам GAC було проведено детальну оцінку «зеленості» методики. У цій оцінці запропоновану методику порівнювали з раніше опублікованими процедурами ВЕРХ, використовуючи два з найбільш відомих і актуальних інструментів оцінювання екологічності: Analytical GREEnness metric (AGREE) [124] та Modified Green Analytic Procedure Index (MOGAPI) [125]. На відміну від попередніх інструментів оцінки «зеленості», які зосереджувалися лише на токсичності реагентів або споживанні енергії, ці підходи використовують комплексний підхід, враховуючи різні аспекти на кожному етапі аналітичного процесу — від відбору проб до утилізації відходів. AGREE (Analytical GREEnness metric) — це кількісний інструмент, що базується на 12 принципах зеленої аналітичної хімії. Він об'єднує всі ці принципи в один круговий піктограмний індикатор, де кожен сегмент кільця відповідає окремому принципу. Оцінка визначається автоматично і має значення від 0 до 1, що відображає загальну екологічність методу: чим вищий показник, тим більш екологічно сталим є метод. MOGAPI — це інноваційний візуальний інструмент, який оцінює екологічний вплив аналітичного методу за допомогою шкали балів, що характеризує загальну «зеленість». Результат представлений у вигляді діаграми з кольорових сегментів (зелений, жовтий і червоний), які відповідно відображають незначний, помірний та значний екологічний вплив. Чим більше зелених сегментів, тим більш екологічно сталим є метод. Як показано на рис. 3.6, запропоновані методики ВЕРХ мають більше зелених сегментів у піктограмі MOGAPI, ніж раніше опубліковані методики, що свідчить про менший негативний вплив на довкілля. Крім того, оцінка AGREE показала вищі загальні значення для нашого підходу, демонструючи його переваги з точки зору екологічної сталості та безпеки для навколишнього середовища (рис. 3.7).

Отримані результати підтверджують придатність нашої методики не лише з погляду аналітичної ефективності, але й з точки зору відповідності

принципам «зеленої» хімії, що сприяє розвитку більш екологічно орієнтованого фармацевтичного аналізу.



а



б

Рисунок 3.7 – Оцінки за інструментами AGREE (а) та MOGAPI (б)

Висновки до розділу 3

1. У цій роботі представлено позитивну роль хаотропних агентів (солей) у розробці швидких, простих та економічно ефективних методів обернено-фазової ВЕРХ. Включення сильних хаотропних солей до складу рухомої фази під час рідинно-хроматографічного визначення показало значне спрощення методики та скорочення часу аналізу. Роль найсильнішого хаотропного агента — перхлорату натрію — була досліджена у двох різних і незалежних дослідницьких випадках для феніраміну малеату із відповідними супровідними речовинами та лікарськими формами. Отримані результати підтвердили високу придатність і ефективність використання цих солей у розробці аналітичних методів контролю лікарських засобів.
2. Досліджено два різні набори колонок із обернено-фазовою (RP) зв'язаною фазою: HClO_4 у поєднанні з менш гідрофобною фенілзв'язаною колонкою для розділення феніраміну та його супровідних речовин. Запропоновано експересну, просту та економічно ефективну методику, що базуються на використанні хаотропної взаємодії між аналітами та лігандами стаціонарної фази.

3. Проведені дослідження та експерименти підтвердили переваги застосування різних хаотропних солей для регулювання сили взаємодій між аналітами та зв'язаними лігандами. Це дало змогу розробити методики, особливо для аналізу сильно полярних молекул із слабким утримуванням, які елююють близько до мертвого об'єму або мертвого часу колонок.
4. Запропонований підхід дозволяє уникнути придбання іон-парних реагентів, а також необхідності формування іонних пар і використання окремих колонок для іон-парної хроматографії. Це робить методи більш універсальними та придатними для повної валідації аналізу складних і проблемних молекулярних структур, таких фенірамін із його супровідними речовинами. Загальний економічний ефект продемонстровано через зменшення часу аналізу, споживання органічних розчинників, тривалості експлуатації обладнання та трудових витрат.
5. ВЕРХ методика була валідована. Запропонована методика є лінійною у діапазоні концентрацій 5–30 мкг/мл з $R^2 > 0.999$. Усі параметри валідації відповідали критеріям прийнятності щодо лінійності, правильності та прецизійності.
6. Загальний ефект від застосування хаотропних агентів проявляється у забезпеченні «зеленого» аналізу за наявності домішок із формуванням симетричних піків для запропонованих методів ВЕРХ. Економічна ефективність методу підтверджується скороченням часу аналізу, зменшенням споживання органічних реагентів, подовженням терміну експлуатації обладнання та зниженням трудових витрат.
7. Наше дослідження відкриває перспективи для подальшого застосування хаотропного ефекту з метою покращення розділення в інших подібних аналітичних задачах. Загальний ефект від застосування хаотропних агентів проявляється у забезпеченні «зеленого» аналізу за наявності

домішок із формуванням симетричних піків для запропонованих методів ВЕРХ. Економічна ефективність методу підтверджується скороченням часу аналізу, зменшенням споживання органічних реагентів, подовженням терміну експлуатації обладнання та зниженням трудових витрат.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в наукових працях автора [122, 123].

РОЗДІЛ 4

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ ВЕРХ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЦИСПЛАТИНУ ТА КАРБОПЛАТИНУ В ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ

4.1 Розробка та валідація ВЕРХ методики кількісного визначення цисплатину в лікарських засобах

Хроматографічне визначення цисплатину та його супровідних речовин є складним завданням через неорганічну природу цієї сполуки. Молекула містить центральний атом платини, розташований між двома атомами хлору та двома аміногрупами, що надає їй виражених амфотерних властивостей із проявами як кислотних, так і основних характеристик. Відсутність хромофорних груп, які поглинають у УФ-діапазоні, робить сполуку майже невидимою для УФ-детектування та зумовлює слабе утримування на алкільних обернено-фазових колонках C8 або C18, які зазвичай забезпечують оптимальне розділення та формування вузьких піків. Відмінності між хроматограмою, отриманою згідно з ВР із використанням двох протилежно заряджених іон-парних реагентів, та хроматограмою, отриманою із застосуванням лише хаотропної солі KPF_6 , наведено на рис. 4.1.

Під час використання колонки LiChrospher C-8e (250 × 4 мм, 5 мкм) для перевірки відтворюваності та ефективності методики ВЕРХ, який базується на застосуванні стаціонарної фази L7, замість оригінальної колонки Supersphere RP-Select B (250 × 4 мм, 4 мкм), що використовується у фармакопейному методі ВР 2025 для визначення споріднених домішок цисплатину з двома іон-парними реагентами, було отримано подібні, але цікаві та придатні для аналізу результати, представлені на рис. 4.1. Оригінальна хроматограма була отримана на колонці Superspher Select B (250 × 4 мм, 4 мкм). Таким чином, фармакопейний метод ВЕРХ для визначення супровідних речовин цисплатину

є специфічним, оскільки подібні колонки на основі октилсилану, виготовлені одним виробником (Merck KGaA, Дармштадт), можуть демонструвати різний профіль розділення.

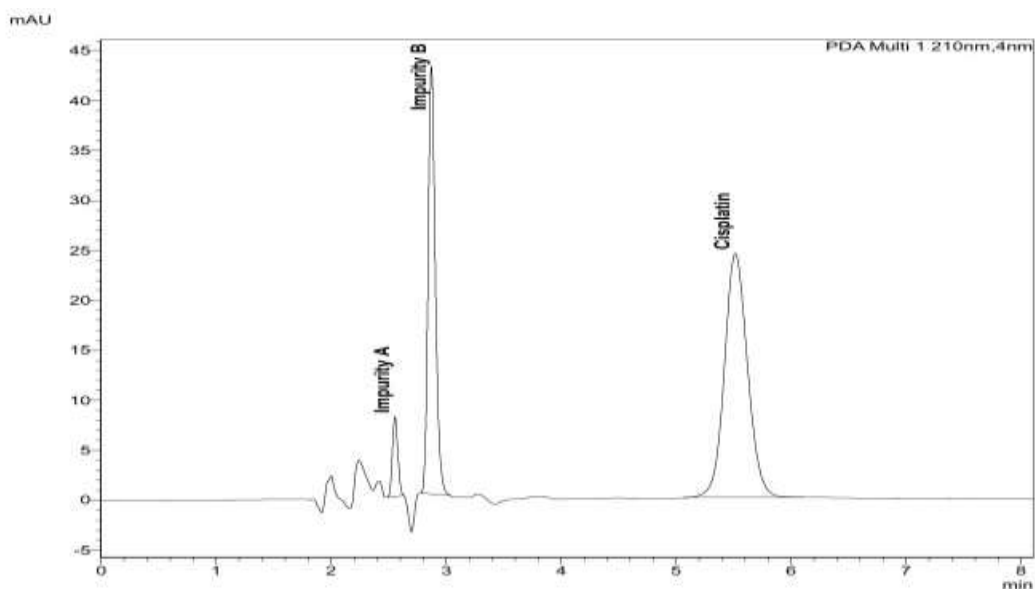


Рисунок 4.1 – Хроматограма, що відображає оригінальне розділення цисплатину та його супровідних речовин А і В на колонці Merck LiChrospher C-8e (250 × 4 мм, 5 мкм) із використанням аніонного та катіонного іон-парних реагентів відповідно до опису у фармакопейних монографіях ВР та USP

Слід зазначити, що колонка RP Superspher Select B містить частинки з порами 50 Å і діаметром 4 мкм, які є деактивованими за основними центрами та ендкепованими, тоді як колонка LiChrospher 100 C-8e має частинки 5 мкм із розміром пор 100 Å, є ендкепованою, але не деактивованою щодо залишкових катіонів металів. Окрім цих параметрів, відрізняються також вміст вуглецю та активна поверхня, що істотно впливає на розділення іоногенних аналітів, особливо за наявності у рухомій фазі двох протилежно заряджених іон-парних реагентів. У подальших дослідженнях колонку LiChrospher C-8e (L7) було замінено на більш ретенційну колонку C18 (L1) – Agilent Zorbax Eclipse Bonus C18 (150 × 4.6 мм, 3.5 мкм), хоча її довжина становила лише 150 мм, оскільки

аналогічної колонки довжиною 250 мм із такою ж матрицею не було доступно. Як зазначалося, фармакопейний метод із використанням двох протилежних іон-парних реагентів є незручним і не надто економічним. Наявність двох аміногруп у молекулі спонукала нас випробувати хаотропні агенти, зокрема хаотропні аніони, у двох різних експериментах із використанням різних колонок і хаотропів.

У першому експерименті використовували колонку Agilent Zorbax Eclipse Bonus RP-18 (150 × 4.6 мм, 3.5 мкм). Рухома фаза складалася з 3 % ACN і 97 % буфера 10 мМ КН₂Р₄ + 0.32 % КРФ₆ (м/об) з рН 5.9. Об'єм інжекції становив 1–2 мкл, температура 30 °С, детектування за довжини хвилі 210/220 нм, швидкість потоку 0,5 мл/хв. Отримані результати наведено на рис. 4.2.

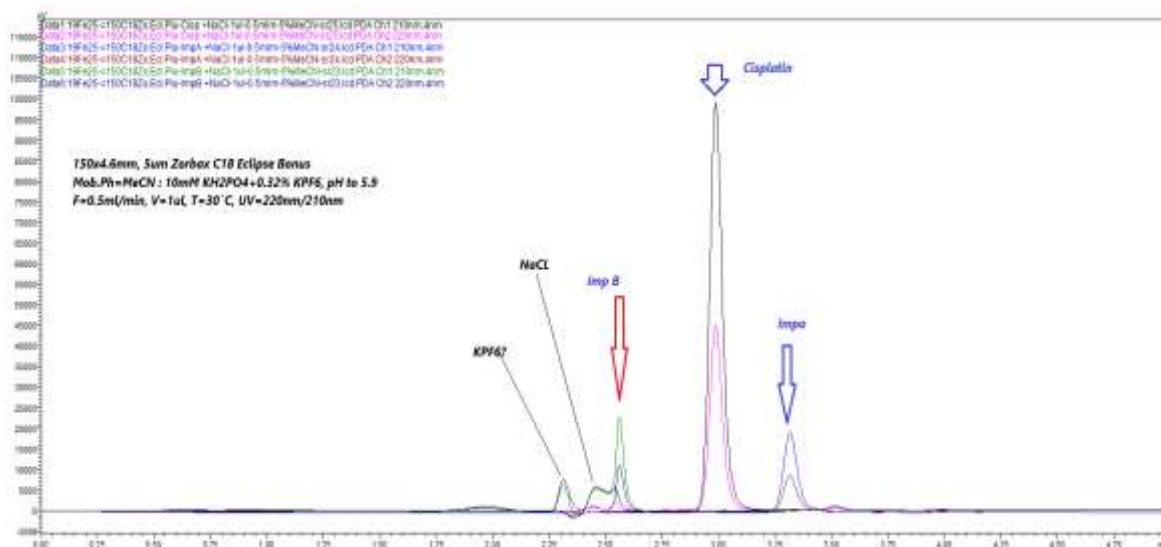


Рисунок 4.2 – Хроматограма, отримана на колонці Agilent Zorbax C18 Eclipse Bonus (150 × 4.6 мм, 3.5 мкм) з використанням рухомої фази 5 % ACN і 95 % буфера (10 мМ КН₂Р₄, 0.32 % м/об КРФ₆, рН = 5.9), детектування за довжини хвилі 210/220 нм (порядок елюювання: Imp В, цисплатин (CSP), Imp А)

Як видно з рис. 4.2, було досягнуто цікавих і придатних результатів, які могли б бути ще кращими при використанні колонки довжиною 250 мм із

такою ж матрицею. Скошена висхідна частина піка Imp В могла бути спричинена NaCl, наявним у розчиннику зразка. Підвищення довжини хвилі детектування до 220 нм зменшує вплив цього забруднення, покращуючи симетрію піка, роздільну здатність, селективність і точність визначення. Зниження чутливості можна компенсувати збільшенням об'єму інжекції. Співвідношення ACN і буфера виявилось оптимальним. Наступним кроком було застосування тієї ж підготовки зразка на колонці ShimPack C18 GIST (250 × 4.6 мм, 5 мкм), яка має майже вдвічі більшу кількість теоретичних тарілок на метр і на колонку та є високоендкепованою і деактивованою кремнеземною матрицею. Як видно з рис. 4.3, ця колонка забезпечує найкращу симетрію піків та задовільну роздільну здатність.

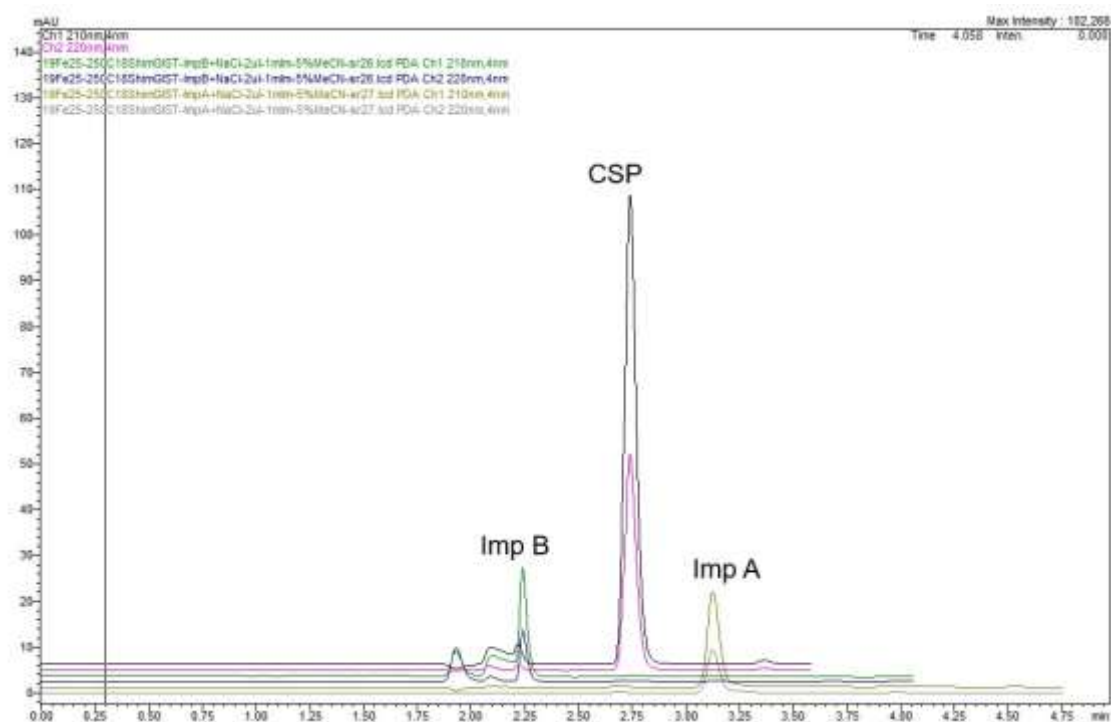


Рисунок 4.3 – Хроматограма цисплатину та супровідних речовин А і В, розділених на колонці ShimPack C18 GIST (250 × 4.6 мм, 5 мкм), із суттєво кращою формою піків; порядок елюювання: 1 — Imp В (2.25 хв), 2 — цисплатин (2.75 хв), 3 — Imp А (3.15 хв)

У третьому експерименті використовували колонку Nucleosil Nucleodur C18 (250 × 4.6 мм, 3 мкм) із високим вмістом вуглецю (15 %) та високою ефективністю (велике значення NTP/м). Рухома фаза складалася з 10 % АСN і 90 % буфера КРF₆ (0.55 % м/об) при рН 2.8. Було протестовано також 5 % АСN, але збільшення до 10 % АСN дало оптимальні результати. Зміна вмісту АСN на 5 % лише незначно впливала на часи утримування і розділення піків, але дозволяла відокремити асиметричний овальний пік від основних піків, що підвищувало точність визначення. Рекомендовано використовувати об'єми інжекції 1–5 мкл. З проведених досліджень встановлено, що порядок елювання відрізняється від фармакопейного методу. У фармакопейному методі: Imp А → Imp В → cisplatin, тоді як у методах із використанням хаотропної солі: Imp В → cisplatin → Imp А. Хроматограма на рис. 4.4 демонструє УФ-спектри поглинання трьох аналізованих сполук.

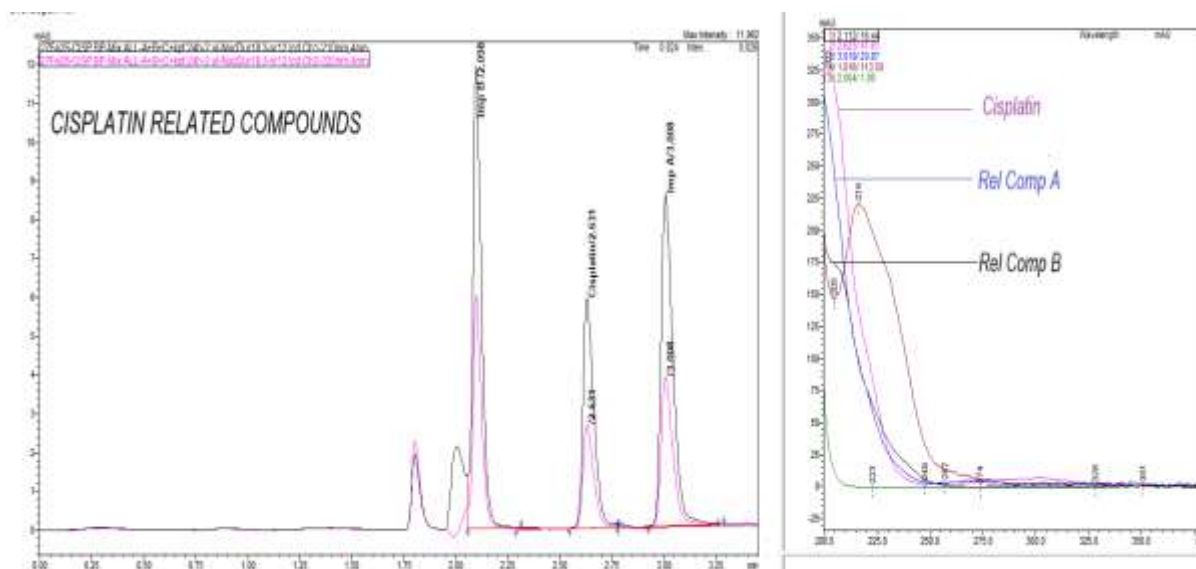


Рисунок 4.4 – Хроматограми цисплатину та його супровідних домішок, отримані на колонці Nucleosil Nucleodur C18 з рухомою фазою 10 % АСN і 90 % буфера, що містить КРF₆ (рН 2.8), кожна з характерними автентичними спектрами УФ-поглинання; швидкість потоку 1 мл/хв, детектування у двох УФ-каналах — 210 нм і 220 нм

Визначення цисплатину ускладнюється відсутністю хромофора, що обмежує детектування у ближній УФ-області 190–210 нм.

Ці характеристики також обмежують вибір компонентів рухомої фази — вони повинні мати мінімальне власне УФ-поглинання, тому оптимальним органічним модифікатором є АСН. Запропонований нами підхід до розробки методики ВЕРХ для визначення цисплатину та супровідних домішок А і В є простішим, експресним та економічно ефективнішим.

На рис. 4.5 показано вплив швидкості потоку та об'єму інжекції. Збільшення об'єму інжекції з 3 до 5 мкл суттєво не погіршує роздільну здатність, тоді як зменшення швидкості потоку вдвічі підвищує роздільну здатність між критичною парою піків.

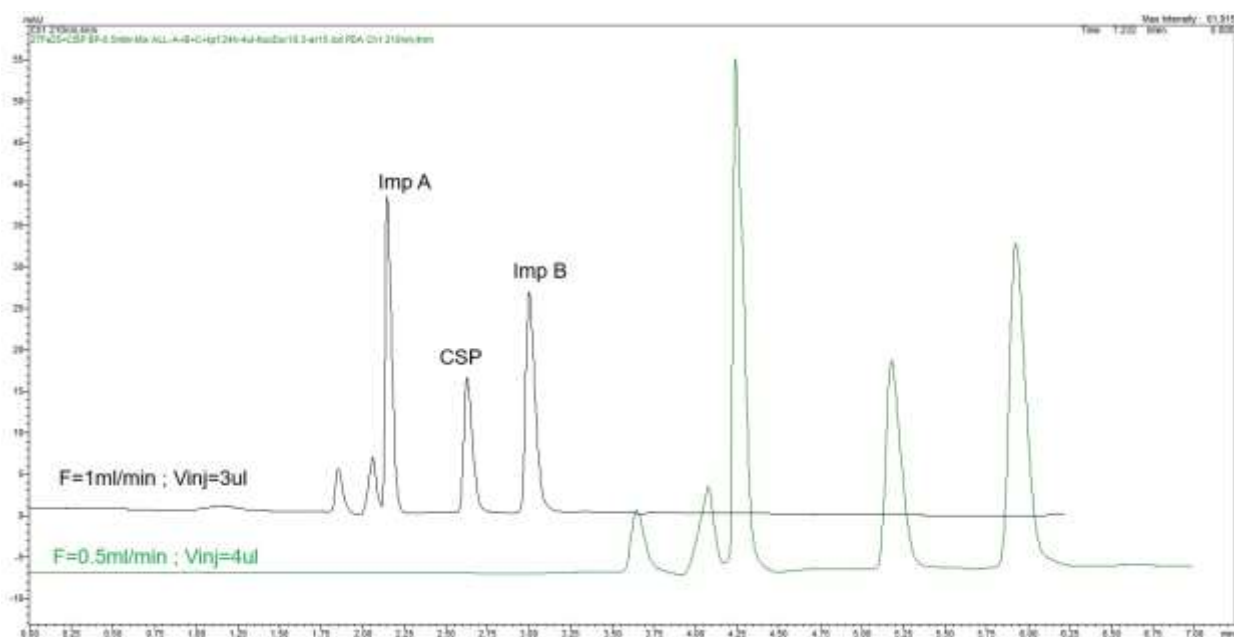


Рисунок 4.5 – Хроматограми, отримані при вивченні робастності при варіюванні параметрів: швидкість потоку 0.5 мл/хв і 1.0 мл/хв та об'єми інжекції 3 мкл і 5 мкл; колонка (рухома фаза: 90 % буфера 0.5 % КРФ₆, рН 2.78 + 10 % АСН); порядок елюювання: 1 — Imp В, 2 — цисплатин, 3 — Imp А.

Останнім етапом дослідження було визначення лінійності методики, результати якої наведено на рис. 4.6. Детектування за довжини хвилі 210 та 220 нм застосовано для порівняння лінійної відповіді УФ-детектора у випадках потенційної коелюції ($R_s < 1.25$). Детектування за довжини хвилі 220 нм покращує селективність, але зменшує чутливість приблизно вдвічі. Це легко компенсується збільшенням об'єму інжекції або концентрації аналіту.

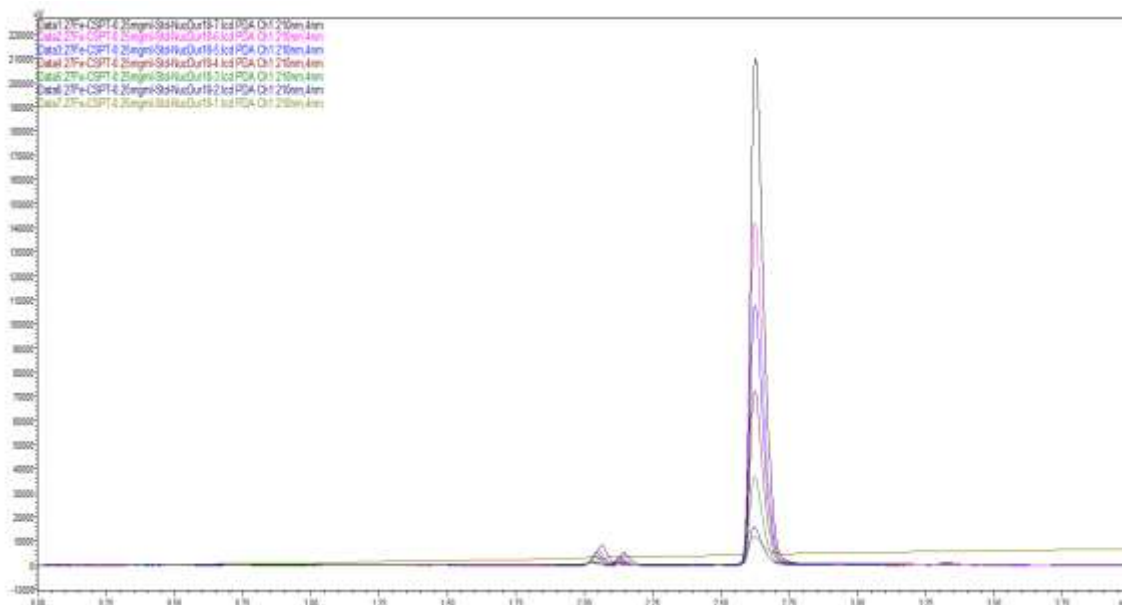


Рисунок 4.6 – Хроматограми, отримані при вивченні лінійності в діапазоні концентрацій цисплатину 0.025–0.5 мг/мл на колонці Nucleosil Nucleodur C18 (250 × 4.6 мм, 3 мкм) з рухомою фазою 10 % ACN і 90 % буфера, що містить KPF_6 (pH = 2.8)

Отримані графіки на рис. 4.7 демонструють дві накладені калібрувальні криві для концентрацій 0.025–0.5 мг/мл цисплатину з високим коефіцієнтом кореляції R^2 . У підсумку нами розроблено новий простий підхід до створення методик ВЕРХ для визначення цисплатину в лікарських формах із одночасним визначенням його супровідних речовин А і В. Запропонована методика є експресною, простою і економічно ефективною, що стало можливим завдяки використанню сильної хаотропної солі KPF_6 , відповідно до теорії

Гофмейстера. Наявність цієї солі забезпечує достатнє утримування молекули цисплатину та його супровідних речовин без використання іон-парних реагентів і спеціального призначення колонок, навіть попри відсутність вуглецевого скелета в молекулі. Аналітичні параметри методики ВЕРХ для визначення цисплатину на колонці Nucleosil Nucleodur C18 із рухомою фазою 10 % ACN та 90 % буфера KPF₆ (рН 2,8) наведено в табл. 4.1.

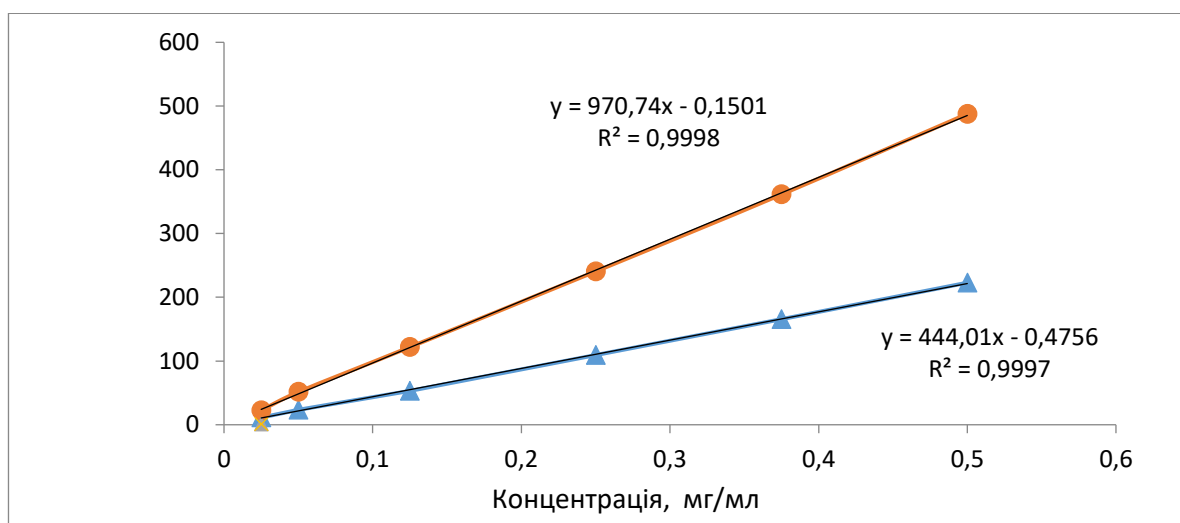


Рисунок 4.7 – Графік залежності площі піка від концентрації при вивченні лінійності цисплатину, вимірюваного у двох УФ-каналах — 210 нм та 220 нм — на колонці Nucleosil Nucleodur C18 (250 × 4.6 мм, 5 мкм) з рухомою фазою 10 % ACN і 90 % 0.5 % KPF₆ (рН = 2.8)

Запропонована методика демонструє лінійність у діапазоні концентрацій 0.025–0.5 мг/мл з $R^2 > 0.999$. Усі параметри валідації відповідають критеріям прийнятності щодо лінійності, точності та прецизійності [121]. Робасність методики була оцінена на етапі його розробки [122, 123].

Порівняння запропонованої методики з існуючими експериментальними методами, описаними у науковій літературі, наведено в таблиці 4.2, що демонструє експресний, «зелений» аналіз за наявності супровідних речовин і симетричні піки.

Таблиця 4.1 – Аналітичні параметри методики ВЕРХ для визначення цисплатину на колонці Nucleosil Nucleodur C18 з рухомою фазою 10 % ACN та 90 % буфера, що містить KPF_6 (рН 2.8)

Параметри	Критерії прийнятності	Аналіт (Imp B / Цисплатин / Imp A)
1	2	3
Селективність (індекс чистоти піка)	Критерій: відсутність інтерференції <1.00	0.991 / 0.996 / 0.997
Роздільна здатність (Resolution)	2.0<	Imp B/Cisp=3.9; Cisp/Imp A= 3.6
Коефіцієнт утримування (Capacity factor, $t_0 = 2,1$ хв — мертвий час)	1–10	1.3-ImpB, 1.78-Cisp,; ImpA-2.17
Фактор асиметрії (Tailing factor)	0.8–1.5	$tF=1.24$ -ImpB; 1.43-Cisp; 1,52-ImpA
Число теоретичних тарілок (NTP/колонка)	,>5000/колонку	10780 ImpB; 10955 Cisp;12186 ImpA
Діапазон лінійності, мг/мл	-	0.025-0.50
Коефіцієнт детермінації	0.999	0.9998 (UV=210нм) 0.9997 (UV=220нм)
Вільний член рівняння (у-перетин), %	2.0	-0.15
Правильність (Accuracy), %	98 -102	101.11
Відновлення (Recovery), %	97-102	99.77
Повторюваність системи (System repeatability), %	RSD 2.0	0.39

Продовження таблиці 4.1

1	2	3
Повторюваність методу (Method repeatability), %	RSD 2.0	0.58
Проміжна прецизійність (Intermediate precision), %	RSD 3.0	0.73
Чутливість виражена через МВ та МКВ	$MB = (3.3 \times s_{y.x}) / \text{slope}$ $МКВ = (10 \times s_{y.x}) / \text{slope}$ UV=210 нм UV=220 нм x 0.52)	МВ - 0.0092 мг/мл МКВ - 0.0279 мг/мл UV=210 нм) $MB = 3.3 * (2.69 / 962.95) \approx 3.3 * 0.00279 \approx 0.0092 \text{ мг/мл}$ $МКВ = 10 * (2.69 / 962.95) \approx 10 * 0.00279 \approx 0.0279 \text{ мг/мл}$ (UV=210 нм) ----- МВ - 0.0118 мг/мл МКВ - 0.0358 мг/мл (UV=220 нм) $MB: МКВ = (10 * 1.5837) / 441.87 \text{ LOQ} = 15.837 / 441.87$ $МКВ \approx 0.0358 \text{ мг/мл (UV=220 нм)}$ $MB: МКВ = (3.3 * 1.5837) / 441.87 \text{ МКВ} = 5.22621 / 441.87$ $МКВ \approx 0.0118 \text{ мг/мл}$

Таблиця 4.2 – Порівняння між запропонованими ВЕРХ методиками та існуючими експериментальними методиками, описаними в науковій літературі

Методика	Лікарська форма/матриця	Рухома фаза	Колонка	Діапазон лінійності	Коментарі
[21]	Людська плазма	MeOH:water:ACN (40:30:30 v/v/v)	Wakosil II (5 мкм, 250 см × 4.6 мм I.D.)	1-10 мкг/мл	Потребує екстракції, оскільки матрицею є плазма людини; час утримування — 12,5 хв
[22]	Водний розчин	Дві рухомі фази: перша містила суміш MeOH та води (3 % об./об.) з рН 2,5, відрегульованим метансульфоною кислотою (процедура I), а друга містила суміш MeOH та води (7 % об./об.) з рН 2,5, відрегульованим тією ж кислотою (процедура II)	25 x 0.4 см, 5-мкм, Spherisorb NH ₂	0.5-1.5 x 10 ⁻³ моль л ⁻¹	Не підходить для аналізу лікарських форм, потребує використання специфічної колонки
Розроблена методика	Розчин для ін'єкцій	10 % ACN and 90 % KPF ₆ containing buffer pH 2.8	Nucleosil Nucleodur C18(250x4.6 мм 3 мкм)	0.025-0.5 мг/мл	Швидкий «зелений» аналіз за наявності домішок із симетричним піком

Принципи ГАС були ретельно враховано під час розробки методики [124-129]. Це чітко проявляється у виборі хроматографічного аналізу, використанні АСН, КРФ₆, а також у відсутності стадії дериватизації. На рис. 4.8 представлено оцінки за інструментами AGREE та MOGAPI.



Рисунок 4.8 – Оцінки за інструментами AGREE (a) та MOGAPI (b)

Розроблена ВЕРХ методика є «зеленою», а отже екологічно безпечною, а також економічно вигідною та доступною. Сумарний вплив позитивної ролі хаотропних агентів полягає у забезпеченні «зеленого» аналізу за наявності супровідних речовин та формуванні симетричних піків у запропонованій нами ВЕРХ методиці; економічна ефективність проявляється у скороченні часу аналізу, зменшенні споживання органічних реагентів, подовженні терміну експлуатації обладнання та зниженні трудових витрат.

4.2 Розробка та валідація ВЕРХ методики кількісного визначення карбоплатину в лікарських засобах

Теорія посилення взаємодії між аналітом та лігандом на оберненофазових колонках С-18 або С-8 припускає, що хаотропні катіони забезпечують кращу експозицію прихованих гідрофобних ділянок молекул до їхніх поверхонь, тим самим посилюючи гідрофобні сили між основним N-

вмісним аналітом та алкілованою фазою. Узагальнений ефект цих взаємодій – це збільшення часу утримування та ємності утримування розділювальних молекул. Попередні експерименти показали, що ці взаємодії є більш інтенсивними, коли в якості рухомої фази використовується АСН, що, за припущенням, утворює товстіший багатосаровий шар на стаціонарній фазі. Інша важлива перевага застосування солей хаотропних аніонів в складі рухомої фази є покращення симетрії піків. Це можна досягнути використанням низьких кількостей АСН (5-10 %) та високих кількостей буферного розчину 40-50 мМ одного з найсильніших хаотропів за теорією Гофмейстера KPF_6 (рН 2.3-2.5) в складі рухомої фази на колонках С18 або С8. Нами розпочато попередні дослідження з використанням рухомої фази - буферного розчину 40 мМ KPF_6 (рН 2.43) та АСН (90:10) на колонці Luna С18 (100 x 4.6 мм 3 мкм), швидкість потоку рухомої фази – 0.6 мл/хв, температура колонки - 30° С, детектування за довжини хвилі 210 нм (рис. 4.9). В таблиці 4.3 представлено параметри придатності хроматографічної системи до рис.4.9. Час утримування карбоплатину становив 2.29 хв. На наступному етапі нами апробовано підхід з використанням рухомої фази - буферного розчину 40 мМ KPF_6 (рН 2.43) та АСН (95:5) на колонці Luna С18 (100 x 4.6 мм 3 мкм), швидкість потоку рухомої фази – 0.6 мл/хв, температура колонки - 30° С, детектування за довжини хвилі 210 нм (рис. 4.10). В таблиці 4.4 представлено параметри придатності хроматографічної системи до рис. 4.10. Час утримування карбоплатину становив 2.97 хв. Параметри придатності хроматографічних систем є задовільними для обох підходів, проте кращі значення отримано з використанням співвідношення компонентів рухомої фази 40 мМ KPF_6 (рН 2.43) та АСН (95:5). Важливим є вибір температури колонки. Ми працювали на 30° С, проте вирішили апробувати і температуру 30° С.

На рис. 4.11 представлено хроматограму розчину карбоплатину, отриману з використанням рухомої фази - буферного розчину 40 мМ KPF_6

(рН 2.43) та ACN (95:5) на колонці Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм), швидкість потоку рухомої фази – 0.6 мл/хв, температура колонки - 35° С, детектування за довжини хвилі 210 нм. В таблиці 4.5 наведено параметри придатності хроматографічної системи до рис. 4.11. Час утримування карбоплатину становив 2.90 хв.

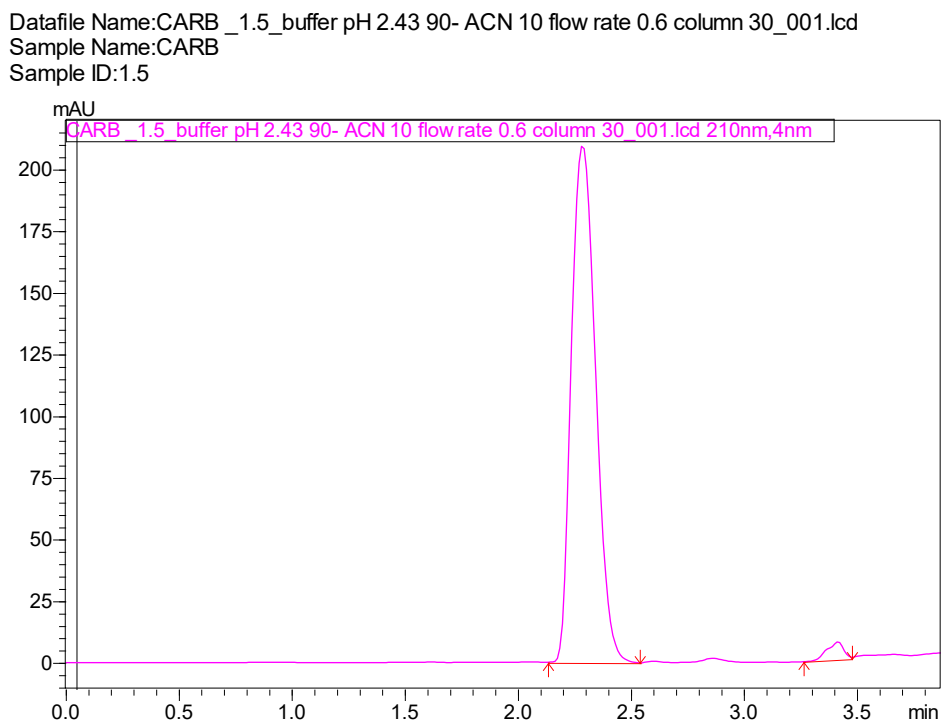


Рисунок 4.9 – Хроматограма карбоплатину (0.1 мг/мл) на колонці Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм) з 10 % ACN та 90 % буфером KPF₆ 40 мМ рН 2.43, температура колонки - 30° С, детектування за довжини хвилі 210 нм

Таблиця 4.3 – Параметри придатності хроматографічної системи до рисунка 4.9

Пік	Час утримування, хв	Площа	Висота	Площа, %	Tailin g F.	k'	Separation	NTP (USP)	HETP (USP)	Resolution (USP)
1	2.287	1563807	209315	97.651	1.220	0.000	--	1872	80.113	--
2	3.416	37613	7274	2.349	--	0.494	0.000	8269	18.141	6.244
Разом		1601420	216588	100.000						

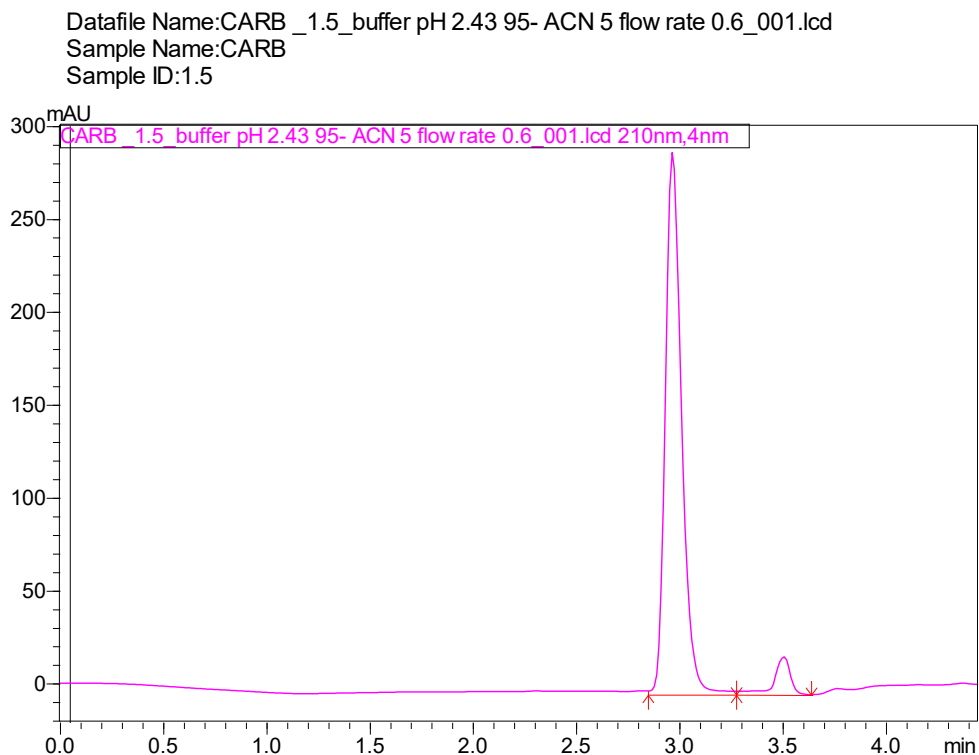


Рисунок 4.10 – Хроматограма карбоплатину (0.1 мг/мл) на колонці Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм) з 5 % ACN та 95 % буфером KPF_6 40 мМ рН 2.43, температура колонки - 30° С, детектування за довжини хвилі 210 нм

Таблиця 4.4 – Параметри придатності хроматографічної системи до рисунку 4.10

Пік	Час утримування, хв	Площа	Висота	Площа, %	Tailing F.	k'	Separation	NTP(USP)	HETP(USP)	Resolution(USP)
1	2.967	1597203	291560	93.422	1.269	0.000	--	5308	28.258	--
2	3.507	112456	20243	6.578	--	0.182	0.000	9471	15.838	3.515
Разом		1709659	311802	100.000						

Як впливає з рис. 4.10, 4.11 та таблиць 4.4, 4.5 оптимальними є обидві температури, проте ми обрали 30° С. рН 2.43 буферного розчину KPF_6 (40 мМ) є відмінним, проте нами досліджено і інші значення рН. В даному дослідженні оптимальною довжиною хвилі детектування є 195-210 нм. Ми розпочали експерименти з 210 нм, проте рис. 4.12 вказує на те, що оптимальною є довжина хвилі детектування 195 нм.

Datafile Name: CARB_1.5_buffer pH 2.43 95- ACN 5 flow rate 0.6 column 35_001.lcd
 Sample Name: CARB
 Sample ID: 1.5

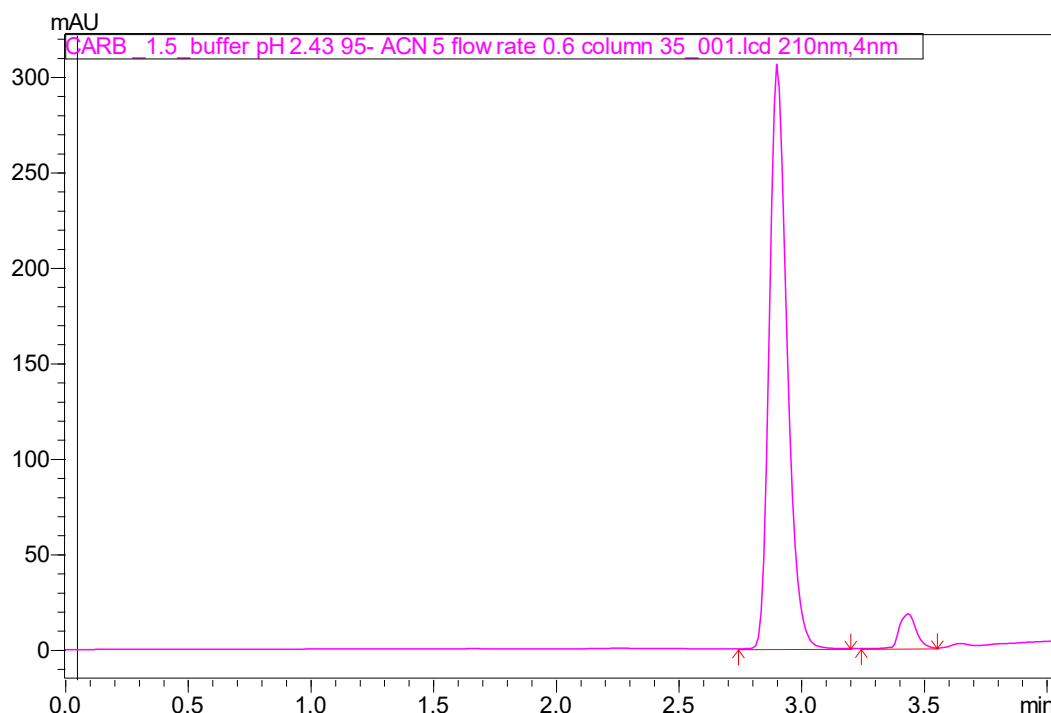


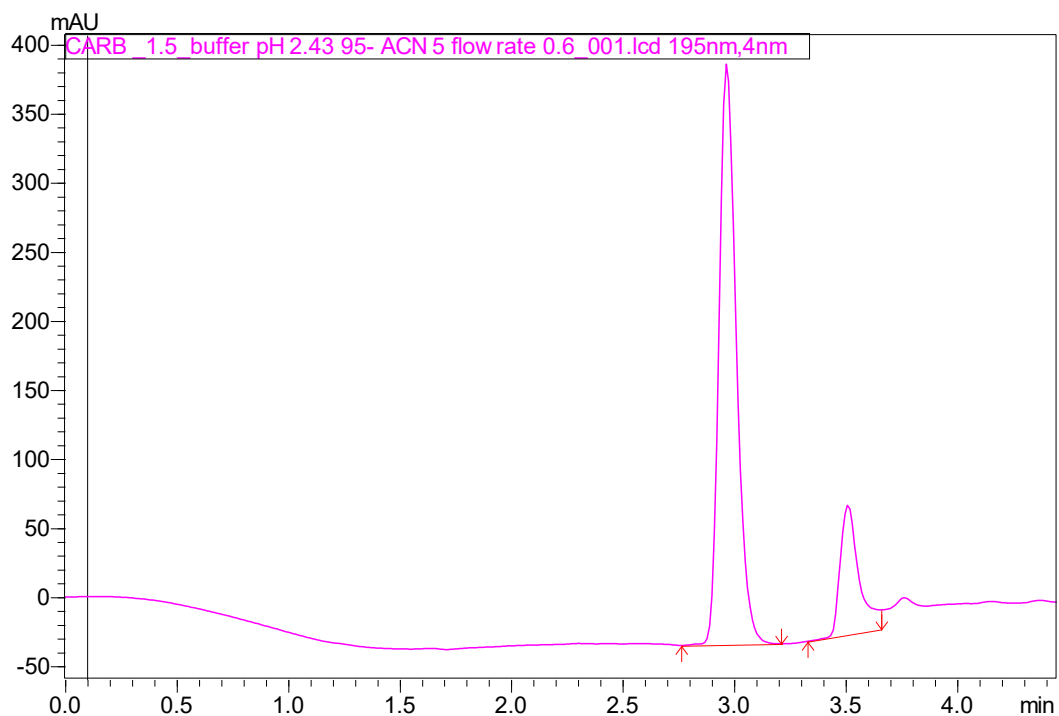
Рисунок 4.11 – Хроматограма карбоплатину (0.1 мг/мл) на колонці Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм) з 5% ACN та 95% буфером KPF_6 40 мМ рН 2.43, температура колонки - 35° С, детектування за довжини хвилі 210 нм

Таблиця 4.5 – Параметри придатності хроматографічної системи до рисунку 4.11

Пік	Час утримування, хв	Площа	Висота	Площа, %	Tailing F.	k'	Separation	NTP(USP)	HETP (USP)	Resolution(USP)
1	2.903	1550679	306145	94.767	1.270	0.000	--	5695	26.337	--
2	3.437	85619	18097	5.233	1.158	0.184	0.000	9237	16.240	3.597
Разом		1636298	324242	100.000						

Як впливає з рис. 4.10, 4.11 та таблиць 4.4, 4.5 оптимальними є обидві температури, проте ми обрали 30° С. рН 2.43 буферного розчину KPF_6 (40 мМ) є відмінним, проте нами досліджено і інші значення рН. В даному дослідженні оптимальною довжиною хвилі детектування є 195-210 нм. Ми розпочали експерименти з 210 нм, проте рис. 4.12 вказує на те, що оптимальною є довжина хвилі детектування 195 нм.

Datafile Name: CARB_1.5_buffer pH 2.43 95- ACN 5 flow rate 0.6_001.lcd
Sample Name: CARB
Sample ID: 1.5



Datafile Name: CARB_1.5_buffer pH 2.43 95- ACN 5 flow rate 0.6_001.lcd
Sample Name: CARB
Sample ID: 1.5

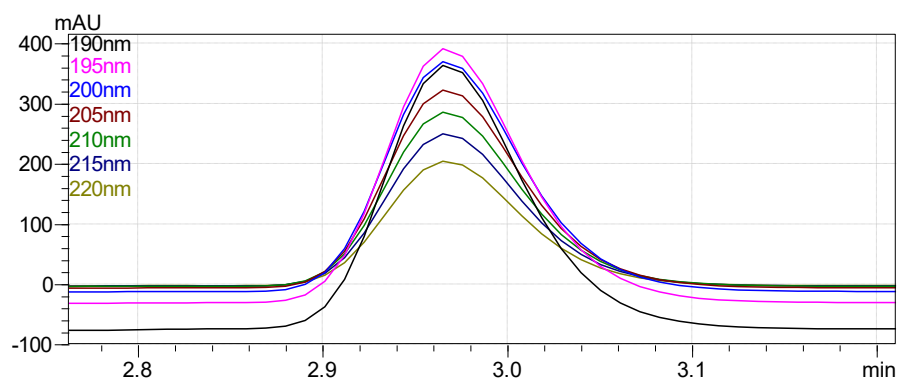
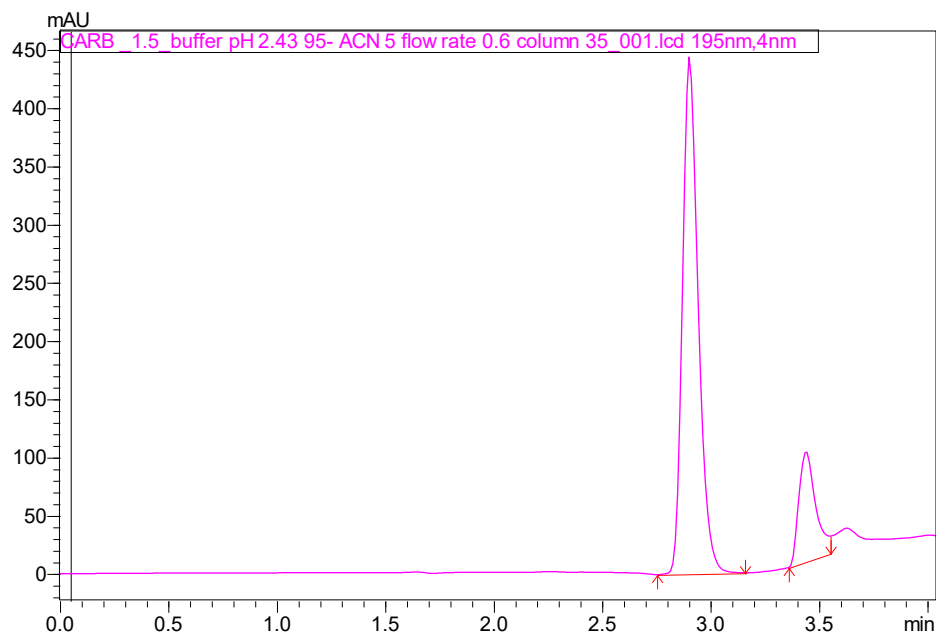


Рисунок 4.12 – Хроматограма карбоплатину (0.1 мг/мл) на колонці Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм) з 5% ACN та 95% буфером KPF_6 40 мМ рН 2.43, температура колонки - 30° С, детектування за довжини хвилі 195 нм, швидкість потоку – 0.6 мл/хв

Проаналізовано також вказані вище хроматографічні умови і на температурі колонки 35° С за довжини хвилі детектування 195 нм (рис. 4.13, табл. 4.6).

Datafile Name: CARB_1.5_buffer pH 2.43 95- ACN 5 flow rate 0.6 column 35_001.lcd
 Sample Name: CARB
 Sample ID: 1.5



Datafile Name: CARB_1.5_buffer pH 2.43 95- ACN 5 flow rate 0.6 column 35_001.lcd
 Sample Name: CARB
 Sample ID: 1.5

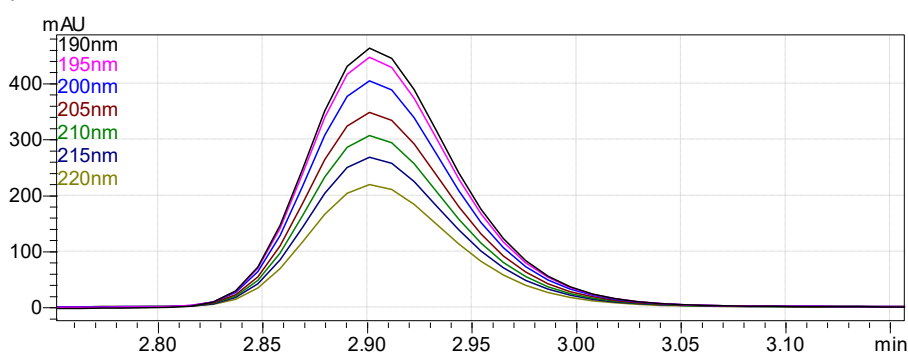


Рисунок 4.13 – Хроматограма карбоплатину (0.1 мг/мл) на колонці Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм) з 5% ACN та 95% буфером KPF_6 40 мМ рН 2.43, температура колонки - 35° С, детектування за довжини хвилі 195 нм, швидкість потоку – 0.6 мл/хв

В результаті численних досліджень встановлено оптимальні хроматографічні умови визначення карбоплатину в лікарському засобі: хроматографічна колонка Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм), рухома фаза – 5 % ACN та 95 % буферний розчин KPF_6 (40 мМ) рН 2.43, температура колонки -

30° С, детектування за довжини хвилі 195 нм, швидкість потоку – 0.6 мл/хв.
Типова хроматограма за вказаних умов наведена на рисунку 4.14.

Таблиця 4.6 – Параметри придатності хроматографічної системи до
рисунку 4.13

Пік	Час утримування, хв	Площа	Висота	Площа, %	Tailing F.	k'	Separation	NTP(USP)	HETP(USP)	Resolution(USP)
1	2.903	2253268	443806	81.254	1.268	0.000	--	5672	26.446	--
2	3.441	519859	94109	18.746	--	0.185	0.000	8198	18.298	3.514
Total		2773126	537914	100.000						

Datafile Name: CARB_90_method 5 ACN-buffer 95 pH 2.43 flow rate 0,6_006.lcd
Sample Name: CARB
Sample ID: 90

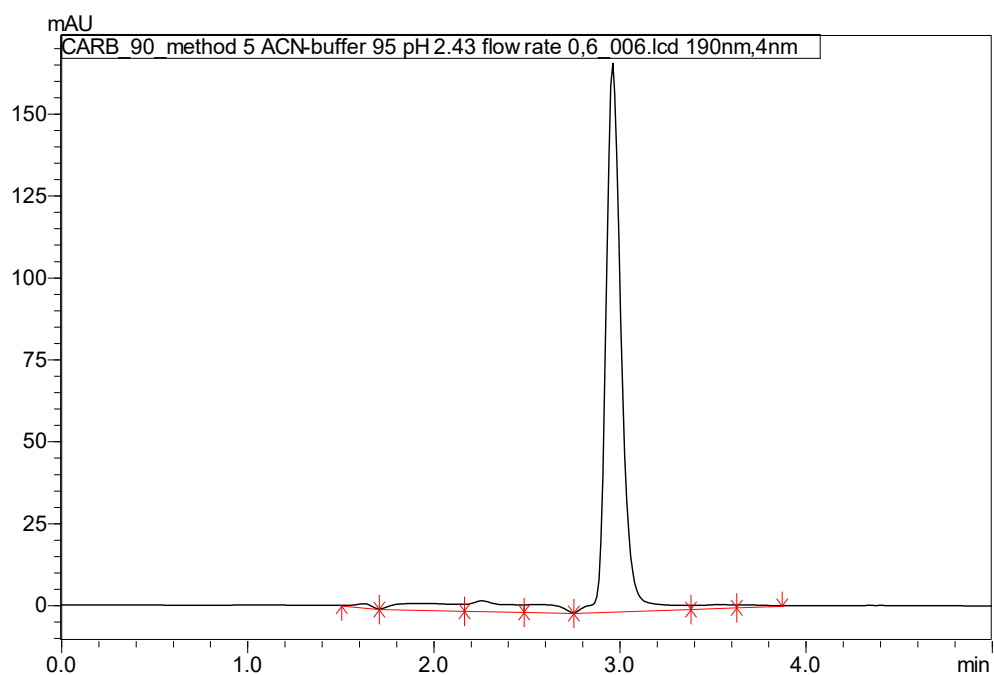


Рисунок 4.14 – Хроматограма карбоплатину (0.09 мг/мл) на колонці Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм) з 5% ACN та 95% буфером KPF₆ 40 мМ рН 2.43, температура колонки - 30° С, детектування за довжини хвилі 195 нм, швидкість потоку – 0.6 мл/хв (визначені оптимальні умови)

Валідацію аналітичної методики проводили за такими валідаційними характеристиками як лінійність, робастність, правильність та прецизійність [121]. Лінійність вивчали в діапазоні 15-90 мкг/мл методом найменших

квадратів та розраховували рівняння регресії з коефіцієнтом кореляції. Результати вивчення лінійності наведено на рис. 4.15. Хроматограми, отримані за умов вивчення лінійності, представлено на рис. 4.16.

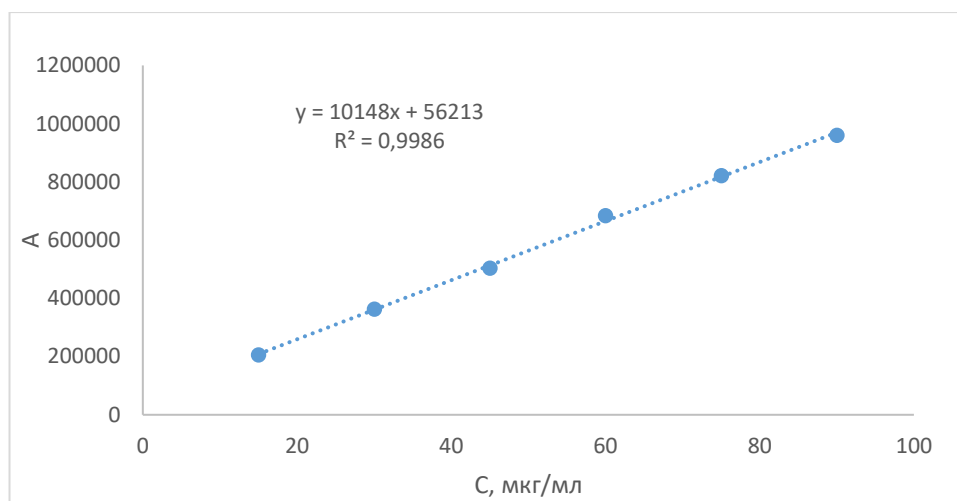


Рисунок 4.15 – Графік залежності площі піку від концентрації розчинів карбоплатину

Datafile Name: CARB_90_method 5 ACN-buffer 95 pH 2.43 flow rate 0,6_006.lcd
 Sample Name: CARB
 Sample ID: 90

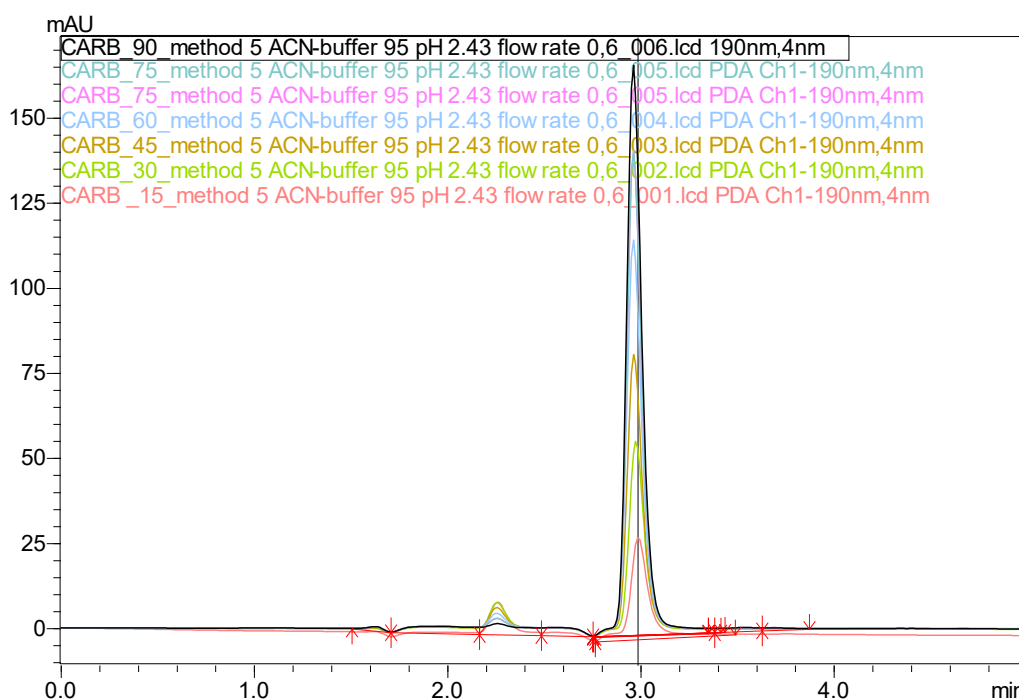


Рисунок 4.16 – Хроматограми, отримані за умов вивчення лінійності методики

МВ становила 3.58 мкг/мл, МКВ – 10.86 мкг/мл.

Для вивчення валідаційного параметру правильність готували модельні зразки з точними концентраціями АФІ карбоплатину в діапазоні 80-120 %. Результати вивчення правильності та прецизійності наведено в таблиці 4.7, 4.8 Отримані результати відповідають критеріям прийнятності.

Таблиця 4.7 – Результати вивчення правильності аналітичної методики

Модельні розчини	Вміст карбоплатину, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100 \%$
	Введено, $X_i = (C_i/C_{rs}) \cdot 100 \%$	Знайдено, $Y_i = (A_i/A_{rs}) \cdot 100 \%$	
M ₁	80.85	80.23	99.23
M ₂	80.07	80.95	101.10
M ₃	80.11	79.65	99.43
M ₄	100.25	100.64	100.39
M ₅	100.18	100.55	100.37
M ₆	100.32	100.87	100.55
M ₇	119.74	120.60	100.72
M ₈	120.84	120.08	99.37
M ₉	120.20	119.54	99.48
Середнє значення, Z, %			100.07
Стандартне відхилення, S _z , %			0.74
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95 \%, 8) \cdot S_z = 2.3060 S_z, \%$			1.71
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta_{As} = 2.4 \%$			Виконується (1.71 < 2.4)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 , \%$			0.07
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta \%$			Виконується (0.07 < 0.51)
коректна			Загальний висновок про методику

Таблиця 4.8 – Результати вивчення прецизійності аналітичної методики

№ розчину	Величина Z_i , %		
	1 дослід	2 дослід	3 дослід
1	100.19	99.82	99.73
2	99.69	100.37	99.82
3	99.93	100.23	100.42
4	100.11	100.04	100.11
5	100.35	99.69	100.10
6	99.90	99.99	99.80
Середнє Z (%)	100.03	100.03	100.00
RSD_x , %	0.24	0.25	0.26
Відносне стандартне відхилення, RSD_Z (%)	0.25		
Відносний довірчий інтервал, Δ_Z	$0.25 \leq 2.4$		
Критичне значення збіжності результатів Δ_{As} , %	2.4		

Уникнення використання токсичних розчинників, зменшення кількості ацетонітрилу (5 співвідношення до 95 буферного розчину) в складі рухомої фази, експресний аналіз та повільна швидкість подачі рухомої фази (а отже менші відходи), ізократичне елюювання та мінімізація пробопідготовки дали змогу отримати «зелений» аналіз, що підтверджено найсучаснішими інструментами вивчення зеленості AGREE (бал 0.74), MoGAPI (бал 81), Complex MoGAPI (бал 81), AGSA (бал 77.78), SaFRI (бал 82) та CACI (бал 79) (рис. 4.17) [130, 131].

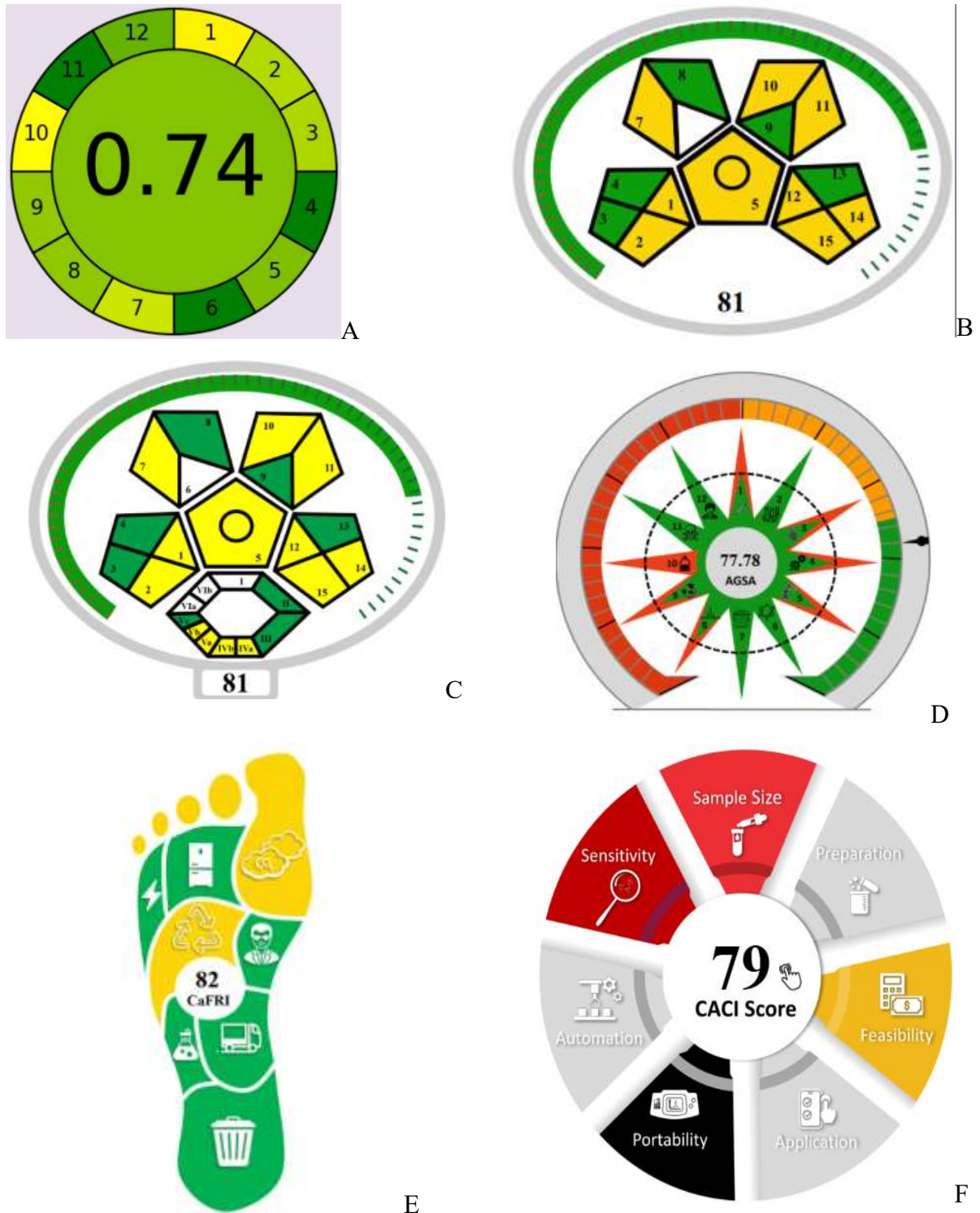


Рисунок 4.17 – Результати вивчення екологічності розробленої ВЕРХ методики визначення карбоплатину інструментами AGREE (A), MoGAPI (B), Complex MoGAPI (C), AGSA (D), CaFRI (E) та CACI (F)

Підсумовуючи, запропонована ВЕРХ методика дає змогу провести хроматографування та кількісне визначення карбоплатину на С18 октадецилсилільній колонці та без застосування іон-парних реагентів. Методика є лінійною в діапазоні концентрацій від 15 до 90 мкг/мл. Інструментами вивчення екологічності аналітичних методик AGREE, MoGAPI, Complex MoGAPI, AGSA, CaFRI та CASI показано, що розроблена ВЕРХ методика є «зеленою». Окрім того, вказана методика є економічновигідною та доступною для лабораторій, які не мають в арсеналі дороговартнісних специфічних хроматографічних колонок (для прикладу, амінопропільних).

4.3 Розробка та валідація ВЕРХ методики одночасного визначення цисплатину та карбоплатину в лікарських засобах

У науковій літературі описано лише одну методику спектрофотометричного визначення цисплатину та карбоплатину, тоді як ВЕРХ методика для їх одночасного визначення поки що не розроблена. Хроматографічний аналіз цисплатину та карбоплатину становить особливу складність через їхню неорганічну структуру. Відсутність органічного вуглецевого скелета, функціональних груп або УФ-поглинаючого хромофора робить ці сполуки майже невидимими для УФ-детектування та зумовлює слабе утримування на алкільних обернено-фазових колонках С8 або С18, які зазвичай використовують для досягнення оптимальної роздільної здатності піків і точного розділення. Завдання одночасного визначення цисплатину та карбоплатину також є складним, наприклад, під час аналізу стічних вод або для біоаналітичних досліджень (терапевтичний моніторинг лікарських засобів, фармакокінетичні дослідження або дослідження біоеквівалентності). У провідних фармакопоях світу є монографії на цисплатин і карбоплатин, у

яких застосовується методика ВЕРХ, колонки з NH_2 -зв'язаною фазою та/або іон-парні реагенти (рис. 4.18) [3].

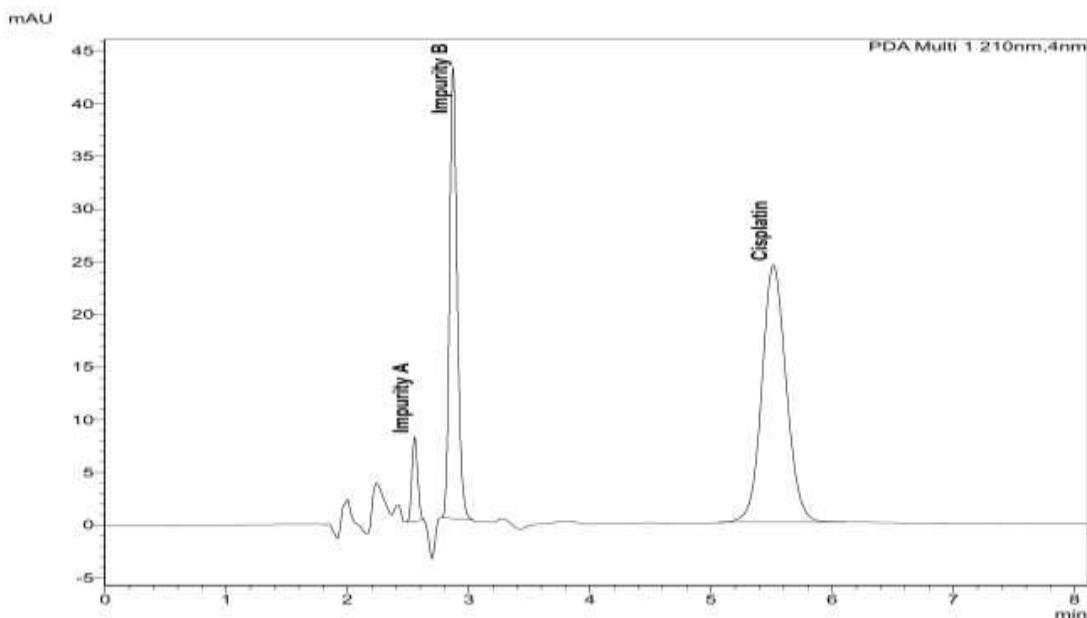


Рисунок 4.18 – Хроматограма, відтворена в нашій лабораторії на колонці Merck LiChrospher C-8e (250 × 4 мм, 5 мкм) із використанням аніонних та катіонних іон-парних реагентів відповідно до фармакопейної монографії, описаної в ВР 2025 та USP 2024 (хроматографічна колонка Superspher Select В 250 × 4.6 мм, 4 мкм)

У нашій лабораторії кафедри фармацевтичної хімії ТНМУ було відтворено та перевірено фармакопейний метод, представлений на рис. 4.18. Однак ця методика виявилася незручною, оскільки передбачає використання двох протилежно заряджених іон-парних реагентів, що робить її менш економічно ефективною. Зважаючи на наявність двох аміногруп у молекулах, ми вирішили дослідити альтернативний підхід із використанням хаотропних агентів аніонів, провівши два різні експерименти з використанням різних колонок і хаотропів. Важливою особливістю застосування солей хаотропних аніонів у обернено-фазовому розділенні N-вмісних молекул на колонках C18 або C8 є їх здатність покращувати симетрію піків та підвищувати утримування

аналітів. З урахуванням попередніх досліджень, проведених нашою науковою групою, було протестовано рухомі фази на основі 40 мМ буферного розчину KPF_6 (рН 2.4) та АСН у співвідношеннях 90:10 і 95:5, а також хроматографічну колонку С18 (Luna С18 (100 × 4.6 мм, 3 мкм)) [132, 133].

Параметри придатності хроматографічної системи були задовільними при використанні рухомої фази — буферного розчину 40 мМ KPF_6 (рН 2.4) та АСН у співвідношеннях 95:5 і 90:10 (рис. 4.19, 4.20; табл. 4.9, 4.10). Співвідношення 90:10 продемонструвало незадовільні параметри придатності системи (низьку NTP та роздільну здатність менше 2.0). Співвідношення 95:5 забезпечило відмінне розділення.

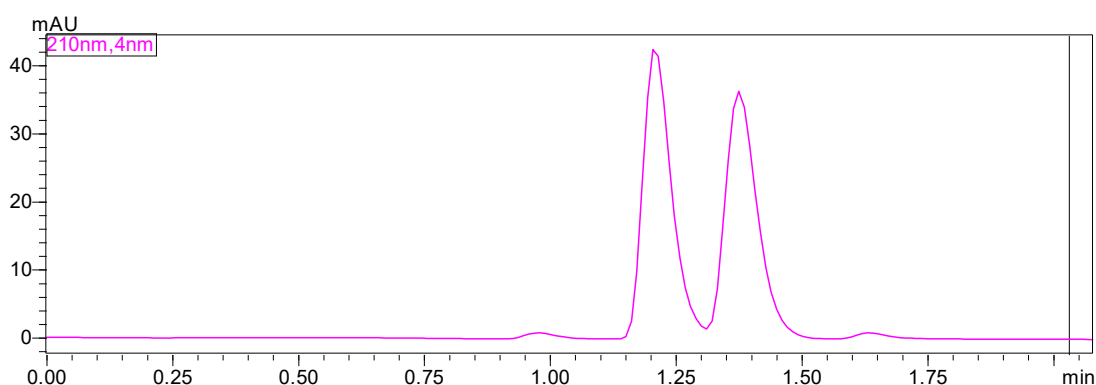


Рисунок 4.19 – Хроматограма цисплатину (0.1 мг/мл) і карбоплатину (0.1 мг/мл) на колонці Luna С18(2) (100 × 4.6 мм, 3 мкм) з рухомою фазою 10 % АСН і 90 % буфера KPF_6 (40 мМ, рН 2.4), швидкість потоку 1 мл/хв, детектування за довжини хвилі 210 нм

Таблиця 4.9 – Параметри придатності хроматографічної системи для рисунку 4.19

Пік	Час утримування, хв	Площа	Висота	Площа %	Tailing F.	k'	NTP(USP)	HETP (USP)	Resolut ion (USP)
Цисплатину	1.209	169222	42451	51.275	1.415	0.000	1554	96.504	--
Карбоплатину	1.376	160805	36334	48.725	1.276	0.138	2624	92.384	1.287

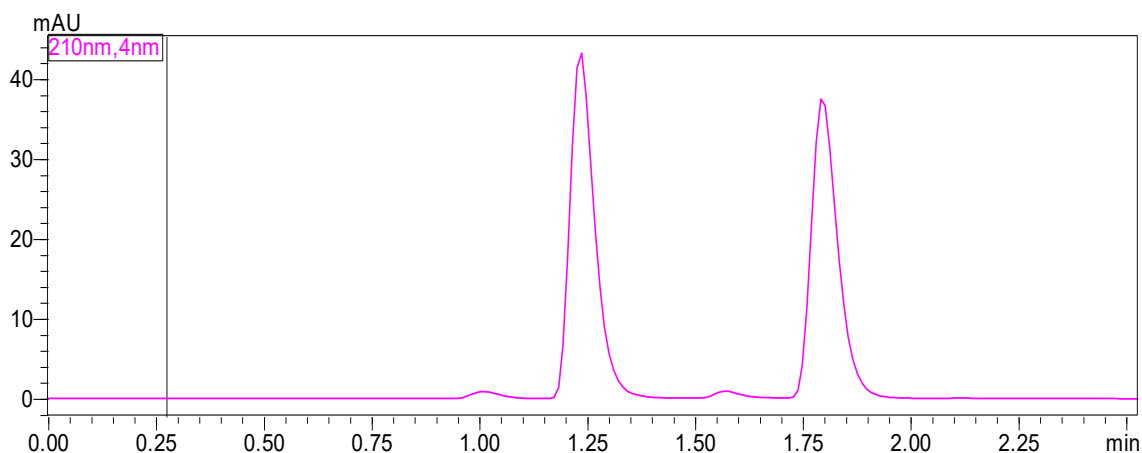


Рисунок 4.20 – Хроматограма цисплатину (0,1 мг/мл) і карбоплатину (0,1 мг/мл) на колонці Luna C18 (100 × 4,6 мм, 3 мкм) з рухомою фазою 5 % ACN і 95 % буфера KPF₆ (40 мМ, рН 2.4), швидкість потоку 1 мл/хв, детектування за довжини хвилі 210 нм

Таблиця 4.10 – Параметри придатності хроматографічної системи для рисунку 4.20

Пік	Час утримування, хв	Площа	Висота	Площа %	Tailing F.	k'	NTP(USP)	HETP(USP)	Resolution (USP)
Цисплатину	1.235	172462	43184	51.942	1.400	0.000	2690	88.735	--
Карбоплатину	1.796	159564	37453	48.058	1.356	0.454	3062	48.986	4.489

Ключовим фактором, що визначає швидкість хроматографування та аналізу, є швидкість потоку рухомої фази. Було протестовано діапазон 0.4–1.0 мл/хв. Типові хроматограми при дослідженні впливу швидкості потоку наведені на рис. 4.21, 4.22. Як видно з рисунків, усі досліджені швидкості потоку є прийнятними. Чим повільніше рухається рухома фаза, тим довший час хроматографування. Для подальших досліджень було обрано швидкість потоку 0.4 мл/хв. Детальні результати впливу швидкості потоку на параметри придатності хроматографічної системи буде наведено під час дослідження робасності (валідації) аналітичного методу.

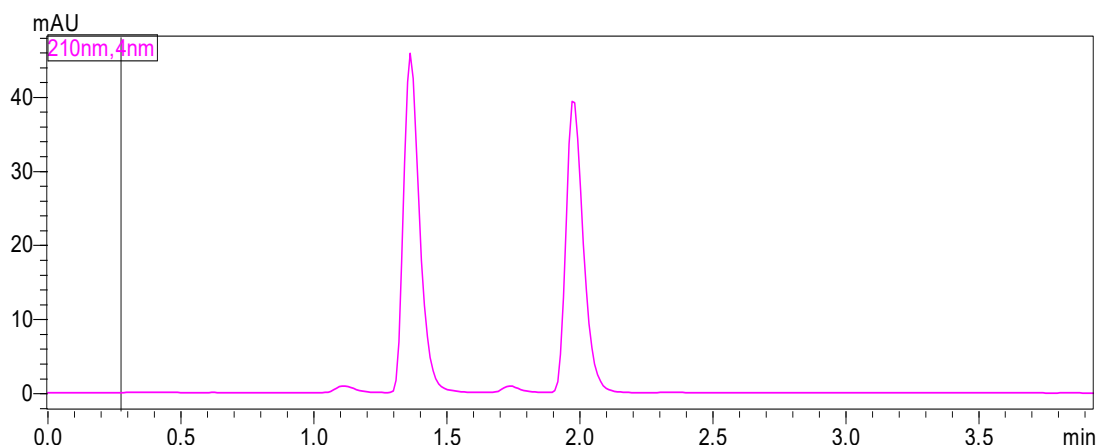


Рисунок 4.21 – Хроматограма цисплатину (0.1 мг/мл) і карбоплатину (0.1 мг/мл) на колонці Luna C18 (100 × 4.6 мм, 3 мкм) з рухомою фазою 5 % ACN і 95 % буфера KPF₆ (40 мМ, рН 2.4), швидкість потоку 0.9 мл/хв, детектування за довжини хвилі 210 нм

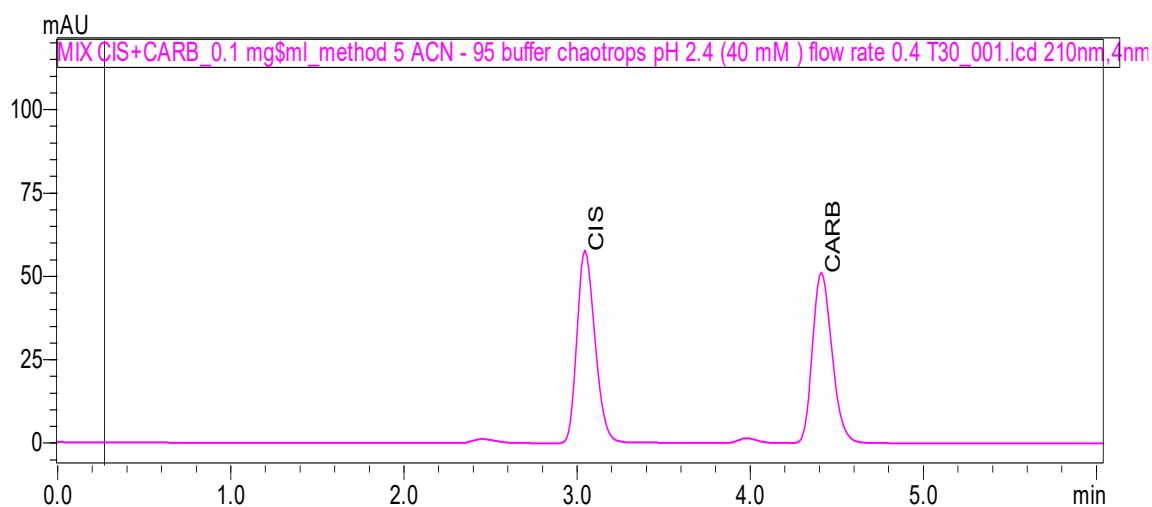


Рисунок 4.22 – Хроматограма цисплатину (0.1 мг/мл) і карбоплатину (0.1 мг/мл) на колонці Luna C18(2) (100 × 4.6 мм, 3 мкм) з рухомою фазою 5 % ACN і 95 % буфера KPF₆ (40 мМ, рН 2.4), швидкість потоку 0.4 мл/хв, детектування за довжини хвилі 210 нм

Також було проведено підбір температури колонки. Хроматограми, отримані при 30 °C і 35 °C, наведено на рис. 4.23. Обидві досліджені температури є оптимальними.

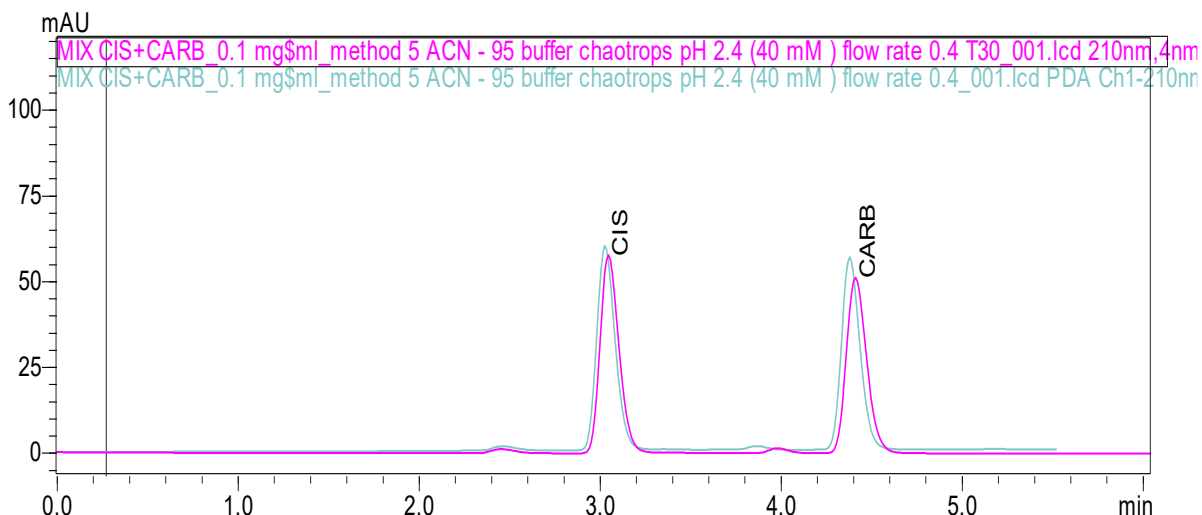


Рисунок 4.23 – Хроматограма цисплатину (0.1 мг/мл) і карбоплатину (0.1 мг/мл) на колонці Luna C18(2) (100 × 4.6 мм, 3 мкм) з рухомою фазою 5 % ACN і 95 % буфера KPF₆ (40 мМ, рН 2.4), швидкість потоку 0.4 мл/хв, температура (рожевий) 30 °С і (синій) 35 °С; детектування за довжини хвилі 210 нм

Експериментально встановлені оптимальні хроматографічні умови:

- рухома фаза — буферний розчин 40 мМ KPF₆ (рН 2.4) та ACN (95:5);
- хроматографічна колонка — Luna C18(2) (100 × 4.6 мм, 3 мкм);
- температура колонки — 30 °С;
- швидкість потоку — 0.4 мл/хв;
- довжина хвилі детектування — 210 нм.

Валідацію запропонованої методики проводили відповідно до рекомендацій ІСН, оцінюючи лінійність, правильність, прецизійність та робасність [121]. Лінійність оцінювали на п'яти рівнях концентрацій для кожного з досліджуваних препаратів, у діапазоні 20–100 мкг/мл (рис. 4.24, 4.25; табл. 4.11). На рис. 4.24, 4.25 наведено відповідні рівняння регресії, коефіцієнти кореляції, діапазони концентрацій, значення нахилу (slope) та перетину (intercept) для проаналізованих даних.

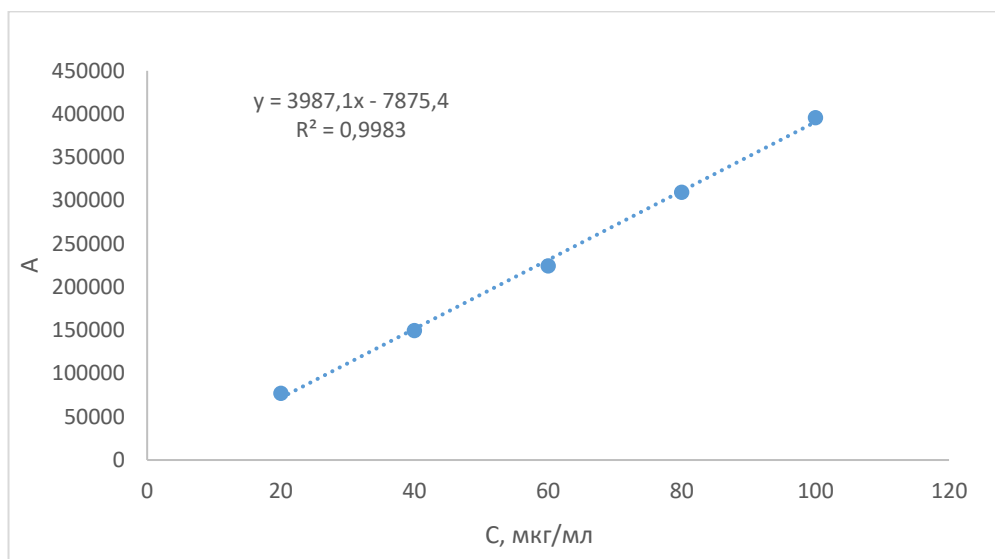


Рисунок 4.24 – Графік залежності площі піка від концентрації цисплатину

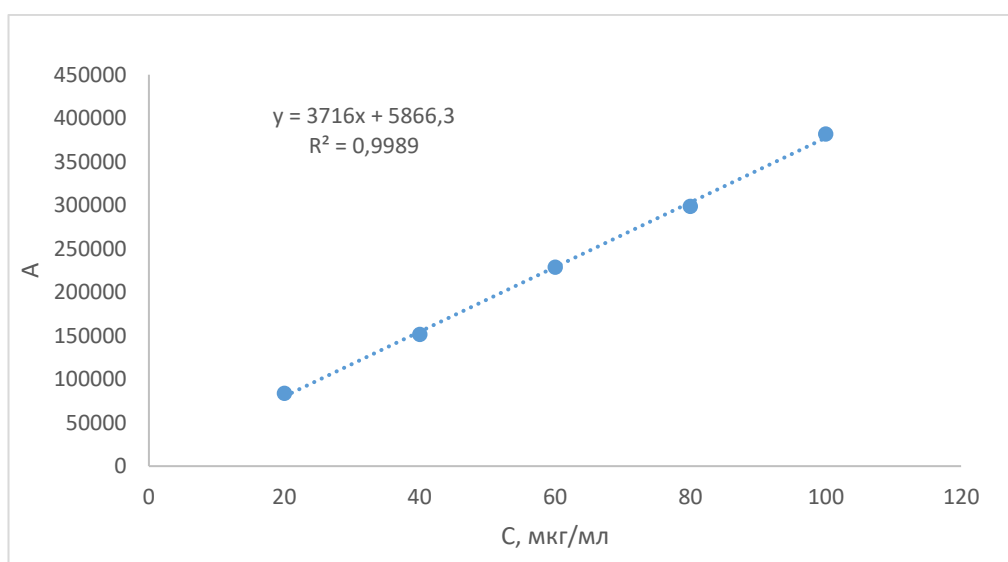


Рисунок 4.24 – Графік залежності площі піка від концентрації карбоплатину

Отримані результати показали, що методика демонструє стійку лінійну залежність у діапазоні концентрацій 20–100 мкг/мл, що підтверджується коефіцієнтами кореляції (r^2) понад 0.9983. Рівняння регресії для цисплатину: $y = 3987.1x - 7875.4$ ($R^2 = 0.9983$); для карбоплатину: $y = 3716x + 5866.3$ ($R^2 = 0.9989$). Такий високий рівень кореляції свідчить про відмінну лінійність аналітичного методу. Крім того, поєднання високих значень r^2 і мінімальних значень вільного члена рівняння (intercept) додатково

підтверджує надійність і точність лінійності методики в зазначеному діапазоні. МВ для карбоплатину становила 4.12 мкг/мл, а для цисплатину — 5.18 мкг/мл. МКВ для карбоплатину становила 12.48 мкг/мл, а для цисплатину — 15.71 мкг/мл.

Таблиця 4.11 – Валідаційні параметри запропонованої методики ВЕРХ

Parameters		Cisplatin	Carboplatin
Довжина хвилі, нм		210	
Діапазон лінійності, мкг/мл		20 – 100	
- Рівняння регресії		$y = b x + a$	$y = b x + a$
- Нахил (b)		3987.1	3716
- Вільний член (a)		-7875.4	5866.3
Коефіцієнт детермінації		0.9983	0.9989
Правильність (%R)		99.42 ± 0.89	100.45 ± 0.64
Прецизійність (%RSD)	Повторюваність (Repeatability)	0.784	0.851
	Проміжна прецизійність (Intermediate precision)	0.874	0.907

Правильність та прецизійність методики ВЕРХ були ретельно оцінені шляхом проведення серії випробувань із використанням лабораторно приготовлених сумішей, що містили заздалегідь визначені концентрації на трьох рівнях: 20, 60 і 100 мкг/мл. Отримані значення становили від 99.42 % до 100.45 % і супроводжувалися незначними стандартними відхиленнями (табл. 4.11). Ці результати переконливо підтверджують високу правильність методики та його здатність надійно визначати концентрації аналітів. Для оцінки повторюваності ті самі концентрації (20, 60 і 100 мкг/мл) аналізували

тричі протягом одного дня. Отримані значення відносного стандартного відхилення (RSD) для всіх досліджуваних препаратів були меншими за 1.0 %, що додатково підтверджує високу повторюваність методики (табл. 4.11). Крім того, проміжну прецизійність оцінювали шляхом проведення вимірювань протягом трьох послідовних днів, виконуючи трикратний аналіз тих самих концентрацій препаратів. Результати, наведені в табл. 4.11, показали, що значення RSD не перевищували 1.0 %, що підтверджує високу стабільність та проміжну прецизійність методики при багатоденному аналізі. Таблиця 4.12 демонструє, що значення відсотка відновлення перебували в межах 99.30–100.45 %, що підтверджує відсутність впливу допоміжних речовин лікарських форм на визначення АФІ [132, 133].

Таблиця 4.12 – Результати кількісного визначення цисплатину та карбоплатину в лікарській формі методом ВЕРХ

ЛФ	Взято (мкг/мл)	Знайдено * (мкг/мл)	Додано стандарту (мкг/мл)	Визначено стандарту (мкг/мл)	%Recovery
Цисплатин	100	100.09	20	20.09	100.45
			60	60.18	100.30
			100	99.82	99.82
Середнє					100.19
Карбоплатин	100	100.17	20	19.86	99.30
			60	60.16	100.27
			100	100.24	100.24
Середнє					99.94

Робасність методики оцінювали шляхом внесення незначних змін до хроматографічних параметрів, зокрема швидкості потоку та температури

колонки (± 2 °C). Як показано в таблиці 4.13, ці незначні зміни не мали суттєвого впливу на T або Rt/Rs, що підтверджує робасність методики ВЕРХ.

Таблиця 4.13 – Результати вивчення робасності методики

Параметр		Фактор асиметрії (T)	Цисплатин	Карбоплатин	Роздільна здатність (Rs)	Цисплатин	Карбоплатин
Швидкість потоку, мл/хв	0.4			1.219		1.211	
	0.6		1.290	1.278		-	5.358
	0.8		1.354	1.313		-	4.799
Температура, °C	30	Фактор асиметрії (T)	1.219	1.211	Час утримування (Rt)	3.031	4.384
	35		1.223	1.215		3.030	4.385

Розробку методики ВЕРХ здійснювали з ретельним урахуванням принципів «зеленої» аналітичної хімії. Це чітко відображено в таких аспектах, як застосування хроматографічного аналізу з використанням АСN, H_3PO_4 та KPF_6 , а також відсутність етапів дериватизації. Ці особливості вигідно відрізняють запропоновану методику від попередніх підходів ВЕРХ, у яких використовувалися більш небезпечні розчинники. Крім того, об'єм відходів розчинника був мінімізований і становив приблизно 2 мл, завдяки швидкості потоку 0.4 мл/хв, що суттєво підвищує екологічність методики (відповідає операції 7, оціненій за допомогою інструменту AGREE). Загальна оцінка «зеленості» методики за інструментом AGREE становила 0.74, за MoGAPI —

81, за complex MoGAPI — 81, за AGSA — 77.78, за CaFRI — 82, за CACI — 79 (рис. 4.25-4.27).

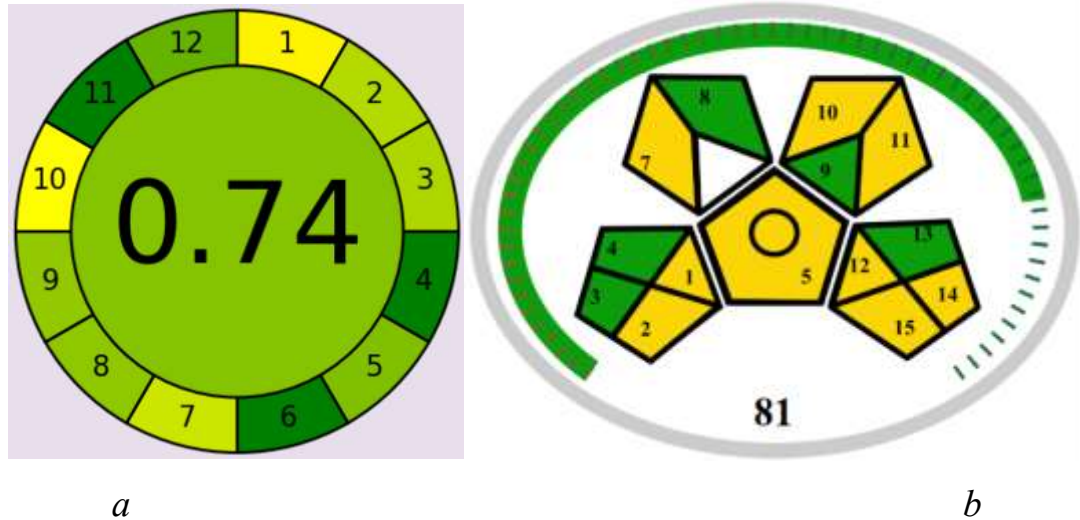


Рисунок 4.25 – Оцінка «зеленості» розробленої методики:
а – AGREE (загальна оцінка 0.74); б – MoGAPI (загальна оцінка 81)

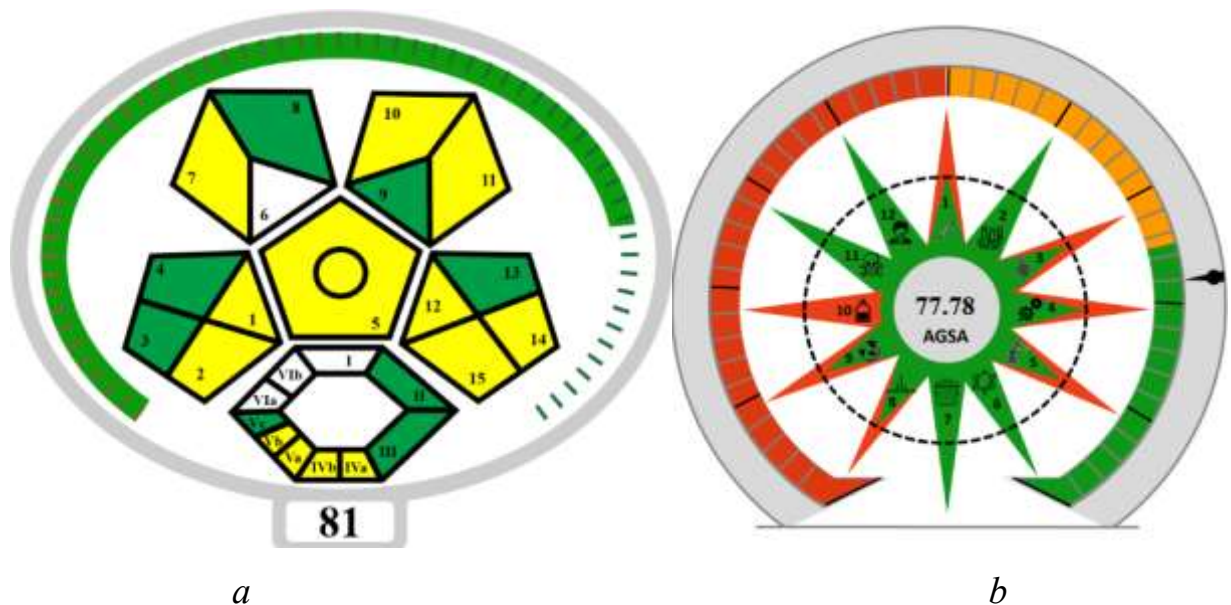


Рисунок 4.26 – Оцінка «зеленості» розробленої методики:
а – complex MoGAPI (загальна оцінка 81); б – AGSA (загальна оцінка 77.78)

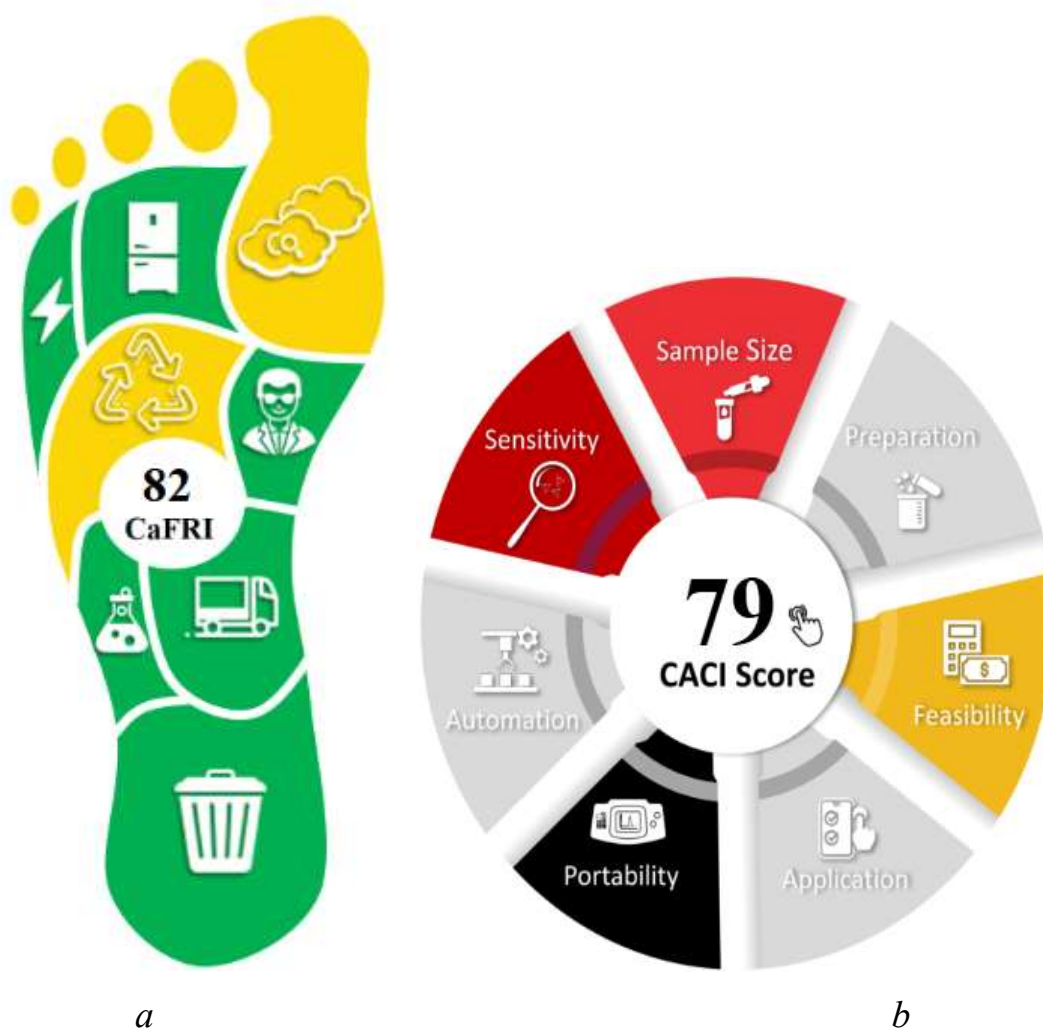


Рисунок 4.27 – Оцінка «зеленості» розробленої методики:
a – CaFRI (загальна оцінка 82); *b* – CACI (загальна оцінка 79)

Отримані результати за інструментами AGREE, MoGAPI, complex MoGAPI, AGSA, CaFRI та CACI підтвердили, що запропонована методика ВЕРХ відповідає принципам «зеленої» аналітичної хімії.

Порівняно з фармакопейним методом [3], усунення необхідності використання іон-парних реагентів та спеціалізованих колонок для іон-парної хроматографії у нашій методиці ВЕРХ підвищує зручність застосування та дає змогу здійснювати повну валідацію складних структур, таких як цисплатин і карбоплатин, покращує симетрію піків і підвищує утримування аналітів, а

також забезпечує проведення «зеленого» аналізу. Запропонована методика ВЕРХ також дозволяє кількісно визначати супровідні речовини.

У цій роботі було проведено ґрунтовне наукове дослідження з представленням розробки методики ВЕРХ для одночасного визначення цисплатину та карбоплатину в модельній суміші із застосуванням солей хаотропних аніонів. Крім того, обидва досліджувані препарати були кількісно визначені за допомогою експресної, простої та економічно ефективної методики ВЕРХ. Проведені дослідження та експерименти продемонстрували переваги використання хаотропних солей для регулювання сили взаємодії між аналітами та зв'язаними лігандами на обернено-фазових колонках. Такий підхід сприяє розробці швидких і економічно ефективних методів ВЕРХ, особливо для сильно полярних молекул зі слабким утримуванням, які елюють поблизу мертвого об'єму або мертвого часу колонок. Усунення необхідності використання іон-парних реагентів та спеціалізованих колонок для іон-парної хроматографії підвищує зручність застосування методу та сприяє повній валідації складних структур, таких як цисплатин і карбоплатин. Ефективність методу може бути додатково підвищена при використанні довших колонок із меншим розміром частинок, що забезпечує більшу роздільну здатність і більшу НТР колонки, а також шляхом оптимізації параметрів ДМД-детектування та діаметра і довжини УФ-кварцової кювети.

Висновки до розділу 4

1. У цій роботі представлено позитивну роль хаотропних агентів (солей) у розробці швидких, простих та економічно ефективних методів обернено-фазової ВЕРХ. Включення сильних хаотропних солей до складу рухомої фази під час рідинно-хроматографічного визначення показало значне спрощення методики та скорочення часу аналізу. Роль двох найсильніших хаотропних агентів — гексафторофосфату калію та перхлорату натрію — була досліджена у різних і незалежних

дослідницьких випадках. Отримані результати підтвердили високу придатність і ефективність використання цих солей у розробці аналітичних методів контролю лікарських засобів. Розроблена методика продемонстрували лінійність у діапазоні концентрацій 0.025–0.5 мкг/мл для визначення цисплатину ($R^2 > 0.9997$). Усі параметри валідації відповідали критеріям прийнятності щодо лінійності, правильності та прецизійності.

2. Провідні Фармакопеї світу регламентують проводити хроматографічне визначення карбоплатину з використанням аміно-пропільної хроматографічної колонки (клас L8). Ми у своїй роботі пропонуємо застосування солей хаотропних аніонів в складі рухомої фази на хроматографічній колонці C18 (Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм) як перспективний підхід для розробки ВЕРХ методик карбоплатину в лікарських засобах, що дасть змогу покращити утримування та форму піка. Важливою перевагою застосування солей хаотропних аніонів в складі рухомої фази є покращення симетрії піків та їх утримування, а також скорочення часу аналізу. Це можна досягнути використанням низьких кількостей ACN (5-10 %) та високих кількостей буферного розчину 40-50 мМ одного з найсильніших хаотропів за теорією Гофмейстера KPF_6 (рН 2.3-2.5) в складі рухомої фази на колонках C18 або C8. Встановлено оптимальні хроматографічні умови визначення карбоплатину в лікарському засобі: хроматографічна колонці Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм), рухома фаза - 5% ACN та 95% буферний розчин KPF_6 (40 мМ) рН 2.43, температура колонки - 30° С, детектування за довжини хвилі 195 нм, швидкість потоку – 0.6 мл/хв. Лінійність вивчали в діапазоні 15-90 мкг/мл методом найменших квадратів та розраховували рівняння регресії ($y=10148x +56213$) з коефіцієнтом кореляції ($R^2=0.9986$). Розроблено експресну, просту, відтворювану та «зелену» ВЕРХ методику визначення карбоплатину в лікарських

засобах з використанням солей хаотропних аніонів. Запропонована ВЕРХ методика дає змогу провести хроматографування та кількісне визначення карбоплатину на С18 октадецилсилільній колонці та без застосування іон-парних реагентів.

3. Розроблено методику обернено-фазової ВЕРХ одночасного визначення надзвичайно полярних молекул цисплатину та карбоплатину, які не мають УФ-абсорбції, в модельній суміші з використанням солей хаотропних аніонів, який також можна використовувати для визначення одного аналіту. Хаотропні агенти покращують утримування основних молекул в кислотних рухомих фазах на колонах з оберненою фазою та покращують форму піків і симетрії. Хаотропні аніони, які збільшують взаємодію між основним N-вмісним аналітом і алкільними ланцюгами лігандів з оберненою фазою, такими як С-8 та С-18, часто використовуються для підвищення та покращення ефективності методик ВЕРХ. Експериментально встановлені оптимальні хроматографічні умови: рухома фаза - 40 мМ буферний розчин KPF_6 (рН 2.4) та АСН (95:5), хроматографічна колонка - Luna С18 (100 x 4.6 мм 3 мкм), температура колонки - 30 °С, швидкість потоку – 0.4 мл/хв, довжина хвилі детектування - 210 нм. Лінійність оцінювали за допомогою п'яти рівнів кожного з досліджуваних препаратів, де концентрація варіювалася в діапазоні 20–100 мкг/мл. Запропонована ВЕРХ методика є екологічною, що підтверджено найсучаснішими метриками для вивчення екологічності (AGREE, MoGAPI, комплекс MoGAPI, AGSA, CaFRI та CACI). У цій роботі проведено ретельне наукове дослідження з представленням розробки методики ВЕРХ одночасного визначення надзвичайно полярних молекул цисплатину та карбоплатину в модельній суміші з використанням солей хаотропних аніонів. Крім того, два аналіти були кількісно визначені за

допомогою швидких, простих та економічно ефективних підходів до методик ВЕРХ.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в наукових працях автора [122, 123, 130-133].

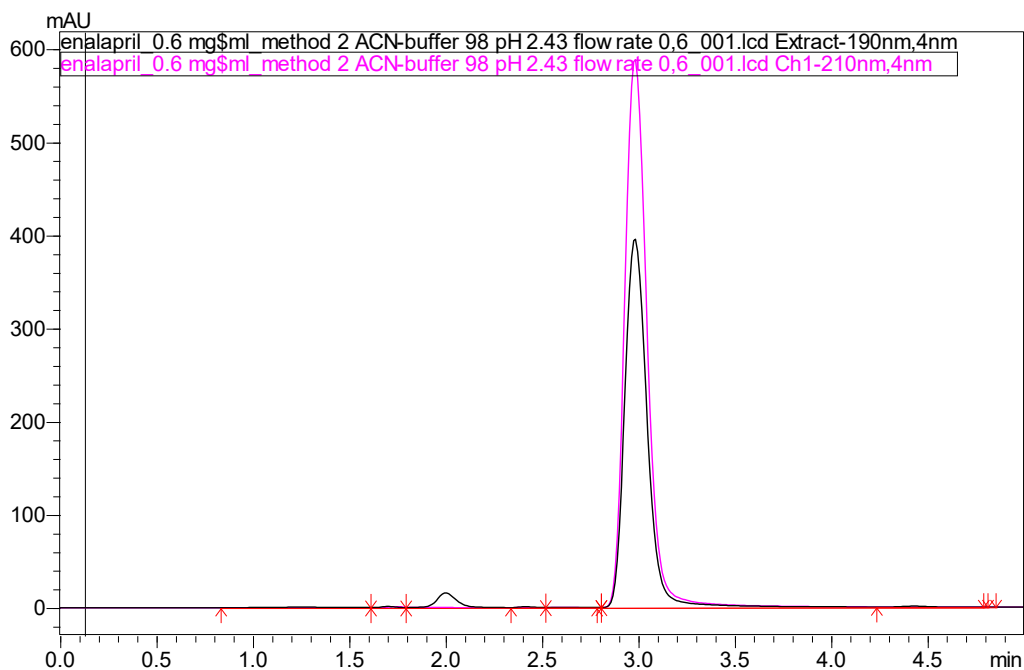
РОЗДІЛ 5

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ ВЕРХ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЕНАЛАПРИЛУ МАЛЕАТУ ТА КАПТОПРИЛУ В ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ

5.1 Розробка та валідація ВЕРХ методики кількісного визначення еналаприлу малеату в лікарських засобах

Хроматографічне визначення еналаприлу не є складним завданням, проте часто запропоновані методики дають елюювання еналаприлу близько «мертвого» об'єму, що притаманно аналітам з проліновою структурою. У нашій роботі представлено вплив солей хаотропних аніонів на розробку «зеленої», експресної та простої ВЕРХ методики визначення еналаприлу в таблетках. Використання солей хаотропних аніонів у рухомій фазі під час визначення еналаприлу методом ВЕРХ дало змогу скоротити часу виконання аналізу (проте не проводити його визначення близько «мертвого» об'єму) та покращити симетрію піка еналаприлу. Нами розпочато дослідження з вибору рухомої фази та апробовано один з найсильніших хаотропів за теорією Гофмейстера KPF_6 (40 мМ, рН 2.43) та АСN в складі рухомої фази у співвідношенні 98:2 на обернено-фазових колонках С18 або С8 за швидкості потоку рухомої фази – 0.6 мл/хв, температури колонки – 30 °С (рис. 5.1). Проведено детектування за довжини хвилі 190 нм та 210 нм, проте при ретельному аналізі рис. 5.1 (УФ-спектрів) можна побачити максимум за довжини хвилі 210 нм, тому прийнято рішення продовжувати подальші дослідження за довжини хвилі 210 нм. Час утримування еналаприлу становив 2.982 хв. В таблиці 5.1 наведено параметри придатності хроматографічної системи до рис. 5.1. Як видно з результатів, отримано симетричний пік, який не елюється близько «мертвого» об'єму. Спостерігається також елюювання супровідної домішки близько 2 хв.

Datafile Name:enalapril_0.6 mg\$ml_method 2 ACN-buffer 98 pH 2.43 flow rate 0,6_001.lcd
 Sample Name:enalapril
 Sample ID:0.6 mg/ml



Datafile Name:enalapril_0.6 mg\$ml_method 2 ACN-buffer 98 pH 2.43 flow rate 0,6_01.lcd
 Sample Name:enalapril
 Sample ID:0.6 mg/ml

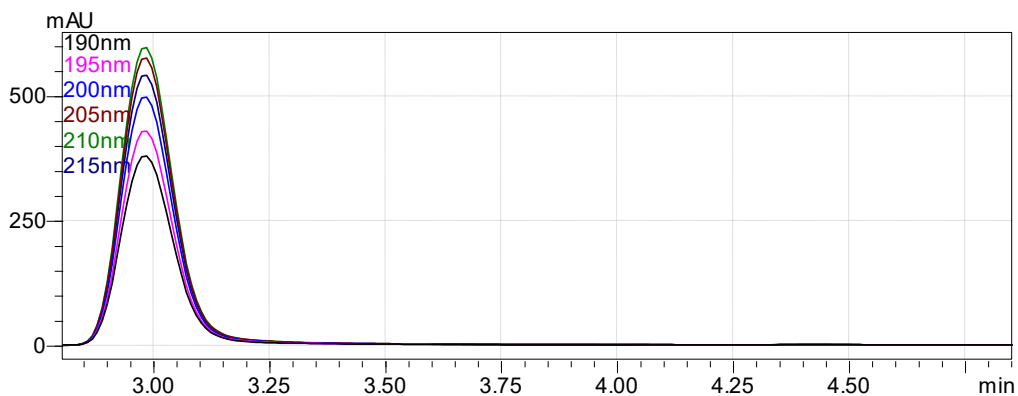


Рисунок 5.1 – Хроматограма розчину еналаприлу (0.6 мг/мл) на колонці Luna C18 (100 x 4,6 мм 3 мкм) з 2 % ACN та 98 % буфером KPF₆ 40 мМ рН 2.43, температура колонки - 30° С, детектування за довжини хвилі 190 нм та 210 нм

Вказані умови хроматографування повністю задовольняли параметри придатності хроматографічної системи, проте ми вирішили апробувати співвідношення 95 буферного розчину KPF₆ (40 мМ, рН 2.43) та 5 ACN за

швидкості потоку рухомої фази – 0.6 мл/хв, температури колонки – 30 °С, детектування за довжини хвилі 210 нм (рис. 5.2). Час утримування еналаприлу становив 2.986 хв.

Таблиця 5.1 – Параметри придатності хроматографічної системи до рисунка 5.1

Пік	Час утримування, хв	Площа	Висота	Площа, %	Tailing F.	NTP(USP)	НЕТР(USP)	Resoluti on(USP)
1	2.982	4784869	588549	100.000	1.213	2921	51.346	--
Ра- зом		4784869	588549	100,000				

Datafile Name:enalapril_0.6 mg\$ml_method 5 ACN-buffer 95 pH 2.43 flow rate 0,6_001.lcd
 Sample Name:enalapril
 Sample ID:0.6 mg/ml

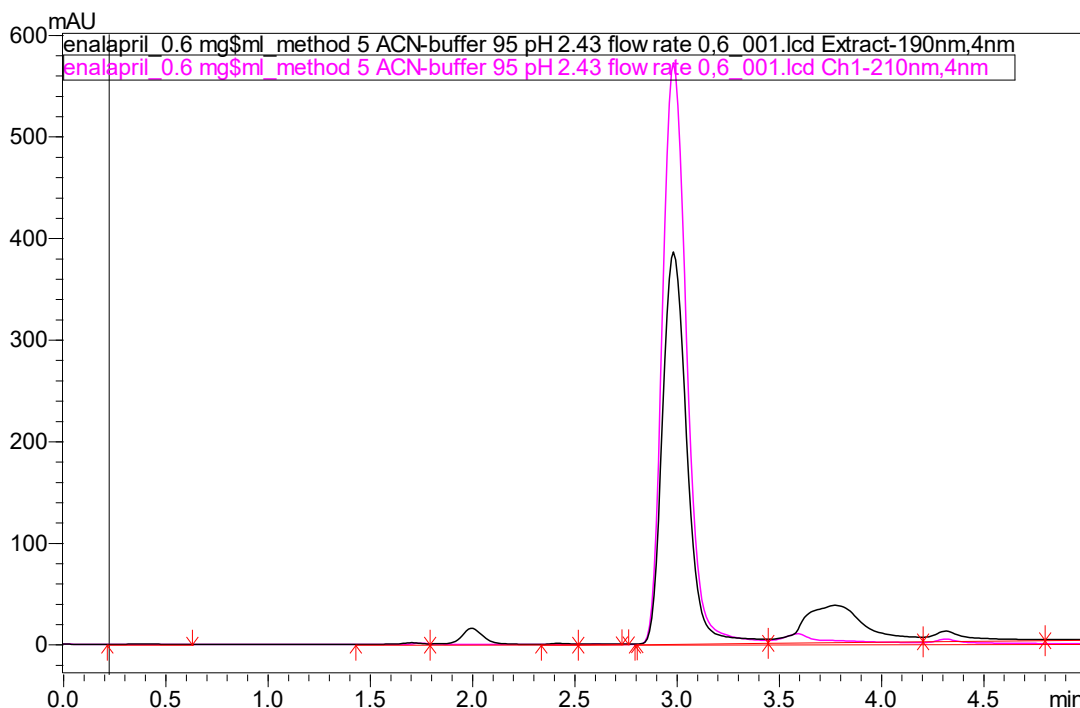


Рисунок 5.2 – Хроматограма розчину еналаприлу (0.6 мг/мл) на колонці Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм) з 5 % ACN та 95% буфером КРФ₆ 40 мМ рН 2.43, температура колонки - 30° С, детектування за довжини хвилі 210 нм

У таблиці 5.2 представлено параметри придатності хроматографічної системи до рис. 5.2. Як видно з результатів, отримано також симетричний пік, який не елююється близько «мертвого» об'єму. Спостерігається елюювання вже двох супровідних речовин – першої близько 2 хв та другої (несиметричний пік) близько 3.7 хв. Тому прийнято рішення для подальшого дослідження обрати співвідношення 98:2 та апробувати швидкість потоку рухомої фази 0.6-1.2 мл/хв.

Таблиця 5.2 – Параметри придатності хроматографічної системи до рисунка 5.2

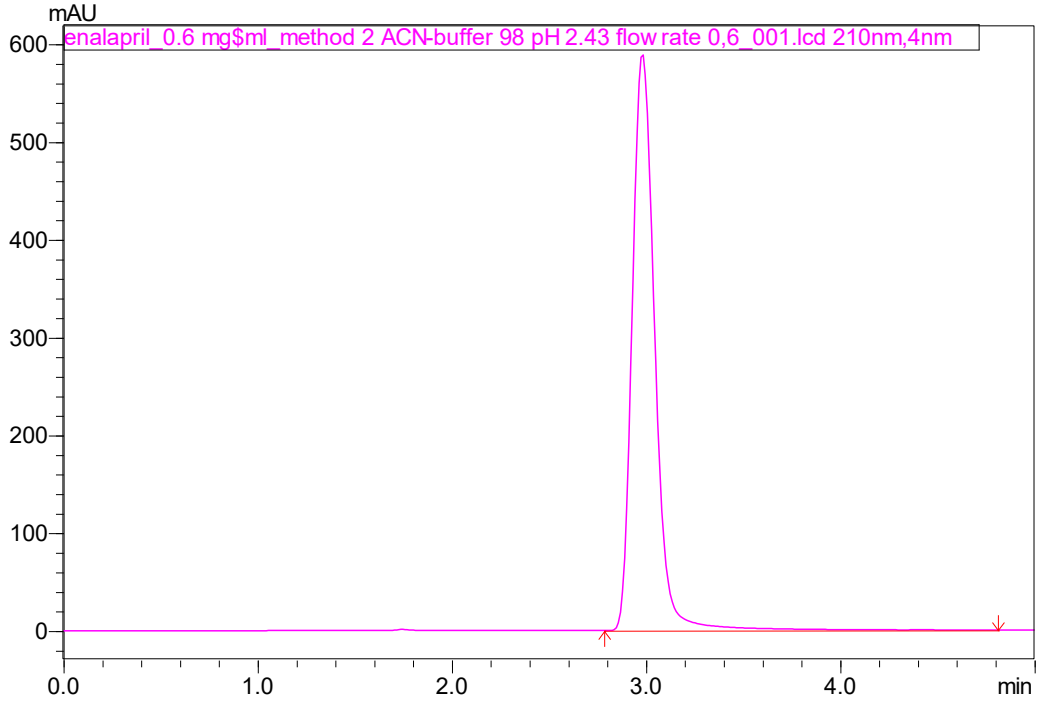
Пік	Час утримування, хв	Площа	Висота	Площа, %	Tailing F.	NTP(USP)	HETP(USP)	Resolution(USP)
1	2.986	4864671	572416	100.000	1.214	2781	53.937	--
Разом		4864671	572416	100,000				

На рис. 5.3 представлено хроматограми розчину еналаприлу за умов апробації швидкості потоку рухомої фази. Як видно з рис. 5.3, усі протестовані швидкості потоку є оптимальними та не елююється пік еналаприлу близько «мертвого» об'єму, проте ми поставили за мету отримати «зелену» методику. Чим повільніша швидкість потоку, тим менше втрат розчинників і тим зеленіша аналітична методика. Для прикладу втрати розчинників при швидкості потоку 0.6 мл/хв становлять 1.20 мл, при 0.8 мл/хв – 1.75, при 1.0 мл/хв – 1.81 мл, при 1.2 мл/хв – 1.83 хв. Тому ми обрали оптимальну швидкість 0.6 мл/хв.

Важливим у виборі оптимальних хроматографічних умов є вибір температури колонки. В попередніх дослідженнях проводили хроматографування на температурі 30° С, проте апробували і температуру 35 °С. На рис. 5.4 наведено хроматограми розчину еналаприлу при температурах 30 °С та 35 °С для порівняння. Обидві температури колонки є оптимальними.

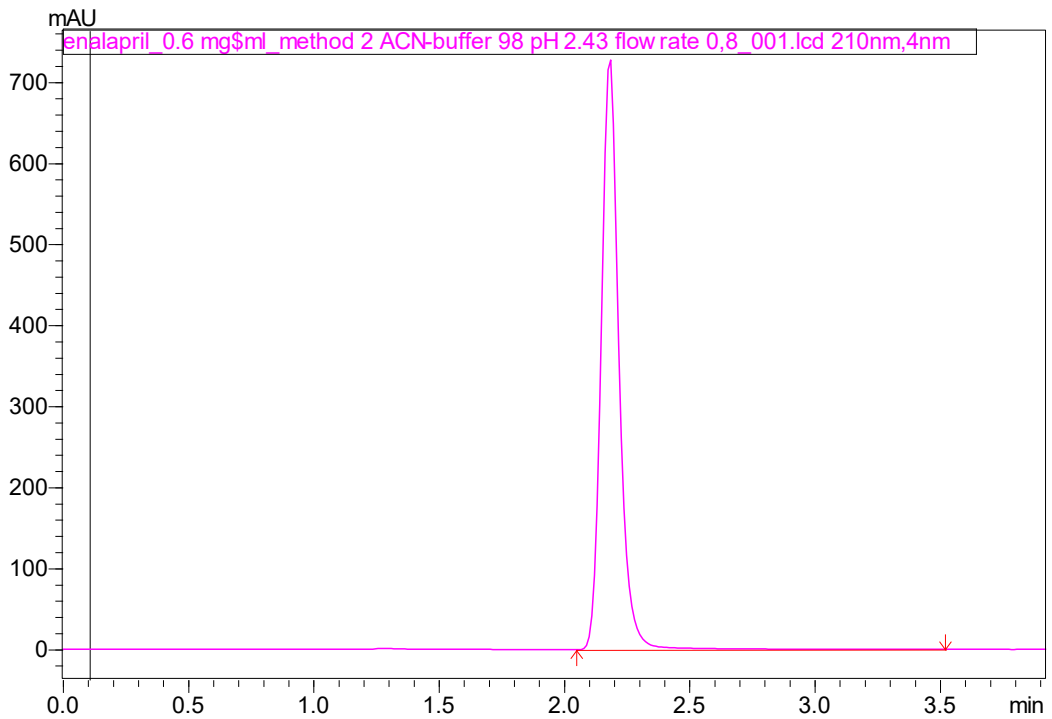
A

Datafile Name:enalapril_0.6 mg/ml_method 2 ACN-buffer 98 pH 2.43 flow rate 0,6_001.lcd
Sample Name:enalapril
Sample ID:0.6 mg/ml



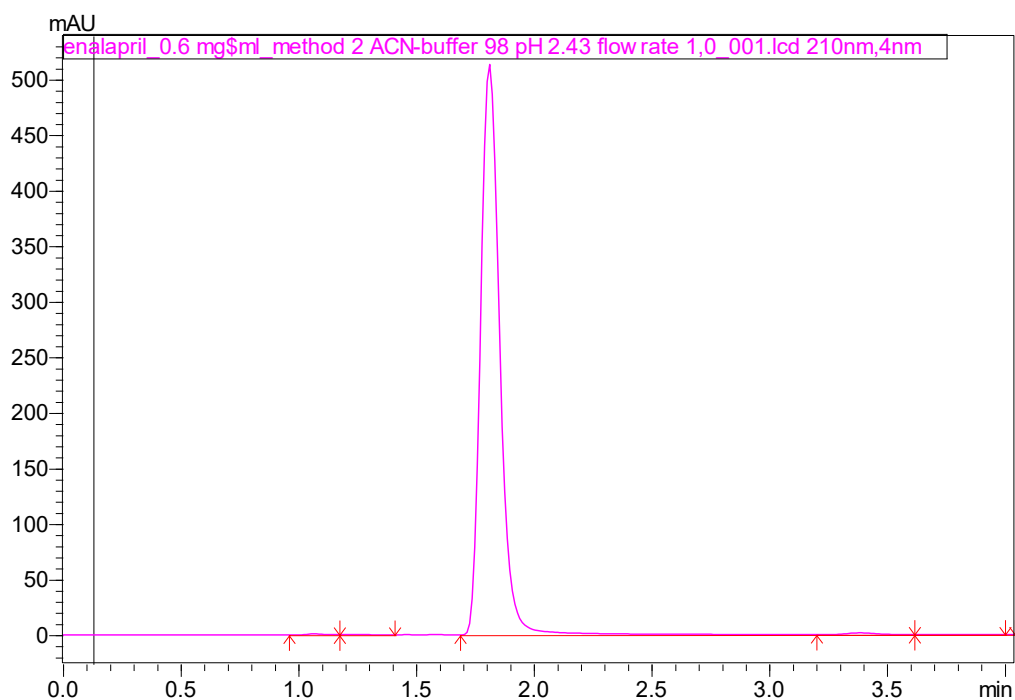
B

Datafile Name:enalapril_0.6 mg/ml_method 2 ACN-buffer 98 pH 2.43 flow rate 0,8_001.lcd
Sample Name:enalapril
Sample ID:0.6 mg/ml



C

Datafile Name:enalapril_0.6 mg/ml_method 2 ACN-buffer 98 pH 2.43 flow rate 1,0_001.lcd
 Sample Name:enalapril
 Sample ID:0.6 mg/ml



D

Datafile Name:enalapril_0.6 mg/ml_method 2 ACN-buffer 98 pH 2.43 flow rate 1,2_001.lcd
 Sample Name:enalapril
 Sample ID:0.6 mg/ml

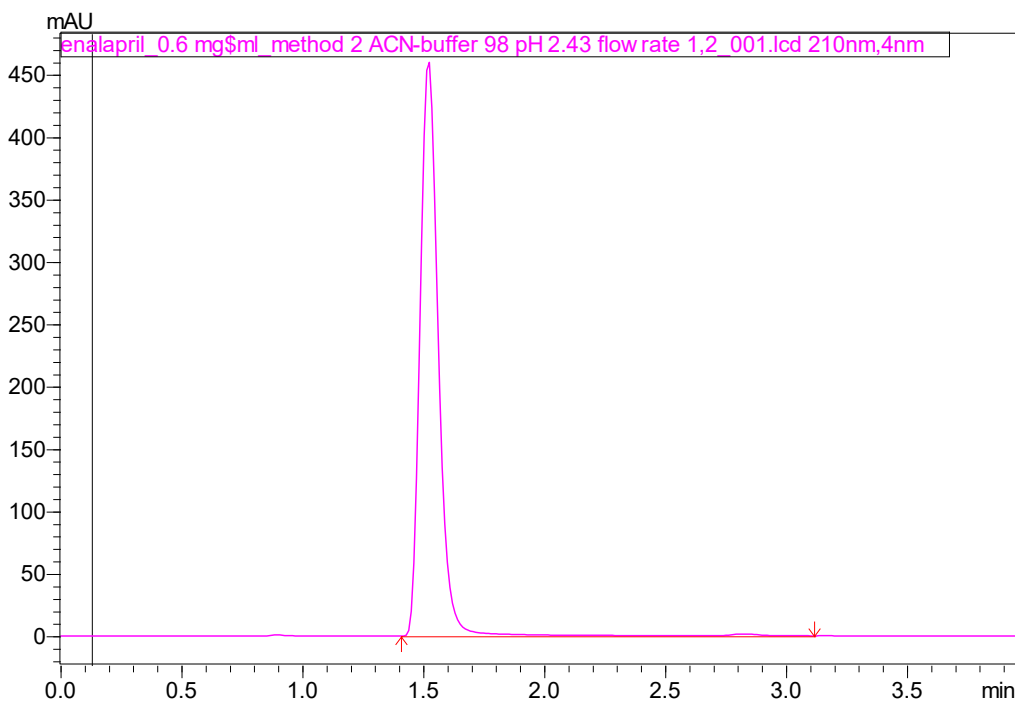


Рисунок 5.3 – Хроматограма розчину еналаприлу (0.6 мг/мл) на колонці Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм) з 2 % ACN та 98 % буфером KPF₆ 40 мМ рН 2.43, температура колонки - 30° С, детектування за довжини хвилі 210 нм (А – швидкість потоку 0.6 мл/хв, В – 0.8 мл/хв, С – 1.0 мл/хв, D – 1.2 мл/хв)

Datafile Name:enalapril_0.6 mg/ml_method 2 ACN-buffer 98 pH 2.43 flow rate 0.6 T35_001.lcd
 Sample Name:enalapril
 Sample ID:0.6 mg/ml

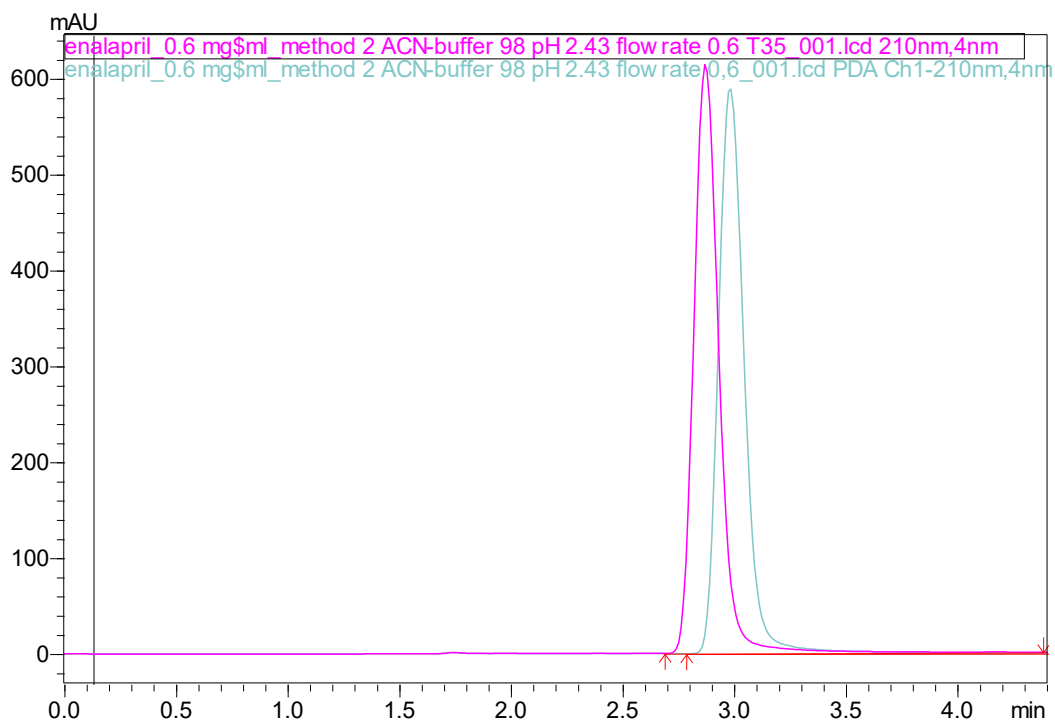


Рисунок 5.4 – Хроматограми розчину еналаприлу (0.6 мг/мл) на колонці Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм) з 2 % ACN та 98 % буфером KPF_6 40 мМ рН 2.43, температура колонки - 30° С та 35° С, детектування за довжини хвилі 210 нм, швидкість потоку – 0.6 мл/хв

Отже, в процесі проведених експериментальних досліджень встановлено оптимальні хроматографічні умови для проведення кількісного визначення еналаприлу в таблетках: хроматографічна колонка Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм), рухома фаза - 2 % ACN та 98 % буферний розчин KPF_6 40 мМ рН 2.43, температура колонки - 30° С, детектування за довжини хвилі 210 нм, об'єм інжекції – 5 мкл.

Валідували аналітичну методику за такими валідаційними характеристиками як робасність, лінійність, правильність та прецизійність. Робасність вивчено ще на етапі розробки методики, оскільки проведено детальні дослідження щодо вибору оптимальних співвідношень компонентів рухомих фаз (95-5 та 98-2, довжин хвиль детектування (190 нм та 210 нм),

температури колонки (30 °С та 35 ° С), швидкості потоку рухомої фази (0.6-1.2 мл/хв). Встановлено, що невеликі зміни в хроматографічних умовах не впливають на результати аналізу, а отже методика є робасною.

Лінійність досліджували регресійним аналізом в діапазоні концентрацій 40-120 мкг/мл. Результати вивчення лінійності наведено на рис. 5.5. На рис. 5.6 представлено хроматограми розчинів еналаприлу за умов вивчення лінійності в діапазоні концентрацій 40-120 мкг/мл. МВ – 8.52 мкг/мл, МКВ – 25.80 мкг/мл.

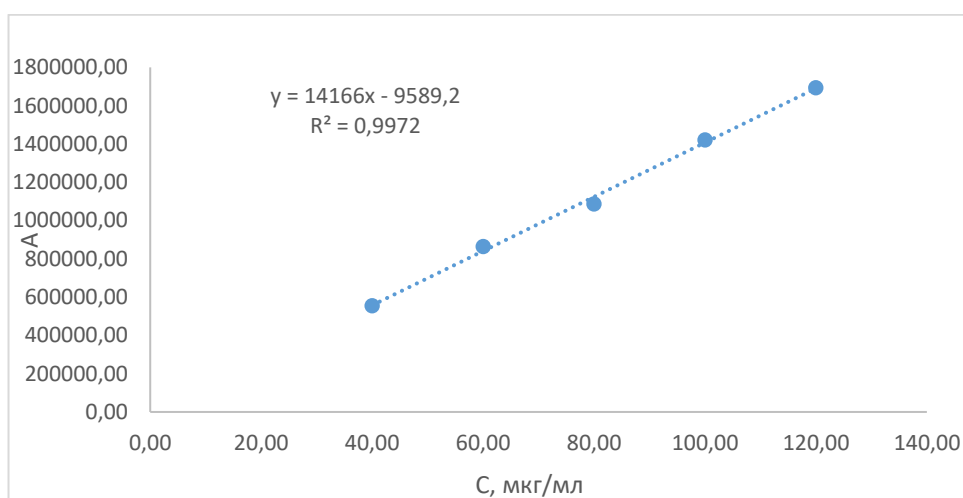


Рисунок 5.5 – Графік залежності площі піку від концентрації розчинів еналаприлу за умов вивчення лінійності аналітичної методики

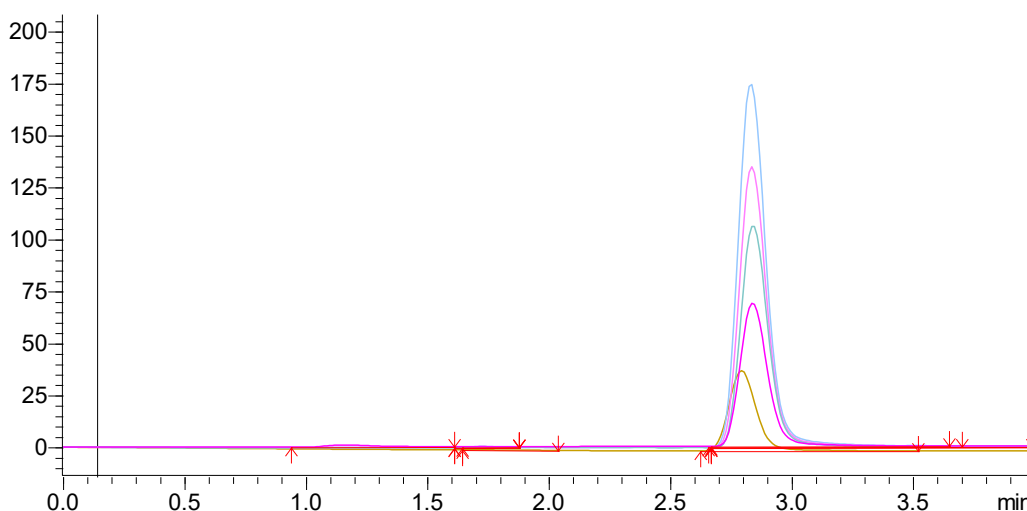


Рисунок 5.6 – Хроматограми, отримані за умов вивчення лінійності аналітичної методики

Для вивчення правильності та прецизійності готували модельні зразки з точними концентраціями еналаприлу малеату в діапазоні 80-120 %. Результати вивчення правильності та прецизійності представлено в таблиці 5.3, 5.4. Одержані результати показали повну відповідність критеріям прийнятності.

Таблиця 5.3 – Результати вивчення правильності ВЕРХ методики

Модельні розчини	Вміст еналаприлу малеату, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100 \%$
	Введено, $X_i = (C_i/C_{rs}) \cdot 100 \%$	Знайдено, $Y_i = (A_i/A_{rs}) \cdot 100 \%$	
M ₁	80.07	80.94	101.09
M ₂	79.92	80.51	101.74
M ₃	80.06	79.89	99.79
M ₄	100.56	100.09	99.54
M ₅	99.85	100.05	100.20
M ₆	100.22	100.73	100.51
M ₇	119.74	120.60	100.72
M ₈	120.81	120.39	99.65
M ₉	120.08	120.97	100.74
Середнє значення, Z , %			100.44
Стандартне відхилення, S_z , %			0.85
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95 \%, 8) \cdot S_z = 2.3060 S_z$, %			1.96
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta_{As} = 2.4 \%$			Виконується (1.96 < 2.4)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 $, %			0.44
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta \%$			Виконується (0.44 < 0.51)
коректна			Загальний висновок про методику

Таблиця 5.4 – Результати вивчення прецизійності ВЕРХ методики

№ розчину	Величина Z_i , %		
	1 дослід	2 дослід	3 дослід
1	100.63	100.94	99.92
2	100.18	99.85	100.19
3	100.34	100.26	100.55
4	100.55	100.82	100.02
5	99.94	99.94	99.90
6	100.07	100.18	99.83
Середнє Z (%)	100.29	100.33	100.07
RSD _x , %	0.27	0.45	0.27
Відносне стандартне відхилення, RSD _Z (%)	0.33		
Відносний довірчий інтервал, Δ_Z	$0.33 \leq 2.4$		
Критичне значення збіжності результатів Δ_{As} , %	2.4		

Розроблену ВЕРХ методику використано для проведення кількісного визначення еналаприлу в таблетках «Енап» 20 мг. Отримані результати доводять те, що запропонована ВЕРХ методика придатна для аналізу таблеток еналаприлу (табл. 5.5) [134, 135].

Мінімізація пробопідготовки, уникнення використання токсичних розчинників, зменшення кількості органічних розчинників – АСН (2 співвідношення до 98 буферного розчину) в складі рухомої фази ізократичним елююванням, швидкий аналіз дали змогу провести «зелений» аналіз, що підтверджено сучасними метриками вивчення зеленості AGREE (бал 0.74),

MoGAPI (бал 81), Complex MoGAPI (бал 81), AGSA (бал 77.78), CaFRI (бал 82) та CACI (бал 79) (рис. 5.7).

Таблиця 5.5 – Результати кількісного визначення еналаприлу малеату в таблетках

Лікарський засіб	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
Таблетки «Енап» 20 мг	0.0205	$\bar{m} = 0.0206$ г $S = 6.44 \times 10^{-4}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 6.76 \times 10^{-4}$ RDS = 3.12 $\varepsilon = 3.29$ %
	0.0211	
	0.0217	
	0.0203	
	0.0200	
	0.0222	

Отже, розроблено «зелену», експресну та просту ВЕРХ методику визначення еналаприлу в таблетках з використанням солей хаотропних аніонів в складі рухомої фази та C18 колонки.

Запропонований підхід дав змогу отримати симетричні піки з відмінними значеннями параметрів хроматографічної системи і провести аналіз за короткий час. Окрім того, сповільнення швидкості потоку рухомої фази до 0.6 мл/хв зробило аналіз «зеленішим», що підтверджено найсучаснішими метриками вивчення «зеленості» (AGREE, MoGAPI, Complex MoGAPI, AGSA, CaFRI та CACI). Діапазон застосування аналітичної методики знаходився в діапазоні від 40 до 120 мкг/мл.

Розроблена ВЕРХ методика визначення еналаприлу в таблетках може застосовуватися як у рутинному фармацевтичному аналізі, так і при тестуванні незалежними лабораторіями.

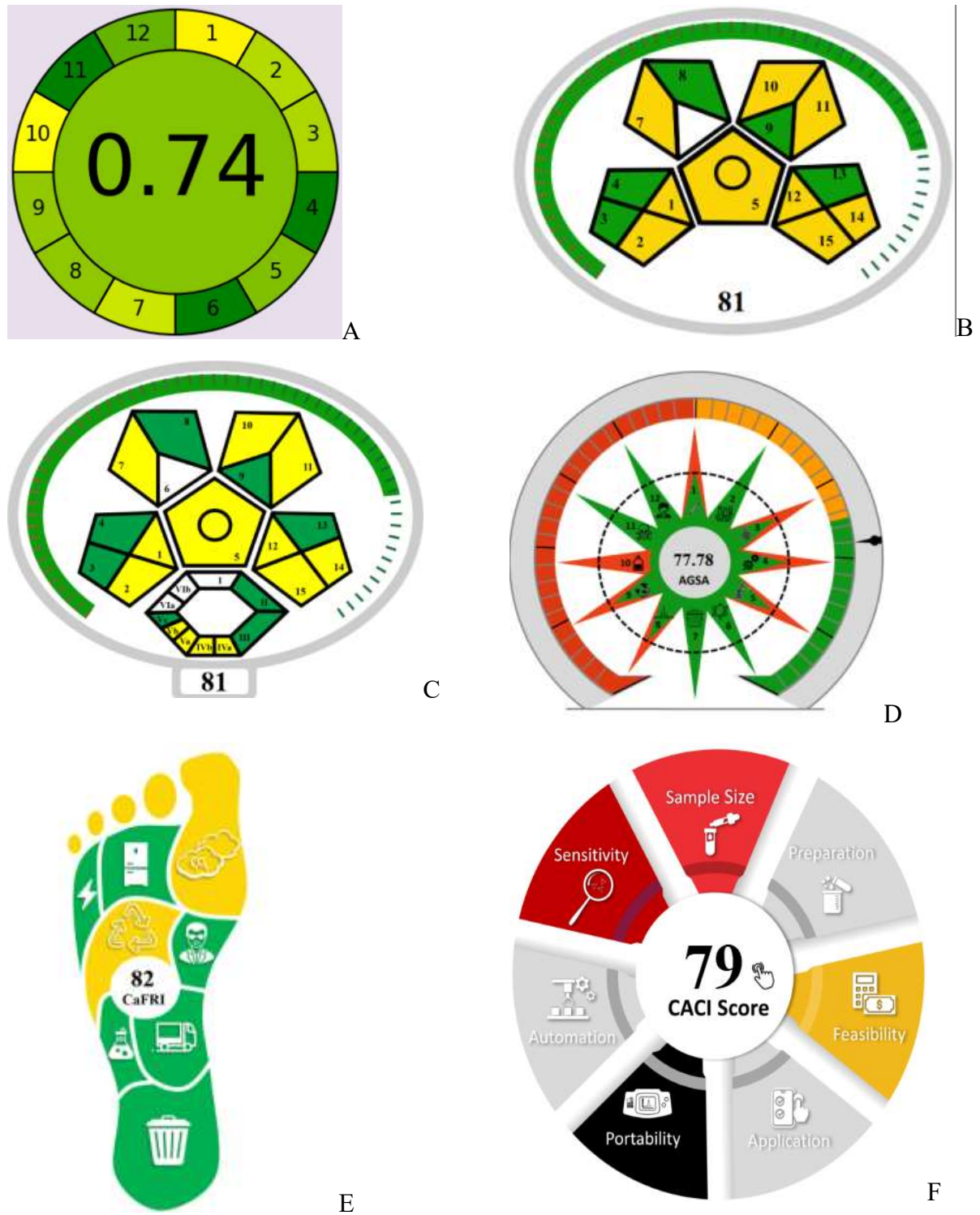


Рисунок 5.7 – Результати вивчення зеленості запропонованої ВЕРХ методики визначення еналаприлу в таблетках метриками AGREE (A), MoGAPI (B), Complex MoGAPI (C), AGSA (D), CaFRI (E) та CACI (F)

5.2 Розробка та валідація ВЕРХ методики кількісного визначення каптоприлу в лікарських засобах

Нами заплановано розробку ВЕРХ методики визначення каптоприлу в таблетках, яка була б «зелена», експресна, давала симетричний пік каптоприлу та можливість визначення також супровідних домішок (зокрема каптоприлу дисульфід). Каптоприл — це водорозчинна молекула з $\log P = 0.34$, $pK_{a1} = 3.7$; $pK_{a2} = 9.8$. Прямий аналіз каптоприлу за допомогою обернено-фазової рідинної хроматографії не є складним, проте через пролінову структуру каптоприл може елююватися близько мертвого об'єму, що створює проблеми у проведенні кількісного визначення. Другою проблемою є схильність піка каптоприлу до деформації із хвостовим ефектом та давати несиметричний пік. Поведінка іонізованих аналітів у обернено-фазовій ВЕРХ та вплив типу буфера й інших добавок у рухомій фазі привертають увагу через їхнє значення для ефективної аналітичної розробки, де більшість аналітів є іонізованими. За умов рухомої фази АСN–вода, PF_6^- проявляє найбільше утримування і є найліофільнішим іоном у серії Гоффмейстера. PF_6^- має найвищий ступінь делокалізації заряду та найвищу поляризованість, що полегшує його дисперсійні (або ван-дер-ваальсові) взаємодії. Нами апробовано KPF_6 як один з найсильніших хаотропів, проте буферний розчин рН 2.4 не дав змоги отримати відмінну хроматограму. Ми модифікували буферний розчин і додали 0.1 % $HClO_4$. Отже, склад нового апробованого буферного розчину - рН 2.10 (0.25 % KPF_6 , 0.1 % $HClO_4$, 0.1 % KH_2PO_4). Співвідношення АСN-буферний розчин 50-50 та 40-60 на хроматографічній колонці Zorbax SB-C18 (150 x 4.6 мм 3.5 мкм) дали змогу отримати відмінне утримування каптоприлу, проте незадовільне розділення з супровідньою домішкою каптоприлу дисульфід, а співвідношенням 30-70 АСN-буферний розчин отримано відмінне розділення, проте NTP становило 1080 (рис. 5.8). В

таблиці 5.5 представлено параметри придатності хроматографічної системи до рис. 5.8. Оптимальною визначено довжину хвилі детектування 200 нм.

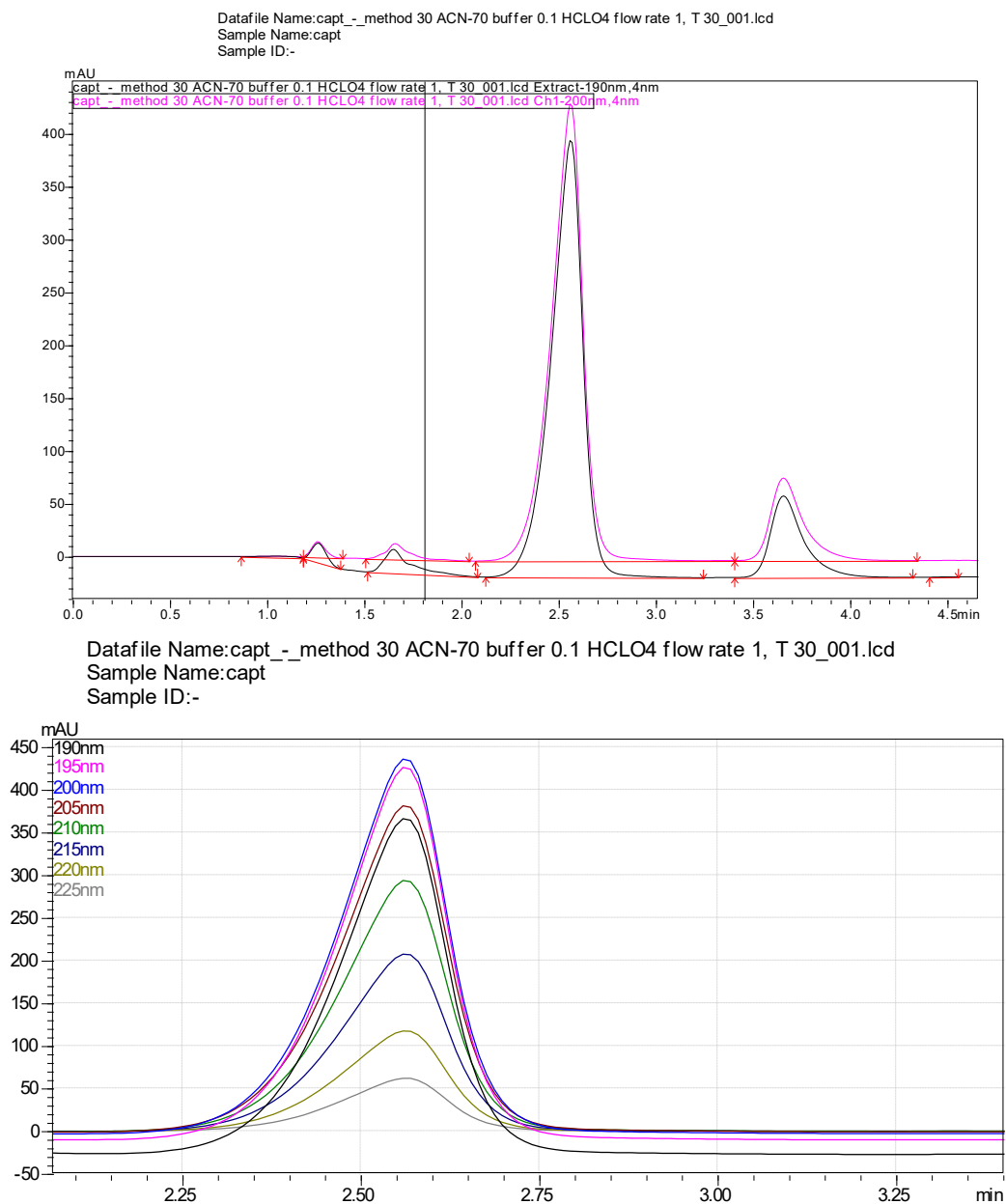


Рисунок 5.8 – Хроматограма розчину каптоприлу (1.0 мг/мл) на колонці Zorbax SB-C18 (150 x 4.6 мм 3.5 мкм) з 30% ACN та 70 % буферним розчином pH 2.10 (0.25 % KPF₆, 0.1 % HClO₄, 0.1 % KH₂PO₄), температура колонки - 30° С, детектування за довжин хвиль 190 нм та 200 нм, швидкість потоку рухомої фази – 1.0 мл/хв

Таблиця 5.5 – Параметри придатності хроматографічної системи до рисунку 5.8

Пік	Час утримування, хв	Площа піка	Висота	Площа, %	Tailing F.	k'	Separation	NTP(USP)	HETP(USP)	Resolution (USP)
1	1.261	70493	14753	1.159	1.181	0.000	--	1160	129.311	--
2	1.659	119315	14759	1.962	1.587	0.315	0.000	1008	148.852	2.224
3	2.563	4963793	432127	81.631	0.804	1.032	3.279	1080	138.888	3.474
4	3.658	927150	78180	15.247	1.524	1.900	1.841	2317	64.729	3.554
Разом		6080751	539819	100.000						

Ми продовжили подальші дослідження з апробації вищих температур 35 °C та 40 °C. На рис. 5.9 представлено хроматограми, отримані на колонці Zorbax SB-C18 (150 x 4.6 мм 3.5 мкм) з рухомою фазою 30 % ACN та 70 % буферним розчином рН 2.10 (0.25 % KPF₆, 0.1 % HClO₄, 0.1 % KH₂PO₄), температура колонки – 35 °C, детектування за довжини хвилі 200 нм.

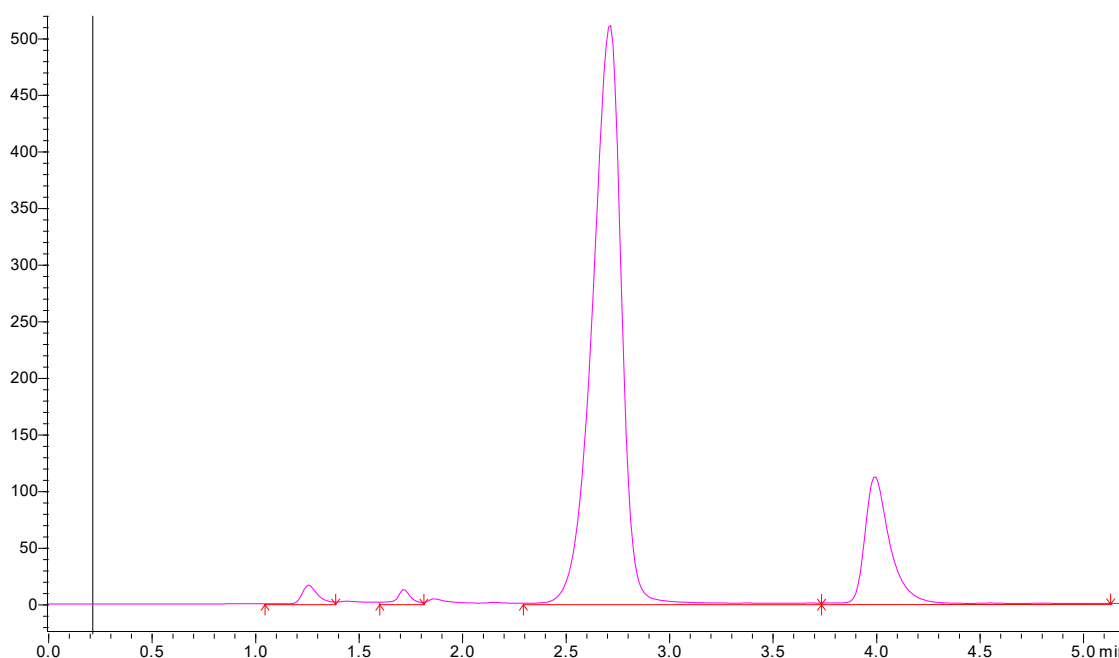


Рисунок 5.9 – Хроматограма розчину каптоприлу (1.0 мг/мл) на колонці Zorbax SB-C18 (150 x 4.6 мм 3.5 мкм) з 30% ACN та 70 % буферним розчином рН 2.10 (0.25 % KPF₆, 0.1 % HClO₄, 0.1 % KH₂PO₄), температура колонки – 35 °C, детектування за довжини хвилі 200 нм, швидкість потоку рухомої фази – 1.0 мл/хв

У таблиці 5.6 наведено параметри придатності хроматографічної системи до рисунка 5.9. Варто відмітити, що NTP зросло до 1679.

Таблиця 5.6 – Параметри придатності хроматографічної системи до рисунка 5.9

Пік	Час утримування, хв	Площа піка	Висота	Площа, %	Tailing F.	k'	Separation	NTP(USP)	HETP(USP)	Resolution(USP)
1	1.260	86670	16385	1.433	--	0.000	--	1056	142.066	--
2	1.720	57651	12546	0.953	--	0.365	0.000	3162	47.439	3.312
3	2.715	4962544	510598	82.065	0.832	1.155	3.168	1679	89.361	5.141
4	3.996	940191	112043	15.548	1.519	2.171	1.880	4971	30.176	5.208
Разом		6047055	651573	100.000						

На рис. 5.10 наведено хроматограми, отримані на колонці Zorbax SB-C18 (150 x 4.6 мм 3.5 мкм) з рухомою фазою 30% ACN та 70 % буферним розчином рН 2.10 (0.25 % KPF₆, 0.1 % HClO₄, 0.1 % KH₂PO₄), температура колонки – 40 ° С, детектування за довжини хвилі 200 нм.

У таблиці 5.7 наведено параметри придатності хроматографічної системи до рис.5.10. NTP зросло до 2596, що абсолютно задовольняє параметри придатності хроматографічної системи. Апробовано також температури 36 ° С та 38 ° С, що засвідчено порівняльними хроматограмами на рис. 5.11. Для подальших досліджень обрано температуру 40 ° С.

Дослідження з вибору оптимальної швидкості потоку рухомої фази представлено на рис. 5.12. Обрано швидкість потоку 1.0 мл/хв як оптимальну для проведення експресного, «зеленого» та відтворюваного аналізу. Встановлено також, що швидкість потоку рухомої фази не впливає суттєво на результати аналізу.

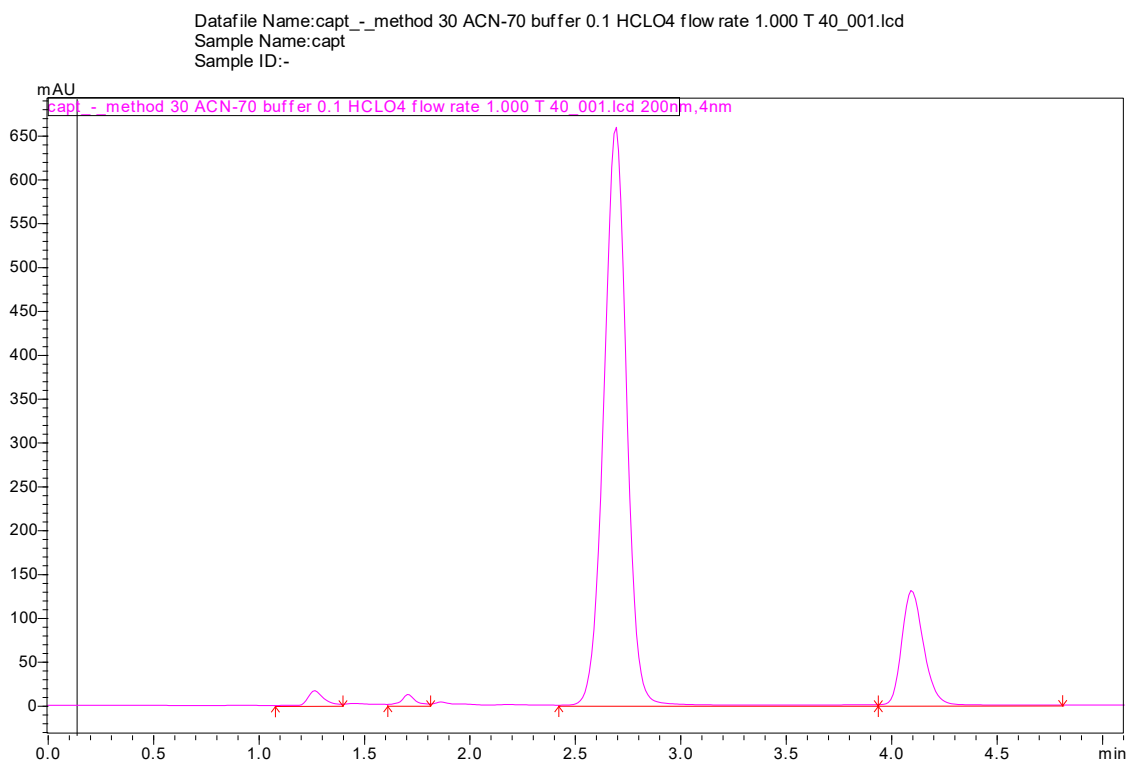


Рисунок 5.10 – Хроматограма розчину каптоприлу (1.0 мг/мл) на колонці Zorbax SB-C18 (150 x 4.6 мм 3.5 мкм) з 30% ACN та 70 % буферним розчином рН 2.10 (0.25 % KPF_6 , 0.1 % $HClO_4$, 0.1 % KH_2PO_4), температура колонки – 40 ° С, детектування за довжини хвилі 200 нм, швидкість потоку рухомої фази – 1.0 мл/хв

Таблиця 5.7 – Параметри придатності хроматографічної системи до рисунка 5.10

Пік	Час утримування, хв	Площа	Висота	Площа, %	Tailing F.	k'	Separation	NTP(USP)	HETP(USP)	Resolution(USP)
1	1.267	86587	16764	1.440	--	0.000	--	1153	130.115	--
2	1.710	57981	12454	0.964	--	0.349	0.000	3058	49.049	3.243
3	2.696	4928035	659037	81.945	0.981	1.127	3.226	2596	57.783	5.878
4	4.098	941194	130767	15.651	1.234	2.234	1.982	6403	23.425	6.736
Total		6013798	819022	100.000						

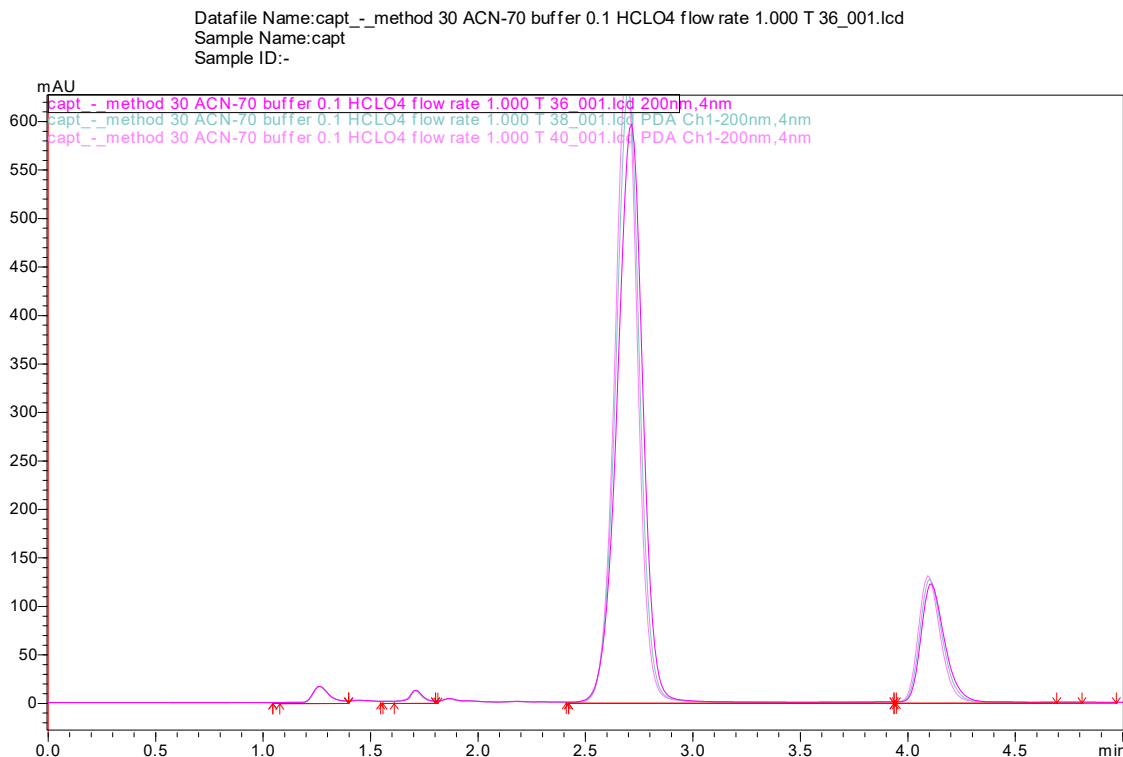


Рисунок 5.11 – Порівняльні хроматограми розчину каптоприлу (1.0 мг/мл) на колонці Zorbax SB-C18 (150 х 4.6 мм 3.5 мкм) з 30% ACN та 70 % буферним розчином рН 2.10 (0.25 % KPF_6 , 0.1 % $HClO_4$, 0.1 % KH_2PO_4), температура колонки – 36 ° С, 38 ° С та 40 ° С, детектування за довжини хвилі 200 нм, швидкість потоку рухомої фази – 1.0 мл/хв

В результаті проведених численних експериментальних досліджень встановлено оптимальні хроматографічні умови визначення каптоприлу в таблетках: хроматографічна колонці Zorbax SB-C18 (150 х 4.6 мм 3.5 мкм), рухома фаза - 30% ACN та 70 % буферний розчин рН 2.10 (0.25 % KPF_6 , 0.1 % $HClO_4$, 0.1 % KH_2PO_4), температура колонки - 40° С, детектування за довжини хвилі 200 нм, швидкість потоку – 1.0 мл/хв, розчинник – рухома фаза. Типова хроматограма за вказаних умов представлена на рис. 5.13. За оптимальних умов утримування каптоприлу, ефективність розділення, форма піку та відтворюваність значно покращилися порівняно з іншими опублікованими в науковій літературі аналітичними методиками.

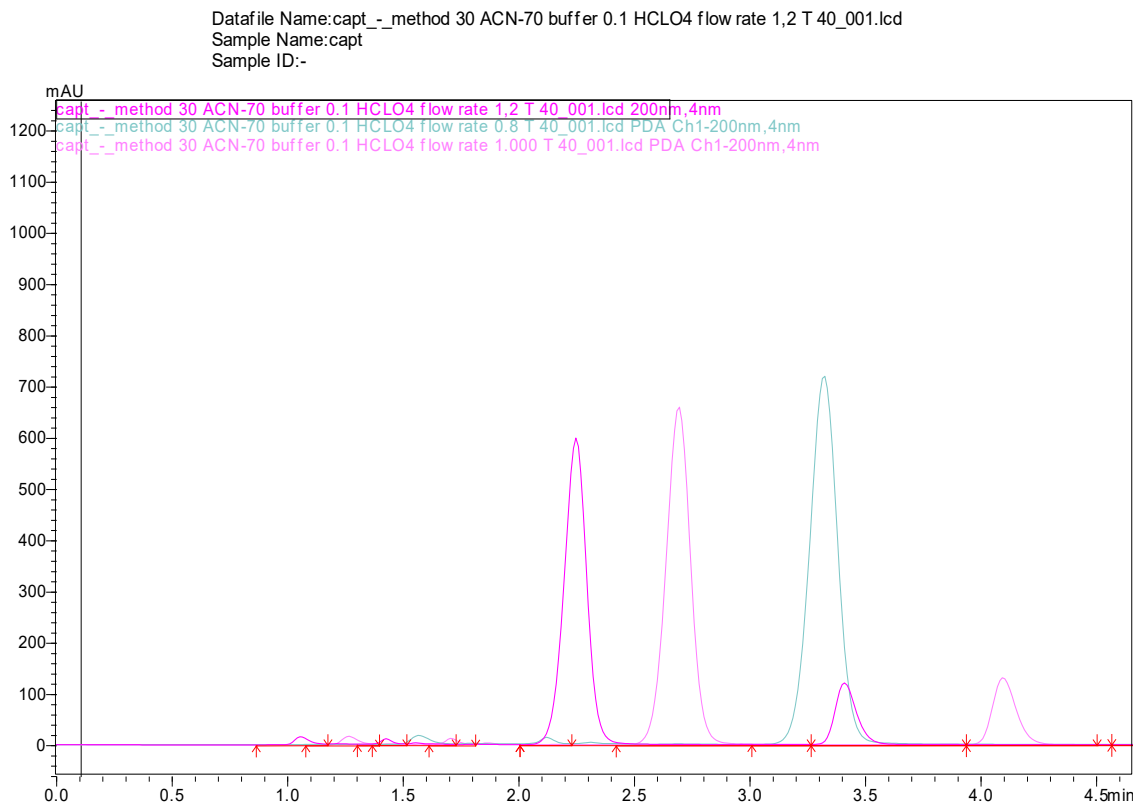


Рисунок 5.12 – Порівняльні хроматограми розчину каптоприлу (1.0 мг/мл) на колонці Zorbax SB-C18 (150 x 4.6 мм 3.5 мкм) з 30% ACN та 70 % буферним розчином рН 2.10 (0.25 % KPF₆, 0.1 % HClO₄, 0.1 % KH₂PO₄), температура колонки – 40 ° С, детектування за довжини хвилі 200 нм, швидкість потоку рухомої фази – 0.8 мл/хв, 1.0 мл/хв та 1.2 мл/хв

Валідацію аналітичної методики проводили за такими валідаційними характеристиками як робастність, лінійність, правильність та прецизійність. Лінійність аналітичної методики вивчали в діапазоні 40-120 мкг/мл методом найменших квадратів та розраховували рівняння регресії ($y=12096x-45214$) з коефіцієнтом кореляції ($R^2=0.9998$).

Хроматограми, отримані за умов вивчення лінійності аналітичної методики, наведено на рис. 5.14. Розраховували рівняння регресії. Результати дослідження лінійності наведено на рис. 5.15. МВ становила 8.51 мкг/мл, МКВ – 25.80 мкг/мл.

Datafile Name: captopril_0.1 mg/ml_method 30 ACN - buffer pH 2.10 KPF6, HClO4 70 Flow rate 1, T40_003.lcd
Sample Name: captopril
Sample ID: 0.1 mg/ml

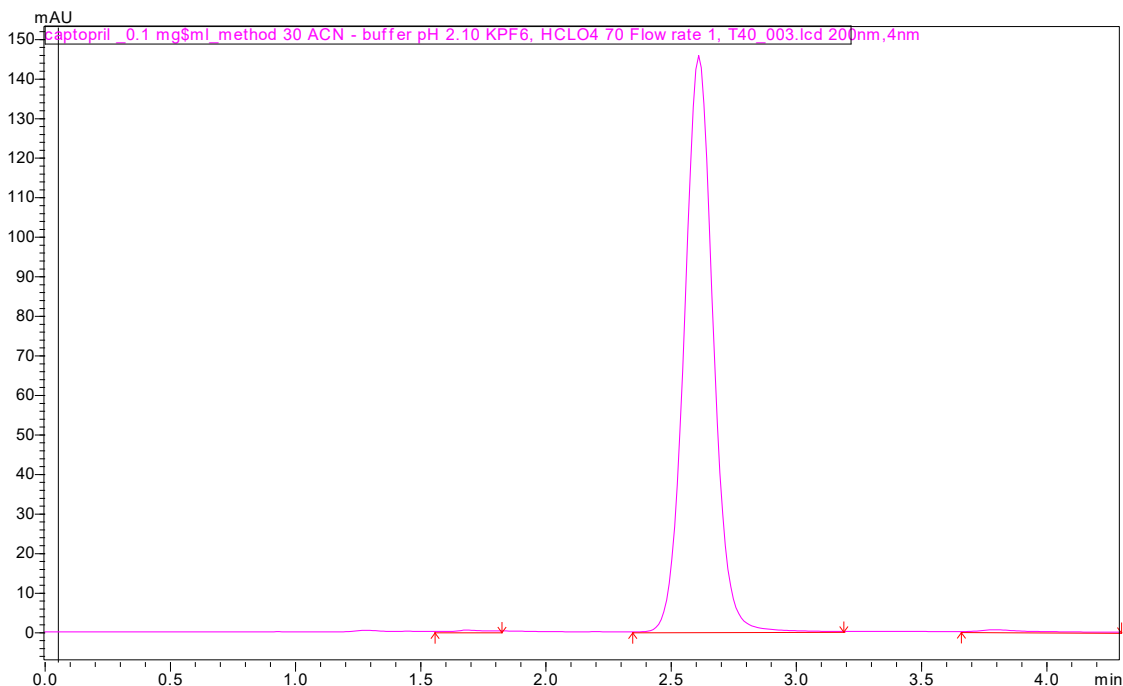


Рисунок 5.13 – Типова хроматограма розчину каптоприлу (0.1 мг/мл), отримана за оптимальних хроматографічних умов на колонці Zorbax SB-C18 (150 x 4.6 мм 3.5 мкм) з 30% ACN та 70 % буферним розчином pH 2.10 (0.25 % KPF₆, 0.1 % HClO₄, 0.1 % KH₂PO₄), температура колонки – 40 ° C, детектування за довжини хвилі 200 нм, швидкість потоку рухомої фази – 1.0

мл/хв

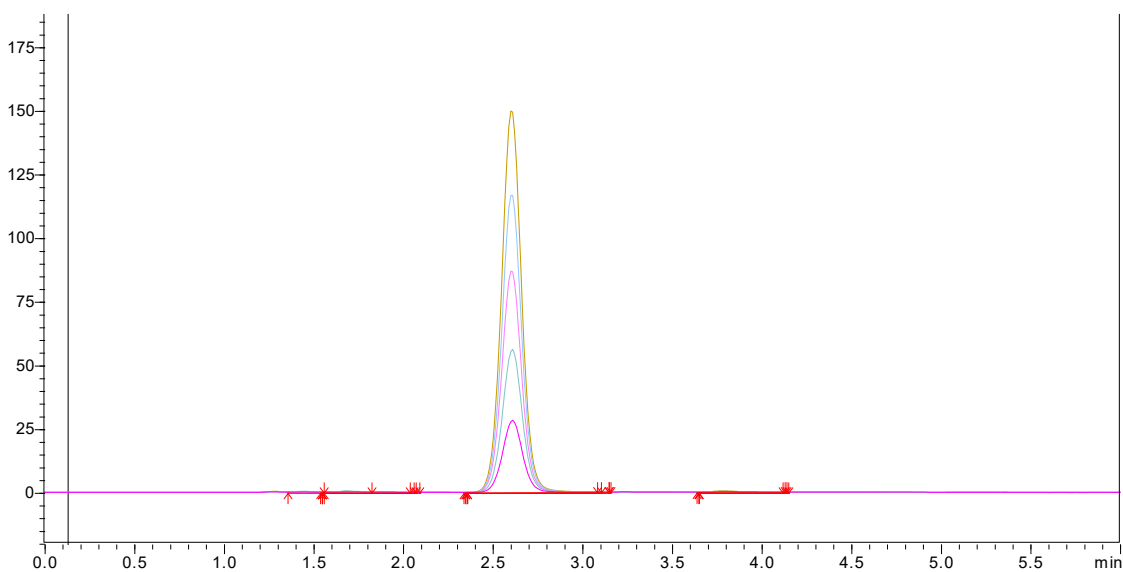


Рисунок 5.14 – Хроматограми, отримані за умов вивчення лінійності аналітичної методики

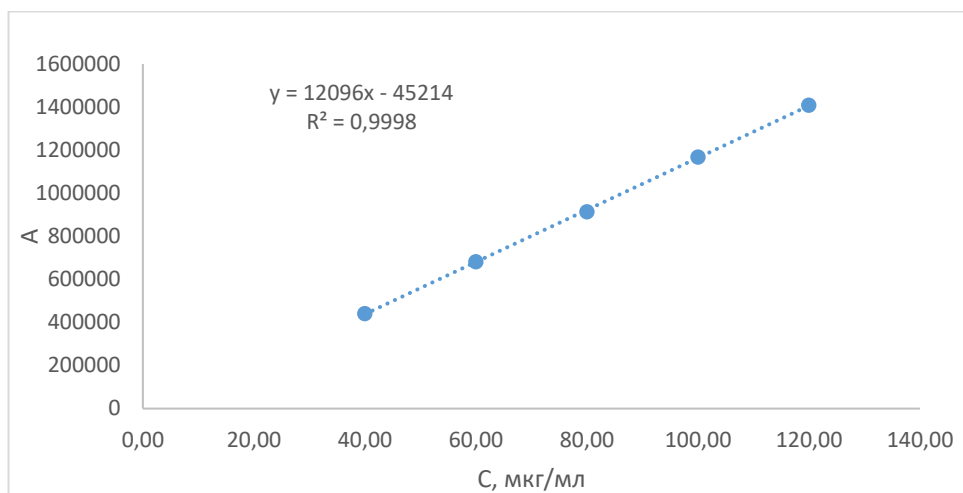


Рисунок 5.15 – Графік залежності площі піку від концентрації розчинів каптоприлу

З метою дослідження правильності приготовлено модельні зразки з концентраціями АФІ каптоприлу в діапазоні 80-120 %. Результати вивчення правильності та прецизійності представлено в таблиці 5.8, 5.9. Одержані результати задовольняють критерії прийнятності.

Розроблену ВЕРХ методику застосовано для проведення кількісного визначення каптоприлу в таблетках «Каптоприл» 25 мг. Отримані результати у таблиці 5.10 вказують на те, що запропонована ВЕРХ методика визначення каптоприлу із застосуванням солей хаотропних аніонів у складі рухомої фази може використовуватися для кількісного визначення каптоприлу в таблетках [136].

Використання нетоксичних розчинників, зменшення кількості ацетонітрилу до 30 у рухомій фазі, ізократичне елюювання, час хроматографування до 4 хв, мінімізація пробопідготовки дали можливість провести зелений аналіз, що засвідчено результатами вивчення зеленості аналітичної методики метриками AGREE (бал 0.72), MoGAPI (бал 81), Complex MoGAPI (бал 81), AGSA (бал 73.61), CaFRI (бал 74) та CACI (бал 82) (рис. 5.16).

Таблиця 5.8 – Результати дослідження правильності ВЕРХ методики

Модельні розчини	Вміст каптоприлу, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100 \%$
	Введено, $X_i = (C_i/C_{rs}) \cdot 100 \%$	Знайдено, $Y_i = (A_i/A_{rs}) \cdot 100 \%$	
M ₁	80.07	80.45	100.47
M ₂	79.82	80.32	100.62
M ₃	80.45	79.90	99.32
M ₄	100.11	100.55	100.44
M ₅	100.05	100.31	100.26
M ₆	99.87	100.11	100.24
M ₇	120.82	120.59	99.81
M ₈	120.05	120.42	100.31
M ₉	120.22	120.49	100.22
Середнє значення, Z, %			100.19
Стандартне відхилення, S _z , %			0.48
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95 \%, 8) \cdot S_z = 2.3060 S_z, \%$			1.11
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta_{As} = 2.4 \%$			Виконується (1.11 < 2.4)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 , \%$			0.19
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta \%$			Виконується (0.19 < 0.51)
коректна			Загальний висновок про методику

Таблиця 5.9 – Результати дослідження прецизійності ВЕРХ методики

№ розчину	Величина Z_i , %		
	1 дослід	2 дослід	3 дослід
1	100.44	99.88	100.18
2	99.85	100.46	99.90
3	100.20	100.20	100.58
4	100.52	100.11	100.10
5	100.05	99.79	100.27
6	99.99	100.24	99.79
Середнє Z (%)	100.18	100.11	100.14
RSD_x , %	0.26	0.25	0.28
Відносне стандартне відхилення, RSD_Z (%)	0.26		
Відносний довірчий інтервал, Δ_Z	$0.26 \leq 2.4$		
Критичне значення збіжності результатів Δ_{As} , %	2.4		

Таблиця 5.10 – Результати кількісного визначення каптоприлу в таблетках

Лікарський засіб	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
Таблетки «Каптоприл» 25 мг	0.0250	$\bar{m} = 0.0251$ г $S = 1.63 \times 10^{-4}$ $t = 2,57$ $\Delta x = 1.71 \times 10^{-4}$ RDS = 0.65 $\varepsilon = 0.68$ %
	0.0249	
	0.0251	
	0.0253	
	0.0249	
	0.0252	

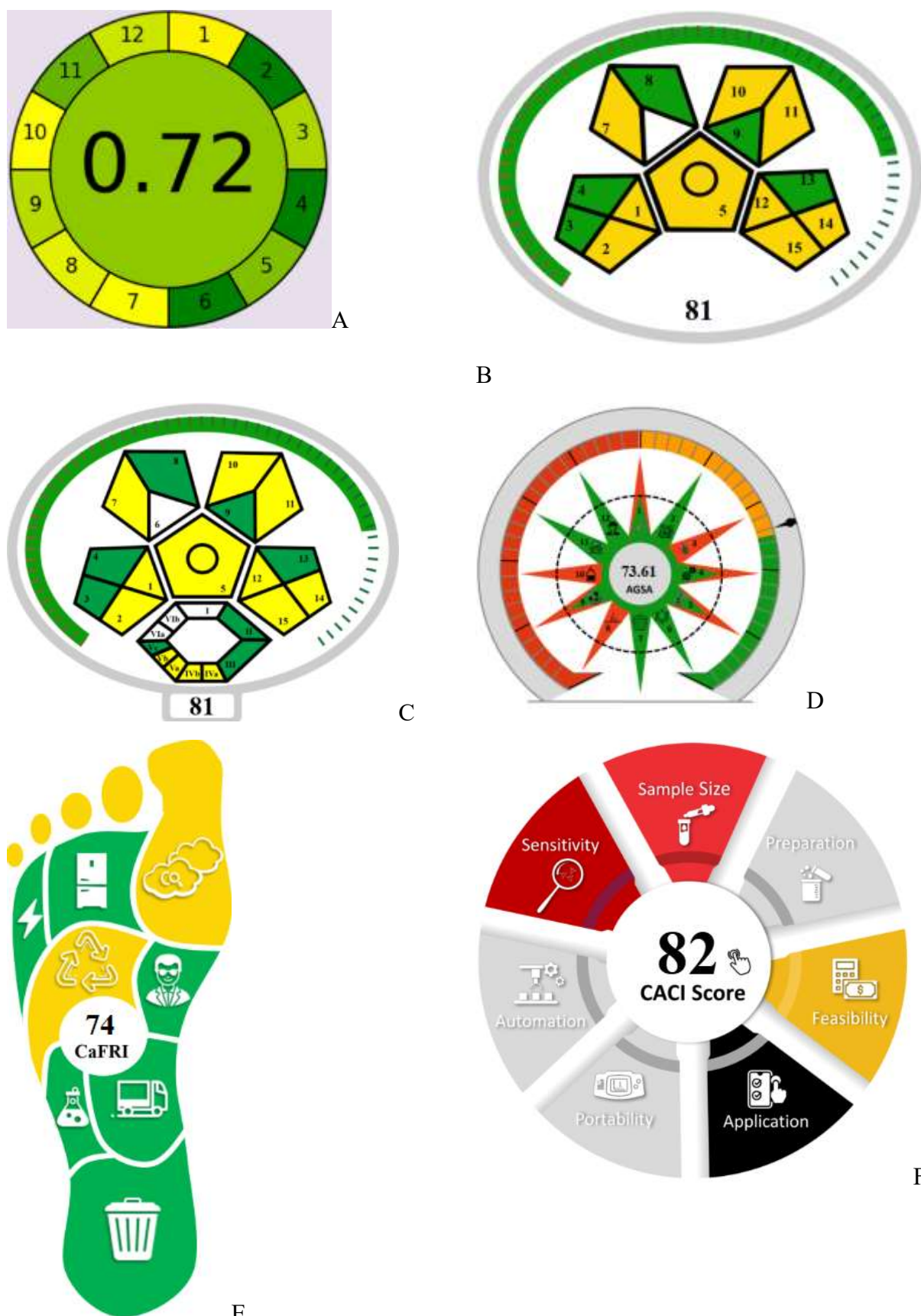


Рисунок 5.16 – Результати вивчення зеленості розробленої аналітичної методики визначення каптоприлу метриками AGREE (A), MoGAPI (B), Complex MoGAPI (C), AGSA (D), CaFRI (E) та CACI (F)

Підсумовуючи, розроблено експресну, просту та «зелену» ВЕРХ методику визначення каптоприлу в таблетках з використанням солей хаотропних аніонів. Запропонована ВЕРХ методика дає змогу провести кількісне визначення каптоприлу в таблетках з отриманням симетричного піку, який не елююється близько мертвого об'єму. Окрім того, розроблена ВЕРХ методика може бути використана для аналізу супровідних домішок. ВЕРХ методика була лінійною в діапазоні концентрацій 40-120 мкг/мл. Метриками вивчення зеленості AGREE, MoGAPI, Complex MoGAPI, AGSA, CaFRI та CASI показано, що запропонована аналітична методика з використанням солей хаотропних аніонів у складі рухомої фази є екологічно безпечною.

Висновки до розділу 5

1. Провідні Фармакопеї світу регламентують проведення хроматографічного визначення еналаприлу в субстанції градієнтним елюювання (на 30 хв) з використання хроматографічної колонки 4.1 мм × 15 см, 5 мкм класу L21, температури 70 °С, швидкості потоку 1.5 мл/хв та в таблетках на колонці класу L7, температури 50 °С, швидкості потоку 2.0 мл/хв з використанням ізократичного елюювання ACN та буфером (розчином натрію дигідрогенфосфату у воді, доведений кислотою фосфорною до рН 2.2) (250:750). В науковій літературі вченими запропоновано ВЕРХ методики визначення еналаприлу в лікарських засобах, проте такі методики мають недоліки (несиметричні піки, елюювання близько «мертвого» об'єму та інші). Ми пропонуємо застосування солей хаотропних аніонів у складі рухомої фази на хроматографічній колонці C18 як перспективний підхід для отримання симетричного піку еналаприлу, який елююється не близько «мертвого» об'єму. Використання солей хаотропних аніонів у рухомій фазі під час ВЕРХ визначення еналаприлу дало змогу скоротити часу аналізу (проте не проводити його визначення близько «мертвого» об'єму) та покращити

симетрію піка еналаприлу. В процесі проведених експериментальних досліджень встановлено оптимальні хроматографічні умови для проведення кількісного визначення еналаприлу в таблетках: хроматографічна колонка Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм), рухома фаза – 2 % ACN та 98 % буферний розчин KPF₆ 40 mM рН 2.43, температура колонки - 30° С, детектування за довжини хвилі 210 нм. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 40-120 мкг/мл. Рівняння регресії $y=14166x -9589.2$, коефіцієнт кореляції $R^2 = 0.9972$. МВ – 8.52 мкг/мл, МКВ – 25.80 мкг/мл. Сучасними інструментами вивчення зеленості AGREE (бал 0,74), MoGAPI (бал 81), Complex MoGAPI (бал 81), AGSA (бал 77,78), CaFRI (бал 82) та CASI (бал 79) підтверджено, що запропонована ВЕРХ методика є «зеленою». Розроблена ВЕРХ методика визначення еналаприлу в таблетках може застосовуватися як у рутинному фармацевтичному аналізі, так і при тестуванні незалежними лабораторіями.

2. Аналіз каптоприлу за допомогою обернено-фазової рідинної хроматографії не є складним завданням, проте через пролінову структуру каптоприл може елююватися близько мертвого об'єму, що створює проблеми у проведенні кількісного визначення. Другою проблемою є схильність піка каптоприлу до деформації із хвостовим ефектом та давати несиметричний пік. Ми у своїй роботі пропонуємо застосування солей хаотропних аніонів в складі рухомої фази на колонці C18 як перспективний підхід до ефективної аналітичної розробки, що дасть змогу покращити утримування та форму піка каптоприлу. За умов рухомої фази ACN–вода, PF₆⁻ проявляє найбільше утримування і є найліофільнішим іоном у серії Гоффмейстера. PF₆⁻ має найвищий ступінь делокалізації заряду та найвищу поляризованість, що полегшує його дисперсійні (або ван-дер-ваальсові) взаємодії. В результаті проведених численних експериментальних досліджень встановлено

оптимальні хроматографічні умови визначення каптоприлу в таблетках: хроматографічна колонка Zorbax SB-C18 (150 x 4.6 мм 3.5 мкм), рухома фаза – 30% ACN та 70 % буферний розчин pH 2.10 (0.25 % KPF_6 , 0.1 % $HClO_4$, 0.1 % KH_2PO_4), температура колонки – 40° C, детектування за довжини хвилі 200 нм, швидкість потоку – 1.0 мл/хв, розчинник – рухома фаза. Лінійність аналітичної методики вивчали в діапазоні 40-120 мкг/мл методом найменших квадратів та розраховували рівняння регресії ($y=12096x-45214$) з коефіцієнтом кореляції ($R^2=0.9998$). МВ становила 8.51 мкг/мл, МКВ – 25.80 мкг/мл. Найсучаснішими інструментами вивчення зеленості AGREE (бал 0.72), MoGAPI (бал 81), Complex MoGAPI (бал 81), AGSA (бал 73.61), CaFRI (бал 74) та CASI (бал 82) встановлено, що запропонована ВЕРХ методика є екологічно безпечною. Розроблено експресну, просту та зелену ВЕРХ методику визначення каптоприлу в таблетках з використанням солей хаотропних аніонів. Запропонована ВЕРХ методика дає змогу провести кількісне визначення каптоприлу в таблетках з отриманням симетричного піку, який не елююється близько мертвого об'єму. Окрім того, розроблена ВЕРХ методика може бути використана для аналізу супровідних домішок.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в наукових працях автора [134, 135, 136].

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне та експериментальне вирішення актуального наукового завдання, що полягає у застосуванні хаотропних солей у рідинній хроматографії як сучасного підходу для покращення ефективності фармацевтичного аналізу, зокрема шляхом підвищення утримування та селективності, отримання симетричних піків, спрощення хроматографічних умов, скорочення часу аналізу та створення експресних, точних, економічно ефективних і екологічно безпечних методик визначення АФІ і їх супровідних речовин.

1. Представлено позитивну роль хаотропних агентів (солей) у розробці швидких, простих та економічно ефективних методів обернено-фазової ВЕРХ. Включення сильних хаотропних солей до складу рухомої фази під час рідинно-хроматографічного визначення показало значне спрощення методики та скорочення часу аналізу. Розроблено методику ВЕРХ визначення феніраміну малеату та супровідних речовин з лікарської форми з використанням солей хаотропних аніонів. Отримані результати підтвердили високу придатність і ефективність використання цих солей у розробці аналітичних методів контролю лікарських засобів. Запропонований підхід дозволяє уникнути використання іон-парних реагентів, а також необхідності формування іонних пар і використання окремих колонок для іон-парної хроматографії. Запропонована методика є лінійною у діапазоні концентрацій 5–30 мкг/мл з $R^2 > 0.999$. Усі параметри валідації відповідали критеріям прийнятності щодо лінійності, правильності та прецизійності. Загальний ефект від застосування хаотропних агентів проявляється у забезпеченні «зеленого» аналізу із формуванням симетричних піків для запропонованих методів ВЕРХ. Економічна ефективність методу

підтверджується скороченням часу аналізу, зменшенням споживання органічних реагентів, подовженням терміну експлуатації обладнання та зниженням трудових витрат.

2. Роль двох найсильніших хаотропних агентів — гексафторофосфату калію та перхлорату натрію — була досліджена у різних і незалежних дослідницьких випадках. Розроблена ВЕРХ методика визначення цисплатину продемонструвала лінійність у діапазоні концентрацій 0.025–0.5 мкг/мл ($R^2 > 0.9997$) для цисплатину. Усі параметри валідації відповідали критеріям прийнятності щодо лінійності, правильності та прецизійності.
3. Запропоновано застосування солей хаотропних аніонів в складі рухомої фази на хроматографічній колонці C18 (Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм) як перспективний підхід для розробки ВЕРХ методик карбоплатину в лікарських засобах, що дасть змогу покращити утримування та форму піка. Важливою перевагою застосування солей хаотропних аніонів в складі рухомої фази є покращення симетрії піків та їх утримування, а також скорочення часу аналізу. Це можна досягнути використанням низьких кількостей АСН (5-10 %) та високих кількостей буферного розчину 40-50 мМ одного з найсильніших хаотропів за теорією Гофмейстера KPF_6 (рН 2.3-2.5) в складі рухомої фази на колонках C18 або C8. Лінійність вивчали в діапазоні 15-90 мкг/мл методом найменших квадратів та розраховували рівняння регресії ($y=10148x + 56213$) з коефіцієнтом кореляції ($R^2=0.9986$). Розроблено експресну, просту, відтворювану та «зелену» ВЕРХ методику визначення карбоплатину в лікарських засобах з використанням солей хаотропних аніонів. Запропонована ВЕРХ методика дає змогу провести хроматографування та кількісне визначення карбоплатину на C18 октадецилсилільній колонці та без застосовування іон-парних реагентів.

4. Розроблено методику ВЕРХ одночасного визначення надзвичайно полярних молекул цисплатину та карбоплатину, які не мають УФ-абсорбції, в модельній суміші з використанням солей хаотропних аніонів. Експериментально встановлені оптимальні хроматографічні умови: рухома фаза – 40 мМ буферний розчин KPF_6 (рН 2.4) та АСН (95:5), хроматографічна колонка – Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм), температура колонки – 30 °С, швидкість потоку – 0.4 мл/хв, довжина хвилі детектування – 210 нм. Лінійність оцінювали за допомогою п'яти рівнів кожного з досліджуваних препаратів, де концентрація варіювалася в діапазоні 20–100 мкг/мл. Запропонована ВЕРХ методика є екологічною, що підтверджено найсучаснішими метриками для вивчення екологічності (AGREE, MoGAPI, комплекс MoGAPI, AGSA, CaFRI та CACI). У цій роботі проведено ретельне наукове дослідження з представленням розробки методики ВЕРХ одночасного визначення надзвичайно полярних молекул цисплатину та карбоплатину в модельній суміші з використанням солей хаотропних аніонів. Крім того, два вивчені препарати були кількісно визначені за допомогою швидких, простих та економічно ефективних підходів до методик ВЕРХ.
5. Запропоновано використання солей хаотропних аніонів у складі рухомої фази на хроматографічній колонці C18 як перспективний підхід для отримання симетричного піку еналаприлу, який елююється не близько «мертвого» об'єму. Використання солей хаотропних аніонів у рухомій фазі під час ВЕРХ визначення еналаприлу дало змогу скоротити часу аналізу (проте не проводити його визначення близько «мертвого» об'єму) та покращити симетрію піка еналаприлу. В процесі проведених експериментальних досліджень встановлено оптимальні хроматографічні умови для проведення кількісного визначення еналаприлу в таблетках:

хроматографічна колонка Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм), рухома фаза – 2 % ACN та 98 % буферний розчин KPF_6 40 мМ рН 2.43, температура колонки - 30° С, детектування за довжини хвилі 210 нм. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 40-120 мкг/мл. Рівняння регресії $y=14166x - 9589.2$, коефіцієнт кореляції $R^2 = 0.9972$. МВ – 8.52 мкг/мл, МКВ – 25.80 мкг/мл. Сучасними інструментами вивчення зеленості AGREE (бал 0,74), MoGAPI (бал 81), Complex MoGAPI (бал 81), AGSA (бал 77,78), CaFRI (бал 82) та CACI (бал 79) підтверджено, що запропонована ВЕРХ методика є «зеленою». Розроблена ВЕРХ методика визначення еналаприлу в таблетках може застосовуватися як у рутинному фармацевтичному аналізі, так і при тестуванні незалежними лабораторіями.

6. Запропоновано застосування солей хаотропних аніонів в складі рухомої фази на колонці C18 як перспективний підхід до ефективної аналітичної розробки, що дасть змогу покращити утримування та форму піка каптоприлу. За умов рухомої фази ACN–вода, PF_6^- проявляє найбільше утримування і є найліофільнішим іоном у серії Гоффмейстера. PF_6^- має найвищий ступінь делокалізації заряду та найвищу поляризованість, що полегшує його дисперсійні (або ван-дер-ваальсові) взаємодії. В результаті проведених численних експериментальних досліджень встановлено оптимальні хроматографічні умови визначення каптоприлу в таблетках: хроматографічна колонці Zorbax SB-C18 (150 x 4.6 мм 3.5 мкм), рухома фаза - 30% ACN та 70 % буферний розчин рН 2.10 (0.25 % KPF_6 , 0.1 % HClO_4 , 0.1 % KH_2PO_4), температура колонки – 40° С, детектування за довжини хвилі 200 нм, швидкість потоку – 1.0 мл/хв, розчинник – рухома фаза. Лінійність аналітичної методики вивчали в діапазоні 40-120 мкг/мл методом найменших квадратів та розраховували рівняння регресії ($y=12096x-45214$) з коефіцієнтом

кореляції ($R^2=0.9998$). Сучасними інструментами вивчення зеленості AGREE (бал 0.72), MoGAPI (бал 81), Complex MoGAPI (бал 81), AGSA (бал 73.61), CaFRI (бал 74) та SAsI (бал 82) встановлено, що запропонована ВЕРХ методика є екологічно безпечною. Розроблена ВЕРХ методика дає змогу провести кількісне визначення каптоприлу в таблетках з отриманням симетричного піку, який не елюється близько мертвого об'єму. Окрім того, розроблена ВЕРХ методика може бути використана для аналізу супровідних речовин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. DrugBank. Pheniramine maleate. Available from: <https://go.drugbank.com/salts/DBSALT001440> (accessed on 11 June 2025).
2. British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia. London: TSO, 2025. Available from: <https://labmix24.com/en/pharmaceutical-reference-standards/british-pharmacopoeia>
3. European Pharmacopoeia, 11.5 edition. 2024. Available from: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph.-eur.-11th-edition> (accessed on 5 June 2025).
4. Державна фармакопея України: в 3 т. 2-е вид. Харків: Державне підприємство «Український науково-експертний фармакопейний центр якості лікарських засобів»; 2014. Т. 2. 724 с.
5. El-Gizawy SM., Ahmed A-El-HN, High-performance liquid chromatographic determination of mepyramine maleate, pheniramine maleate and phenylpropanolamine hydrochloride in tablets and drops. *Analyst*. 1987;112:867-9. doi: 10.1039/AN9871200867.
6. Caglar H., Buyuktuncel E. HPLC method development and validation: simultaneous determination of active ingredients in cough and cold pharmaceuticals. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2014;6(10):421-8.
7. Kelani KM, Hegazy MA, Tantawy MA. Determination of naphazoline HCl, pheniramine maleate and their official impurities in eye drops and biological fluid rabbit aqueous humor by a validated LC-DAD method. *RSC Adv*. 2021, 11(12):7051-8. doi: 10.1039/D0RA10598H.
8. Kelani KM, Hegazy MA, Hassan AM, Tantawy MA. A green TLC densitometric method for the simultaneous detection and quantification of naphazoline HCl, pheniramine maleate along with three official impurities. *BMC Chem*. 2022;16(1):24. doi: 10.1186/s13065-022-00819-9.

9. Makhdoom HS, Abid AI, Mujahid M, Afzal S, Sultana K, Hussain N, Barkat K. Assessment of pheniramine in alternative biological matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Med Pathol.* 2024;20(4):1291-302. doi: 10.1007/s12024-024-00795-7.
10. Louhaichi MR, Jebali S, Loueslati MH, Adhoum N, Monser L. Simultaneous determination of pseudoephedrine, pheniramine, guaifenesin, pyrilamine, chlorpheniramine and dextromethorphan in cough and cold medicines by high performance liquid chromatography. *Talanta.* 2009;78(3):991-7. doi: 10.1016/j.talanta.2009.01.019.
11. Deconinck E, Sacré PY, Baudewyns S, Courselle P, De Beer J. A fast ultra high pressure liquid chromatographic method for qualification and quantification of pharmaceutical combination preparations containing paracetamol, acetyl salicylic acid and/or antihistaminics. *J Pharm Biomed Anal.* 2011 Sep 10;56(2):200-9. doi: 10.1016/j.jpba.2011.05.013.
12. Eckhart CG, McCorkle T. Chlorpheniramine Maleate. In: Florey KF, editor. *Analytical Profiles of Drug Substances.* Academic Press; 1978. Volume 7. p. 43-80. doi: 10.1016/S0099-5428(08)60089-1.
13. DrugBank. Cisplatin. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00515> (accessed on 11 June 2025).
14. The United States Pharmacopeial Convention (USP). USP–NF 2025. Available from: <https://www.usp.org/about/usp-convention> (accessed on 5 June 2025).
15. Krull IS, Ding XD, Selavka C, Hochberg F. HPLC-Electrochemical Determination of CIS-Platinum Anti-Cancer Drugs. In: Reid E, Wilson ID, editors. *Drug Determination in Therapeutic and Forensic Contexts. Methodological Surveys in Biochemistry and Analysis*, 14. 1984th Edition. Springer; 1985. p. 139-144. doi: 10.1007/978-1-4613-2397-6_16.
16. Zhao Z, Tepperman K, Dorsey JG, Elder R. Determination of cisplatin and some possible metabolites by ion-pairing chromatography with inductively

- coupled plasma mass spectrometric detection. *Chromatogr.* 1993;615(1):83-9. doi: 10.1016/0378-4347(93)80293-D.
17. Kominkova M, Heger Z, Zitka O, Kynicky J, Pohanka M, Beklova M, et al. Flow injection analysis with electrochemical detection for rapid identification of platinum-based cytostatics and platinum chlorides in water. *Int J Environ Res Public Health*/ 2014;11(2):1715-24. doi: 10.3390/ijerph110201715.
 18. Hayat M, Sohail M, .Ashraf M. Spectrophotometric determination of cisplatin, carboplatin and oxaliplatin in pure and injectable dosage forms. *Biomed Res.* 2019;30(4):557-62.
 19. Basotra M, Singh S, Gulati M. Development and Validation of a Simple and Sensitive Spectrometric Method for Estimation of Cisplatin Hydrochloride in Tablet Dosage Forms: Application to Dissolution Studies. *Analytical Chemistry.* 2013;936254:1-8. doi: 10.1155/2013/936254.
 20. Hann S, Koellensperger G, Stefánka Zs, Fürhacker M, Buchberger W, Mader RM. Application of HPLC-ICP-MS to speciation of cisplatin and its degradation products in water containing different chloride concentrations and in human urine. *J Anal At Spectrom.* 2003;18:1391-5. doi: 10.1039/B309028K.
 21. Kaushik KH, Sripuram VK, Bedada S, Reddy NY, Priyadarshini GI, Devarakonda KR. A simple and sensitive validated HPLC method for quantitative determination of cisplatin in human plasma. *Clinical Research and Regulatory.* 2010;27(1):1-6. doi: 10.3109/10601330903490462.
 22. Ramos Yi, Hernández L, Fernandez A, Bataller M, Veliz E, Small R. Optimization of a HPLC procedure for simultaneous determination of cisplatin and the complex cis,cis,trans-diamminedichlorodihydroxoplatinum(IV) in aqueous solutions. *Quimica para un mundo melhor.* 2011;34(8):1450-4. doi: 10.1590/s0100-40422011000800026

23. Yaroshenko DV, Grigoriev AV, Sidorova AA. Determination of cisplatin in blood plasma by liquid chromatography with mass spectrometry detection. *J Anal Chem.* 2013;68(2):156-60. doi: 10.1134/S1061934813020160.
24. Toro-Córdova A, Ledezma-Gallegos F, Mondragon-Fuentes L, Jurado R, Medina LA, Pérez-Rojas JM, Garcia-Lopez P. Determination of Liposomal Cisplatin by High-Performance Liquid Chromatography and Its Application in Pharmacokinetic Studies. *J Chromatogr Sci.* 2016;54(6):1016-21. doi: 10.1093/chromsci/bmw039.
25. Arenas M, Martín J, Santos JL, Aparicio I, Fernández-Sanfrancisco O, Alonso E. Comparison of Different Techniques for the Determination of Platinized Cytostatic Drugs in Urine Samples. *Molecules.* 2022;27(23):8139. doi: 10.3390/molecules27238139.
26. Riley CM, Sternson LA, Repta AJ. High-performance liquid chromatography of cisplatin. *J Pharm Sci.* 1983;72(4):351-5. doi: 10.1002/jps.2600720408.
27. Zahednezhad F, Zakeri-Milani P, Shahbazi Mojarrad J, Valizadeh H. The latest advances of cisplatin liposomal formulations: essentials for preparation and analysis. *Expert Opin Drug Deliv.* 2020;17(4):523-541. doi: 10.1080/17425247.2020.1737672.
28. Schmedes AV, Harlev C, Bue M, Petersen EK, Bergmann ML, Petersen LK, Stilling M. Analysis of free cisplatin in microdialysates and plasma ultrafiltrate by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2024;1235:124040. doi: 10.1016/j.jchromb.2024.124040.
29. Jain AP, Ghose V, Munshi S, Bhat FA, Dey G, Nanjappa V. Mass spectrometry-based proteomic analysis to characterize cisplatin induced early signaling events in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cell Oncol.* 2024;11(1):2328873. doi: 10.1080/23723556.2024.2328873.

30. Narikimalli A, Galla R. Stability indicating RP-HPLC method development and validation for the simultaneous estimation of cisplatin and etoposide. *Journal of Xidian University*. 2024;18(4):632-48. doi: 10.5281/Zenodo.10981756
31. Zhang Z, Chen J, Wen T, Deng H, Zhang Y, Guo H, Chang H, Xu H, Zhang W. Quantification of Cisplatin Encapsulated in Nanomedicine: An Overview. *Biosensors (Basel)*. 2025;15(5):293. doi: 10.3390/bios15050293.
32. Bondu VK, Israel DS, Pradeep K, Sirisha V. Simultaneous Estimation Of Gemcitabine And Cisplatin Using RP-HPLC: Method Development And Validation. *Journal of Neonatal Surgery* 2025;14(8):58-62.
33. Kato R, Sato T, Kanamori M, Miyake M, Fujimoto A, Ogawa K, et al. A Novel Analytical Method of Cisplatin Using the HPLC with a Naphthylethyl Group Bonded with Silica Gel (π NAP) Column. *Biol Pharm Bull*. 2017;40(3):290-296. doi: 10.1248/bpb.b16-00760.
34. Jacobs AI, Njue AW, Swain GM. Detection of Cisplatin with Boron-Doped Diamond Thin-Film Electrodes Using Flow Injection Analysis and Ion Exclusion Chromatography with Amperometric Detection. *Electroanalysis*. 2025;37:e70007. doi: 10.1002/elan.70007.
35. DrugBank. Carboplatin. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00958> (accessed on 11 September 2025).
36. Mittal A, Chitkara D, Kumar N. HPLC method for the determination of carboplatin and paclitaxel with cremophorEL in an amphiphilic polymer matrix. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007;855(2):211-9. doi: 10.1016/j.jchromb.2007.05.005.
37. Rama Devi P, Rambabu K. Rapid determination of carboplatin and docetaxel using RP-HPLC with PDA detector. *International journal of*

- applied pharmaceuticals. 2022;14(2):186-92. doi: 10.22159/ijap.2022v14i2.43633.
38. Hafiz MA, Ghauri MA, Abbas N, Hussain T, Bukhari NI. Development of cervix-targeted hydrogel carrier for carboplatin-loaded nanosponges: In-vitro and ex-vivo evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2023;84:104472. doi: 10.1016/j.jddst.2023.104472.
 39. Hafiz AM, Abbas N, Bukhari NI. Quality by design approach for formulation development and evaluation of carboplatin loaded ethylcellulose nanosponges. *Int J Polymeric Mater Polymeric Biomater*. 2021;71(13):1012-24. doi: 10.1080/00914037.2021.1933978.
 40. DrugBank. Enalapril maleate. Available from: <https://go.drugbank.com/salts/DBSALT001036> (accessed on 29 September 2025).
 41. Manindra M, Zafar HS., Ankur K. Validation of Stability Indicating HPLC Method for the Determination of Enalapril Maleate in Tablet Formulations. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2011;3(5):180-3.
 42. Al-Momani F. Determination of hydrochlorothiazide and enalapril maleate in tablet formulations by reversed-phase. *Turk J Chem*. 2001;25(1):49-54.
 43. Vidyadhara S, Rao BV, Tejaswiand K, Rani AL. Analytical Method Development and Validation for Simultaneous Estimation of Enalapril Maleate and Hydrochlorothiazide by RP-HPLC. *Der Pharma Chemica*. 2014;6(1):217-23.
 44. Chaudhari BG. Development and Validation of Rp-Hplc Method for Simultaneous Stimation of Enalapril Maleate and Amlodipine Besylate in Combined Dosage form. *J App Pharm. Sci*. 2012;2(9):054-7. doi: 10.7324/JAPS.2012.2911
 45. Sultana N, Saeed A, Naveed S. Simultaneous determination of enalapril and statin's in pharmaceutical formulations by Rp-hplc. *Journal of the Chilean*

- Chemistry Society. 2011;56(3):734-7. doi: 10.4067/S0717-97072011000300003
46. Chaitanya Sai B, Satish Kumar V, Satish Babu K, Ravindra Babu SVD. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of enalapril and felodipine in pharmaceutical-dosage form. *Journal of Chemistry and Pharmaceutical Research*. 2012;4(2):1383-8.
 47. Tajerzadeh H, Hamidi M. A simple HPLC method for quantitation of enalaprilat. *J Pharm Biomed Anal*. 2001;24(4):675-80. doi: 10.1016/s0731-7085(00)00446-5.
 48. Uslu B, Ozden T. HPLC and UPLC methods for the simultaneous determination of enalapril and hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage forms. *Chromatographia*. 2013;76(21-22):1487-94. doi: 10.1007/s10337-013-2442-6.
 49. Piponski M, Balkanov T, Logoyda L. Development and validation of a fast and simple HPLC method for the simultaneous determination of bisoprolol and enalapril in dosage form. *Pharmacia*. 2021;68(1):69-77. doi: 10.3897/pharmacia.68.e50919.
 50. DrugBank. Captopril. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01197> (accessed on 10 October 2025).
 51. Jebaslinhepzybai B, Velmurugan C, Chenthilnathan A. Validation of the RP-HPLC method for analysis of captopril in pharmaceutical tablets. *Der Pharmacia Sinica*. 2016;7(4):1-6.
 52. Leanpolchareanchai J, Suksiriworapong J. Validation of analytical method for captopril extemporaneous preparations by high performance liquid chromatography. *MU J Pharm Sci*. 2015;42(2):85-92. doi: 10.14456/mujps.2015.11.
 53. Sultan N, Naveed S, Arayne MS. RP-HPLC Method for the simultaneous determination of captopril and H₂-receptor antagonist: Application to

- interaction studies. *Med Chem.* 2013;3:183-7. doi: 10.4172/2161-0444.1000136.
54. Papanov S, Hadjieva B, Koleva N. Rapid RP-HPLC method for estimation of captopril from tablet dosage form. *IJBPAS.* 2014;3(3):317-25.
 55. Sultana N, Arayne MS, Naveed S. Simultaneous quantitation of captopril and NSAID's in API, dosage formulations and human serum by RP-HPLC. *J Chin Chem Soc.* 2010;57(1):62-7. doi: 10.1002/jccs.201000010.
 56. Kazakevich YV, Lobrutto R. *HPLC for Pharmaceutical Scientists.* John Wiley & Sons, Hoboken; 2007. 30 p. doi: 10.1002/0470087951
 57. Snyder RL, Kirckland J, Dolan WJ. *Introduction to Modern Liquid Chromatography.* 3rd ed. John Willey & Sons; 2009. 960 c.
 58. Ahuja S, Dong MW. *Handbooh of pharmaceutical analysis by HPLC.* Amsterdam: Elsevier scince; 2005. 679 p.
 59. Sadek PC. *The HPLC Solvent Guide.* Second ed. New York: Wiley & Sons; 2002. 664 p.
 60. Hibbert DB. Experimental design in chromatography: a tutorial review. *J Chromatogr B.* 2012;910:2-13. doi: 10.1016/j.jchromb.2012.01.020.
 61. Ahuja S. High Pressure Liquid Chromatography. In: Ahuja S, Jespersen N, eds. *Comprehensive Analytical Chemistry.* Elsevier; 2006. Chapter 15. p. 486-559.
 62. 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. doi: 10.22159/ajpcr.2020.v13i7.37336.
 63. 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.

64. Basharat R, Kotra V, Loong LY, Mathews A, Kanakal MM, Praveena Devi CHB, et al. Ultra Performance Liquid Chromatography (Mini-Review). *Oriental journal of chemistry*. 2021;37(4):847-57. doi: 10.13005/ojc/370411.
65. Patil AS. A Review On Ultra Performance Liquid Chromatography. *Asian Journal of Pharmaceutical Technology and Innovation*. 2015;3(10):86-96.
66. Bhattacharya K, Chanu NR, Bhattacharjee A, Sahariah BJ, Devi CM, Bordoloi R. Ultra-Performance Liquid Chromatography – An Updated Review. *Research Journal of Pharmacy and Technology* 2022;15(12):5849-3. doi: 10.52711/0974-360X.2022.00987.
67. 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.
68. Kumar A, Saini G, Nair A, Sharma R. UPLC: A preeminent technique in pharmaceutical analysis. *Acta Pol Pharm*. 2012;69(3):371-81.
69. Gorja A, Medala P, Madhavi M, Goud GM. A Review On Ultra Performance Liquid Chromatography. *Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences*. 2025;11(4):279-86. doi: 10.36348/sjmps.2025.v11i04.007.
70. Novakova L, Matysova L, Solich P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*. 2006;8(3):908-18. doi: 10.1016/j.talanta.2005.06.035.
71. Chawla G, Ranjan C. Principle, Instrumentation, and Applications of UPLC: A Novel Technique of Liquid Chromatography. *Open Chemistry Journal*. 2016;3:1-16. doi: 10.2174/1874842201603010001.
72. 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.

73. 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. doi: 10.5958/0974-360X.2020.00284.X.
74. Patond UR, Kale SC, Gawai A, Biyani KR. A Review on Analytical Method Development and Validation by High Performance Liquid Chromatography Technique. *International Journal of Advanced Research in Science, Communication and Technology (IJARSCT)*. 2022;2(2):545-57. doi: 10.48175/IJARSCT-5602.
75. Gumułka P, Zandarek J, Dąbrowska M, Starek M. UPLC Technique in Pharmacy – An Important Tool of the Modern Analyst. *Processes*. 2022;10(12):2498. doi: 10.3390/pr10122498.
76. 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. doi: 10.1002/bmc.5482.
77. 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. doi: 10.1016/B978-0-12-803684-6.00013-5.
78. Salis A, Ninham BW. Models and mechanisms of Hofmeister effects in electrolyte solutions, and colloid and protein systems revisited. *Chem Soc Rev*. 2014;43(21):7358-77.
79. Hyde AM, Zultanski SL, Waldman JH, Zhong Y-L, Shevlin M, Peng F. General Principles and Strategies for Salting-Out Informed by the Hofmeister Series. *Organic Process Research & Development*. 2017;21(9):1355-70. doi: 10.1021/acs.oprd.7b00197.
80. Zhao H, Campbell SM, Jackson L, Song Z, Olubajo O. Hofmeister series of ionic liquids: kosmotropic effect of ionic liquids on the enzymatic hydrolysis of enantiomeric phenylalanine methyl ester. *Tetrahedron: Asymmetry*. 2006;17(3):377-83. doi: 10.1016/j.tetasy.2006.01.015.

81. Yuan Q, Chen J, Xu Y, Zhang Y-B, He T. Hofmeister effect of anions on the layer-by-layer nanofiltration membranes: Assembly kinetics and micropollutant removal. *Water Research*. 2025;287(Part A):124340. doi: 10.1016/j.watres.2025.124340.
82. Moelbert S, Normand B, De Los Rios P. Kosmotropes and chaotropes: modelling preferential exclusion, binding and aggregate stability. *Biophysical Chemistry*. 2004;112(1):45-57. doi: 10.1016/j.bpc.2004.06.012.
83. Moelbert S, De Los Rios P. Chaotropic effect and preferential binding in a hydrophobic interaction model. *J Chem Phys*. 2003;119:7988-8001. doi: 10.1063/1.1609982.
84. Suh JH, Jung J, Kim B, Cho HD, Kim J, Eom T, Park M, Wang Y, Han SB. Development of aqueous mobile phase using chaotrope for the chromatographic determination of melamine in infant formula. *J Chromatogr A*. 2017;1496:174-179. doi: 10.1016/j.chroma.2017.03.045.
85. Moldoveanu S, David V. Chapter 10 – Other HPLC separations performed on hydrophobic stationary phases. In: Moldoveanu S, David V, Editors. *Essentials in Modern HPLC Separations (Second Edition)*. Elsevier; 2022. p. 421-446.
86. Cecchi T, Passamonti P. Retention mechanism for ion-pair chromatography with chaotropic reagents. *J Chromatogr A*. 2009;1216(10):1789-97. doi: 10.1016/j.chroma.2008.10.031.
87. Cecchi T, Pucciarelli F, Passamonti P. Extended thermodynamic approach to ion interaction chromatography. *Anal Chem*. 2001;73(11):2632-9. doi: 10.1021/ac001341y.
88. Cecchi T, Pucciarelli F, Passamonti P. Ion-interaction chromatography of neutral molecules. *Chromatographia*. 2001;53:27-34. doi: 10.1007/BF02492423.

89. Cecchi T, Passamonti P. Erratum to “Retention mechanism for ion-pair chromatography with chaotropic reagents” [*J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1789–1797]. *J Chromatogr A*. 2009;1216(26):5164. doi: 10.1016/j.chroma.2009.04.088.
90. Čolović J, Kalinić M, Vemić A, Erić S, Malenović A. Investigation into the phenomena affecting the retention behavior of basic analytes in chaotropic chromatography: Joint effects of the most relevant chromatographic factors and analytes’ molecular properties. *J Chromatogr A*. 2015;1425:150-7. doi: 10.1016/j.chroma.2015.11.027.
91. Pan L, LoBrutto PR, Kazakevich YV, Thompson R. Influence of inorganic mobile phase additives on the retention, efficiency and peak symmetry of protonated basic compounds in reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2004;1049(1-2):63-73.
92. LoBrutto R, Jones A, Kazakevich YV. Effect of counter-anion concentration on retention in high-performance liquid chromatography of protonated basic analytes. *J Chromatogr A*. 2001;913(1-2):189-96. doi: 10.1016/S0021-9673(00)01031-1.
93. LoBrutto R, Jones A, Kazakevich YV, McNair HM. Effect of the eluent pH and acidic modifiers in high-performance liquid chromatography retention of basic analytes. *J Chromatogr A*. 2001;913(1-2):173-87. doi: 10.1016/S0021-9673(00)01012-8.
94. Kazakevich IL, Snow NH. Adsorption behavior of hexafluorophosphate on selected bonded phases. *J Chromatogr A*. 2006;1119(1-2):43-50. doi: 10.1016/j.chroma.2006.02.094.
95. Vemić A, Jančić Stojanović B, Stamenković I, Malenović A. Chaotropic agents in liquid chromatographic method development for the simultaneous analysis of levodopa, carbidopa, entacapone and their impurities. *J Pharm Biomed Anal*. 2013;77:9-15. doi: 10.1016/j.jpba.2013.01.007.

96. Vemić A, Rakić T, Malenović A, Medenica M. Chaotropic salts in liquid chromatographic method development for the determination of pramipexole and its impurities following quality-by-design principles. *J Pharm Biomed Anal.* 2015;102:314-20. doi: 10.1016/j.jpba.2014.09.031.
97. Flieger J. Effect of mobile phase composition on the retention of selected alkaloids in reversed-phase liquid chromatography with chaotropic salts. *J Chromatogr A.* 2007;1175(2):207-16. doi: 10.1016/j.chroma.2007.10.036.
98. Knox JH, Hartwick RA. Mechanism of ion-pair liquid chromatography of amines, neutrals, zwitterions and acids using anion hetaerons. *J Chromatogr.* 1981;204:3-21. doi: 10.1016/S0021-9673(00)81633-7.
99. Vemić A, Malenović A, Medenica M. The influence of inorganic salts with chaotropic properties on the chromatographic behavior of ropinirole and its two impurities. *Talanta.* 2014;123:122-7. doi: 10.1016/j.talanta.2014.02.006.
100. Vemić A, Kalinić M, Erić S, Malenović A, Medenica M. The influence of salt chaotropicity, column hydrophobicity and analytes' molecular properties on the retention of pramipexole and its impurities. *J Chromatogr A.* 2015 Mar 20;1386:39-46. doi: 10.1016/j.chroma.2015.01.078.
101. Flieger J, Swieboda R. Application of chaotropic effect in reversed-phase liquid chromatography of structurally related phenothiazine and thioxanthene derivatives. *J Chromatogr A.* 2008;1192(2):218-24. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.02.117>
102. Flieger J. Application of perfluorinated acids as ion-pair reagents for reversed phase chromatography and retention-hydrophobicity relationship studies of selected β -blockers. *J Chromatogr A.* 2010;1217(4):540-9. doi: 10.1016/j.chroma.2009.11.083.
103. Casimiro A, Weijers C, Scheepers D, Borneman Z, Nijmeijer K. Kosmotropes and chaotropes: Specific ion effects to tailor layer-by-layer

- membrane characteristics and performances. *Journal of Membrane Science*. 2023;672:121446. doi: 10.1016/j.memsci.2023.121446.
104. Moldoveanu SC, David V. Retention and elution processes in high-performance liquid chromatography. In: Moldoveanu SC, David V, editors. *Method Development in Analytical HPLC*. Elsevier; 2025. p. 59-94. doi: 10.1016/B978-0-443-29849-3.00004-X.
 105. Djajić N, Krmar J, Rmandić M, Rašević M, Otašević B, Zečević M, et al. Modified aqueous mobile phases: A way to improve retention behavior of active pharmaceutical compounds and their impurities in liquid chromatography. *Journal of Chromatography Open*. 2022;2:100023. doi: 10.1016/j.jcoa.2021.100023.
 106. Zhong JJ, Liao N, He M, Pu Y, Liu D. Development of an analytical method for urocanic acid isomers in fish based on reactive extraction cleanup and chaotropic chromatography techniques. *J Chromatogr A*. 2018;1548:44–50. doi: 10.1016/j.chroma.2018.03.023.
 107. Haidar Ahmad IA, R. Bennett, D. Makey, V. Shchurik, H. Lhotka, B.F. Mann, et al. In silico method development for the reversed-phase liquid chromatography separation of proteins using chaotropic mobile phase modifiers. *J Chromatogr B*. 2021;1173:122587. doi: 10.1016/j.jchromb.2021.122587.
 108. Rmandić M, Malenović A. Chaotropic chromatography method development for the determination of aripiprazole and its impurities following analytical quality by design principles. *J Sep Sci*. 2020;43:3242-50. doi: 10.1002/jssc. 201900985.
 109. Čolović J, Rmandić M, Malenović A. Characterization of bonded stationary phase performance as a function of qualitative and quantitative chromatographic factors in chaotropic chromatography with risperidone and its impurities as model substances. *Anal Bioanal Chem*. 2018;410:4855-66. doi: 10.1007/ s00216-018-1122-7.

110. Liu J, Makarov AA, Bennett R, Haidar Ahmad IA, Dasilva J, Reibarkh M, et al. Chaotropic effects in sub/supercritical fluid chromatography via ammonium hydroxide in water-rich modifiers: enabling separation of peptides and highly polar pharmaceuticals at the preparative scale. *Anal Chem*. 2019;91:13907-15. doi: 10.1021/acs.analchem.9b03408.
111. Ahmad IAH, Chen W, Halsey HM, Klapars A, Limanto J, Pirrone GF, et al. Multi-column ultra-high performance liquid chromatography screening with chaotropic agents and computer-assisted separation modeling enables process development of new drug substances. *Analyst*. 2019;144:2872-80. doi: 10.1039/C8AN02499E.
112. Milošević N, Vemić A, Čolović J, Kostić N, Malenović A. Design of experiments— design space approach for development of chaotropic chromatography method for determination of trimetazidine dihydrochloride and two impurities. *Chromatographia*. 2017;80:585-92. doi: 10.1007/s10337-017-3275-5.
113. Čolović J, Rmandić M, Malenović A. Robust optimization of chaotropic chromatography assay for lamotrigine and its two impurities in tablets. *Chromatographia*. 2019;82:565-77. doi: 10.1007/s10337-018-3661-7.
114. Pantović J, Malenović A, Vemić A, Kostić N, Medenica M. Development of liquid chromatographic method for the analysis of dabigatran etexilate mesilate and its ten impurities supported by quality-by-design methodology. *J Pharm Biomed Anal*. 2015;111:7-13. doi: 10.1016/j.jpba.2015.03.009.
115. Čolović J, Vemić A, Kostić N, Malenović A, Medenica M. Testing the capability of a polynomial-modified gaussian model in the description and simulation of chromatographic peaks of amlodipine and its impurity in ion-interaction chromatography. *J Sep Sci*. 2014;37:1797-804. doi: 10.1002/jssc.201400206.

116. Ramezani AM, Yousefinejad S, Nazifi M, Absalan G. Response surface approach for isocratic separation of some natural anthraquinone dyes by micellar liquid chromatography. *J Mol Liq.* 2017;242:1058-65. doi: 10.1016/j.molliq.2017.07.090.
117. Jimenez O, Marina M. Retention modeling in micellar liquid chromatography, *J Chromatogr A.* 1997;780:149-63. doi: 10.1016/S0021-9673(97) 00262-8.
118. Jafari SA, Entezari MH. Salting out in ACN/water systems: Hofmeister effects and partition of quercetin. *Journal of Molecular Liquids.* 2020;312:113331. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113331>.
119. Horyn M, Piponski M, Zarembo T, Kucher T, Krstevska Balkanov S, Bakovska Stoimenova T, Korobko D, Potikha N, Kryskiw L, Logoyda L. Application of salts of chaotropic anions in the development of HPLC methods for the determination of meldonium in dosage forms. *ScienceRise: Pharmaceutical Science.* 2023;1(41):14-22. doi.org/10.15587/2519-4852.2023.274469.
120. Shulyak N, Piponski M, Kovalenko S, Bakovska Stoimenova T, Drapak I, Piponska M, Rezk MR, Abbeyquaye AD, Oleshchuk O, Logoyda L. Chaotropic salts impact in HPLC approaches for simultaneous analysis of hydrophilic and lipophilic drugs. *J Sep Sci.* 2021;44(15):2908-16. doi: 10.1002/jssc.202100168.
121. ICH Harmonised Guideline. Validation of Analytical Procedures Q2(R2). Final Version. Geneva; 2023. Available from: https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2%28R2%29_Guideline_2023_1130.pdf. (accessed on 8 October 2025).
122. Piponski M, Druchok M, Horyn M, Zarivna N, Despodov I, Beneta A, Stojanovski K, Shulyak N, Dmytriv M, Logoyda L. Impact of chaotropic salts on separation simplification on liquid chromatographic determination of cisplatin, pheniramine and their related compound. *BMC*

- Chemistry*. 2026; 20: 59 Available from: <https://doi.org/10.1186/s13065-026-01755-8>.
123. Druchok M, Piponski M, Logoyda L. Chaotrops role benefits in development and improvement of simple HPLC methods: two isolated studies in the determination of two distinct drugs and dosage forms of pheniramine maleate and cisplatin with their related compounds. В: Матеріали LXVIII підсумкової науково-практичної конференції Здобутки клінічної та експериментальної медицини; 2025 черв. 12-13; Тернопіль. Тернопіль: ТНМУ; 2025. с. 291.
 124. Pena-Pereira F, Wojnowski W, Tobiszewski, M. AGREE–Analytical GREEnness metric approach and software. *Analytical chemistry*. 2020;92(14):10076-82. doi: 10.1021/acs.analchem.0c01887.
 125. Mansour FR, Płotka-Wasyłka J, Locatelli M. Modified GAPI (MoGAPI) tool and software for the assessment of method greenness: case studies and applications. *Analytica*. 2024;5(3):451-7. doi: 10.3390/analytica5030030.
 126. Mansour FR, Omer KM, Płotka-Wasyłka J. A total scoring system and software for complex modified GAPI (ComplexMoGAPI) application in the assessment of method greenness. *Green Analytical Chemistry*. 2024;10:100126. doi: 10.1016/j.greeac.2024.100126.
 127. Mansour FR, Bedair A, Belal F, Magdy G, Locatelli M. Analytical Green Star Area (AGSA) as a new tool to assess greenness of analytical methods. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2025;46:102051. doi: 10.1016/j.scp.2025.102051.
 128. Mansour FR, Nowak PM. Introducing the carbon footprint reduction index (CaFRI) as a software-supported tool for greener laboratories in chemical analysis. *BMC chemistry*. 2025;19(1):121. doi: 10.1186/s13065-025-01486-2.

129. Mansour FR, Bedair A, Locatelli M. Click analytical chemistry index as a novel concept and framework, supported with open source software to assess analytical methods. *Advances in Sample Preparation*. 2025;14:100164. doi: 10.1016/j.sampre.2025.100164.
130. Дручок МІ, Логойда ЛС. Розробка ВЕРХ-методики визначення карбоплатину в лікарських засобах із використанням солей хаотропних аніонів. *Медична та клінічна хімія*. 2025;27(3):57-67. doi: 10.11603/mcch.2410-681X.2025.i3.15694.
131. Дручок М. Розробка ВЕРХ методики визначення карбоплатину в лікарських засобах з використанням солей хаотропних аніонів. В: *Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю Досягнення та перспективи розвитку медицини та фармації. Погляд молодих вчених; 2025 листоп. 5-6; Чернівці. Чернівці; 2025. с. 80.*
132. Druchok M, Piponski M, Horyn M, Zarivna N, Logoyda L. The usage of salts of chaotropic anions for the development of HPLC method for the simultaneous determination of cisplatin and carboplatin in model mixture. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2025;5(57):29-36. doi: 10.15587/2519-4852.2025.341476
133. Дручок М, Логойда Л. Використання солей хаотропних аніонів для розробки ВЕРХ методики одночасного визначення цисплатини та карбоплатини в модельній суміші. В: *Матеріали XV Всеукраїнської конференції молодих вчених, студентів та аспірантів з актуальних питань хімії; 2025 жовт. 7-10; Харків. Харків; 2025. с. 35.*
134. Дручок МІ, Логойда ЛС. Розробка ВЕРХ-методики визначення еналаприлу в таблетках з використанням солей хаотропних аніонів. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2025;18(3):244-252. doi: 10.14739/2409-2932.2025.3.340923.

135. Дручок М, Логойда Л. Розробка ВЕРХ методики визначення еналаприлу в таблетках з використанням солей хаотропних аніонів. В: Матеріали Міжнародної internet-конференції Modern chemistry of medicines; 2025 листоп. 7; Харків. Харків; 2025. с. 111.
136. Дручок МІ, Логойда ЛС. Розробка методики високоефективної рідинної хроматографії для визначення каптоприлу в таблетках з використанням солей хаотропних аніонів. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2026;(4):56-66. doi: 10.11603/1811-2471.2025.v.i4.15776.

ДОДАТОК А

Список публікацій здобувача:

1. Druchok M, Piponski M, Horyn M, Zarivna N, Logoyda L. The usage of salts of chaotropic anions for the development of HPLC method for the simultaneous determination of cisplatin and carboplatin in model mixture. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2025;5(57):29-36. doi: 10.15587/2519-4852.2025.341476. **(SCOPUS, Q3)**
2. Дручок МІ, Логойда ЛС. Розробка ВЕРХ-методики визначення карбоплатину в лікарських засобах із використанням солей хаотропних аніонів. *Медична та клінічна хімія*. 2025;27(3):57-67. doi: 10.11603/mcch.2410-681X.2025.i3.15694
3. Дручок МІ, Логойда ЛС. Розробка ВЕРХ-методики визначення еналаприлу в таблетках з використанням солей хаотропних аніонів. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2025;18(3):244-252. doi: 10.14739/2409-2932.2025.3.340923.
4. Piponski M, Druchok M, Horyn M, Zarivna N, Despodov I, Beneta A, Stojanovski K, Shulyak N, Dmytriv M, Logoyda L. Impact of chaotropic salts on separation simplification on liquid chromatographic determination of cisplatin, pheniramine and their related compound. *BMC Chemistry*. 2026; 20: 59. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13065-026-01755-8>. **(SCOPUS, Q2)**
5. Дручок МІ, Логойда ЛС. Розробка методики високоефективної рідинної хроматографії для визначення каптоприлу в таблетках з використанням солей хаотропних аніонів. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2026;(4):56-66. doi: 10.11603/1811-2471.2025.v.i4.15776.
6. Druchok M, Piponski M, Logoyda L. Chaotropes role benefits in development and improvement of simple HPLC methods: two isolated studies in the determination of two distinct drugs and dosage forms of pheniramine maleate

- and cisplatin with their related compounds. В: Матеріали LXVIII підсумкової науково-практичної конференції Здобутки клінічної та експериментальної медицини; 2025 черв. 12-13; Тернопіль. Тернопіль: ТНМУ; 2025. с. 291.
7. Дручок М, Логойда Л. Використання солей хаотропних аніонів для розробки ВЕРХ методики одночасного визначення цисплатини та карбоплатини в модельній суміші. В: Матеріали XV Всеукраїнської конференції молодих вчених, студентів та аспірантів з актуальних питань хімії; 2025 жовт. 7-10; Харків. Харків; 2025. с. 35.
 8. Дручок М, Логойда Л. Розробка ВЕРХ методики визначення еналаприлу в таблетках з використанням солей хаотропних аніонів. В: Матеріали Міжнародної internet-конференції Modern chemistry of medicines; 2025 листоп. 7; Харків. Харків; 2025. с. 111.
 9. Дручок М. Розробка ВЕРХ методики визначення карбоплатину в лікарських засобах з використанням солей хаотропних аніонів. В: Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю Досягнення та перспективи розвитку медицини та фармації. Погляд молодих вчених; 2025 листоп. 5-6; Чернівці. Чернівці; 2025. с. 80.

ДОДАТОК Б

Відомості про апробацію результатів дисертації:

- LXVIII підсумкова науково-практична конференція «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (м. Тернопіль, 12-13 червня 2025 року) – *публікація та постерна доповідь*;
- XV Всеукраїнська конференція молодих вчених, студентів та аспірантів з актуальних питань хімії, на базі НТК «Інститут монокристалів» НАН України (м. Харків, 7-10 жовтня 2025 року) – *публікація та доповідь*;
- Міжнародна internet-конференція «Modern chemistry of medicines» (м. Харків, 7 листопада 2025 року) – *публікація та доповідь*;
- Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Досягнення та перспективи розвитку медицини та фармації. Погляд молодих вчених» (м. Чернівці, 5-6 листопада 2025 року) – *публікація*.

ДОДАТОК В



ЗАТВЕРДЖУЮ
 Начальник Державної служби з лікарських
 засобів та контролю за наркотиками
 у Тернопільській області
 Тарас ПРОНІВ
 «03» Березня 2026 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Хроматографічні методики визначення цисплатину та карбоплатину, інгібіторів АПФ (каптоприлу та еналаприлу), феніраміну малеату в лікарських засобах.
2. **Установа, автори:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, 46001, м. Тернопіль, Майдан Волі, 1, кафедра фармацевтичної хімії, Дручок М.І., проф. Логойда Л. С.
3. **Джерела інформації:**
 1. Дручок М., Piponski M., Horyn M., Zarivna N., Logoyda L. The usage of salts of chaotropic anions for the development of HPLC method for the simultaneous determination of cisplatin and carboplatin in model mixture // *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. – 2025. – Vol. 5 (57). – P. 29–36 (SCOPUS, Q3).
 2. Piponski, M., Дручок, М., Horyn, M. *et al.* Impact of chaotropic salts on separation simplification on liquid chromatographic determination of cisplatin, pheniramine and their related compound. *BMC Chemistry* (2026). <https://doi.org/10.1186/s13065-026-01755-8> (SCOPUS, Q2).
 3. Дручок, М. І., Логойда, Л. С. Розробка методики високоефективної рідинної хроматографії для визначення каптоприлу в таблетках з використанням солей хаотропних аніонів // *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. – 2026. – № 4. – С. 56–66.
 4. Дручок М., Логойда Л. Оптимізація ВЕРХ методики визначення карбоплатину в лікарських засобах з використанням солей хаотропних аніонів // *Медична та клінічна хімія*. – 2025. – Т. 27, № 3. – С. 57-67.
 5. Дручок М., Логойда Л. Розробка ВЕРХ-методики визначення еналаприлу в таблетках з використанням солей хаотропних аніонів // *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. – 2025. – Т. 18, №3 (49). – С. 244-252.
4. **Ефективність впровадження:** запропоновані хроматографічні методики визначення цисплатину та карбоплатину, інгібіторів АПФ (каптоприлу та еналаприлу), феніраміну малеату характеризуються простотою у виконанні, експресністю, зеленістю.
5. **Пропозиції:** розроблені методики можуть бути використані при здійсненні контролю якості лікарських засобів.

Відповідальний за впровадження: провідний фахівець,
 в.о. завідувача лабораторії з контролю якості лікарських
 засобів та медичної продукції Державної служби з
 лікарських засобів та контролю за наркотиками
 у Тернопільській області

«03» Березня 2026 р.

Марія СТЕЦЮК