

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

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ГОРИН Мар'яна Миронівна

УДК 615.07:615.225:615.45:611.018.54]-092.4(043.3)

ДИСЕРТАЦІЯ

**РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК АНАЛІЗУ МЕЛЬДОНІЮ І
МЕТОПРОЛОЛУ В ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ ТА ПЛАЗМІ КРОВІ**

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. М. Горин

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

Тернопіль – 2023

АНОТАЦІЯ

Горин М. М. Розробка та валідація методик аналізу мельдонію і метопрололу в лікарських засобах та плазмі крові. – 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 МОЗ України, 2023.

Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, 2023.

У дисертаційній роботі наведено експериментальне дослідження розробки аналітичних та біоаналітичних методик визначення метопрололу та мельдонію в субстанції, лікарських засобах та плазмі крові.

Метою роботи була розробка експресних, простих у виконанні, доступних та валідованих спектрофотометричних і хроматографічних методик визначення метопрололу та мельдонію в субстанції, лікарських засобах та плазмі крові.

Розроблено та валідовано УФ-спектрофотометричну методику визначення метопрололу тартрату в субстанції та монокомпонентних лікарських засобах. Обмеженнями щодо застосування запропонованої УФ-спектрофотометричної методики є визначення метопрололу в комбінованих лікарських формах за умови, що інший АФІ буде поглинати в діапазоні 220-230 нм.

Розроблено та валідовано спектрофотометричні методики кількісного визначення метопрололу тартрату в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромкрезоловим зеленим (БКЗ), бромфеноловим синім (БФС), бромтимоловим синім (БТС); експериментально обґрунтовано оптимальні умови утворення продуктів взаємодії метопрололу тартрату з БКЗ, БФС, БТС – вибір концентрації реагента (1.6×10^{-4} М розчину БКЗ, 2.0×10^{-4} М розчину БФС, 1.6×10^{-4} М розчину БТС), органічного розчинника (БКЗ, БФС – метанол, БТС – ацетонітрил), аналітичної довжини хвилі (БКЗ – 624 нм, БФС – 595 нм, БТС – 402 нм);

встановлено коефіцієнти стехіометричних співвідношень «метопрололу тартрату–БКЗ/БФС/БТС» (1:1) та показники чутливості реакції. Запропоновані спектрофотометричні методики визначення метопрололу показали відмінний результат «зеленості» методами аналітичної еко-шкали, AGREE, GAPI, оскільки при розробці методик не використовувалися токсичні розчинники та мінімізувалася пробопідготовка.

Розроблено та валідовано спектрофотометричну методику кількісного визначення мельдонію в субстанції та лікарських засобах за реакцією з алізарином; встановлено оптимальні умови проведення кількісного визначення (концентрація розчину алізарину – 0.8 %, об'єм 0.8 % розчину алізарину – 0.5 мл, аналітична довжина хвилі – 517 нм, час нагрівання – 20 хв, температура – (95 ± 2) °C), стехіометричні співвідношення реагуючих компонентів «мельдоній-алізарин» (1:1) та показники чутливості реакції. Запропонована спектрофотометрична методика визначення мельдонію в субстанції та лікарських засобах за реакцією з алізарином не є достатньо «зеленою», тому актуальною залишається розробка ВЕРХ методики визначення мельдонію в субстанції та лікарських засобах. Проте, незважаючи на описаний факт, дана методика може застосовуватися для проведення арбітражного контролю.

На початку концептуалізації розробки ВЕРХ методики визначення мельдонію в субстанції та лікарських формах опрацьовано основні проблеми, які планувалося вирішити. Мельдоній – непростий аналіт для аналізу через низьку молекулярну масу та високу полярність. Розуміючи описані вище факти, ми розпочали дослідження з першого підходу, який передбачав використання короткої хроматографічної колонки Agilent Zorbax C-18 SB (4.6 мм i.d. X 150 мм, 3.5 мкм) та рухомої фази, що складається з 0.25 % KPF₆ – 0.1 % 85 % H₃PO₄ 95 % – 5 % ACN. Використання солей хаотропних аніонів у рухомій фазі показало певні переваги в розробці ВЕРХ методик, такі як збільшення утримування N-вмісних молекул у колонці, особливо в кислому рН-середовищі, та покращення симетрії піків. Профіль елюювання цієї колонки та рухомої фази показали відмінне утримування. Для вибору оптимальної довжини хвилі апробовано

чотири різні довжини хвилі (190 нм, 195 нм, 200 нм, 205 нм). Аналізуючи вищеописані факти щодо першого підходу, можна зробити висновок про придатність запропонованої хроматографічної колонки Agilent Zorbax C-18 SB (150 мм x 4.6 мм, 3.5 мкм) та рухомої фази з використанням однієї солі хаотропного аніону (KPF_6) для розробки експрес ВЕРХ-методики визначення мельдонію в субстанції та лікарських формах. Враховуючи позитивні результати, отримані в першому підході, ми продовжили пошуки щодо можливості використання інших солей хаотропних аніонів у рухомій фазі. Ми перейшли до другого підходу, який передбачав використання тієї ж колонки, що й у першій концепції Agilent Zorbax C-18 SB (150 мм x 4.6 мм, 3.5 мкм) і рухомої фази, що складається з 0.3 % біс-(трифторметан)сульфоніміду літію 97 % – 0.1 % 85 % H_3PO_4 80 % – 20 % ACN. Використання солі хаотропного аніону (біс-(трифторметан)сульфонімід літію) подовжило час утримування мельдонію до 4.4 хв і дозволило отримати відмінну хроматограму із задовільними параметрами хроматографічної системи. Параметри хроматографічної системи підтверджують висновки та результати цього дослідження щодо впливу хаотропних солей на N-вмісну молекулу шляхом збільшення їх утримування та покращення форми піку та однорідності навіть на колонці без дезактивації основи. Тому описаний другий підхід також може бути використаний для розробки ВЕРХ методики визначення мельдонію в субстанції та лікарських засобах. Всі запропоновані підходи є «зеленими» та експресними, проте, враховуючи отримані значення МВ та МКВ, ми пропонуємо застосовувати перший підхід (1 варіація) з рухомою фазою, що складалася з 0.25 % калію гексафторофосфату (V), 0.1 % 85 % H_3PO_4 95 %, 5 % ACN, та довжину хвилі детектування 190 нм.

На початку розробки ВЕРХ методики одночасного кількісного визначення метопрололу та мельдонію виникли основні проблеми, які полягали в різниці у хімічній структурі та фізико-хімічних властивостях метопрололу та мельдонію. Хроматографічні колонки, які використовувалися в даному дослідженні, – LiChrospher 100 CN двох розмірів (4 мм × 250 мм, 5 мкм) та (4 мм × 125 мм, 5

мкм), Waters Spherisorb CNRP (4.6 мм × 250 мм, 5 мкм), ZORBAX StableBond CN (4.6 мм × 250 мм, 5 мкм) (Merck Darmstadt, Німеччина та Agilent Technologies, США). Основним акцентом у нашому експерименті, окрім вибору хроматографічної колонки, було варіювання та вибір найкращих комбінацій компонентів рухомої фази та підходів: ACN з $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, ACN з TFA. Рекомендована довжина хвилі для забезпечення чутливості вибиралася в діапазоні УФ 190–205 нм, залежно від концепції рухомої фази, але у випадку використання підходу з TFA рекомендований діапазон для максимальної чутливості повинен бути вище 196 нм завдяки вищому граничному значенню УФ-поглинання TFA порівняно з фосфатним буфером. ACN – органічний розчинник з найкращими характеристиками УФ поглинання, найнижчим граничним значенням 190 нм, що зробило його унікальним органічним розчинником у наших експериментах. З метою розробки ВЕРХ методики одночасного визначення двох аналітів із різницею в полярностях (мельдоній та метопролол) апробовано три хроматографічні колонки та різні рухомі фази з низьким та високим відсотком ACN, що сформульовано в 3 підходи та 12 варіацій. Всі три хроматографічні колонки (LiChrospher 100 CN двох розмірів (4 мм × 250 мм, 5 мкм), (4 мм × 125 мм, 5 мкм), Waters Spherisorb CNRP (4.6 мм × 250 мм, 5 мкм), ZORBAX StableBond CN (4.6 мм × 250 мм, 5 мкм)) є придатними для одночасного визначення мельдонію та метопрололу за різних умов щодо складу рухомої фази. Використання фосфатного буфера забезпечує стабільні та відтворювані результати з високою чутливістю для обох аналітів, що забезпечується високою УФ-прозорістю ACN та фосфату і дозволяє проводити визначення в найкоротшому діапазоні довжин хвиль 190–195–200 нм. Чутливість з УФ детектором для мельдонію приблизно в 11-20 разів вища порівняно з методиками з використанням розведеної TFA, залежно від обраної порівняльної довжини хвилі. Підкислення рухомої фази викликає погіршення симетрії піків, особливо мельдонію. Розмір, площа, висота піку менш чутливі до змін у моніторингу довжини хвилі за наявності TFA порівняно з H_3PO_4 , тоді як наявність 13 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ викликає значні зміни у висоті піків, мельдонію та

метопрололу. Використання комбінації ACN з розведеною H_3PO_4 забезпечує чутливе вимірювання за нижчої довжини хвилі 190 нм, так само, як і з комбінаціями $NH_4H_2PO_4$. Однак наявність розведеної 0.065–0.07 % TFA не дозволяє проводити чутливі вимірювання в діапазонах нижче 195 нм через високі граничні значення органічної кислоти. В разі необхідності використання запропонованих хроматографічних умов для ВЕРХ/МС, комбінація рухомих фаз із розведеною TFA є рекомендованою для всіх перевірених CN-ціанокколонок, з перевагою Zorbax CN-SB, яка є найбільш стабільною в кислому значенні рН. У разі потреби використання методики для ВЕРХ визначення з УФ, PDA, флуоресцентним детектором, комбінація $NH_4H_2PO_4$ з ACN є рекомендованим варіантом вибору рухомої фази, що забезпечує високопродуктивний аналіз для лабораторій контролю якості. Обидві варіації рухомих фаз легко повторно оптимізуються для точного налаштування пікових положень елюювання та досягнення роздільної здатності. Оскільки методики з $NH_4H_2PO_4$ та H_3PO_4 з кращим вибором CN-колонки набагато чутливіші до мельдонію в 10–17 разів порівняно з методиками з розведеною TFA, перші рекомендовані для рутинних високопродуктивних аналізів мельдонію та метопрололу у лікарських формах, тоді як друга група з TFA відмінно підходить для аналізу біологічних зразків із застосуванням ВЕРХ/МС, де МС детектор підвищуватиме чутливість методики. Враховуючи результати, отримані при валідації аналітичних методик та вивченні «зеленості», ми рекомендуємо 9 (рухома фаза – ACN – 0.15 % $NH_4H_2PO_4$ (60:40), хроматографічна колонка – Zorbax CN SB) та 10 (рухома фаза – ACN – 0.15 % $NH_4H_2PO_4$ (50:50), хроматографічна колонка – Zorbax CN SB) варіації як оптимальні, оскільки стостерігаються низькі значення МВ та МКВ, експресність (час хроматографування 3.5 хв), бал за методом AGREE – 0.77.

Нами розроблено оригінальну біоаналітичну методику визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові методом ВЕРХ/МС/МС з використанням внутрішніх стандартів, проведена оптимізація хроматографічної колонки, рухомої фази та швидкості потоку, що є важливими для отримання відмінного розділення піків та впливає на правильність, прецизійність та

чутливість методики. Для оптимізації ефективної хроматографічної роздільної здатності метопрололу та мельдонію проведено попередні експериментальні дослідження доцільності застосування різних сумішей розчинників, таких як ACN, MeOH та FA. Роздільна здатність піків метопрололу найкраще досягалася за допомогою колонки Discovery C18 50 мм × 2.1 мм, 5 мкм та мельдонію – ZORBAX HILIC Plus 50 мм × 2.1 мм, 3.5 мкм. Зразки метопрололу хроматографували в градієнтному режимі (елюент А (ACN – H₂O – FA, 5:95:0.1), елюент В (ACN – FA, 100:0.1)). Зразки мельдонію хроматографували в ізократичному режимі, використовуючи як рухома фазу H₂O – ACN – амонію форміатний буфер 200 мМ (20:75:5). За даних умов пік метопрололу та мельдонію елюються близько 1.39 хв та 1.18 хв, відповідно. Загальний час хроматографування складав 2 хв, тому розроблена біоаналітична методика визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові є експресною. Придатність біоаналітичної методики підтверджено валідаційними характеристиками, які висуваються до біоаналітичних методик. Запропонована біоаналітична методика визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові є екологічно безпечною, що підтверджено методами аналітичної еко-шкали, AGREE, GAPI. Розроблена біоаналітична методика визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові має практичне значення і може бути застосована в практичній роботі лабораторіями з вивчення фармакокінетики та біоеквівалентності лікарських засобів, які містять метопролол та мельдоній.

Новизна розробок підтверджена патентом України на корисну модель.

Ключові слова: аналіз, метопролол, мельдоній, лікарські засоби, таблетки, капсули, біоаналітика, валідація, високоефективна рідинна хроматографія, реагент, спектрофотометрія, спектроскопія, фіксована комбінація.

ANNOTATION

Horyn M. M. Development and Validation of the Methods for the Analysis of Meldonium and Metoprolol in Pharmaceuticals and Blood Plasma. – Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for obtaining the degree of Doctor of Philosophy in specialty 226 “Pharmacy, Industrial Pharmacy” (22 “Healthcare”). – Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Healthcare of Ukraine, 2023.

Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, 2023.

The dissertation presents an experimental study of the development of analytical and bioanalytical methods for the determination of metoprolol and meldonium in substances, pharmaceuticals and blood plasma.

The aim of the work has been the development of express, easy-to-implement, accessible and validated spectrophotometric and chromatographic methods for the determination of metoprolol and meldonium in substances, pharmaceuticals and blood plasma.

The UV spectrophotometric method for the determination of metoprolol tartrate in the substance and monocomponent pharmaceuticals has been developed and validated. Limitations regarding the application of the proposed UV spectrophotometric method are the determination of metoprolol in combined dosage forms, provided that the other API will absorb in the range of 220-230 nm.

Spectrophotometric methods for the quantitative determination of metoprolol tartrate in substances and pharmaceuticals by reaction with bromocresol green (BCG), bromophenol blue (BPB), bromothymol blue (BTB) have been developed and validated, the optimal conditions for the formation of products of the interaction of metoprolol tartrate with BCG, BPB, BTB have been experimentally substantiated – choice of reagent concentration (1.6×10^{-4} M of BCG solution, 2.0×10^{-4} M of BPB solution, 1.6×10^{-4} M of BTB solution), organic solvent (BCG, BPB – methanol, BTB – acetonitrile), analytical wavelength (BCG – 624 nm, BPB – 595 nm, BTB – 402 nm), the coefficients of the stoichiometric ratios of “metoprolol tartrate–BCG/BPB/BTB” (1:1) and the reaction sensitivity indicators have been determined. The proposed spectrophotometric methods for the determination of metoprolol have showed an excellent result of “greenness” by the methods of analytical eco-scale, AGREE, GAPI,

since toxic solvents have not been used during the development of the methods and sample preparation has been minimized.

A spectrophotometric method for quantitative determination of meldonium in substances and pharmaceuticals by reaction with alizarin has been developed and validated, optimal conditions for quantitative determination have been established (alizarin solution concentration – 0.8%, volume of 0.8% alizarin solution – 0.5 ml, analytical wavelength – 517 nm, heating time – 20 min, temperature – (95 ± 2) °C), stoichiometric ratios of reacting components “meldonium-alizarin” (1:1) and indicators of reaction sensitivity. The proposed spectrophotometric method for determining meldonium in substances and pharmaceuticals by reaction with alizarin is not sufficiently “green”, therefore the development of HPLC methods for determining meldonium in substances and pharmaceuticals remains relevant. However, despite the described fact, this method can be used to conduct arbitration control.

At the beginning of conceptualization of the development of HPLC methods for the determination of meldonium in substances and dosage forms, the main issues, planned to be solved, have been worked out. Meldonium is a difficult analyte to analyze due to its low molecular weight and high polarity. Understanding the facts described above, we began our study with the first approach, which involved the use of an Agilent Zorbax C-18 SB short chromatographic column (4.6 mm i.d. X 150 mm, 3.5 μ m) and a mobile phase consisting of 0.25 % KPF₆ – 0.1 % 85 % H₃PO₄ 95 % – 5 % ACN. The use of chaotropic anion salts in the mobile phase has shown certain advantages in the development of HPLC methods, such as increasing the retention of N-containing molecules in the column, especially in an acidic pH environment, and improving the symmetry of peaks. The elution profile of this column and mobile phase showed excellent retention. To choose the optimal wavelength, four different wavelengths (190 nm, 195 nm, 200 nm, 205 nm) have been tested. Analyzing the facts described above regarding the first approach, it is possible to conclude about the suitability of the proposed Agilent Zorbax C-18 SB chromatographic column (150 mm x 4.6 mm, 3.5 μ m) and a mobile phase using one chaotropic anion salt (KPF₆) for the development of an express HPLC method of determination meldonium in substance and dosage forms.

Considering the positive results obtained in the first approach, we continued our search for the possibility of using other salts of chaotropic anions in the mobile phase. We have switched to a second approach that involved using the same column as in the first concept, an Agilent Zorbax C-18 SB (150 mm x 4.6 mm, 3.5 μ m) and a mobile phase consisting of 0.3 % lithium bis(trifluoromethane)sulfonimide 97 % – 0.1 % 85 % H_3PO_4 80 % – 20 % ACN. The use of a chaotropic anion salt (lithium bis(trifluoromethane)sulfonimide) has extended the retention time of meldonium to 4.4 min and has allowed to obtain an excellent chromatogram with satisfactory parameters of the chromatographic system. The parameters of the chromatographic system confirm the findings and results of this study regarding the effect of chaotropic salts on the N-containing molecule by increasing their retention and improving the peak shape and homogeneity even on the column without base deactivation. Therefore, the described second approach can also be used for the development of HPLC methods for the determination of meldonium in substances and pharmaceuticals. All proposed approaches are “green” and express, however, taking into account the obtained values of LOD and LOQ, we suggest using the first approach (1 variation) with a mobile phase consisting of 0.25 % potassium hexafluorophosphate (V), 0.1 % 85 % H_3PO_4 95 %, 5 % ACN, and a detection wavelength of 190 nm.

At the beginning of the development of HPLC methods for the simultaneous quantitative determination of metoprolol and meldonium, the main problems arose, which consisted in the difference in the chemical structure and physicochemical properties of metoprolol and meldonium. Chromatographic columns used in this study are LiChrospher 100 CN of two sizes (4 mm \times 250 mm, 5 μ m) and (4 mm \times 125 mm, 5 μ m), Waters Spherisorb CNRP (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), ZORBAX StableBond CN (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) (Merck Darmstadt, Germany and Agilent Technologies, USA). The main focus of our experiment, besides choosing a chromatographic column, has been to vary and choose the best combinations of mobile phase components and approaches: ACN with $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, ACN with TFA. The recommended wavelength for sensitivity has been chosen in the UV range of 190–205 nm, depending on the mobile phase concept, but when using the TFA approach, the recommended range for

maximum sensitivity should be above 196 nm due to the higher UV absorption limit of TFA compared to phosphate buffer. ACN is the organic solvent with the best UV absorption characteristics, the lowest peak value at 190 nm, making it the unique organic solvent in our experiments. In order to develop an HPLC method for the simultaneous determination of two analytes with a difference in polarities (meldonium and metoprolol), three chromatographic columns and different mobile phases with a low and high percentage of ACN have been tested, formulated in 3 approaches and 12 variations. All three chromatographic columns (LiChrospher 100 CN of two sizes (4 mm × 250 mm, 5 μm), (4 mm × 125 mm, 5 μm), Waters Spherisorb CNRP (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), ZORBAX StableBond CN (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)) are suitable for the simultaneous determination of meldonium and metoprolol under different conditions regarding the composition of mobile phase. The use of a phosphate buffer provides stable and reproducible results with high sensitivity for both analytes, which is supported by the high UV transparency of ACN and phosphate and allows determination in the shortest wavelength range of 190–195–200 nm. The sensitivity with the UV detector for meldonium is about 11–20 times higher compared to methods using diluted TFA, depending on the comparison wavelength chosen. Acidification of the mobile phase causes deterioration of the symmetry of peaks, especially meldonium. Peak size, area, height are less sensitive to changes in wavelength monitoring in the presence of TFA compared to H₃PO₄, whereas the presence of 13 mM NH₄H₂PO₄ causes significant changes in peak height, meldonium and metoprolol. Using the combination of ACN with dilute H₃PO₄ provides a sensitive measurement below the wavelength of 190 nm, the same as with the NH₄H₂PO₄ combinations. However, the presence of diluted 0.065–0.07 % TFA does not allow for sensitive measurements in the ranges below 195 nm due to the high limit values of the organic acid. If the proposed HPLC/MS chromatographic conditions are required, a combination of mobile phases with diluted TFA is recommended for all CN-cyano columns tested, with Zorbax CN-SB being the most stable at acidic pH. When using an HPLC method with UV, PDA, fluorescence detection, the combination of NH₄H₂PO₄ with ACN is the recommended choice of mobile phase, providing high-performance analysis for quality

control laboratories. Both mobile phase variations are easily re-optimized to fine-tune elution peak positions and achieve resolution. Since the $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ and H_3PO_4 methods with the preferred CN column are much more sensitive to meldonium by a factor of 10-17 compared to the dilute TFA methods, the former are recommended for routine high-performance analysis of meldonium and metoprolol in dosage forms, while the latter TFA group is excellent for analysis of biological samples using HPLC/MS, where the MS detector will increase the sensitivity of the method. Taking into account the results obtained during the validation of analytical methods and the study of “greenness”, we recommend 9 (mobile phase – ACN – 0.15 % $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (60:40), chromatographic column – Zorbax CN SB) and 10 (mobile phase – ACN – 0.15 % $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (50:50), chromatographic column – Zorbax CN SB) variations as optimal, as low values of LOD and LOQ are observed, expressivity (chromatography time 3.5 min), score according to the AGREE method – 0.77.

We have developed an original bioanalytical method for the determination of metoprolol and meldonium in blood plasma by HPLC/MS/MS using internal standards, optimized the chromatographic column, mobile phase and flow rate, which are important for obtaining excellent peak separation and affect the correctness, precision and sensitivity of the method. To optimize the effective chromatographic resolution of metoprolol and meldonium, preliminary experimental studies of the feasibility of using different solvent mixtures such as ACN, MeOH and FA have been carried out. Resolution of the metoprolol peaks has been best achieved using a column Discovery C18 50 mm × 2.1 mm, 5 μm and a meldonium – ZORBAX HILIC Plus 50 mm × 2.1 mm, 3.5 μm. Metoprolol samples have been chromatographed in gradient mode (eluent A (ACN – H_2O – FA, 5:95:0.1), eluent B (ACN – FA, 100:0.1)). Meldonium samples have been chromatographed in isocratic mode, using H_2O – ACN – ammonium formate buffer 200 mM (20:75:5) as the mobile phase. Under these conditions, peaks of metoprolol and meldonium are eluted at about 1.39 min and 1.18 min, respectively. The total time of chromatography is 2 min, therefore the developed bioanalytical method for determining metoprolol and meldonium in blood plasma is rapid. The suitability of bioanalytical methods is confirmed by the validation

characteristics that are put forward for bioanalytical methods. The proposed bioanalytical method for determining metoprolol and meldonium in blood plasma is ecologically safe, which is confirmed by the methods of analytical eco-scale, AGREE, GAPI. The developed bioanalytical method for determining metoprolol and meldonium in blood plasma is of practical importance and can be applied in practical work by laboratories studying the pharmacokinetics and bioequivalence of pharmaceuticals containing metoprolol and meldonium.

The novelty of developments is confirmed by the patent of Ukraine for a utility model.

Key words: analysis, metoprolol, meldonium, pharmaceuticals, tablets, capsules, bioanalytics, validation, high-performance liquid chromatography, reagent, spectrophotometry, spectroscopy, fixed combination.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні результати дисертації:

1. Horyn M, Logoyda L. Bioanalytical method development and validation for the determination of metoprolol and meldonium in human plasma. *Pharmacia*. 2020;67(2):39-48. **(SCOPUS)** *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні статті).*

2. Горин ММ, Логойда ЛС. Розробка спектрофотометричної методики визначення метопрололу в лікарських засобах. *Медична та клінічна хімія*. 2022;2:105-11. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні статті).*

3. Horyn M, Kucher T, Kryskiw L, Poliak O, Zarivna N, Peleshok K, Logoyda L. Development of the spectrophotometric method for the determination of metoprolol tartrate in tablets by using bromocresol green. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022;5(39):55-63. **(SCOPUS)** *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та*

проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні статті).

4. Horyn M, Kryskiw L, Kucher T, Poliak O, Zarivna N, Zahrychuk H, Korobko D, Peleshok K, Logoyda L. Development of the spectrophotometric method for the determination of metoprolol in tablets by using bromophenol blue. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022;6(40):36-42. **(SCOPUS)** *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні статті).*

5. Horyn M, Piponski M, Melnyk O, Ivanchuk I, Susla O, Grytsyshyn L, Korobko D, Logoyda L. Development of the Spectrophotometric Method for the Determination of Metoprolol in Tablets by using Bromothymol Blue. *Methods and objects of chemical analysis*. 2023;18(2):63-69. **(SCOPUS)** *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні статті).*

6. Piponski M, Horyn M, Grncaroska K, Oleshchuk O, Petrovska E, Angelevski S, Uglyar T, Kucher T, Logoyda L. Concepts for a new rapid and simple HPLC method for simultaneous determination of Metoprolol and Meldonium in pharmaceutical dosage forms. *Sci Pharm*. 2022;90(4):65. **(SCOPUS)** *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні статті).*

7. Horyn M, Piponski M, Zarembo T, Kucher T, Krstevska Balkanov S, Vakovska 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):14-222. **(SCOPUS)** *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні статті).*

8. Логойда ЛС, Горин ММ, винахідники; Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, патентовласник. Спосіб хроматографічного визначення метопрололу та мeldonію в плазмі крові.

Патент України № 143684. 2020 серп. 10. *(Особистий внесок – брала участь в патентному пошуку, плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні заявки на патент).*

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

9. Horyn M, Kucher T, Kryskiw L, Poliak O, Logoyda L. Development of the spectrophotometric method for the determination of metoprolol tartrate in tablets by using bromocresol green. В: Матеріали ІХ науково-практичної конференції з міжнародною участю Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів; 2022 Верес. 22-23; Тернопіль. Тернопіль; 2022. с. 94. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні тез).*

10. Horyn M, Logoyda L. Development of spectrophotometric method for the determination of metoprolol in tablets by using bromphenol blue. MOL2NET'22, Conference on Molecular, Biomedical & Computational Sciences and Engineering, 8th ed. congress CHEMBIOMOL-08: Chem. Biol., Org. Chem., Med. Chem., Pharm. Ind., & Mol. Biol. Congress; 2022 December 24; Paris. Paris, France-Galveston, USA, 2022. с. 1-2. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні тез).*

11. Horyn M, Melnyk O. Development of the spectrophotometric method for the determination of metoprolol in tablets by using bromothymol blue. В: Матеріали XXVII конгресу студентів та молодих учених Майбутнє за наукою; 2023 Квіт. 10-12; Тернопіль. Тернопіль; 2023. с. 176. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні тез).*

12. Горин ММ, Тифонюк ЮВ, Логойда ЛС. Експериментальні підходи до вибору реагенту для спектрофотометричної методики визначення мельдонію в лікарських засобах. В: Матеріали XV Всеукраїнської наукової конференції студентів та аспірантів Хімічні Каразінські читання – 2023; 2023 Квіт. 24-26;

Харків. Харків; 2023. с. 68. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні тез).*

13. Horyn M, Piponski M, Zaremba T, Logoyda L. Approaches to the selection of the optimal mobile phases in the development of HPLC method for the determination of meldonium in dosage forms. In: Abstracts of 19th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry (HSMC-19); 2023 March 9-11; Patras. Patras; 2023. p. 1. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні тез).*

14. Horyn M. Possibilities of simultaneous chromatographic determination of metoprolol and meldonium in medicines. В: Матеріали XXVI міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених; 2022 Квіт. 13-15; Тернопіль. Тернопіль; 2022. с. 139. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні тез).*

15. Horyn M, Logoyda L. LC-MS/MS method development the determination of metoprolol and meldonium in human plasma. In: Current trends in pharmaceutical chemistry and standardization of medicines; 2021 May 25-26; Ternopil. Ternopil; 2021. с. 44. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні тез).*

16. Горин М. Розробка біоаналітичної методики визначення мельдонію та метопрололу в плазмі крові. В: Матеріали XXIV міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених; 2020 Квіт. 13-15; Тернопіль. Тернопіль; 2020. с. 144. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні тез).*

17. Logoyda L, Horyn M, Kovalenko S, Berest G. Method Development and Validation for the Determination of Meldonium and Metoprolol in Human Plasma by using LC-MS/ MS. In: Abstracts of the Dubai international pharmaceuticals & technologies conference & exhibition; 2020 February 25-27; Dubai. Dubai; 2020.

р. 36. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні тез).*

18. Logoyda L, Horyn M, Kovalenko S. Development of the method for determination of metoprolol in human plasma. In: Abstracts of the 10th International Pharmaceutical Conference Science and Practice 2019; 2019 November 15; Kaunas. Kaunas; 2019. p. 86. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні тез).*

19. Горин ММ, Тивонюк ЮВ, Логойда ЛС. Розробка спектрофотометричної методики визначення мельдонію в капсулах за реакцією з алізарином. В: Матеріали Міжнародної Internet-конференції Modern chemistry of medicines; 2023 Трав. 18; Харків. Харків; 2023. с. 140. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні тез).*

20. Горин М, Мельник О, Логойда Л. Застосування сульфогфталейнових барвників у фармацевтичному аналізі метопрололу. В: Матеріали ХІХ наукової конференції Львівські хімічні читання – 2023; 2023 Трав. 29-31; Львів. Львів; 2023. с. 117. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів, написанні та оформленні тез).*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	23
ВСТУП	25
РОЗДІЛ 1 АНАЛІЗ ІСНУЮЧИХ ПІДХОДІВ ДО РОЗРОБКИ ТА ВАЛІДАЦІЇ МЕТОДІВ АНАЛІЗУ МЕТОПРОЛОЛУ ТА МЕЛЬДОНІЮ В СУБСТАНЦІЯХ, ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ ТА БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	34
1.1 Загальна характеристика метопрололу та мельдонію	34
1.2 Огляд аналітичних та біоаналітичних методик аналізу метопрололу	36
1.3 Огляд аналітичних та біоаналітичних методик аналізу мельдонію	52
1.4 Застосування принципів «зеленої» та «білої» хімії в розробці аналітичних та біоаналітичних методик визначення метопрололу та мельдонію в субстанціях, лікарських засобах та біологічних рідинах	59
РОЗДІЛ 2 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ОБ’ЄКТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА МОДЕЛЮВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ	63
2.1 Методологія дослідження	63
2.2 Фізико-хімічні властивості об’єктів дослідження	66
2.3 Характеристика методик дослідження	68
2.3.1 УФ-спектрофотометрична методика визначення метопрололу в субстанції та лікарських засобах	69
2.3.2 Спектрофотометрична методика визначення метопрололу в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромкрезоловим зеленим	70

2.3.3	Спектрофотометрична методика визначення метопрололу в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромфеноловим синім	71
2.3.4	Спектрофотометрична методика визначення метопрололу в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромтимоловим синім	72
2.3.5	Спектрофотометрична методика визначення мельдонію в субстанції та лікарських засобах за реакцією з алізарином	73
2.3.6	ВЕРХ-методики кількісного визначення мельдонію у субстанції та лікарських засобах	74
2.3.7	ВЕРХ-методики одночасного кількісного визначення метопрололу та мельдонію в бінарній суміші та лікарських засобах	75
2.3.8	ВЕРХ-МС/МС методика кількісного визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові	78
2.3.9	Методи вивчення «зеленості» аналітичних та біоаналітичних методик	84
РОЗДІЛ 3 РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИХ МЕТОДИК ВИЗНАЧЕННЯ МЕТОПРОЛОЛУ ТА МЕЛЬДОНІЮ В СУБСТАНЦІЯХ ТА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ		85
3.1	Розробка та валідація УФ-спектрофотометричної методики визначення метопрололу в субстанції та лікарських засобах	85
3.1.1	Специфічність методики	86
3.1.2	Лінійність, діапазон застосування методики	86
3.1.3	Правильність та прецизійність методики	87
3.1.4	Прогноз повної невизначеності методики	90
3.1.5	Робасність методики	91

3.2	Методологія вибору реагенту для розробки спектрофотометричних методик визначення метопрололу в субстанції та лікарських засобах	92
3.3	Розробка та валідація спектрофотометричної методики визначення метопрололу в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромкрезоловим зеленим	102
3.3.1	Специфічність методики	105
3.3.2	Лінійність, діапазон застосування методики	105
3.3.3	Правильність та прецизійність методики	106
3.3.4	Прогноз повної невизначеності методики	108
3.3.5	Робасність методики	110
3.4	Розробка та валідація спектрофотометричної методики визначення метопрололу в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромфеноловим синім	111
3.4.1	Специфічність методики	114
3.4.2	Лінійність, діапазон застосування методики	115
3.4.3	Правильність та прецизійність методики	115
3.4.4	Прогноз повної невизначеності методики	117
3.4.5	Робасність методики	119
3.5	Розробка та валідація спектрофотометричної методики визначення метопрололу в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромтимоловим синім	120
3.5.1	Специфічність методики	123
3.5.2	Лінійність, діапазон застосування методики	123
3.5.3	Правильність та прецизійність методики	124
3.5.4	Прогноз повної невизначеності методики	126
3.5.5	Робасність методики	128

3.6 Порівняльний аналіз впливу на навколишнє середовище спектрофотометричних методик визначення метопрололу в субстанції та лікарських засобах	129
3.7 Методологія вибору реагенту для розробки спектрофотометричних методик визначення мельдонію в субстанції та лікарських засобах	135
3.8 Розробка та валідація спектрофотометричної методики визначення мельдонію в субстанції та лікарських засобах за реакцією з алізарином	140
3.8.1 Специфічність методики	143
3.8.2 Лінійність, діапазон застосування методики	144
3.8.3 Правильність та прецизійність методики	145
3.8.4 Прогноз повної невизначеності методики	147
3.8.5 Робастність методики	148
3.8.6 Розрахування оцінки впливу аналітичної методики на навколишнє середовище	149
РОЗДІЛ 4 РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ ХРОМАТОГРАФІЧНИХ МЕТОДИК ВИЗНАЧЕННЯ МЕТОПРОЛОЛУ ТА МЕЛЬДОНІЮ В СУБСТАНЦІЯХ ТА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ	154
4.1 Розробка та валідація ВЕРХ-методик кількісного визначення мельдонію в субстанції та лікарських засобах	154
4.1.1 Валідація аналітичних методик та порівняльна оцінка впливу аналітичних методик на навколишнє середовище	163
4.2 Розробка та валідація ВЕРХ-методик одночасного кількісного визначення метопрололу та мельдонію в бінарній суміші та лікарських засобах	165
4.2.1 Застосування першого підходу на колонці LiChrospher 125 CN (5 мкм) та LiChroSpher 250 CN (5 мкм)	167

4.2.2 Застосування другого підходу на колонці Waters Spherisob CN RP 250 мм × 4.6 мм, 5 мкм	178
4.2.3 Застосування третього підходу на колонці Zorbax CN-SB 250 мм × 4.6 мм, 5 мкм	186
4.2.4 Валідація аналітичних методик та порівняльний аналіз впливу аналітичних методик на навколишнє середовище	206
РОЗДІЛ 5 РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ ВЕРХ-МС/МС МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ МЕТОПРОЛОЛУ ТА МЕЛЬДОНІУ В ПЛАЗМІ КРОВІ	216
5.1 Розробка ВЕРХ-МС/МС методики визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові	216
5.2 Валідація ВЕРХ-МС/МС методики визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові	219
5.2.1 Специфічність/селективність	219
5.2.2 Лінійність/калібрувальна модель	220
5.2.3 Правильність та прецизійність	222
5.2.4 Ступінь ізолювання та ефект матриці	223
5.2.5 Стабільність	226
5.3 Розрахування впливу аналітичної методики на навколишнє середовище	227
ВИСНОВКИ	229
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	234
ДОДАТКИ	254

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФІ	– активний фармацевтичний інгредієнт
ВЕРХ/МС/МС	– високоефективна рідинна хроматографія з подвійним мас-спектрометричним детектуванням
ВЕРХ/УФ	– високоефективна рідинна хроматографія з УФ детектуванням
ВМКВ	– верхня межа кількісного визначення
ВС	– внутрішній стандарт
ДМД	– діодно-матричне детектування
ДФУ	– Державна Фармакопея України
ЄФ	– Європейська Фармакопея
ЛЗ	– лікарський засіб
ЛФ	– лікарська форма
МВ	– межа виявлення
МКВ	– межа кількісного визначення
МКЯ	– методи контролю якості
НМКВ	– нижня межа кількісного визначення
ТШХ	– тонкошарова хроматографія
УЗ	– ультразвуковий
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)
LQC (QCL)	– контрольний зразок низької концентрації, ≤ 3 НМКВ

MQC (QCM)	– контрольний зразок середньої концентрації, близько 0.5 ВМКВ
HQC (QCH)	– контрольний зразок високої концентрації, близько 0.75 ВМКВ
RSD	– відносне стандартне відхилення (Relative Standard Deviation)
T	– критерій Стюдента
x, y	– поточні координати в рівнянні лінійної залежності
KPF ₆	– калію гексафторофосфат
H ₃ PO ₄	– кислота фосфорна
ACN	– ацетонітрил
NH ₄ H ₂ PO ₄	– амонію дигідрогенфосфат
TFA	– кислота трифтороцтова

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Артеріальна гіпертензія та ішемічна хвороба серця займає одне з лідируючих позицій у поширеності серед захворювань серцево-судинної системи. Зазвичай лікування артеріальної гіпертензії та ішемічної хвороби серця монопрепаратами менш ефективне, ніж лікування комбінованими лікарськими засобами (ЛЗ). Сучасні стандарти лікування пацієнтів з артеріальною гіпертензією та ішемічною хворобою серця передбачають застосування засобів нейрогуморальної модуляції, до яких зокрема належать блокатори β -адренорецепторів та інгібітори АПФ, препаратів гемодинамічної підтримки та інших груп ЛЗ, що покращують якість та тривалість життя. Метопролол – блокатор β -1 адренорецепторів, який володіє високою селективністю та ліпофільністю, що зумовлює часте використання даного препарату для лікування хронічної серцевої недостатності, артеріальної гіпертензії, ішемічної хвороби серця, аритмії, інфаркту міокарда та інших захворювань серцево-судинної системи. Мельдоній – метаболічний засіб, який належить до парціальних інгібіторів жирних кислот та використовується для лікування захворювань серцево-судинної системи, зокрема стабільної стенокардії та постінфарктного стану, дія якого проявляється в підвищенні ефективності споживання кисню ішемізованим органом через окислення глюкози. Вчені підтвердили, що застосування мельдонію в комплексній терапії хворих на стабільну стенокардію та супутню артеріальну гіпертензію дозволяє підвищити ефективність традиційної антиангінальної терапії та покращити якість життя пацієнтів. Існуючі аналітичні методики визначення метопрололу та мельдонію в субстанції, ЛЗ та біологічних рідинах часто мають обмежене застосування через не завжди достатню селективність, трудомісткість та невідповідність принципам «зеленої хімії» [11, 12, 53]. Окрім того, на сьогоднішній день підходи до розробки хроматографічних методик дещо змінилися. Виробниками впроваджено в практику нові хроматографічні колонки, використовуються інші підходи до підбору рухомих фаз та умов

хроматографування, тому існуючі хроматографічні методики потребують удосконалення.

Доцільність виконання даного дослідження, в першу чергу, визначається принциповою відсутністю системних досліджень з розробки аналітичних та біоаналітичних методик визначення метопрололу та мельдонію в субстанціях, ЛЗ та плазмі крові, тому дисертаційна робота дозволяє вирішити не тільки науково-теоретичне, але й значне прикладне завдання, що дозволить оптимізувати підходи до розробки таких методик і як наслідок, забезпечити належні вимоги до сучасного контролю якості лікарських форм (ЛФ) на основі метопрололу та мельдонію.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана згідно з планами науково-дослідних робіт Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України «Розробка оригінальних комбінацій антигіпертензивних засобів, їх аналіз та стандартизація» (держбюджетна, номер державної реєстрації 0120U104201), «Цілеспрямований пошук біологічно активних речовин в ряду 7,8-дизаміщених теофіліну; розробка та валідація методик контролю якості антигіпертензивних лікарських засобів зі статинами» (номер державної реєстрації 0121U100062).

Мета дослідження: розробка експресних, простих у виконанні, доступних та валідованих спектрофотометричних і хроматографічних методик визначення метопрололу та мельдонію в субстанціях, ЛЗ і плазмі крові.

Завдання дослідження:

- узагальнити інформацію щодо цілей, завдань, особливостей досліджень, ускладнень, які виникають під час розробки та валідації методик визначення метопрололу та мельдонію в субстанціях, ЛЗ та плазмі крові;
- розробити та валідувати УФ-спектрофотометричну методику визначення метопрололу в субстанції та ЛЗ;
- запропонувати методологію вибору оптимального реагенту для подальшої розробки спектрофотометричної методики визначення метопрололу в

субстанції та ЛЗ, розробити та валідувати спектрофотометричні методики визначення метопрололу в субстанції та ЛЗ за реакцією з сульффталеїновими барвниками (бромкрезоловим зеленим (БКЗ), бромфеноловим синім (БФС), бромтимоловим синім (БТС)), експериментально обґрунтувати оптимальні умови проведення кількісного визначення, встановити коефіцієнти стехіометричних співвідношень «метопролол – сульффталеїновий барвник» та показники чутливості реакцій;

- описати методологію вибору реагенту для розробки спектрофотометричних методик визначення мельдонію в субстанції та ЛЗ, розробити та валідувати спектрофотометричну методику визначення мельдонію в субстанції та ЛЗ за реакцією з алізарином, встановити оптимальні умови проведення кількісного визначення, стехіометричні співвідношення реагуючих компонентів «мельдоній-алізарин» та показники чутливості реакції;
- розробити експресні та екологічно безпечні ВЕРХ-методи визначення мельдонію в субстанції та ЛЗ з використанням хроматографічної колонки Agilent Zorbax C-18 SB (4.6 мм i.d. X 150 мм, 3.5 мкм);
- продемонструвати методологію розробки ВЕРХ-методи одночасного визначення двох аналітів із різницею в полярностях (мельдоній та метопролол), запропонувати хроматографічні умови для розробки ВЕРХ-методи одночасного визначення метопрололу та мельдонію в ЛЗ;
- розробити та валідувати ВЕРХ-методи одночасного визначення метопрололу та мельдонію в бінарній суміші та ЛЗ з використанням хроматографічних колонок (LiChrospher 100 CN двох розмірів (4 мм × 250 мм, 5 мкм), (4 мм × 125 мм, 5 мкм), Waters Spherisorb CNRP (4.6 мм × 250 мм, 5 мкм), ZORBAX StableBond CN (4.6 мм × 250 мм, 5 мкм));
- запропонувати хроматографічні умови для розробки біоаналітичної методи визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові, розробити

та валідувати методику ВЕРХ-МС/МС для кількісного визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові.

Об'єкт дослідження – обґрунтування підходів та розробка оригінальних спектрофотометричних і хроматографічних методик визначення метопрололу та мельдонію в субстанціях, ЛЗ, плазмі крові.

Предмет дослідження – АФІ, таблетки метопрололу, капсули мельдонію, плазма крові.

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

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше продемонстровано узагальнені підходи до розробки оригінальних експресних аналітичних та біоаналітичних методик визначення АФІ та готових ЛФ метопрололу та мельдонію, а також їх комбінації.

Розроблено та валідовано оригінальні спектрофотометричні методики кількісного визначення метопрололу тартрату в субстанції та ЛЗ за реакцією з БКЗ, БФС, БТС, експериментально обґрунтовано оптимальні умови проведення кількісного визначення. Вперше запропоновано методологію вибору реагенту для розробки спектрофотометричних методик визначення мельдонію в субстанції та ЛЗ. Розроблено та валідовано оригінальну спектрофотометричну методику кількісного визначення мельдонію в субстанції та ЛЗ за реакцією з алізарином, встановлено оптимальні умови проведення кількісного визначення.

Вперше запропоновано хроматографічні умови і розроблено експресні та екологічно безпечні ВЕРХ-методику кількісного визначення мельдонію в субстанції та ЛЗ з використанням хроматографічної колонки Agilent Zorbax C-18 SB (4.6 мм i.d. X 150 мм, 3.5 мкм). В результаті проведених досліджень, отримано 8 ВЕРХ варіацій. Валідація аналітичних методик показала їх придатність для цілей фармацевтичного аналізу.

Вперше продемонстровано методологію розробки ВЕРХ-методику одночасного визначення двох аналітів із різницею в полярностях (мельдоній та метопролол) та запропоновано хроматографічні умови для розробки ВЕРХ-методику одночасного визначення метопрололу та мельдонію в ЛЗ. Розроблено та валідовано оригінальні ВЕРХ-методику одночасного визначення метопрололу та мельдонію в бінарній суміші і ЛЗ з використанням хроматографічних колонок (LiChrospher 100 CN двох розмірів (4 мм × 250 мм, 5 мкм), (4 мм × 125 мм, 5 мкм), Waters Spherisorb CNRP (4.6 мм × 250 мм, 5 мкм), ZORBAX StableBond CN (4.6 мм × 250 мм, 5 мкм)), які сформульовано в 12 варіацій. Рекомендовано 9 (рухома фаза – ACN – 0.15 % $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (60:40), хроматографічна колонка – Zorbax CN SB) та 10 (рухома фаза – ACN – 0.15 % $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (50:50), хроматографічна колонка – Zorbax CN SB) варіації як оптимальні, оскільки стостерігалися низькі значення МВ та МКВ, експресність (час хроматографування – 3.5 хв), бал за методом AGREE – 0.77.

Запропоновано хроматографічні умови для розробки біоаналітичної методику визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові та розроблено оригінальну ВЕРХ-МС/МС методику кількісного визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові, що може бути застосована лабораторіями з вивчення фармакокінетики та біоеквівалентності ЛЗ, які містять метопролол та мельдоній.

На підставі запропонованих принципів та підходів розроблено оригінальну ВЕРХ-МС/МС методику визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові (патент України на корисну модель № 143684 від 10.08.2020).

Практичне значення одержаних результатів. Розроблені оригінальні спектрофотометричні та хроматографічні методики визначення метопрололу та мельдонію в субстанціях та ЛЗ можуть використовуватися для рутинного аналізу метопрололу та мельдонію на однорідність вмісту, дослідження профілю розчинення та аналізу ЛЗ. Розроблені методики можуть застосовуватися атестованими аналітичними лабораторіями як арбітражні методики. ВЕРХ методики визначення метопрололу та мельдонію в ЛЗ опрацьовано в умовах промислового виробництва публічного акціонерного товариства «Фармак», що засвідчено актом впровадження від 16.03.2023 р.

Запропонована методологія розробки ВЕРХ-методик визначення мельдонію (2 підходи, 8 варіацій) та одночасного кількісного визначення метопрололу та мельдонію (3 підходи, 12 варіацій) в ЛЗ може використовуватися в наукових цілях хіміками-аналітиками для розробки ВЕРХ методик визначення АФІ з відмінностями у їх полярності.

Розроблена ВЕРХ-МС/МС методика кількісного визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові може бути застосована в практичній роботі лабораторіями з вивчення фармакокінетики та біоеквівалентності ЛЗ.

Розроблені аналітичні та біоаналітичні методики впроваджено в науково-педагогічний процес кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (акт впровадження від 28.08.2023 р.), кафедри фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету (акт впровадження від 30.08.2023 р.), кафедри медичної та фармацевтичної хімії Буковинського державного медичного університету (акт впровадження від 28.08.2023 р.), кафедри хімії, фармацевтичного аналізу та післядипломної освіти Івано-Франківського національного медичного університету (акт впровадження від 31.08.2023 р.), в практику роботи Державної служби з лікарських засобів та контролю за наркотиками в Тернопільській області (акт впровадження від 11.09.2023 р.).

Особистий внесок здобувача. Безпосередньо автором проведено патентно-інформаційний пошук та аналіз сучасного стану досліджень за темою дисертаційної роботи. Дисертантом разом з науковим керівником визначено мету, завдання та методики експериментальних досліджень. Автором самостійно розроблено та валідовано спектрофотометричні методики визначення метопрололу та мельдонію в субстанціях та ЛЗ. Проведено методологію вибору реагенту як потенційного для подальшої розробки методики, встановлено оптимальні умови проведення кількісного визначення метопрололу та мельдонію в субстанціях та ЛЗ. Запропоновано хроматографічні умови та розроблено експресні та екологічно безпечні ВЕРХ-методику кількісного визначення мельдонію в субстанції та ЛЗ з використанням хроматографічної колонки Agilent Zorbax C-18 SB (4.6 мм i.d. X 150 мм, 3.5 мкм). В результаті проведених досліджень отримано 8 варіацій. Продемонстровано методологію розробки ВЕРХ-методику одночасного визначення мельдонію та метопрололу та запропоновано хроматографічні умови для розробки ВЕРХ-методику одночасного визначення метопрололу та мельдонію в ЛЗ з використанням хроматографічних колонок LiChrospher 100 CN двох розмірів (4 мм × 250 мм, 5 мкм), (4 мм × 125 мм, 5 мкм), Waters Spherisorb CNRP (4.6 мм × 250 мм, 5 мкм), ZORBAX StableBond CN (4.6 мм × 250 мм, 5 мкм), які сформульовано в 12 варіацій. Запропоновано хроматографічні умови для розробки біоаналітичної методики визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові та розроблено методику ВЕРХ МС/МС для кількісного визначення метопрололу і мельдонію в плазмі крові. Особисто проведено експериментальні дослідження та статистичну обробку одержаних результатів, систематизовано отримані дані, сформульовано висновки роботи.

Особистий внесок дисертанта 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 10th International Pharmaceutical Conference «Science and Practice 2019» (Kaunas, 15 листопада 2019 р.), міжнародній конференції «Dubai international pharmaceuticals & technologies conference & exhibition» (Dubai, 25–27 лютого 2020 р.), XXIV міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених (м. Тернопіль, 13–15 квітня 2020 р.), науково-практичній конференції «Current trends in pharmaceutical chemistry and standardization of medicines» (м. Тернопіль, 25–26 травня 2021 р.), XXVI міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених (м. Тернопіль, 13–15 квітня 2022 р.), VIII науково-практичній конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (м. Тернопіль, 22–23 вересня 2022 р.), міжнародній конференції MOL2NET'22, Conference on Molecular, Biomedical & Computational Sciences and Engineering – 8th ed. congress CHEMBIOMOL-08: Chem. Biol., Org. Chem., Med. Chem., Pharm. Ind., & Mol. Biol. Congress (December 24, 2022. Paris, France-Galveston, USA, 2022), 19th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry (Patras, 9–11 березня 2023 р.), XXVII міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених (м. Тернопіль, 10–12 квітня 2023 р.), XV Всеукраїнській науковій конференції студентів та аспірантів «Хімічні Каразінські читання – 2023» (м. Харків, 24–26 квітня 2023 р.), Міжнародній Internet-конференції «Modern chemistry of medicines» (м. Харків, 18 травня 2023 р.), XIX науковій конференції «Львівські хімічні читання – 2023» (м. Львів, 29–31 травня 2023 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 20 наукових праць, із них 7 статей (2 – у зарубіжних фахових наукових виданнях, що індексуються наукометричною базою *Scopus*, 4 – у виданнях України категорії А (3 – фахові, 1 – із суміжної галузі знань), 1 стаття у фаховому виданні категорії Б),

12 публікацій в матеріалах вітчизняних і міжнародних конгресів та конференцій, 1 патент України на корисну модель.

Обсяг та структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 265 сторінках, складається з анотації, вступу, п'яти розділів, висновків, списку використаних джерел, що містить 174 найменувань (16 кирилицею та 158 латиною), додатків. Робота ілюстрована 69 таблицями, 103 рисунками. Список використаних джерел і додатки викладено на 31 сторінці.

РОЗДІЛ 1
АНАЛІЗ ІСНУЮЧИХ ПІДХОДІВ ДО РОЗРОБКИ ТА ВАЛІДАЦІЇ
МЕТОДІВ АНАЛІЗУ МЕТОПРОЛОЛУ ТА МЕЛЬДОНІУ В
СУБСТАНЦІЯХ, ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ ТА БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ
(ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Загальна характеристика метопрололу та мельдонію

Артеріальна гіпертензія та ішемічна хвороба серця займає одне з лідируючих позицій у поширеності серед захворювань серцево-судинної системи. Зазвичай лікування артеріальної гіпертензії та ішемічної хвороби серця монопрепаратами менш ефективне, ніж лікування комбінованими лікарськими засобами (ЛЗ). Сучасні стандарти лікування пацієнтів з артеріальною гіпертензією та ішемічною хворобою серця передбачають застосування засобів нейрогуморальної модуляції, до яких зокрема належать блокатори β -адренорецепторів та інгібітори АПФ, препаратів гемодинамічної підтримки та інших груп ЛЗ, що покращують якість та тривалість життя. β -адреноблокатори – одні з базисних засобів, які використовуються для лікування артеріальної гіпертензії. Для лікування артеріальної гіпертензії рекомендується застосування селективних β_1 -адреноблокаторів, які мають виражену кардіоселективну дію та менш виражену побічну дію. Окрім цього, важливою характеристикою даної групи ЛЗ є ліпофільність, яка характеризується значною кардіопротекторною дією, що дає можливість застосування препарату в постінфарктний період. Метопролол – блокатор β_1 -адренорецепторів, який володіє високою селективністю та ліпофільністю, що зумовлює часте використання даного препарату для лікування хронічної серцевої недостатності, ішемічної хвороби серця, аритмії, інфаркту міокарда та інших захворювань серцево-судинної системи [1, 2]. У хімічному відношенні метопролол є біс[(2RS)-1-[4-(2-метоксиетил)фенокси]-3-[(1-метилетил)аміно]пропан-2-олом [3]. В ЛЗ метопролол використовують у вигляді солей тартратної та сукцинатної кислот

[3]. Рекомендованими є дози від 25 мг до 100 мг метопрололу. В Україні метопролол зареєстрований під такими торговими назвами: Метопролол, Корвітол, Егілок, Беталок, Імпликор та інші.

В арсеналі фармакологічних засобів варто відокремити антиангінальні ЛЗ – парціальні інгібітори окислення жирних кислот, які здатні впливати на метаболічні процеси в міокарді в умовах ішемії. Часто як наслідок артеріальної гіпертензії та інших захворювань серцево-судинної системи може розвинути інфаркт міокарда, який супроводжується ішемізацією міокарду. Саме метаболічні препарати підвищують ефективність використання кисню за рахунок блокування окислення жирних кислот та стимулювання окислення глюкози. Мельдоній – метаболічний засіб, який належить до парціальних інгібіторів жирних кислот та використовується для лікування захворювань серцево-судинної системи, зокрема стабільної стенокардії та постінфарктного стану, дія якого проявляється в підвищенні ефективності споживання кисню ішемізованим органом через окислення глюкози. Синтезований мельдоній у 70-х роках ХХ століття латвійськими дослідниками та вперше був впроваджений на ринку Латвії фармацевтичною фірмою «Grindex». З 2016 року Всесвітнім антидопінговим агентством занесений до списку препаратів, які заборонено використовувати спортсменам, оскільки збільшує витривалість при навантаженнях [4-7]. У хімічному відношенні мельдоній є 3-(2,2,2-триметилгідразинію)пропіонату дигідратом [3]. Рекомендованими є дози від 100 мг до 500 мг мельдонію. Мельдоній зареєстрований в Україні під такими торговими назвами: Метамакс, Тризипин, Мілдронат, Метонат, Цитоцерт, Рипронат, Мітра, Аккордин, Мілдронат GX, Мілдрокард –Н, Вазопро, МЛ-Кард, Мельдін, Алтум, Міолокард, Мілдралекс.

Вчені підтвердили, що застосування мельдонію в комплексній терапії хворих на стабільну стенокардію та супутню артеріальну гіпертензію дозволяє підвищити ефективність традиційної антиангінальної терапії та покращити якість життя таких пацієнтів [8]. Окрім того, згідно інструкції до мельдонію,

дозволено комбінувати його з антиангінальними засобами, тобто і з β -адреноблокаторами.

З вищесказаного можна зробити висновок, що фіксована комбінація метопрололу та мельдонію є вдалою для лікування пацієнтів з стабільною стенокардією та артеріальною гіпертензією.

1.2 Огляд аналітичних та біоаналітичних методик аналізу метопрололу

У ДФУ не наведено монографії на субстанцію та ЛФ метопрололу. У Європейській Фармакопеї (ЄФ) [3] є монографії на субстанції метопрололу тартрату та метопрололу сукцинату. ЄФ регламентує ідентифікацію метопрололу тартрату та метопрололу сукцинату проводити методом абсорбційної спектрофотометрії в ІЧ області, окрім цього метопрололу тартрат рекомендовано визначити за значенням питомого оптичного обертання. Кількісне визначення метопрололу тартрату та метопрололу сукцинату згідно ЄФ здійснюється ацидиметричним титруванням в неводному середовищі, титрант – кислота хлорна, середовище – безводна кислота оцтова, потенціометрична фіксація кінцевої точки титрування. Також в Американській Фармакопеї представлені монографії на субстанції метопрололу фумарату, метопрололу тартрату, метопрололу сукцинату та таблетки метопрололу тартрату, а також комбінації метопрололу тартрату та гідрохлортіазиду [9]. Американська фармакопея рекомендує проводити ідентифікацію метопрололу тартрату, метопрололу сукцинату та метопрололу фумарату в субстанціях методом спектоскопії в ІЧ області, тоді як комбінацію метопрололу тартрату з гідрохлортіазидом та таблетки метопрололу тартрату – УФ-спектрофотометрією. Для кількісного визначення субстанцій та ЛФ пропонується метод ВЕРХ з УФ-детектуванням. Умови проведення кількісного визначення метопрололу наведено в табл. 1.1.

Таблиця 1.1 – Умови проведення кількісного визначення метопрололу згідно Американської фармакопеї

Умови хроматографування	Аналіт				
	Метопрололу тартрат	Метопрололу сукцинат	Метопрололу фумарат	Таблетки метопрололу тартрату	Таблетки метопрололу тартрату та гідрохлортіазиду
Метод	ВЕРХ/УФ				
Довжина хвилі детектування, нм	223	223	223	254	223
Рухома фаза	Буферний розчин (1.3 г/л розчин натрію додецилсульфату в 0.1 % кислоті фосфорній) та ацетонітрил (600:400)	1.3 г/л розчин натрію додецилсульфату доведеного до 1 л за допомогою 0.1 % водного розчину кислоти фосфорної та ацетонітрил (60:40)	1.3 г/л розчин натрію додецилсульфату в 0.1 % кислоті фосфорній та ацетонітрил (60:40)	961 мг натрію 1-пентансульфонату і 82 мг безводного ацетату натрію в суміші 550 мл метанолу і 470 мл води, та 0.57 мл кислоти оцтової льодяної	Гradientне елюювання. А: 4.1 г/л розчину одноосновного натрію фосфату у воді (доведеного до рН 3.0 кислотою фосфорною). В: ацетонітрил. Елюювання розпочалось з співвідношення елюенту А 85 %: 15 % елюенту В та зберігалось впродовж 4хв; до 10 хв співвідношення змінилось на 10:90 відповідно, після чого знову повернулось до початкового 85:15 та зберігалось до кінця аналізу.
Хроматографічна колонка	4.6 мм x 15 см, 5 мкм, клас L7	4.6 мм x 12.5 см; 4 мкм, клас L7	4.6 мм x 15 см; 5 мкм, клас L7	3.9 мм x 30 см; 10 мкм, клас L1	4.6 мм x 10 см; 3.5 мкм, клас L1
Швидкість потоку рухомої фази, мл/хв	1.0	0.9	1.0	1.0	1.0
Температура колонки, °С	30	30	30	30	Не вказано

Як впливає з даних, представлених в табл. 1.1, Американська фармакопея пропонує для визначення метопрололу тартрату, метопрололу фумарату та метопрололу сукцинату в субстанціях використовувати рухома фаза – суміш буферного розчину (1.3 г/л розчин натрію додецилсульфату в 0.1 % кислоті фосфорній) та ацетонітрилу (60:40), хроматографічні колонки класу L7 розміром 4.6 мм x 15 см, 5 мкм та 4.6 мм x 12.5 см, швидкість потоку рухома фази – 0.9 мл – 1.0 мл, температура колонки – 30 °С, детектування – за довжини хвилі 223 нм. Для визначення метопрололу тартрату в таблетках використовується рухома фаза – суміш 961 мг натрію 1-пентансульфонату, 82 мг безводного ацетату натрію в суміші 550 мл метанолу і 470 мл води, та 0.57 мл кислоти оцтової льодяної, хроматографічна колонка класу L1 розміром 3.9 мм x 30 см, 10 мкм, швидкість потоку рухома фази – 1.0 мл, температура колонки – 30 °С, детектування – за довжини хвилі 254 нм. З метою визначення метопрололу тартрату в комбінованих таблетках з гідрохлортіазидом пропонується градієнтне елюювання, рухома фаза – А – 4.1 г/л розчину одноосновного натрію фосфату у воді (доведеного до рН 3.0 кислотою фосфорною), В – ацетонітрил, хроматографічна колонка класу L1 розміром 4.6 мм x 10 см, 3.5 мкм, швидкість потоку рухома фази – 1.0 мл, детектування – за довжини хвилі 223 нм.

У наукових джерелах літератури представлено значну кількість методик визначення метопрололу, в більшості у вигляді солей тартратної та сукцинатної кислот за допомогою спектрофотометричних та хроматографічних методів (табл. 1.2, 1.3). Провівши детальний огляд літератури існуючих аналітичних методик визначення метопрололу можна зробити висновок, що метопролол в монокомпонентних ЛЗ частіше визначають методом спектрофотометрії, а в комбінованих ЛЗ – із застосуванням методу хроматографії, що є очевидним, оскільки хроматографічні методи аналізу є селективнішими та специфічнішими. У табл. 1.2 представлено існуючі спектрофотометричні методики визначення метопрололу в субстанції та ЛФ.

Таблиця 1.2 – Спектрофотометричні методики визначення метопрололу в субстанції та ЛФ, які наведено в науковій літературі

№, поси лання	Зразок	Реагент	Середо- вище	Аналітична довжина хвилі, нм	Діапазон концент рацій	МВ/МКВ
1	2	3	4	5	6	7
1. [10]	ЛФ	Солі Cu (II)	Буферний розчин Брітона Робінсона	675	8.5-70 мкг/мл	МВ 5.56 мкг/мл
2. [11]	Таб-летки, капсули, субс-танції	БТС, 2,3-дихлор-5,6-диціано-1,4-бензохінон (ДДБХ)	Буферний розчин рН 3.4, хлоро-форм (БТС), ацетоніт-рил (ДДБХ)	413 (БТС), 457 (ДДБХ)	2.0-40.0 мкг/мл ⁻¹ (БТС), 5.0-25.0 мкг/мл ⁻¹ (ДДБХ)	БТС МВ 0.363 мкг/мл ⁻¹ , МКВ 1.10 мкг/мл ⁻¹ , ДДБХ МВ 0.746 мкг/мл ⁻¹ , МКВ 2.286 мкг/мл ⁻¹
3. [12]	Субс-танції та ЛЗ	2,3- дихлор-1,4-нафтохінон	Диметил формаїд (ДМФА)	493	18.00-28.00 мкг/100 мл	МВ 1.48 мг/100 мл, МКВ 4.49 мг/100 мл
4. [13]	ЛЗ	- нульове, перше, друге та третє похідне	Метанол	Нульове похідне 240-310, перше похідне при 265, 278 та 285, друге похідне при 276, 279, 287 та 282, третє похідне при 275, 278 та 281	-	-
5. [14]	Субс-танції та таблетки	-	Фосфат-ний буфер рН 6.8	223, 226	5-25 мкг/мл	МВ 0.0498 мкг/мл та 0.765 мкг/мл, МКВ 0.232 мкг/мл та 0.280 мкг/мл
6. [15]	ЛФ	Лужний розчин калію перманганат у 25+/-1 °С	0.60 М NaOH	610	10-60 мкг/10 мл	МВ 0.15 мкг/мл ⁻¹ , 0.44 мкг/мл ⁻¹
7. [16]	Комбі-нація з олме-сарта-ном	-	Метанол	223	5.0-30.00 мкг/мл	МВ 0.98 мкг/мл, МКВ 3.25 мкг/мл

Продовження таблиці 1.2

1	2	3	4	5	6	7
8. [17]	Комбі- нація з олме- сарта- ном	-	Метанол	221	5.0-25.0 мкг/мл	МВ 0.3 мкг/мл, МКВ 0.9 мкг/мл
9. [18]	Коміб- нація з триме- тазиди- ном	-	Вода	243.93, 274 та 254, 280 та 260	54-270 мкг/мл	МВ 9.76 мкг/мл, МКВ 29.6 мкг/мл

Mustafa Cesme et al. розроблено спектрофотометричну методику визначення метопрололу тартрату в ЛЗ за реакцією з солями Cu (II). Взаємодія відбувалась в середовищі буферного розчину Бріттона-Робінсона з рН 6.0. Утворений продукт взаємодії синього кольору мав максимум поглинання за довжини хвилі 675 нм та підпорядковувався закону Бера в концентраціях 8.5-70 мкг/мл. Проведено валідацію аналітичної методики. Коефіцієнт кореляції та МВ становили 0.998 мкг/мл та 5.56 мкг/мл, відповідно. Розроблена спектрофотометрична методика може застосовуватися для аналізу метопрололу тартрату в таблетках [10].

Вченими з Саудівської Аравії описано дві спектрофотометричні методики визначення метопрололу тартрату в ЛЗ за реакцією з БТС та 2,3-дихлор-5,6-діціано-1,4-бензохіноном. Максимум поглинання утвореного комплексу жовтого кольору метопрололу за реакцією з БТС спостерігався за довжини хвилі 413 нм, тоді як утворена реакційна суміш оранжевого кольору метопрололу з 2,3-дихлор-5,6-діціано-1,4-бензохіноном мала максимум поглинання за довжини хвилі 457 нм. Методики були лінійними в діапазоні концентрацій 2.0-40.0 мкг/мл⁻¹ (БТС) та 5.0-25.0 мкг/мл⁻¹ (ДДБХ). Запропоновані спектрофотометричні методики можуть застосовуватися для прецизійного визначення метопрололу тартрату як в субстанціях, так і в ЛЗ [11].

Науковцями з Запорізького державного медичного університету під керівництвом проф. Васюк С. О. розроблено спектрофотометричну методику

визначення метопрололу тартрату в субстанціях та ЛФ. Суть методики полягала у взаємодії метопрололу тартрату з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном в середовищі ДМФА з утворенням комплексу з максимумом поглинання за довжини хвилі 493 нм. Проведено валідацію аналітичної методики відповідно до вимог ДФУ. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 18.00-28.00 мг/100 мл. МВ та МКВ становили 1.48 мг/100 мл та 4.49 мг/100 мл, відповідно. Розроблена спектрофотометрична методика визначення метопрололу тартрату за реакцією з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном в середовищі ДМФА може застосовуватися для рутинного аналізу в лабораторіях з контролю якості [12].

Турецьким вченим Yılmaz B. запропоновано УФ-спектрофотометричну методику визначення метопрололу в ЛФ за його нульовою, першою, другою та третьою похідними в середовищі метанолу. Максимуми поглинання за нульовою похідною спостерігався за довжини хвилі 276 нм, першою похідною – за довжин хвиль 265 нм, 278 нм та 285 нм, другою похідною – за довжин хвиль 276 нм, 279 нм, 287 нм та 282 нм, третьою похідною – за довжин хвиль 275 нм, 278 нм та 281 нм. Проведено валідацію аналітичної методики. Лінійність для всіх похідних спостерігалась в діапазоні концентрацій 3.0-20 мкг/мл. МК та МКВ для нульової похідної становили 0.8 мкг/мл та 2.42 мкг/мл, відповідно. Для похідної першого порядку МВ та МВК за довжини хвилі 265 нм становила 0.73 мкг/мл та 2.21 мкг/мл, 278 нм – 0.72 мкг/мл та 2.18 мкг/мл, 285 нм – 0.70 мкг/мл та 2.12 мкг/мл, відповідно. Для другої похідної МВ та МВК за довжини хвилі 276 нм становила 0.78 мкг/мл та 2.36 мкг/мл, 279 нм – 0.52 мкг/мл та 1.58 мкг/мл, 287 нм – 0.62 мкг/мл та 1.88 мкг/мл, 282 нм – 0.63 мкг/мл та 1.92 мкг/мл, відповідно. МВ та МКВ для третьої похідної становили за довжини хвилі 275 нм 0.72 мкг/мл та 2.18 мкг/мл, 278 нм – 0.64 мкг/мл та 1.94 мкг/мл, 285 нм – 0.62 мкг/мл та 1.88 мкг/мл, відповідно. Розроблена УФ-спектрофотометрична методика визначення метопрололу в ЛЗ може застосовуватися в рутинному аналізі ЛФ метопрололу [13].

Jadhav A. S. et al. описано УФ-спектрофотометричну методику визначення метопрололу сукцинату в субстанції та ЛЗ з використанням фосфатного

буферного розчину рН 6.8. Максимуми поглинання спостерігалися за довжини хвиль 223 нм (метод I) та 226 нм (метод II). Аналітична методика була лінійною в діапазоні концентрацій 5 – 25 мкг/мл, коефіцієнт кореляції становив 0.9999 та 0.9799 для методу I та II, відповідно. МКВ для I методу становила 0.232 мкг/мл, для II методу – 0.280 мкг/мл. МВ становила 0.0498 мкг/мл та 0.765 мкг/мл для I та II методу, відповідно. Розроблена УФ-спектрофотометрична методика може бути використана для аналізу метопрололу сукцинату в таблетках для проведення рутинного аналізу ЛФ [14].

Індійськими вченими розроблено кінетичну спектрофотометричну методику визначення метопрололу тартрату в ЛЗ за реакцією з лужним розчином калію перманганату. Максимум поглинання утвореної реакційної суміші спостерігався за довжини хвилі 610 нм. При взаємодії метопрололу тартрату з лужним розчином калію перманганату відбувається утворення манганат йону, який утворюється внаслідок відновлення калію перманганату, що призводить до появи забарвлення, яке стає інтенсивніше в залежності від часу. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 10-60 мкг/10 мл. Розроблена спектрофотометрична методика може застосовуватися лабораторіями з контролю якості для аналізу метопрололу в ЛЗ, оскільки не вимагає застосування дороговартісних реактивів та тривалої пробопідготовки [15].

Вченими Vachhani K. H. та Patel S. A. описано спектрофотометричну методику одночасного визначення метопрололу сукцинату та олмесартану медоксомолу в таблетках. Методика базувалася на визначенні подвійної довжини хвилі, при якому різниця поглинання була прямо пропорційною концентрації компоненту. Таким чином для визначення метопрололу сукцинату обрано довжини хвиль 225.2 нм та 258.2 нм, а для олмесартану медоксомолу – 211 нм та 229.8 нм. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 5–30 мкг/мл. МВ для метопрололу становила 0.98 мкг/мл (223 нм) та 0.95 мкг/мл (255.4 нм), а для олмесартану 0.92 мкг/мл (223 нм) та 1.03 мкг/мл (255.4 нм). МКВ становила 3.25 мкг/мл (223 нм) та 2.81 мкг/мл (255.4 нм) для метопрололу, а 3.04 мкг/мл (223 нм) та 3.40 мкг/мл (255.4 нм) для олмесартану. Запропонована

спектрофотометрична методика може застосовуватися для визначення метопрололу сукцинату та олмесартану медоксомолу в таблетках [16].

Індійськими науковцями розроблено УФ-спектрофотометричну методику визначення метопрололу сукцинату та олмесартану медоксомолу в таблетках. Максимум поглинання водних розчинів метопрололу та олмесартану спостерігався за довжин хвиль 221 нм та 257 нм, відповідно. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 5-25 мкг/мл для метопрололу та 4-20 мкг/мл для олмесартану. МВ та МКВ метопрололу становили 0.3 мкг/мл та 0.9 мкг/мл, відповідно. Розроблена УФ-спектрофотометрична методика визначення метопрололу та олмесартану в таблетках може застосовуватися для рутинного аналізу ЛФ метопрололу в лабораторіях з контролю якості [17].

Вченими Ekta S. Patel et al. запропоновано УФ-спектрофотометричну методику одночасного визначення метопрололу сукцинату та триметазидину гідрохлориду в таблетках, яка ґрунтувалася на визначенні подвійної довжини хвилі. Розроблена методика була валідована відповідно до вимог ІСН. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 40-200 мкг/мл для триметазидину гідрохлориду та 54-270 мкг/мл для метопрололу сукцинату. Запропонована спектрофотометрична методика може застосовуватися для аналізу субстанцій та таблеток метопрололу та триметазидину [18].

У наукових джерелах літератури описано хроматографічні методики визначення метопрололу в субстанціях, ЛЗ та біологічних рідинах [19-38]. Індійськими вченими описано ВЕРХ методику визначення метопрололу тартрату та амлодипіну бесилату в таблетках з використанням рухомої фази, що складалась з 0.03 М фосфатного буферу (рН 3.5) та ацетонітрилу у співвідношенні 32:68. Для дослідження використовували колонку ODS C18 (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм) класу L1, ізократичне елюювання зі швидкістю потоку рухомої фази – 1.2 мл/хв та УФ детектуванням за довжини хвилі 230 нм. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 8-12 мкг/мл. Розроблена хроматографічна методика визначення метопрололу тартрату та амлодипіну бесилату в ЛЗ може застосовуватись для рутинного аналізу в лабораторіях з контролю якості [19].

Методику оберненофазової ВЕРХ із спектрофотометричним детектуванням для визначення метопрололу сукцинату та гідрохлортіазиду в таблетках розроблено вченими Singh Brijesh et al. Для аналізу метопрололу сукцинату та гідрохлортіазиду використовували хроматографічну колонку Lichrospher Merck (250 мм × 4 мм, 5 мкм) та рухоми фазу – суміш 50 мМ динатрію гідроген фосфату, метанолу, ацетонітрилу (525:225:250). Швидкість потоку рухоми фазу – 1 мл/хв, температура 24±2 °С, детектування – за довжини хвилі 222 нм. Час утримування та вміст метопрололу сукцинату складав 5.38 хв. та 96.05 %, тоді як гідрохлортіазиду – 3.04 хв та 97.64 %, відповідно. Проведено валідацію хроматографічної методики. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 2-32 мкг/мл для обох аналітів. Описана ВЕРХ-методика придатна для аналізу метопрололу сукцинату та гідрохлортіазиду в таблетках [20].

Prasad P. N. et al. запропоновано ВЕРХ-методику визначення метопрололу тартрату та хлорталідону в таблетках з використанням оберненофазової колонки RP18 (250 мм × 4.6 мм, 5 мкм), УФ- детектування за довжини хвилі 254 нм та рухоми фазу, що складалася з метанолу, ацетонітрилу та 0.05 М фосфатного буферного розчину (60:20:20). Швидкість потоку рухоми фазу – 1.0 мл/хв, час утримування метопрололу тартрату складав 2.5 хв, хлорталідону – 4.25 хв. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 10-60 мкг/мл. Розроблена ВЕРХ-методика може використовуватися для аналізу метопрололу тартрату та хлорталідону в таблетках [21].

Індійськими науковцями Mahaparale S. P. et al. розроблено ВЕРХ/УФ методику одночасного визначення метопрололу сукцинату та телмісартану в ЛЗ. Хроматографічні умови: колонка HiQ Sil C₁₈ (250 мм × 4.6 мм, 5 мкм), рухома фаза – метанол- натрію дигідроген фосфатний буфер – гексансульфонова кислота (80:10:10), швидкість потоку рухоми фазу – 1 мл/хв, детектування за довжини хвилі 223 нм. Час утримування метопрололу сукцинату становив 3.067 хв, тоді як телмісартану – 5.653 хв. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 5-80 мкг/мл для метопрололу сукцинату та 5-60 мкг/мл для телмісартану. Запропонована ВЕРХ/УФ методика є простою та експресною,

тому може використовуватись для аналізу метопрололу сукцинату та телмісартану в ЛЗ [22].

Вченими Braza A. J., Modamio P., Lastra C. F. та Marino E. L описано ВЕРХ-методику визначення бісопрололу та метопрололу в плазмі крові з флуорометричним детектуванням. Для екстракції з плазми крові бісопрололу та метопрололу використовували рідинно-рідинну екстракцію із застосуванням діетилового ефіру та дихлорометану. Дослідження проводилось з використанням колонки Nucleosil C₁₈, час утримування метопрололу становив 3.2 хв, бісопрололу – 8.7 хв. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 6.25-200 нг/мл. Запропонована ВЕРХ-методика може застосовуватися для вивчення фармакокінетики та визначення метопрололу та бісопрололу в плазмі крові [23].

Китайськими вченими з Університету Гонконгу запропоновано ВЕРХ-методику визначення метопрололу та його двох основних метаболітів в сечі з використанням ізократичного елююванням та твердофазної екстракції. Хроматографування проводилося на колонці Novapak C 100 мм x 5 мм, 4 мкм, швидкість потоку рухомої фази – 1.4 мл/хв. Рухома фаза складалась з ацетонітрилу, метанолу, триетиламіну/фосфатного буферу рН 3.0 (9:1:90). Детектування проводили з використанням УФ- моніторингу за довжини хвилі 229 нм та 309 нм. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 0.25-40.0 мг/мл. Використання твердофазної екстракції дає ряд переваг методиці (мінімізація втрат аналіту та екологічну безпеку) [24].

Вченими Johnson R. D. та Lewis R. J. розроблено методику визначення атенололу, метопрололу та пропранололу методом рідинної хроматографії з градієнтним елююванням та МС-детектуванням. Запропоновані умови хроматографічного визначення дозволили отримати високу селективність методики, оскільки нівелюється вплив метаболітів та ендогенний вплив матриці на визначення атенололу, метопрололу та пропранололу. До складу рухомої фази входили водна суміш (50 мМ форміатного буфера, доведеного до рН 5.0 амоній гідроксидом, та ацетонітрил (98:2)) та метанол, що подавались зі швидкістю – 1 мл/хв. Загальний час хроматографування становив 8 хв. МВ атенололу

становила 0.78 нг/мл, метопрололу – 0.39 нг/мл та пропранололу – 0.39 нг/мл. МКВ атенололу та метопрололу була 1.6 нг/мл, пропранололу – 0.78 нг/мл. Застосування даної методики дозволяє визначати речовини без дериватизації, що в загальному позитивно впливає на час та вартість дослідження [25].

Науковцями з Нової Зеландії описано методику визначення R- та S-ізомерів метопрололу в плазмі крові з використанням стереоселективної рідинної хроматографії з рухомою фазою, що складалася з метанолу, кислоти оцтової та розчину аміаку (100:0.15:0.15). Екстрагування з матриці відбувалось рідинно- рідинною екстракцією з використанням етилацетату. Умови хроматографування – хіральна T колонка (250 мм × 4.6 мм, 5 мкм), ізократичне елюювання зі швидкістю потоку рухомої фази – 1 мл/хв, детектування – за допомогою МС. Запропонована ВЕРХ-МС/МС методика може використовуватись для визначення R- та S-ізомерів метопрололу в плазмі крові [26].

Науковцями Gowda K. V. et al. розроблено ВЕРХ-МС/МС методику одночасного визначення метопрололу тартрату та раміприлу в плазмі крові з використанням колонки C8 (50 мм × 3 мм, 3 мкм) та рухомої фази – 10 мМ амоній форміату та метанолу (3:97). Аналіти екстрагувалися з біологічної матриці рідинно-рідинною екстракцією за допомогою діетилового етеру та дихлорометану (70:30). Швидкість потоку рухомої фази складала 1 мл/хв, температура колонки – 23 °С, загальний час хроматографування – 5 хв. МКВ метопрололу тартрату та раміприлу становила 1 нг/мл, МКВ – 5 нг/мл. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 5-500 нг/мл. Завдяки високій селективності запропонована методика може застосовуватися для визначення метопрололу тартрату та раміприлу в плазмі крові в клінічній та токсикологічній практиці [27].

Науковцями Stefanie Albers et al. запропоновано ВЕРХ-методику визначення метопрололу тартрату в крові із застосуванням твердофазової екстракції та флуорометричного детектування. Хроматографування проводили з використанням рухомої фази, що складалась з 30 % ацетонітрилу та 70 % 0.25 М натрію ацетатного буферу (рН 4.0), хроматографічної колонки Spherisorb C6 (5 мкм).

МКВ становила 2.4 нг/мл. Розроблена методика може застосовуватися для вивчення фармакокінетики та визначення метопрололу тартрату в крові [28].

Індійськими вченими Nirmal Thakker et al. описано біоаналітичну УВЕРХ методику визначення метопрололу сукцинату та олмесартану з МС/МС детектуванням. Для хроматографування використовували колонку Shimadzu Shimpack-C18 GIST AQ (50 мм × 2.1 мм, 1.9 мкм), градієнтне елюювання, рухомої фази, що складалася з розчину А (0.1 % кислота мурашина у воді) та розчину В (ацетонітрил), із швидкістю потоку рухомої фази – 0.3 мл/хв. Визначувані речовини екстрагували з плазми крові за допомогою ацетонітрилу. Загальний час хроматографування складав 4 хв (1.029 хв для метопрололу сукцинату та 2.514 хв для олмесартану). Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 5-1500 нг/мл, НМКВ становила 5 нг/мл для обох аналітів. Розроблена УВЕРХ методика може використовуватися для визначення метопрололу сукцинату та олмесартану в плазмі крові [29]. Роком пізніше (2023 р.) тією самою науковою групою розроблено УВЕРХ методику визначення домішок метопрололу сукцинату та олмесартану медоксомолу в таблетках з використанням градієнтного елюювання, хроматографічної колонки Shimadzu Shimpack GIST-C18 (100 мм x 2.1 мм, 2 мкм), рухомої фази – 0.1 % кислоти фосфорної у воді (А), ацетонітрилу (В). Загальний час хроматографування складав 16 хв. Запропонована методика може використовуватися для визначення домішок метопрололу та олмесартану в таблетках [30].

Науковцями Madhuri A. Hinge et al. описано ВЕРХ/УФ методику одночасного визначення триметазидину гідрохлориду та метопрололу сукцинату в субстанціях та ЛЗ. Довжина хвилі детектування становила 274 нм. Для виконання дослідження використовували хроматографічну колонку Enable C18 (250 x 4.6 мм, 5 мкм), рухомої фази – вода – метанол – ацетонітрил (45:45:10), швидкість потоку рухомої фази – 1 мл/хв. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 20-120 мкг/мл та 27 -162 мкг/мл для триметазидину гідрохлориду та метопрололу сукцинату, відповідно. МВ триметазидину гідрохлориду

становила 1.205 мкг/мл, метопрололу сукцинату – 1.53 мкг/мл. МКВ складала 3.652 та 4.64 мкг/мл триметазидину гідрохлориду та метопрололу сукцинату, відповідно. Час утримування триметазидину гідрохлориду склав (2.61 ± 0.175) хв та (4.12 ± 0.129) хв для метопрололу сукцинату. Запропонована методика може застосовуватися лабораторіями з контролю якості для одночасного визначення триметазидину гідрохлориду та метопрололу сукцинату в субстанціях та ЛЗ [31].

Ojeuyemi Matthew Olabemiwo et al. запропоновано ВЕРХ/УФ методику одночасного визначення метопрололу сукцинату та олмесартану медоксомолу в субстанції та ЛЗ з використанням колонки Agilent Eclipse XBD-C18 (150 мм × 4.6 мм, 5 мкм), ізократичного елюювання, УФ-детектування за довжини хвилі 225 нм, рухомої фази – ацетонітрил та буферний розчин 10 мМ калію дигідрофосфат (70:30). Час утримування метопрололу становив 2.233 хв, олмесартану – 3.00 хв. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 2-15 мкг/мл для визначення метопрололу та 2-12 мкг/мл для визначення олмесартану медоксомолу. Запропоновану експресну ВЕРХ методику одночасного визначення метопрололу сукцинату та олмесартану медоксомолу можна використовувати в рутинному аналізі ЛЗ [32].

Китайськими науковцями описано методику визначення β -адреноблокаторів та β_2 -агоністів методом ВЕРХ МС/МС за допомогою магнітної твердофазної екстракції з біологічних матеріалів [33].

Методики ВЕРХ та УФ-спектрофотометрії розроблено індійськими вченими Shashank Soni et al. для визначення метопрололу сукцинату в субстанціях та ЛЗ. Хроматографування проводилося з використанням колонки Water Spherisorb (4.6 мм x 250 мм, 5 мкм) та рухомої фази – ацетонітрил – кислота фосфорна – вода (рН 3.0). Загальний час хроматографування становив 10 хв. УФ-моніторинг та спектрофотометричне визначення проводилося за довжини хвилі 224 нм. Лінійність хроматографічної методики була підтверджена в діапазоні концентрацій 10-50 мкг/мл, спектрофотометричної 2-10 мкг/мл. МВ та МКВ метопрололу сукцинату становили 0.0955 мкг/мл та 0.2896 мкг/мл, відповідно.

Розроблені аналітичні методики можуть застосовуватися в рутинному аналізі для визначення метопрололу сукцинату в субстанціях та ЛЗ [34].

Сирійськими вченими Younes O. M. et al. запропоновано ВЕРХ методику визначення метопрололу тартрату та енантіомерів з додаванням до рухомої фази метилбетациклодекстрину як хірального компонента. Детектування проводилося за довжини хвилі 274 нм. Для аналізу використовували рухому фазу, що складалася з водного розчину (до 1 л води для ВЕРХ додали 3.3 мл триетиламіну та довели до рН 3.1 кислотою оцтовою льодяною) 1.5 г/л метил бетациклодекстрину та метанолу (86:14), та хроматографічну колонку Macherey Nagel C18 (250 мм×4.6 мм, 5.0 мкм). Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 182.5-1000 мг/л. В результаті додавання хірального компонента з'явилася можливість розділення та визначення енантіомерів метопрололу тартрату, що є економічно вигідним, оскільки не потрібно застосовувати дороговартісну хіральною колонку та простим, бо не вимагає застосування похідних діастереомерів для визначення енантіомерів. МВ становила 7.48 мг/л та 5.83 мг/л для R і S енантіомерів, відповідно. Запропонована методика може застосовуватися в рутинному аналізі для визначення метопрололу тартрату та його енантіомерів в ЛЗ [35].

Natem Elmongy et al. описано біоаналітичну методику визначення метопрололу в плазмі крові та слині за допомогою ВЕРХ-МС/МС. Хроматографування проводилося з використанням ізократичного елюювання, колонки Cellulose-SB (150мм × 4.6 мм, 5 мкм), рухомої фази, що складалася з 0.1 % амонію гідроксиду в гексані та ізопропанолу (80:20). Загальний час хроматографування склав 10 хв. МВ та МКВ становили 0.5 нг/мл та 2.5 нг/мл, відповідно для обох енантіомерів в плазмі крові та слині. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 2.5- 500 нг/мл для R і S енантіомерів. Запропонована методика може застосовуватися для аналізу терапевтичного рівня метопрололу та його енантіомерів в крові та слині [36].

Індійськими вченими Jain N. et al. розроблено ВЕРХ/УФ методику визначення метопрололу сукцинату та лацидипіну в бінарній комбінації з

використанням ізократичного елюювання, рухомої фази – ацетонітрил та 20 мМ фосфатний буферний розчин (рН 3.6) (60:40), хроматографічної колонки Prontosil C 18 (250 мм x 4.60 мм, 5 мкм) та детектування за довжини хвилі 278 нм. Час утримування метопрололу сукцинату та лацидипіну становив 5.25 хв та 6.72 хв, відповідно. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 5-25 мкг/мл для метопрололу та 4-40 мкг/мл для лацидипіну. Розроблена методика може застосовуватися для визначення метопрололу сукцинату та лацидипіну в субстанціях та в бінарній суміші [37].

Mahvash Iram та Shobha Rani R. Н запропоновано ВЕРХ-методику визначення метопрололу в плазмі крові з використанням хроматографічної колонки Grace C₁₈ ODS (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм) та ізократичного елюювання рухомою фазою – ацетонітрилом та калію фосфатним буфером (рН 3.0) (60:40). Детектування проводиться за довжини хвилі 262 нм. Час утримування метопрололу та пропанололу становив (4.14 ± 0.02) хв та (3.89 ± 0.05) хв, відповідно. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 2-20 мкг/мл. МВ та МКВ становили 30 нг/мл та 50 нг/мл, відповідно. Розроблена методика може застосовуватися для вивчення фармакокінетики метопрололу [38].

ВЕРХ/УФ методики визначення метопрололу в субстанції, ЛЗ та плазмі крові, які описано в літературних джерелах, узагальнено в табл. 1.3.

Таблиця 1.3 – ВЕРХ/УФ методики визначення метопрололу в субстанції, ЛЗ та плазмі крові, які наведено в науковій літературі

№	Зразок	Хроматографіч на колонка	Рухома фаза	Детектування	Хроматографічні умови	Діапазон застосування методики	Посилання на джерело літератури
1	2	3	4	5	6	7	8
1	Комбінація з амлодипіном	ODS C18 (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм) класу L1	0.03 М фосфатний буфер та ацетонітрил рН 3.5 (32:68)	УФ (230 нм)	Швидкість потоку рухомої фази – 1.2 мл/хв	8-12 мкг/мл	[19]

Продовження таблиці 1.3

1	2	3	4	5	6	7	8
2	Комбінація з гідрохлоріазином	Lichrospher Merck (250 мм×4 мм, 5 мкм)	50 мМ динатрію гідроген фосфат – метанол – ацетонітрил (525:225:250)	УФ (222 нм)	Швидкість потоку рухомої фази – 1.0 мл/хв	2-32 мкг/мл	[20]
3	Комбінація з хлорталідоном	RP18 (250 мм ×4.6 мм, 5 мкм)	Метанол – ацетонітрил – 0.05 М фосфатний буферний розчин (60:20:20)	УФ (254 нм)	Швидкість потоку рухомої фази – 1.0 мл/хв	10-60 мкг/мл	[21]
4	Комбінація з телмісартаном	HiQ Sil C ₁₈ (250 × 4.6 м, 5 мкм)	Метанол- натрію дигідроген фосфатний буфер-гексан сульфонова кислота (80:10:10)	УФ (223 нм)	Швидкість потоку рухомої фази – 1.0 мл/хв	5-80 мкг/мл	[22]
5	Комбінація з триметазидину гідрохлоридом	Enable C18 (250 x 4.6 мм, 5 мкм)	Вода- метанол – ацетонітрил рН 3.0 (45:45:10)	УФ (274 нм)	Швидкість потоку рухомої фази – 1.0 мл/хв	27 -162 мкг/мл	[31]
6	Комбінація з олмесартаном	Agilent Eclipse XBD-C18 (150 мм × 4.6 мм, 5 мкм)	Ацетонітрил та буферний розчин (10 мМ калію дигідрофосфат) (70:30)	УФ (225 нм)	Швидкість потоку рухомої фази – 0.6 мл/хв	2-15 мкг/мл	[32]
7	Субстанції та ЛЗ	Water Spherisorb (4.6 мм x 250мм, 5 мкм)	Ацетонітрил-кислота фосфорна - вода рН 3.0	УФ (224 нм)	Швидкість потоку рухомої фази – 2.0 мл/хв	10-50 мкг/мл	[34]
8	ЛЗ	Macherey Nagel C18 (250 мм×4.6 мм, 5.0 мкм)	1.5 г/л метил бета циклодекстрину водного розчину та метанол (86: 14)	УФ (274 нм)	Швидкість потоку рухомої фази – 0.5 мл/хв	182.5-1000 мг/л	[35]
9	Комбінація з лацидипіном	Prontosil C 18 (250 мм x 4.60 мм, 5 мкм)	Ацетонітрил та 20 мМ фосфатний буферний розчин (60:40 рН 3.6).	УФ (278)	Швидкість потоку рухомої фази – 1.0 мл/хв	5-25 мкг/мл	[37]
10	Плазма крові	Grace C ₁₈ ODS (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм)	Ацетонітрил – калію фосфатний буфер рН 3.0 (60:40)	УФ (262 нм)	Швидкість потоку рухомої фази – 1.0 мл/хв	2-20 мкг/мл	[38]

1.3 Огляд аналітичних та біоаналітичних методик аналізу мельдонію

У ДФУ відсутня монографія на субстанцію мельдонію. У ЄФ є монографія на субстанцію мельдонію дигідрату. ЄФ регламентує проведення ідентифікації мельдонію дигідрату методом абсорбційної спектрофотометрії в ІЧ області, кількісне визначення – титриметричним методом (ацидиметрія у неводному середовищі) з потенціометричною фіксацією точки титрування [3].

В науковій літературі представлено численні хроматографічні методики [39-52] та одна спектрофотометрична методика [53] визначення мельдонію в субстанції, ЛЗ та біологічних рідинах. Спектрофотометричне визначення мельдонію в ЛФ запропоноване науковою групою з Запорізького державного медичного університету під керівництвом проф. Васюк С. О. та базується на утворенні забарвленого продукту реакції мельдонію з *n*-хлоранілом в середовищі ДМФА з максимумом поглинання за довжини хвилі 556 нм [53]. Пробопідготовка вихідних розчинів включала розчинення наважки мельдонію у воді та ДМФА та *n*-хлоранілу в ДМФА. Утворений комплекс мельдонію з *n*-хлоранілом та компенсаційний розчин (*n*-хлораніл в ДМФА) перед вимірюванням нагрівали впродовж 20 хв на водяній бані при температурі 95 °С. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 8.00-20.00 мг/100 мл. Розроблена спектрофотометрична методика визначення мельдонію в ЛФ може застосовуватися в лабораторіях з контролю якості для рутинного аналізу.

Китайськими вченими з Шеньянського фармацевтичного університету запропоновано біоаналітичну методику визначення мельдонію в сечі та плазмі крові, яка базувалася на застосуванні методу ВЕРХ-МС/МС. Хроматографічні умови: хроматографічна колонка Inersil NH3 (250 мм × 4.6 мм, 5 мкм), рухома фаза – вода 60 % – метанол 40 %, швидкість потоку рухомої фази – 500 мкл/хв, температура колонки – 25 °С. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 1.0 -20000 нг/мл⁻¹. НМКВ становила 1 нг/мл⁻¹. Запропонована хроматографічна методика може використовуватися для вивчення фармакокінетики мельдонію [39].

Іншою науковою групою з Китаю Ye Peng et al. розроблено ВЕРХ-МС/МС методику визначення мельдонію в плазмі крові з використанням хроматографічної колонки C_{18} (150 мм × 4.6 мм, 5 мкм), ізократичного елюювання рухомої фази, що складалась з метанолу та 10 мМ амонію ацетату (55:45). Швидкість потоку рухомої фази становила 0.4 мл/хв, температура колонки – 35 °С. Час хроматографування складав 5.8 хв. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 0.01- 20.0 мкг/мл. Розроблена ВЕРХ-МС/МС методика визначення мельдонію в плазмі може застосовуватися для вивчення фармакокінетики [40].

Українськими науковцями Pidpruzhnykov Y. V. et al. запропоновано УВЕРХ/МС/МС методику визначення мельдонію для вивчення біоеквивалентності пероральних ЛФ з використанням колонки Waters Acquity UPLC_W VEN HILIC (50 мм × 2.1 мм, 1.7 мкм) та рухомої фази – води, ацетонітрилу та 200 мМ кислоти мурашиної (доведеної до рН 3.0 12.5 % розчином амонію гідроксидом) (25:70:5). Швидкість потоку рухомої фази становила 0.3 мл/хв, температура колонки – 40 °С. Загальний час хроматографування становив 1.4 хв. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 10-6000 нг/мл. Запропонована УВЕРХ/МС/МС методика визначення мельдонію може застосовуватися для вивчення біоеквивалентності пероральних ЛФ мельдонію [41].

Німецькими науковцями Christian Görgens et al. запропоновано ВЕРХ/МС методику визначення мельдонію в сечі для проведення допінг контролю з використанням хроматографічної колонки Nucleodur HILIC (100 мм x 2 мм, 1.8 мкм), градієнтного елюювання, рухомої фази, що складалась з деіонізованої води (розчин А) та ацетонітрилу (розчин В), 200 мМ амонію ацетатного буфера (розчин С). Швидкість потоку рухомої фази становила 250 мкл/хв. Загальний час хроматографування склав 18 хв. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 1.0-12.5 мкг/мл. Запропонована методика може застосовуватися для визначення мельдонію в сечі при проведенні допінг контролю [42].

Daniely Oliveira et al. розроблено ВЕРХ/МС методику визначення мельдонію та понад 300 інших допінгових речовин, що базувалася на градієнтному елююванні з використанням хроматографічної колонки Synchronis C₁₈ (50 мм × 2.1 мм, 1.7 мкм), рухомої фази – 0.1 % кислоти мурашиної, 5 мМ амонію форміату у воді (А) та 0.1 % кислоти мурашиної в метанолі (В). Швидкість потоку рухомої фази складала 0.3 мл/хв. Час утримування мельдонію складав 0.5 хв. НМКВ становила 100.0 нг/мл. Розроблена методика може застосовуватися для визначення мельдонію та інших допінгових речовин у сечі [43].

ВЕРХ-методику визначення мельдонію та його аналогів (гамма-бутиробетаїну та карнітину) в плазмі крові запропоновано науковцями з Латвії. Для проведення даного дослідження використовувалася хроматографічна колонка Silasorb silica (4.6 мм x 150 мм) та рухома фаза складалась – ацетонітрил – 0.025 М фосфатний буфер (рН 5.7) (10:90). МКВ мельдонію, гамма-бутиробетаїну та карнітину становила 1.0 мкг/мл⁻¹, 2.5 мкг/мл⁻¹, 0.75 мкг/мл⁻¹, відповідно. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 5-100 мкг/мл⁻¹. Запропонована ВЕРХ-методика може застосовуватися для визначення мельдонію в плазмі крові [44].

Корейськими вченими запропоновано ВЕРХ-МС методику визначення мельдонію в сечі з використанням хроматографічної колонки Kinetex C18 (100 мм × 2.1 мм, 2.6 мкм) та рухомої фази – 0.1 % водний розчин кислоти мурашиної (А) та 0.1% кислота мурашина в метанолі (В). Швидкість потоку рухомої фази становила 0.5 мл/хв. Загальний час хроматографування складав 10 хв. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 50-2000 нг/мл. Розроблена ВЕРХ-МС методика може використовуватися для визначення мельдонію у сечі для проведення антидопінгового контролю [45].

Вченими Christian Görgens et al. запропоновано ВЕРХ МС/МС методику визначення мельдонію в сечі з використанням хроматографічної колонки Nucleodur HILIC та рухомої фази – 200 мМ амонію ацетатного буферу (0.15 % кислота оцтова рН 5.0 та деіонізована вода) та ацетонітрилу.

Науковцями підтверджена гіпотеза щодо нелінійного, двофазного та дозозалежного профілю виведення мельдонію з організму з МКВ у сечі не менше 10 нг/мл [46].

Li-Jing Cai et al. розроблено УВЕРХ-МС/МС методику визначення мельдонію в плазмі крові та сечі з використанням хроматографічної колонки UPLC VEN HILIC та рухомої фази – 0.08 % кислоти мурашиної в 30 мМ розчині амонію ацетату та ацетонітрилу. Загальний час хроматографування становив 3.5 хв. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 0.1-100.0 мкг/мл¹ для зразків плазми крові та 0.5-600.0 мкг/мл¹ для сечі. Запропонована методика може застосовуватися для вивчення фармакокінетики мельдонію [47].

Дослідження щодо підтвердження нелінійної фармакокінетики мельдонію проведено L. Tretzel et al. В даній роботі застосовувався метод ВЕРХ-МС/МС з використанням хроматографічної колонки Hypersil Gold C8 (2.1 мм × 30 мм, 1.9 мкм) та градієнтного елюювання рухомої фази, що складалась з 5 мМ амонію ацетатного буферу (рН 3.5) та ацетонітрилу. Загальний час хроматографування становив 13 хв. Лінійність методики підтверджено в діапазоні концентрацій 0-2000 нг/мл, НМКВ-20 нг/мл. Проаналізовано зразки двох здорових добровольців, одному з яких було введено перорально монодозу препарату 500 мг, а другому по 3 таблетки (500 мг) на добу впродовж 6 днів. Проаналізувавши дане дослідження можна зробити висновок, що багаторазове введення мельдонію призводить до другого етапу метаболізму, який передбачає включення препарату в еритроцити, що не спостерігається при застосуванні моноدوزи препарату [48].

Guro Forsdahl et al. запропоновано HILIC-МС/МС методику визначення мельдонію в сечі з використанням колонки Atlantis HILIC Silica (50 мм × 4.6 мм, 3 мкм) та градієнтного елюювання рухомою фазою – 0.2 % кислоти мурашиної у воді (А) та 0.1 % кислотою мурашиною у метанолі (В). Швидкість потоку рухомої фази складала 0.4 мл/хв⁻¹, температура колонки – 25 °С. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 10-4000 нг/мл¹.

Запропонована методика може застосовуватися для вивчення фармакокінетики мельдонію у сечі [49].

Латвійськими вченими розроблено HILIC методику визначення мельдонію та його шести домішок в субстанції з використанням колонок Discovery cyano, Hypersil APS-1, Atlantis HILIC silica, Alltima HP silica, Spherisorb silica, ZIC-HILIC та рухомої фази, що складалась з ацетонітрилу та 0.1 % кислоти мурашиної у воді або амонію форміатного буферного розчину. Швидкість потоку рухомої фази – 0.2 мл/хв, температура колонки – 30°C. Встановлено, що розділення четвертинних похідних гідразину можливе як на колонках HILIC, які виробники спеціально позиціонують як тип HILIC, так і на звичайних колонках з кремнеземом. Спеціалізовані колонки демонструють слабше утримування і більш придатні для розділення при високих концентраціях ацетонітрилу. Найкращі результати показує колонка ZIC-HILIC. Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 0.0005–0.00125 мг/мл. Запропонована методика придатна для визначення чистоти АФІ мельдонію [50].

Lu R. F. et al. описано ВЕРХ-методику визначення мельдонію в інекційній ЛФ з використанням хроматографічної колонки NH2-3 (250 мм × 4.6 мм, 5мкм) та рухомої фази, що складалась з води та ацетонітрилу (65:35). Методика була лінійною в діапазоні концентрацій від 5-600.0 мкг/мл⁻¹. Запропонована ВЕРХ-методика може використовуватися для аналізу мельдонію в розчинах для ін'єкцій [51].

Китайськими вченими розроблено ВЕРХ методику визначення мельдонію та його домішок з використанням колонки CN – 3 (4.6 мм × 250 мм, 5 мкм) та рухомої фази – вода та ацетонітрил (80:20). Методика була лінійною в діапазоні концентрацій 10.3-814.4 мкг/мл⁻¹. Запропонована методика може застосовуватися для визначення мельдонію та його домішок [52].

Хроматографічні методики визначення мельдонію в субстанції, ЛЗ та біологічних рідинах, які описано в літературних джерелах, узагальнено у таблиці 1.4.

Таблиця 1.4 – Хроматографічні методи визначення мельдонію в субстанції, ЛЗ та біологічних рідинах, які наведено в науковій літературі

№	Зразок	Хроматографічна колонка	Рухома фаза	Діапазон застосування методики	Хроматографічні умови	Посилання на джерело літератури
1	2	3	4	5	6	7
1	Сеча та плазма крові	Inersil NH3 (250 мм × 4.6 мм, 5 мкм)	Вода – метанол (60:40)	1.0 -20000 нг/мл ⁻¹	Швидкість потоку рухомої фази – 500 мкл/хв	[39]
2	Плазма крові	C ₁₈ (150 мм × 4.6 мм, 5 мкм)	Метанол та 10 мМ амонію ацетат (55:45)	0.01- 20.0 мкг/мл	Швидкість потоку рухомої фази – 0.4 мл/хв	[40]
3	Біологічні рідини	Waters Acquity UPLC WVEN HILIC (50 мм × 2.1 мм, 1.7 мкм)	вода, ацетонітрилу та 200 мМ кислота мурашина (25:70:5)	10-6000 нг/мл	Швидкість потоку рухомої фази – 0.3 мл/хв	[41]
4	Сеча	Nucleodur HILIC (100 мм × 2 мм, 1.8 мкм)	Деіонізована вода (розчин А) – ацетонітрил (розчин В) – 200 мМ амонію ацетатний буфер (розчин С)	1.0-12.5 мкг/мл	Швидкість потоку рухомої фази – 250 мкл/хв	[42]
5	Сеча	The Synchronis C ₁₈ (50 мм × 2.1 мм, 1.7 мкм)	0.1 % кислота мурашина, 5 мМ амонію форміату у воді (А) та 0.1 % кислота мурашина в метанолі (В)	Не вказано НМКВ – 100.0 нг/мл	Швидкість потоку рухомої фази – 0.3 мл/хв	[43]
6	Плазмі крові	Silasorb silica (4.6 мм × 150 мм)	ацетонітрил – 0.025 М фосфатний буфер (рН 5.7) (10:90)	5-100 мкг/мл ⁻¹	Швидкість потоку рухомої фази – 1.5 мл/хв ⁻¹	[44]
7	Сеча	Kinetex C18 (100 мм × 2.1 мм, 2.6 мкм)	0.1 % водний розчин кислоти мурашиної (А) та 0.1 % кислота мурашина в метанолі (В)	50-2000 нг/мл	Швидкість потоку рухомої фази – 0.5 мл/хв	[45]

Продовження таблиці 1.4

1	2	3	4	5	6	7
8	Сеча	Nucleodur HILIC	200 мМ амонію ацетатного буферу (0.15 % кислота оцтова рН 5.0 та деіонізована вода) та ацетонітрилу	Не вказано МКВ – 10 нг/мл	Не вказано	[46]
9	Сеча та плазма крові	UPLC BEH HILIC	0.08 % кислота мурашина в 30 мМ розчині амонію ацетату та ацетонітрил	0.1-100.0 мкг/мл ⁻¹ для зразків плазми крові та 0.5-600.0 мкг/мл ⁻¹ для зразків сечі	Не вказано	[47]
10	Кров	Hypersil Gold C8 (2.1 мм×30 мм, 1.9 мкм)	5 мМ амонію ацетатний буфер (рН 3.5) та ацетонітрил	0- 2000 нг/мл	Не вказано	[48]
11	Сеча	Atlantis HILIC Silica (50 мм × 4.6 мм, 3 мкм)	0.2 % кислота мурашина у воді (А) та 0.1 % кислота мурашина у метанолі (В)	10-4000 нг/мл ¹	Швидкість потоку рухомої фази – 0.4 мл/хв ⁻¹	[49]
12	Субстанція	ZIC-HILIC (2.1 мм × 100 мм, 5 мкм)	Ацетонітрил та 0.1 % кислота мурашина у воді або амонію форміатний буферний розчин	0.0005– 0.00125 мг/мл	Швидкість потоку рухомої фази – 0.2 мл/хв	[50]
13	Ін'єкційні ЛФ	Колонка NH2-3 (250 мм×4.6 мм, 5мкм)	Вода та ацетонітрил (65:35)	5-600.0 мкг/мл ⁻¹	Не вказано	[51]
14	Субстанція	CN – 3 (4.6 мм × 250 мм, 5 мкм)	вода та ацетонітрил (80:20)	10.3-814.4 мкг/мл ⁻¹	Швидкість потоку – 2.5 мл/хв ⁻¹	[52]

1.4 Застосування принципів «зеленої» та «білої» хімії в розробці аналітичних та біоаналітичних методик визначення метопрололу та мельдонію в субстанціях, лікарських засобах та біологічних рідинах

Одним з пріоритетних завдань під час розробки аналітичних та біоаналітичних методик залишається імплементація принципів «зеленої» та «білої» хімії, оскільки із зростанням забруднення атмосфери актуальною як ніколи є мінімізація негативного впливу хімічних речовин та проведених досліджень на навколишнє середовище та людей, які безпосередньо виконують дослідження. При розробці аналітичних та біоаналітичних методик дотримання принципів «зеленої» хімії передбачає зменшення використання затрат енергії, газу, загальної кількості реактивів, особливо токсичних, що призводить, в свою чергу, до зменшення відходів під час проведення аналізу [54-68].

В 2012 році польськими вченими запропоновано метод визначення «зеленості» аналітичних методик з використанням аналітичної еко-шкали, яка базувалася на 12 принципах «зеленої хімії». Аналітична еко-шкала – напівкількісний метод визначення «зеленості» аналітичних методик, в основі якого покладено надання кожному етапу аналізу пенальті балів (через наявність несприятливого впливу на екологію), що сумуються та віднімаються від 100. Оцінка 75 та вище вказує на відмінний «зелений» аналіз, а нижче 50 – на негативний «зелений» аналіз [69].

Одним з найвідоміших та новітніх інструментів оцінки екологічності аналітичних методик є метод Analytical GREENness (AGREE), який запропоновано науковою групою іспанських та польських вчених [70]. Оpubлікована у 2020 році стаття в науковому журналі Analytical chemistry має вже більше 430 цитувань, що свідчить про те, що метод AGREE активно використовується науковцями при розрахунку «зеленості» методик. Більше того, авторами надано безкоштовний доступ до програмного забезпечення AGREE – аналітичного калькулятора, що значно полегшує розрахунок. Запропонований аналітичний калькулятор AGREE, який виводить результат у вигляді піктограми

з максимальним значенням 1.0, показує вплив кожного критерію на результат (варіація кольору від зеленого (екологічного) до червоного (небезпечного)) [70].

Ще одним досить популярним методом оцінки «зеленості» аналітичної методики є метод Green Analytical Procedure Index (GAPI) [71, 72]. Суть даного методу полягає в оцінці всієї методології дослідження, починаючи від аналізу операцій, які здійснюються перед аналітичною процедурою (Complex GAPI), реагентів, інструментів та етапів дослідження. При розрахунку екологічності методики методом GAPI науковці можуть побудувати піктограму у вигляді забарвленого шестикутника. Колір кожної з частин залежить від екологічності кожного кроку аналітичної процедури (зелений, жовтий та червоний). Відмінним у Complex GAPI від GAPI є наявність гексагональної частини на піктограмі, яка характеризує такі показники як реагенти, розчинники, умови, прилади, обробку та очищення. Метод GAPI є одним з пріоритетних для вивчення «зеленої» хімії, оскільки вказує на слабкі сторони в створенні безпечної аналітичної методики. Науковцями з Гданського технічного університету під керівництвом проф. J. Płotka-Wasyłka запропоновано підходи до розрахунку «зеленості» аналітичних методик методами GAPI, які опубліковано у високорейтинговому журналі *Talanta* в 2018 році [71]. Вказана стаття має вже більше 570 цитувань. Авторами також надається безкоштовний доступ до програмного забезпечення.

В 2021 році канадськими та польськими науковцями опубліковано статтю в високорейтинговому науковому журналі *Trends in Analytical Chemistry*, в якій описано підходи до розрахунку 12 принципів «білої» хімії як альтернативу 12 принципам «зеленої» хімії. Окрім критеріїв «зеленої» хімії (зелене кільце) науковці додали аналітичні та практичні аспекти для аналізу методології у вигляді червоного та синього кілець, при накладанні яких спостерігається утворення білого забарвлення (червоно-зелено-синя модель). Червоний колір в «білій» хімії відображає сферу застосування, МВ та МКВ, точність та прецизійність. Синій колір вказує на характеристику таких складових як економічність, трудомісткість, простота у експлуатації. Під зеленим кольором

розмістили показники токсичності реагентів, кількість реагентів та відходів, затрати енергії та прямі впливи на людину і навколишнє середовище. Описана методика показує значущість не тільки класичних підходів до «зеленої» хімії, а й аналітичні та практичні аспекти при розробці методик [73].

Що стосується описаних в науковій літературі методик визначення метопрололу та мельдонію в субстанції, ЛЗ та біологічних рідинах (підрозділ 1.2, 1.3), то, на жаль, принципи «зеленої» хімії при розробці більшості методик не враховувалися. Безапаречно, найбільш екологічно безпечними були УФ-спектрофотометричні методики визначення метопрололу в ЛЗ. Для прикладу, спектрофотометрична методика визначення метопрололу в субстанції та таблетках [14] має бал за методом AGREE 0.82. Науковцями досягнуто такого досить високого балу екологічності методики завдяки використанню методу прямої УФ-спектрофотометрії. Що стосується спектрофотометричних методик визначення метопрололу в субстанції та ЛЗ за реакцією з різними дериватизаційними реагентами, то такі методики мали значно нижчий бал за методом AGREE, оскільки передбачали використання реагентів та інколи токсичних розчинників. Для прикладу, спектрофотометрична методика визначення метопрололу в ЛФ [10] мала бал за методом AGREE 0.77, [11] – 0.65 та 0.77, [12] – 0.58, [13] – 0.74, [15] – 0.71. Що стосується хроматографічних методик визначення метопрололу в ЛЗ та біологічних рідинах, то бал за методом AGREE становив 0.60-0.74. Екологічна безпека спектрофотометричних та ВЕРХ/УФ методик є вищою за екологічну безпеку ВЕРХ-МС/МС методик. Це пов'язано з використанням затрат енергії. Спектрофотометр та хроматограф з УФ-детектором використовує до < 0.1 кВт за зразок (0 пенальні балів), тоді як хроматограф з МС-детектором – близько 1.5 кВт за зразок (2 пенальті бали) [69]. Що стосується спектрофотометричної методики визначення мельдонію в ЛФ [53], то бал за методом AGREE становив 0.58, оскільки в методиці використовувався розчинник ДМФА та проводилося нагрівання. Що стосується хроматографічних методик визначення мельдонію в ЛФ та біологічних рідинах, то бал за методом AGREE становив 0.61-0.75. Враховуючи вище описані факти,

можна зробити висновок, що актуальною залишається розробка екологічно безпечних методик визначення метопрололу та мельдонію в субстанціях, ЛЗ та біологічних рідинах.

Висновки до розділу 1

1. Вчені підтвердили, що застосування мельдонію в комплексній терапії хворих на стабільну стенокардію та супутню артеріальну гіпертензію дозволяє підвищити ефективність традиційної антиангінальної терапії та покращити якість життя пацієнтів. З вищесказаного можна зробити висновок, що фіксована комбінація метопрололу та мельдонію є вдалою для лікування пацієнтів з стабільною стенокардією та артеріальною гіпертензією.

2. Аналіз представлених в науковій літературі методик визначення метопрололу та мельдонію в субстанції та ЛЗ продемонстрував, що найбільш використовуваними методами є УФ-та видима спектрофотометрія, а також ВЕРХ. Проте, існуючі методики аналізу часто мають обмежене застосування через не завжди достатню специфічність, трудомісткість, довготривалість, застосування токсичних реагентів.

3. При розробці аналітичних та біоаналітичних методик визначення метопрололу та мельдонію в субстанціях, ЛЗ та біологічних рідинах часто ігнорувалися принципи «зеленої» хімії, що обмежує застосування запропонованих аналітичних та біоаналітичних методик.

4. З урахуванням недоліків представлених в науковій літературі методик визначення метопрололу та мельдонію в субстанціях, ЛЗ та біологічних рідинах перспективною залишається розробка нових методик визначення метопрололу та мельдонію в субстанціях, ЛЗ та біологічних рідинах.

5. Враховуючи описані проблеми, які виникають при розробці аналітичних та біоаналітичних методик визначення метопрололу та мельдонію, актуальною є розробка нових методик з використанням принципів «зеленої» хімії.

РОЗДІЛ 2

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ОБ'ЄКТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА МОДЕЛЮВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ

2.1 Методологія дослідження

Для чіткого розуміння теоретичних підходів та їх експериментального підтвердження, які пропонуються у роботі, окреслено дизайн дослідження на рисунку 2.1, який включав чотири етапи.

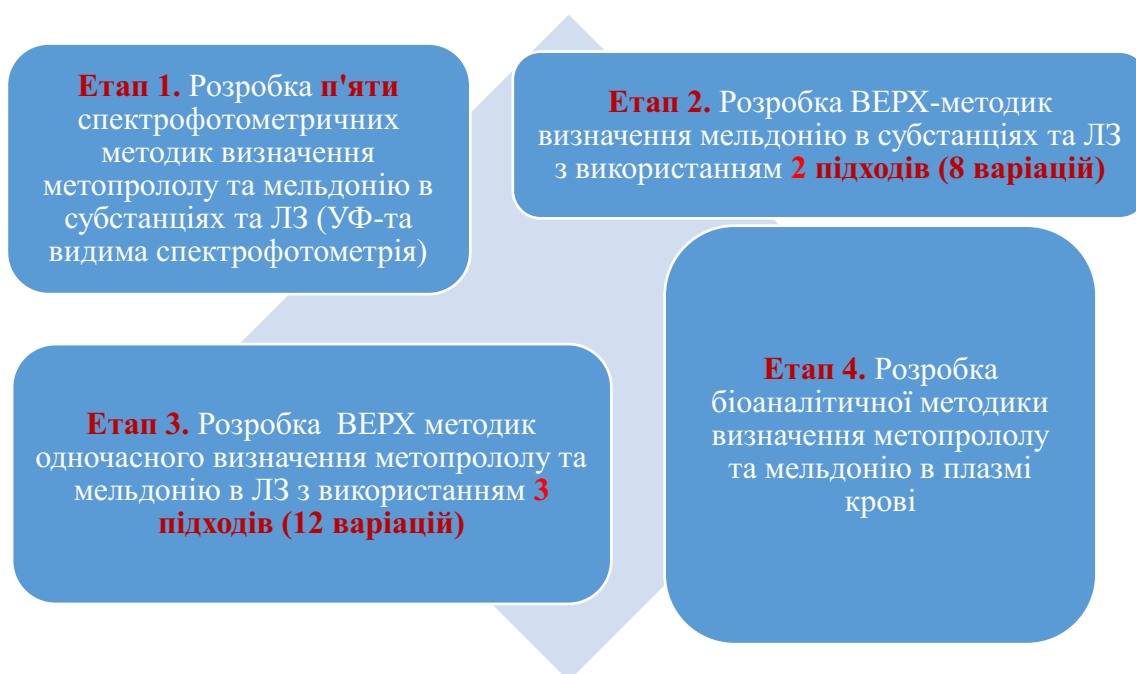


Рисунок 2.1 – Дизайн експерименту

Перший етап передбачав розробку та валідацію спектрофотометричних методик визначення метопрололу (УФ-спектрофотометрична, спектрофотометрична в видимій ділянці спектра за реакціями з БФС, БКЗ, БТС) та мельдонію (спектрофотометрична в видимій ділянці спектра за реакцією з алізарином) в субстанціях та ЛЗ. Другий етап охоплював розробку та валідацію ВЕРХ-методик визначення мельдонію в субстанціях та ЛЗ з використанням 2 підходів до компонентів рухомих фаз. Третій етап передбачав розробку та валідацію ВЕРХ-

методик одночасного визначення метопрололу та мельдонію в ЛЗ з використанням 3 підходів до компонентів рухомих фаз та хроматографічних колонок. Четвертий етап включав розробку та валідацію біоаналітичної методики визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові.

Методологія розробки аналітичної та біоаналітичної методики передбачала такі етапи:

1. Вивчення монографій ДФУ, ЄФ, АФ, аналіз даних сучасної наукової літератури з використанням пошукових баз.
2. Дослідження з вибору оптимальних умов проведення аналізу (вибір реагента та його концентрації, оптимального розчинника, температури, аналітичної довжини хвилі, визначення стехіометричних коефіцієнтів, стабільності – для спектрофотометрії), (вибір компонентів рухомої фази, їх співвідношення, хроматографічної колонки, температури колонки, швидкості подачі рухомої фази, способу детектування, довжини хвилі детектування – для хроматографії).
3. Розробка спектрофотометричної/хроматографічної методики визначення метопрололу та/або мельдонію (можливість застосування запропонованої методики до аналізу субстанції/ЛФ/плазми крові).
4. Валідація розробленої аналітичної/біоаналітичної методики (за такими валідаційними характеристиками як специфічність, лінійність, діапазон застосування, МВ та МКВ, правильність та прецизійність, робасність – для аналітичної методики, специфічність/селективність, лінійність/калібрувальна модель, правильність та прецизійність, ступінь ізолювання та ефект матриці, стабільність – для біоаналітичної методики).
5. Розрахування впливу аналітичної/біоаналітичної методики на навколишнє середовище трьома методами такими як метод аналітичної еко-шкали, метод AGREE та GAPI.

Для розуміння вибору методу аналізу метопрололу та мельдонію в субстанціях, ЛЗ та плазмі крові представлено «Дерево рішень» на рисунку 2.2.

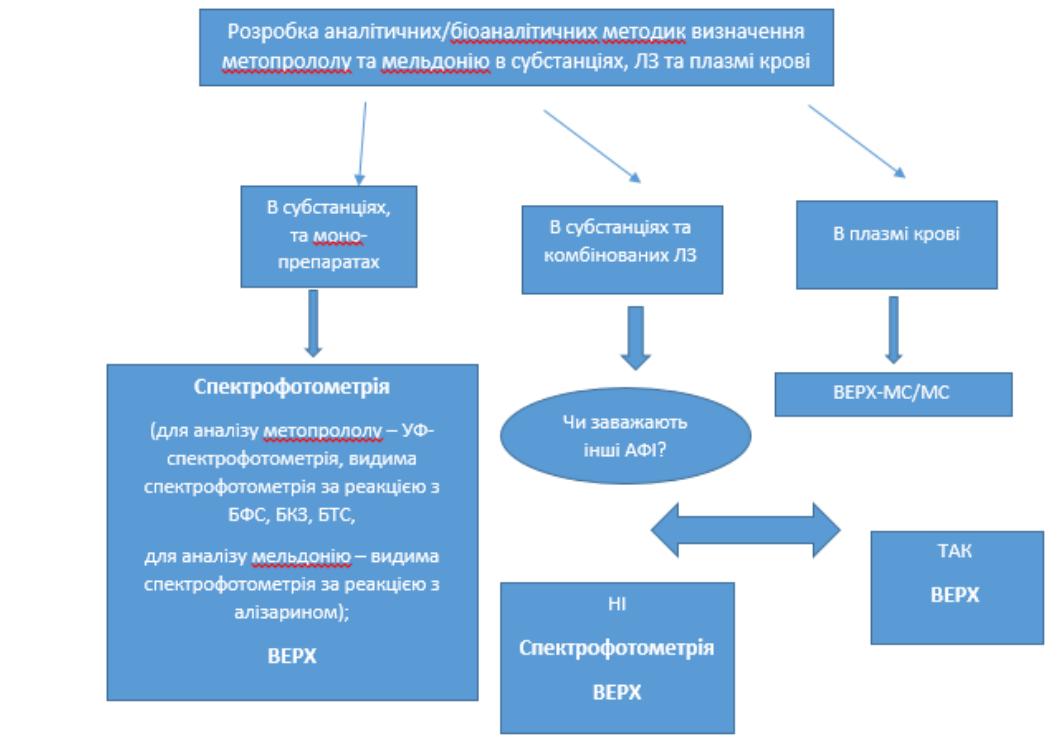


Рисунок 2.2 – «Дерево рішень» щодо вибору методик аналізу метопрололу та мельдонію

Вибір методу аналізу залежить від сфери застосування методики. Якщо метою розробки методики є її застосування для цілей рутинного аналізу метопрололу та/або мельдонію в субстанціях та ЛЗ, то потрібно обрати аналітичну методику (спектрофотометрія та/або ВЕРХ). Якщо ж метою розробки методики є її застосування для визначення метопрололу та/або мельдонію в плазмі крові, то необхідно вибрати біоаналітичну методику (ВЕРХ-МС/МС). Тому, беззаперечно, важливою умовою вибору методики є матриця (субстанція, ЛЗ, плазма крові). При розробці аналітичної методики визначення метопрололу в субстанції та монокомпонентних ЛЗ можна застосувати метод спектрофотометрії (УФ- та видима спектрофотометрія) або ж ВЕРХ. Враховуючи хімічну структуру та фізико-хімічні властивості мельдонію, можна зробити висновок, що для аналізу субстанції чи ЛФ мельдонію пряму УФ-спектрофотометрію неможливо застосувати. Можливим та практично

оправданим методом аналізу мельдонію в субстанції та ЛЗ є спектрофотометрія в видимій ділянці спектра за реакцією з алізарином або ж ВЕРХ. З метою одночасного визначення мельдонію та метопрололу в ЛЗ потрібно обрати метод ВЕРХ, оскільки реагенти, які запропоновані для визначення метопрололу чи мельдонію в монокомпонентних ЛЗ (БФС, БКЗ, БТС, алізарин), не є специфічними.

Розробка аналітичної та біоаналітичної методики є неможливою без її валідації. Потрібно відзначити, що підходи до валідації та валідаційні характеристики аналітичних та біоаналітичних методик кардинально відрізняються, що необхідно враховувати при проведенні досліджень.

Аналізуючи вищесказане можна зробити висновок, що найбільш виправданим методом одночасного аналізу метопрололу та мельдонію в ЛЗ є ВЕРХ, методом визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові є ВЕРХ-МС/МС, кількісного визначення метопрололу в субстанції та моно-препаратах – ВЕРХ та УФ- і видима спектрофотометрія, кількісного визначення мельдонію в субстанції та моно-препаратах – ВЕРХ та видима спектрофотометрія.

У п. 2.1 цього розділу викладено фізико-хімічні властивості метопрололу та мельдонію.

2.2 Фізико-хімічні властивості об'єктів дослідження

На фармацевтичному ринку метопролол представлений у вигляді двох солей – тартрату та сукцинату. Більшість ЛФ метопрололу у своєму складі містять метопрололу тартрат, тому об'єктом наших досліджень є метопролол тартрат.

У хімічному відношенні метопролол тартрат є біс[(2RS)-1-[4-(2-метоксиетил)феноксид]-3-[(1-метилетил)аміно]пропан-2-ол] (2R,3R)-2,3-дигідроксибутанодіоат [3] (рис. 2.3).

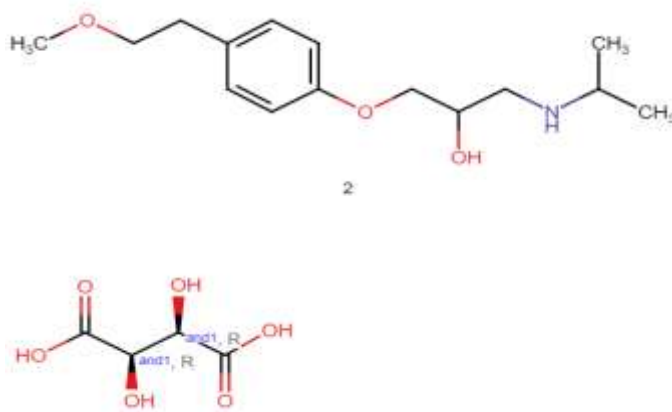
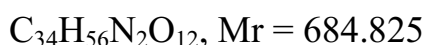


Рисунок 2.3 – Структурна формула метопролол тартрату



Фізико-хімічні властивості: білий чи майже білий кристалічний порошок або безбарвні кристали. Виявляє поліморфізм. Дуже легко розчинний у воді (0.402 мг/мл), розчинний у етанолі. $\text{Log } P=1.8$, $\text{pKa}=14.06, 9.67$ [2, 3].

При виконанні дослідження використовували фармакопейний стандартний зразок (ФСЗ) метопрололу тартрат (“Sigma-Aldrich”, $\geq 98\%$, ВЕРХ), таблетки “Метопролол” (Артеріум) 50 мг серії № 0035415, «Метопрололу тартрат» (Фармак) 50 мг серія № 10822, № 30519, № 31020, 100 мг серія № 30421, 10822.

У хімічному відношенні мельдонію дигідрат є 3-(2,2,2-триметилгідрозин-2-іум-1-іл)пропіонату дигідратом [3] (рис. 2.4).

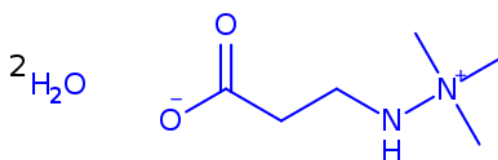


Рисунок 2.4 – Структурна формула мельдонію дигідрату



Фізико-хімічні властивості: білі чи майже білі кристали або кристалічний порошок. Дуже легко розчинний у воді (20.2 мг/мл), легко розчинний в етанолі, практично нерозчинний в ацетоні $\text{Log } P = -2.6$, $\text{pKa } 4.14$ [3, 7].

При виконанні дослідження використовували ФСЗ мельдонію дигідрату (“Sigma-Aldrich”, $\geq 98\%$, ВЕРХ), капсули “Метамакс” (Дарниця) 250 мг серії № NS 20222, «Вазопро» (Фармак) 500 мг серія № 20321, 50821, 10222, 20222, 30222, «Мілдронат» (Grindex) 500 мг серія № 4750321.

Оскільки на фармацевтичному ринку відсутні будь-які комерційні комбінації фіксованих доз метопрололу та мельдонію, застосування розроблених аналітичних методик одночасного кількісного визначення метопрололу та мельдонію проводили на лабораторно виготовлених таблетках.

Використані у роботі реактиви та розчинники: БФС (“Honeywell Fluka”), БКЗ (“Honeywell Fluka”), БТС (“Honeywell Fluka”), нінгідрин (“Sigma-Aldrich”), купруму (II) сульфат (“Honeywell Fluka”), *n*-хлораніл (“Tokyo Chemical Industry”), алізарин (“Сінбіас”), ацетонітрил (“Honeywell Riedel-de Haen”), метанол (“Honeywell Riedel-de Haen”), етанол (“Honeywell Riedel-de Haen”), етилацетат (“Honeywell Riedel-de Haen”), хлороформ (“Honeywell Riedel-de Haen”), диметилформамід (“Honeywell Riedel-de Haen”).

2.3 Характеристика методик дослідження

На основі аналізу наукових публікацій щодо розробки методик визначення метопрололу та мельдонію субстанціях, ЛЗ та плазмі крові, а також власних попередніх досліджень обрано методи спектрофотометрії, ВЕРХ/УФ, ВЕРХ-МС/МС.

Взяття наважок ФСЗ, таблеток, капсул, реагентів проводили з точністю ± 0.2 мг. Для вимірювання об’ємів випробовуваних розчинів використовували піпетки, циліндри та мірні колби класу А.

2.3.1 УФ-спектрофотометрична методика визначення метопрололу в субстанції та лікарських засобах [2.2.25 ДФУ]

При виконанні даного дослідження використовували таке обладнання: спектрофотометр «Shimadzu UV-1800» (Японія), ваги лабораторні електронні RAD WAG AS 200/C, ультразвукову баню Sonorex Digitec DT100H., мірний посуд класу А. Вимірювання абсорбції проводили у УФ-області спектра в прямокутних кварцових кюветах із товщиною шару 1 см на фоні компенсаційного розчину. Для обробки спектрів використовували програмний пакет Software UV-Probe 2.62. Статистичну обробку та визначення валідаційних характеристик проводили відповідно до вимог ДФУ.

Приготування випробовуваного розчину таблеток метопрололу: точну наважку порошку таблеток, еквівалентну 50 мг метопрололу тартрату, переносили до мірної колби об'ємом 100.0 мл, додавали 70 мл метанолу Р, розчиняли впродовж 5-10 хв при нагріванні на водяній бані при температурі 50 °С, охолоджували і доводили об'єм розчину метанолом Р до позначки, перемішували і фільтрували. Переносили 1.0 мл отриманого розчину до мірної колби об'ємом 25.0 мл, доводили об'єм розчину метанолом Р до позначки та перемішували.

Приготування випробовуваного розчину субстанції метопрололу: 50 мг субстанції метопрололу тартрату переносили до мірної колби об'ємом 100.0 мл, додавали 70 мл метанолу Р, розчиняли і доводили об'єм розчину метанолом Р до позначки, перемішували і фільтрували. Переносили 1.0 мл отриманого розчину до мірної колби об'ємом 25.0 мл, доводили об'єм розчину метанолом Р до позначки та перемішували.

Приготування розчину порівняння метопрололу: 50 мг ФСЗ метопрололу тартрату переносили до мірної колби об'ємом 100.0 мл, додавали 70 мл метанолу Р, розчиняли і доводили об'єм розчину метанолом Р до позначки, перемішували. Переносили 1.0 мл отриманого розчину до мірної колби об'ємом 25.0 мл, доводили об'єм розчину метанолом Р до позначки та перемішували.

Компенсаційний розчин – метанол Р.

Вимірювали абсорбцію випробовуваних розчинів та розчину порівняння за аналітичної довжини хвилі 224 нм на фоні компенсаційного розчину.

2.3.2 Спектрофотометрична методика визначення метопрололу в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромкрезоловим зеленим [2.2.25ДФУ]

Приготування випробовуваного розчину таблеток метопрололу: точну наважку порошку розтертих таблеток, еквівалентну 25 мг метопрололу тартрату, переносять до мірної колби на 250.0 мл, розчиняють в 170.0 мл метанолу *P*, доводять метанолом *P* до позначки, витримують в УЗ-бані впродовж 2 хв. Після цього розчин фільтрують через паперовий фільтр («Синя стрічка»), відкидаючи перші порції фільтрату. З наступних порцій фільтрату беруть 1.0 мл розчину, переносять до мірної колби на 10.0 мл, додають 1.0 мл 1.6×10^{-4} М розчину БКЗ в метанолі *P*, доводять метанолом *P* до позначки та перемішують.

Приготування випробовуваного розчину субстанції метопрололу: 25 мг субстанції метопрололу тартрату, переносять до мірної колби місткістю 250.0 мл, розчиняють в 170.0 мл метанолу *P*, доводять метанолом *P* до позначки, витримують в УЗ- бані впродовж 2 хв. 1.0 мл отриманого розчину, переносять у мірну колбу об'ємом 10.0 мл, додають 1.0 мл 1.6×10^{-4} М розчину БКЗ в метанолі *P*, доводять метанолом *P* до позначки та перемішують.

Приготування розчину порівняння метопрололу тартрату: 20 мг ФСЗ метопрололу тартрату вміщують до мірної колби місткістю 200.0 мл, розчиняють у метанолі *P* та доводять метанолом до позначки, перемішують. 1.0 мл розчину, переносять до мірної колби об'ємом 10.0 мл, додають 1.0 мл 1.6×10^{-4} М розчину БКЗ в метанолі *P*, доводять метанолом *P* до позначки та перемішують.

Приготування компенсаційного (1.6×10^{-4} М) розчину БКЗ: 27.9 мг БКЗ вміщують до мірної колби місткістю 250.0 мл, розчиняють у 200.0 мл метанолу *P* та доводять метанолом до позначки, перемішують.

Вимірюють абсорбцію випробовуваних розчинів та розчину порівняння за аналітичної довжини хвилі 624 нм на фоні компенсаційного розчину.

2.3.3 Спектрофотометрична методика визначення метопрололу в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромфеноловим синім [2.2.25 ДФУ]

Приготування випробовуваного розчину таблеток метопрололу: точну наважку порошку розтертих таблеток, еквівалентну 34.15 мг метопрололу тартрату, переносять до мірної колби на 250.0 мл, розчиняють в 200.0 мл метанолу *P*, доводять метанолом *P* до позначки, витримують в УЗ-бані впродовж 2 хв. Після цього розчин фільтрують через паперовий фільтр («Синя стрічка»), відкидаючи перші порції фільтрату. З наступних порцій фільтрату беруть 1.0 мл розчину, переносять до мірної колби на 10.0 мл, додають 1.0 мл 2.0×10^{-4} М розчину БФС в метанолі *P*, доводять метанолом *P* до позначки та перемішують.

Приготування випробовуваного розчину субстанції метопрололу: 34.15 мг субстанції метопрололу тартрату, переносять до мірної колби місткістю 250.0 мл, розчиняють в 200.0 мл метанолу *P*, доводять метанолом *P* до позначки, витримують в УЗ- бані впродовж 2 хв. 1.0 мл отриманого розчину, переносять у мірну колбу об'ємом 10.0 мл, додають 1.0 мл 2.0×10^{-4} М розчину БФС в метанолі *P*, доводять метанолом *P* до позначки та перемішують.

Приготування розчину порівняння метопрололу тартрату: 34.15 мг ФСЗ метопрололу тартрату вміщують до мірної колби місткістю 250.0 мл, розчиняють у метанолі *P* та доводять метанолом до позначки, перемішують. 1.0 мл розчину, переносять до мірної колби об'ємом 10.0 мл, додають 1.0 мл 2.0×10^{-4} М розчину БФС в метанолі *P*, доводять метанолом *P* до позначки та перемішують.

Приготування компенсаційного (2.0×10^{-4} М) розчину БФС: 33.5 мг БФС вміщують до мірної колби місткістю 250.0 мл, розчиняють у 200.0 мл метанолу *P* та доводять метанолом до позначки, перемішують.

Вимірюють абсорбцію випробовуваних розчинів та розчину порівняння за аналітичної довжини хвилі 595 нм на фоні компенсаційного розчину.

2.3.4 Спектрофотометрична методика визначення метопрололу в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромтимоловим синім [2.2.25 ДФУ]

Приготування випробовуваного розчину таблеток метопрололу: точну наважку порошку розтертих таблеток, еквівалентну 27.40 мг метопрололу тартрату, переносять до мірної колби на 250.0 мл, розчиняють в 200.0 мл ацетонітрилу Р, доводять ацетонітрилом Р до позначки, витримують в УЗ- бані впродовж 2 хв. Після цього розчин фільтрують через паперовий фільтр («Синя стрічка»), відкидаючи перші порції фільтрату. З наступних порцій фільтрату беруть 1.0 мл розчину, переносять до мірної колби на 10.0 мл, додають 1.0 мл 1.6×10^{-4} М розчину БТС в ацетонітрилі Р, доводять ацетонітрилом Р до позначки та перемішують.

Приготування випробовуваного розчину субстанції метопрололу: 27.40 мг субстанції метопрололу тартрату, переносять до мірної колби місткістю 250.0 мл, розчиняють в 200.0 мл ацетонітрилу Р, доводять ацетонітрилом Р до позначки, витримують в УЗ- бані впродовж 2 хв. 1.0 мл отриманого розчину, переносять у мірну колбу об'ємом 10.0 мл, додають 1.0 мл 1.6×10^{-4} М розчину БТС в ацетонітрилі Р, доводять ацетонітрилом Р до позначки та перемішують.

Приготування розчину порівняння метопрололу тартрату: 27.40 мг ФСЗ метопрололу тартрату вміщують до мірної колби місткістю 250.0 мл, розчиняють у ацетонітрилі Р та доводять ацетонітрилом до позначки, перемішують. 1.0 мл розчину, переносять до мірної колби об'ємом 10.0 мл, додають 1.0 мл 1.6×10^{-4} М розчину БТС в ацетонітрилі Р, доводять ацетонітрилом Р до позначки та перемішують.

Приготування компенсаційного (1.6×10^{-4} М) розчину БТС: 24.98 мг БТС вміщують до мірної колби місткістю 250.0 мл, розчиняють у 200.0 мл ацетонітрилу Р та доводять ацетонітрилом до позначки, перемішують.

Вимірюють абсорбцію випробовуваних розчинів та розчину порівняння за аналітичної довжини хвилі 402 нм на фоні компенсаційного розчину.

2.3.5 Спектрофотометрична методика визначення мельдонію в субстанції та лікарських засобах за реакцією з алізарином [2.2.25 ДФУ]

Приготування випробовуваного розчину капсул мельдонію: точну наважку грануляту капсул, еквівалентну 33.53 мг мельдонію, переносять до мірної колби на 25.0 мл, розчиняють в 2.5 мл *води Р*, доводять *диметилформамідом Р* до позначки, витримують в УЗ- бані впродовж 2 хв. Після цього розчин фільтрують через паперовий фільтр («Синя стрічка»), відкидаючи перші порції фільтрату. З наступних порцій фільтрату беруть 0.5 мл розчину, переносять до мірної колби на 10.0 мл, додають 0.5 мл 0.8 % *розчину алізарину*, нагрівають на водяній бані при температурі 95 °С впродовж 20 хв, охолоджують, доводять *диметилформамідом Р* до позначки та перемішують.

Приготування випробовуваного розчину субстанції мельдонію: 33.53 мг субстанції мельдонію, переносять до мірної колби місткістю 25.0 мл, розчиняють в 2.5 мл *води Р*, доводять *диметилформамідом Р* до позначки, витримують в УЗ- бані впродовж 2 хв. 0.3 мл отриманого розчину, переносять у мірну колбу об'ємом 10.0 мл, додають 0.3 мл 0.8 % *розчину алізарину*, нагрівають на водяній бані при температурі 95 °С впродовж 20 хв, охолоджують, доводять *диметилформамідом Р* до позначки та перемішують.

Приготування розчину порівняння мельдонію: 33.53 мг ФСЗ мельдонію дигідрату вміщують до мірної колби місткістю 25.0 мл, розчиняють у 2.5 мл *води Р* та доводять *диметилформамідом Р* до позначки, перемішують. 0.3 мл розчину, переносять до мірної колби об'ємом 10.0 мл, додають 0.3 мл 0.8 % *розчину алізарину*, нагрівають на водяній бані при температурі 95 °С впродовж 20 хв, охолоджують, доводять *диметилформамідом Р* до позначки та перемішують.

Приготування компенсаційного (0.8 %) розчину алізарину: 80.40 мг алізарину вміщують до мірної колби місткістю 10.0 мл, розчиняють у 7.0 мл *диметилформаміду Р* та доводять *диметилформамідом Р* до позначки, перемішують.

Вимірюють абсорбцію випробовуваних розчинів та розчину порівняння за аналітичної довжини хвилі 517 нм на фоні компенсаційного розчину.

2.3.6 ВЕРХ-методики кількісного визначення мельдонію у субстанції та лікарських засобах [2.2.29 ДФУ]

При виконанні даного дослідження використовували таке обладнання: хроматограф «Shimadzu», модель «Shimadzu UPLC system LC-40 PDA», «Shimadzu Nexera-i LC-2040C 3D-Plus», ваги лабораторні електронні RAD WAG AS 200/C, ультразвукова баня Sonorex Digitec DT100H., рН метр И-160МИ. Для обробки хроматограм використовували програмний пакет Lab Solutions version 5.97. Хроматографічна колонка – Agilent Zorbax C-18 SB (4.6 мм i.d. X 150 мм, 3.5 мкм) (Agilent, США).

Хроматографічні умови запропонованих методик: рухома фаза 1) – 0.25 % калію гексафторофосфат (V) (KPF_6)– 0.1 % 85 % кислота фосфорна (H_3PO_4) 95 % – 5 % ацетонітрил (ACN), рухома фаза 2) – 0.3 % біс-(трифторометан)сульфаміду літію 97 % – 0.1 % 85 % H_3PO_4 80 % – 20 % ACN, зі швидкістю потоку рухомої фази 1.0 мл/хв, температурою колонки 32 °C та УФ-детектування за довжин хвиль 190 нм, 195 нм, 200 нм, 205 нм. Об'єм проби, що вводився, – 2 мкл.

Приготування випробовуваного розчину капсул мельдонію: Для отримання статистично значущих результатів досліджено дванадцять капсул. Гранулят із капсул, еквівалентно приблизно 6 мг/мл мельдонію, вміщують до мірної колби місткістю 10.0 мл і розчиняють в 5.0 мл свіжоприготованої води *P*, витримують в УЗ- бані впродовж 2 хв і струшують впродовж 15 хв за допомогою механічного шейкера. Розчин доводили розчинником до об'єму 10.0 мл. Фільтрували крізь мембранний фільтр з розміром пор 0.2 мкм, відкидаючи перші 5 мл фільтрату. Кінцева концентрація аналіту – 0.6 мг/мл.

Приготування випробовуваного розчину субстанції мельдонію: 60 мг субстанції мельдонію переносили до мірної колби об'ємом 10.0 мл і розчиняли в 5 мл свіжоприготовленої води *P*, витримували на УЗ-бані впродовж 5 хв та струшували впродовж 10 хв за допомогою механічного шейкера. Розчин доводили розчинником до об'єму 10.0 мл. Фільтрували крізь мембранний фільтр

з розміром пор 0.2 мкм, відкидаючи перші 5 мл фільтрату. Кінцева концентрація аналіту – 0.6 мг/мл.

Приготування розчину порівняння мельдонію: 60 мг ФСЗ мельдонію дигідрату перенесли до мірної колби об'ємом 10.0 мл і розчиняли в 5 мл свіжоприготовленої води Р, витримували на УЗ-бані впродовж 2 хв та струшували впродовж 2 хв за допомогою механічного шейкера. Розчин доводили розчинником до об'єму 10.0 мл. Фільтрували крізь мембранний фільтр з розміром пор 0.2 мкм, відкидаючи перші 5 мл фільтрату. Кінцева концентрація аналіту – 0.6 мг/мл.

2.3.7 ВЕРХ-методики одночасного кількісного визначення метопрололу та мельдонію в бінарній суміші та лікарських засобах [2.2.29 ДФУ]

При виконанні даного дослідження використовували таке обладнання: хроматографи «Shimadzu UPLC system LC-40 PDA», «Shimadzu Nexera-*i* LC-2040C 3D-Plus» (версія 5.97), хроматограф «Dionex Ultimate 3000 UHPLC system» (Chromeleon версія 6.80), хроматограф «Agilent HPLC 1260-II, PhotoDiodeArray Detector 1260 DAD HS G7117C» (версія OpenLab CDS), ваги лабораторні електронні RAD WAG AS 200/C, ультразвукова баня Sonorex Digitec DT100H., рН метр И-160МИ, мірний посуд класу А. Демінералізовану воду отримано за допомогою системи Merck Millipore UV-Simplicity, що генерує провідність 0.05 мкСм.

Хроматографічні колонки: LiChrospher 100 CN двох розмірів (4 мм × 250 мм, 5 мкм) та (4 мм × 125 мм, 5 мкм), Waters Spherisorb CNRP (4.6 мм × 250 мм, 5 мкм), ZORBAX StableBond CN (4.6 мм × 250 мм, 5 мкм) (Merck Darmstadt, Німеччина та Agilent Technologies, США).

Використовувані розчинники (ACN, аміонію дигідрогенфосфат (NH₄H₂PO₄), кислота трифтороцтова (TFA)) були градієнтної якості (Merck Darmstad, Німеччина).

Основним акцентом у експерименті, окрім вибору хроматографічної колонки, було варіювання та вибір кращих комбінацій компонентів рухомої фази та концепцій: ACN з $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, ACN з TFA.

Рекомендована довжина хвилі для забезпечення чутливості вибиралася в діапазоні УФ 190–205 нм, залежно від концепції рухомої фази, але у випадку використання концепції з TFA рекомендований діапазон для максимальної чутливості повинен бути вище 196 нм завдяки вищому граничному значенню УФ-поглинання TFA порівняно з фосфатним буфером. ACN – органічний розчинник з найкращими характеристиками УФ поглинання, найнижчим граничним значенням 190 нм, що зробило його унікальним органічним розчинником у наших експериментах.

Приготування випробовуваного розчину таблеток метопрололу та капсул мельдонію: точну наважку порошку розтертих таблеток (грануляту капсул), еквівалентну 100 мг метопрололу та 500 мг мельдонію, перенесли до мірної колби об'ємом 200.0 мл і розчинили в 100 води, витримували на УЗ-бані впродовж 5 хв, струшували впродовж 10 хв. Розчин доводили водою до об'єму 200.0 мл рухомою фазою. Фільтрували крізь мембранний фільтр з розміром пор 0.2 мкм, відкидаючи перші 5 мл фільтрату. Кінцева концентрація метопрололу – 0.5 мг/мл, мельдонію – 2.5 мг/мл. Об'єм проби, що вводився, – 1-5 мкл.

У випадку хроматографічного аналізу з рухомими фазами, що містять більший відсоток ACN (понад 30 %), розчинником були 100 мл рухомої фази з додаванням 100 мл води.

Нами проведено експерименти з подвійними концентраціями мельдонію 5.0 мг/мл та 1.0 мг/мл метопрололу в зразках, підготувавши капсули мельдонію 500 мг та таблетки метопрололу 100 мг у 100 мл води, підкисленої 0.05 % H_3PO_4 або 0.05 % TFA, і ці концентрації показали відмінну лінійність та чутливість, але пік симетрії параметрів придатності системи погіршувався через високу масу при навантаженні колонки. Робота з такою подвійною концентрацією була несприятливою з точки зору відтворення та правильності методики, тому ми

надали перевагу та рекомендуємо працювати з першими заявленими концентраціями 2.5 мг/мл мельдонію та 0.5 мг/мл метопрололу

Приготування випробовуваного розчину субстанції метопрололу та мельдонію: 100 мг субстанції метопрололу та 500 мг мельдонію переносили до мірної колби об'ємом 200.0 мл і розчиняли в 100 мл води, витримували на УЗ-бані впродовж 3 хв та струшували впродовж 5 хв. Розчин доводили рухомою фазою до об'єму 200.0 мл. Фільтрували крізь мембранний фільтр з розміром пор 0.45 мкм, відкидаючи перші 5 мл фільтрату. Рухому фазу обробляли ультразвуком впродовж 5 хв та струшували впродовж 10 хв. (Примітка: стандарти та зразки можна приготувати в 0.05 % 85 % H_3PO_4 , якщо $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ використовується в складі рухомої фази, або 0.07 % TFA, якщо ця кислота використовується в рухомій фазі для аналізу. Набагато краще завжди використовувати рухому фазу, оскільки базові лінії хроматограми, відтворення, правильність, прецизійність та чутливість досягаються шляхом розчинення їх у свіжоприготованій рухомій фазі). Розчин доводили водою до об'єму 200.0 мл рухомою фазою. Фільтрували крізь мембранний фільтр з розміром пор 0.2 мкм, відкидаючи перші 5 мл фільтрату. Кінцева концентрація метопрололу – 0.5 мг/мл, мельдонію – 2.5 мг/мл. Об'єм проби, що вводився, – 2-5 мкл.

Зразки зберігали при 8–10 °C в автосамплері для аналізу. Вони були стабільними та зберігалися в холодильнику при 4–8 °C впродовж 24 год.

Приготування розчину порівняння метопрололу та мельдонію: 100 мг ФСЗ метопрололу тартрату та 500 мг ФСЗ мельдонію дигідрату переносили до мірної колби об'ємом 200.0 мл і розчиняли в 100 мл води, витримували на УЗ-бані впродовж 3 хв та струшували впродовж 5 хв. Розчин доводили рухомою фазою до об'єму 200.0 мл. Фільтрували крізь мембранний фільтр з розміром пор 0.45 мкм, відкидаючи перші 5 мл фільтрату. Рухому фазу обробляли ультразвуком впродовж 5 хв та струшували впродовж 10 хв. Розчин доводили водою до об'єму 200.0 мл рухомою фазою. Фільтрували крізь мембранний фільтр з розміром пор 0.2 мкм, відкидаючи перші 5 мл фільтрату. Кінцева

концентрація метопрололу – 0.5 мг/мл, мельдонію – 2.5 мг/мл. Об'єм проби, що вводився, – 2-5 мкл.

Зразки зберігали при 8–10 °С в автосамплері для аналізу. Вони були стабільними та зберігалися в холодильнику при 4–8 °С впродовж 24 год.

2.3.8 ВЕРХ-МС/МС методика кількісного визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові

Прилади та обладнання

ВЕРХ-МС/МС система, яка включає МС детектор PE SCIEX API3000, SN 4640001, 2 насоса Shimadzu LC-20ADXR, термостат колонки Shimadzu CTO-10Avр, переключатель потоків Shimadzu FCV-14AH, вакуумний дегазатор Shimadzu DGU-14A, термостатуючий автосамплер SIL-20ACXR, програмне забезпечення Analyst 1.5.2.

Ваги AND GR-202, SN 14212452

Шейкер Lab dancer ІКА

Центрифуга Sigma 4-15C Qiagen

Холодильник DAIHAN, мод. WiseCryo WUF-D700, що забезпечує температуру не вище -35 °С.

Двокамерний холодильник Whirlpool, що забезпечує температуру від 4 °С до 7 °С і не вище -20 °С.

Обладнання для очищення води Barnstead NANOpure Diamond, модель № D11911.

Компресор COAIRE AL5MN

Генератор азота Whatman N2-22-L1466

Приготування допоміжних розчинів:

1 л розчинника M20: H₂O – MeOH (80:20).

У колбу місткістю 1 л помістили:

800 мл H₂O,

200 мл метанолу та перемішали.

Термін придатності розчину – 3 місяці за умови зберігання при кімнатній температурі.

1 л розчинника A5M5: ACN – MeOH (50:50).

У мірну колбу місткістю 1 л помістили:

500 мл ACN,

500 мл MeOH та перемішали.

Термін придатності розчину – 6 місяці за умови зберігання при кімнатній температурі.

1 л елюента А: ACN – H₂O – FA (5:95:0.1).

У мірну колбу місткістю 1 л помістили:

50 мл ACN,

950 мл H₂O,

1 мл FA та перемішали.

Термін придатності розчину – 3 місяці за умови зберігання при кімнатній температурі

1 л елюента В: ACN – FA (100 : 0.1, v/v).

У мірну колбу місткістю 1 л помістили:

1000 мл ACN,

1 мл FA та перемішали.

Термін придатності розчину – 6 місяці за умови зберігання при кімнатній температурі.

Використовувані внутрішні стандарти – бетанехол (“Снамін”, ≥ 95 %, ВЕРХ), бісопролол (“Moehs Catalana, S.L., Іспанія”, ≥ 98 %, ВЕРХ).

Більшість біоаналітичних досліджень проводиться на плазмі крові, тому в нашій роботі ми використовували плазму крові людини свіжозаморожену (біоматриця).

Схема приготування калібрувальних розчинів стандартних зразків та контрольних робочих розчинів стандартних зразків представлена в таблицях 2.1, 2.2.

Таблиця 2.1 – Схема приготування калібрувальних розчинів стандартних зразків

Вихідний розчин		Приговлений розчин		
Назва розчину	Аліквота / колба, розчинник	Назва розчину	Концентрація мельдонію, нг/мл	Концентрація метопрололу, нг/мл
MixC 1M	1.0 мл / 5 мл, M50	MixC 200K	200 000	8 000
MixC 1M	0.75 мл / 5 мл, M50	MixC 150K	150 000	6 000
MixC 1M	0.5 мл / 5 мл, M50	MixC 100K	100 000	4 000
MixC 1M	0.6 мл / 10 мл, M50	MixC 60K	60 000	2 400
MixC 200K	1.0 мл / 10 мл, M50	MixC 20K	20 000	800
MixC 60K	1.0 мл / 10 мл, M50	MixC 6K	6 000	240
MixC 20K	1.0 мл / 10 мл, M50	MixC 2K	2 000	80

Таблиця 2.2 – Схема приготування контрольних робочих розчинів стандартних зразків

Вихідний розчин		Приговлений розчин		
Назва розчину	Аліквота / колба, розчинник	Назва розчину	Концентрація мельдонію, нг/мл	Концентрація метопрололу, нг/мл
MixQ 1M	0.75 мл / 5 мл, M50	MixQ 150K	150 000	6 000
MixQ 1M	0.6 мл / 10 мл, M50	MixQ 60K	60 000	2 400
MixQ 60K	1.0 мл / 10 мл, M50	MixQ 6K	6 000	240

Отримані розчини зберігали у холодильнику за температури від 4 °С до 7 °С не більше 1 місяця.

Приготування калібрувальних стандартів та QC-зразків

Калібрувальну криву будували відповідно до таблиці 2.3 за 7 калібрувальними стандартами від 50 нг/мл (НМКВ) до 5000 нг/мл (ВМКВ) для мельдонію та від 2 нг/мл (НМКВ) до 200 нг/мл (ВМКВ) для метопрололу.

Таблиця 2.3 – Схема приготування контрольних робочих розчинів стандартних зразків

Назва зразка	РР СЗ аналіта, V = 30 мкл	Концентрація мельдонію, нг/мл	Концентрація метопрололу, нг/мл
C1	MixC 2К	50	2
C2	MixC 6К	150	6
C3	MixC 20К	500	20
C4	MixC 60К	1500	60
C5	MixC 100К	2500	100
C6	MixC 150К	3750	150
C7	MixC 200К	5000	200
L1-L2	MixQ 6К	150	6
M1-M2	MixQ 60К	1500	60
H1-H2	MixQ 150К	3750	150

У кожен пробірку вносили по 1780 мкл бланкової плазми. За схемою, наведеною в таблиці 2.3, в пробірки додавали по 30 мкл відповідних робочих розчинів стандартних зразків аналітів, пробірки закривали та перемішували їх вміст за допомогою шейкеру 10 с.

Примітка:

* Вказана номінальна концентрація аналітів у перерахунку на аліквоту плазми. Для проведення аналізу відбирають аліквоти по 100 мкл та переносять їх в мікропробірки. Свіжоприготовлені зразки використовували впродовж 4 год. Не пізніше, ніж через 4 год після приготування залишки зразків поміщають в

холодильник за температури не вище $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Допускається використання зразків після 3 циклів заморожування-розморожування.

Методика пробопідготовки біозразків

Розмістили в штативі мікропробірки з аліквотами по 100 мкл калібрувальних стандартів та бланкову плазму для отримання нульового зразка. Налили до резервуару розчин внутрішнього стандарту. За допомогою восьмиканального піпет-дозатора додали по 300 мкл розчину у відповідні пробірки. Перемішали зміст піпетуванням 5 разів. Для отримання бланкового розчину у відповідну мікропробірку внесли 100 мкл бланкової плазми, додали 300 мкл розчинника MeOH та перемішали зміст піпетуванням 5 разів. Центрифугували штатив з мікропробірками при 6000 об/хв 4 хв. Закривали мікропробірки та проводили хроматографування.

При необхідності виконували процедуру 2-кратного розведення: в пробірку вносили 50 мкл біозразка, додавали 50 мкл бланкової плазми, перемішували.

Параметри проведення вимірювання

Проби хроматографували з використанням хроматографічної колонки Discovery C18 50 мм \times 2.1 мм, 5 мкл (для визначення метопрололу), ZORBAX HILIC Plus, 50 мм \times 2.1 мм, 3.5 мкл (для визначення мельдонію) та умов градієнтного елюювання з рухомою фазою, що складалася з ACN, H₂O та FA (5:95:0.1) (для визначення метопрололу), ізократичного елюювання з рухомою фазою, що складалася з H₂O, ACN та амонію форміатного буферного розчину (20:75:5) (для визначення мельдонію). Зразки метопрололу хроматографували в градієнтному режимі (елюенти А (ACN – H₂O – FA, 5:95:0.1), елюенти В (ACN-FA, 100:0.1)).

Для визначення метопрололу вихідний зміст елюента В 0 %, який лінійно збільшується до 1.0 хв до 100 %, тримається стабільно до 1.1 хв та в 1.11 хв повертається до вихідного 0 % (рис. 2.3). Швидкість потоку – 0.4 мл/хв. Температура термостата колонки – 30 $^{\circ}\text{C}$. Об'єм проби, що вводиться, – 2 мкл. Температура термостата автосамплера – 15 $^{\circ}\text{C}$.

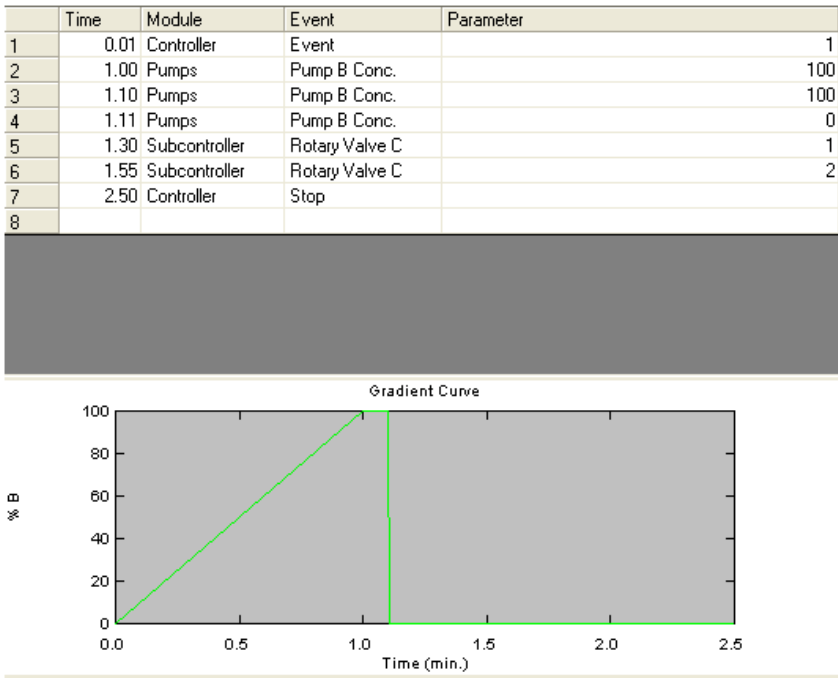


Рисунок 2.3 – Градієнтне елюювання визначення метопрололу

Для визначення мельдонію використовували ізократичне елюювання (рис. 2.4). Швидкість потоку – 0.4 мл/хв. Температура термостата колонки – 30 °С. Об’єм проби, що вводиться, – 0,5 мкл. Температура термостата автосамплера – 15 °С. Параметри електроспрей іонізатора наведені в таблиці 2.4.

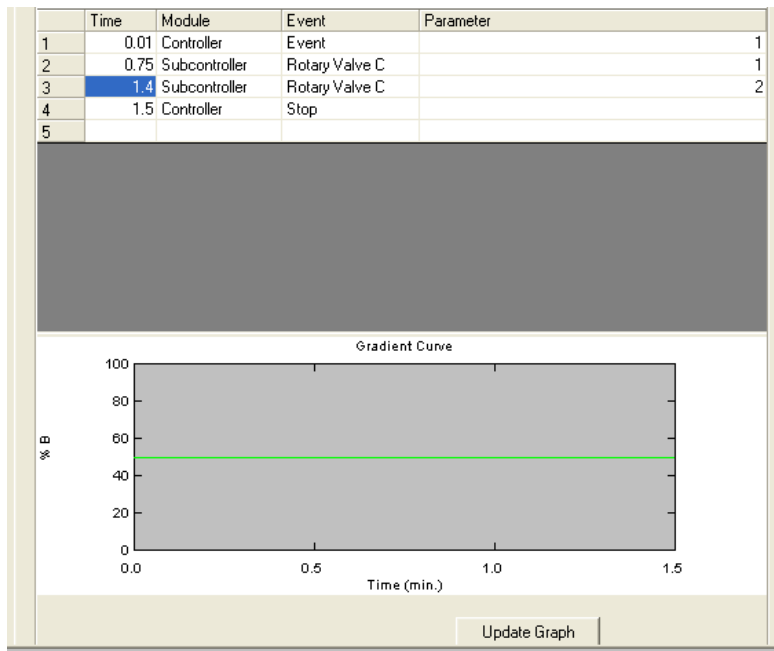


Рисунок 2.4 – Ізократичне елюювання визначення мельдонію

Таблиця 2.4 – Параметри електроспрей іонізатора

	Параметр	Значення
1	Polarity	Positive
2	Nebulizer Gas (NEB, Gas 1)	15
3	Curtain Gas (CUR)	8
4	Collision Gas (CAD)	4
5	IonSpray Voltage (IS)	5000
6	Temperature (TEM)	400
7	Turbo IonSpray Gas	8
8	Horizontal Position	8.0
9	Lateral Position	2.0

Для розрахунку хроматографічних даних використовувалося програмне забезпечення Analyst 1.5.2 (AB Sciex, США).

2.3.9 Методи вивчення «зеленості» аналітичних та біоаналітичних методик

Розрахування оцінки впливу аналітичних та біоаналітичних методик на навколишнє середовище проводили трьома методами (інструментами) такими як метод аналітичної еко-шкали [69], метод AGREE [70] та GAPI [71] (програмні забезпечення розроблено Гданським технічним університетом, Польща).

РОЗДІЛ 3

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИХ МЕТОДИК ВИЗНАЧЕННЯ МЕТОПРОЛОЛУ ТА МЕЛЬДОНІЮ В СУБСТАНЦІЯХ ТА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ

3.1 Розробка та валідація УФ-спектрофотометричної методики визначення метопрололу в субстанції та лікарських засобах

Метод УФ-спектрофотометрії вважається одним із «зелених», експресних та простих у виконанні методів фармацевтичного аналізу, що є беззаперечною перевагою. Враховуючи хімічну структуру метопрололу (див. рис. 2.3), можна спрогнозувати можливість застосування методу УФ-спектрофотометрії для кількісного визначення монокомпонентних ЛФ метопрололу. Попередньо спектрофотометрували метанольні вилучення з таблеток метопрололу тартрату. Як випливає зі спектральних кривих на рис 3.1, УФ-спектри метанольного вилучення з таблеток метопрололу тартрату та ФСЗ метопрололу тартрату мають інтенсивно виражену смугу поглинання за довжини хвилі 224 нм, що дало можливість проводити кількісне визначення за вказаної аналітичної довжини хвилі.

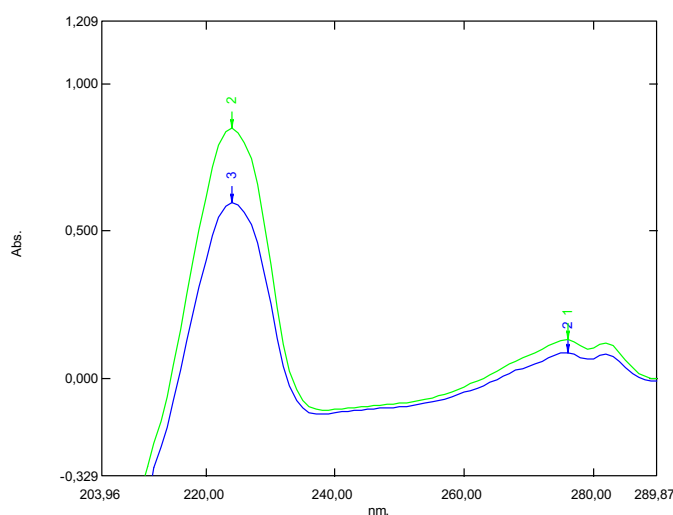


Рисунок 3.1 – Абсорбційні спектри поглинання метанольних розчинів за умов кількісного визначення для: синій колір – розчин ФСЗ метопрололу тартрату (розчин порівняння), зелений колір – метанольне вилучення з таблеток «Метопрололу тартрат» (Фармак) 50 мг серія № 10822 (випробовуваний розчин)

Запропоновану аналітичну методику валідовано відповідно до вимог ДФУ [74] та ICH Q2 [75] за такими валідаційними характеристиками як специфічність, лінійність, діапазон застосування, правильність, прецизійність та робастність [76].

3.1.1 Специфічність методики

З метою вивчення специфічності аналітичної методики готували розчин допоміжних речовин («плацебо»). Результати вивчення специфічності УФ-спектрофотометричної методики визначення метопрололу в таблетках представлено в таблиці 3.1. Результати вивчення специфічності аналітичної методики вказують на те, що абсорбція допоміжних речовин («плацебо») за довжини хвилі 224 нм є незначною (знайдене значення δ_{noise} становить 0.44 %) та не перевищує критерій прийнятності (не більше 0.5 %).

Таблиця 3.1 – Результати вивчення специфічності УФ-спектрофотометричної методики визначення метопрололу в таблетках

Абсорбція плацебо (А плацебо)	Абсорбція розчину домішок ЛФ (А домішок)	Абсорбція розчину порівняння (Ast)	Знайдене значення δ_{noise} , %	Критерій прийнятності
0.002	-	0.456	0.44	не більше 0.5 %

3.1.2 Лінійність, діапазон застосування методики

Лінійність аналітичної методики вивчали в діапазоні концентрацій 20–36 мкг/мл відповідно до вимог ДФУ методом найменших квадратів, використовуючи модельні розчини зразків. Абсорбційні спектри поглинання метанольних розчинів метопрололу за умов вивчення лінійності аналітичної методики показано на рис. 3.2.

Метрологічні характеристики рівняння регресійної залежності для кількісного визначення метопрололу наведено в табл. 3.2. Параметри лінійності (рис. 3.2, табл. 3.2) відповідають вимогам ДФУ на всьому діапазоні застосування

аналітичної методики (20–36 мкг/мл). МВ метопрололу становила 3.27 мкг/мл, МКВ – 9.92 мкг/мл.

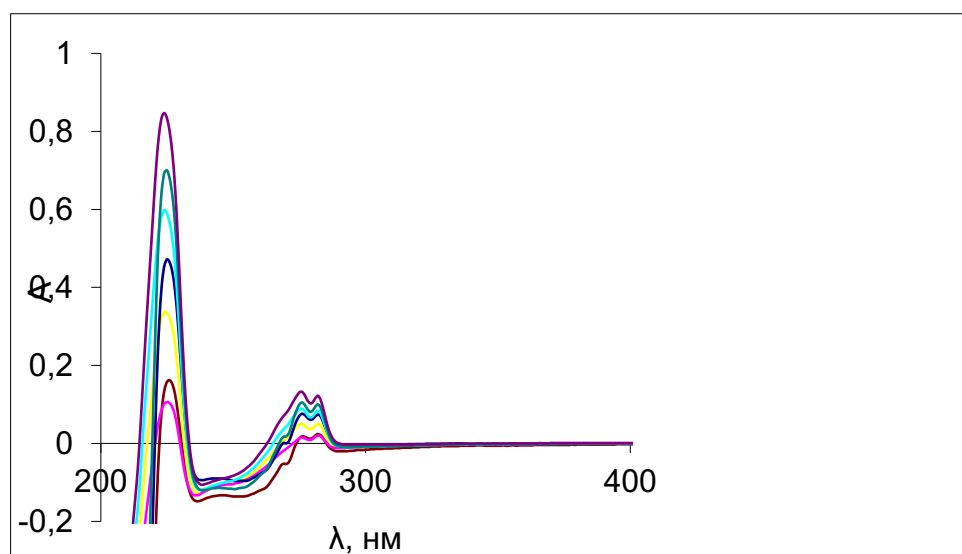


Рисунок 3.2 – Абсорбційні спектри поглинання метанольних розчинів метопрололу за умов вивчення лінійності аналітичної методики

Таблиця 3.2 – Метрологічні характеристики лінійної залежності

Величина	Значення	Критерій	Висновок (відповідає або не відповідає)
$b \pm (S_b)$	$31.4500 \pm (1.0924)$	–	
$a \pm (S_a)$	$-0.2942 \pm (0.0313)$	$ a \leq 2.6$	Відповідає
R^2	0.9964	> 0.9952	Відповідає
МВ (мкг/мл)	3.28	–	
МКВ (мкг/мл)	9.95	–	
Підпорядкування закону Бера в діапазоні концентрацій (мкг/мл)	20.00-36.00	–	

3.1.3 Правильність та прецизійність методики

Правильність та прецизійність УФ-спектрофотометричної методики перевіряли шляхом приготування модельних розчинів з точно відомою

концентрацією з вмістом 70-130 % від номінального. Одержані результати проведених розрахунків наведено в табл. 3.3.

Таблиця 3.3 – Результати аналізу модельних сумішей і їх статистична обробка для кількісного визначення

Модельні розчини	Вміст метопрололу, %		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	69.91	70.09	100.26
M ₂	80.06	80.05	99.99
M ₃	90.09	90.01	99.91
M ₄	95.07	95.01	99.94
M ₅	100.14	100.09	99.95
M ₆	105.04	105.11	100.07
M ₇	110.08	110.17	100.08
M ₈	119.95	120.09	100.12
M ₉	130.02	130.09	100.05
Середнє значення, Z , %			100.04
Стандартне відхилення, S_z , %			0.12
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95 \%, 8) \cdot S_z = 2.3060 S_z$, %			0.28
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta A_s = 1.6 \%$			Виконується (0.28 < 1.60)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 $, %			0.04
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta \%$			Виконується (0.04 < 0.51)
Загальний висновок про методику			Коректна

Як випливає з таблиці 3.3, методика визначення метопрололу характеризується достатньою прецизійністю, отримане значення відносного довірчого інтервалу величини Δz (0.28) менше критичного значення для

збіжності результатів (1.6 %). Виконується критерій незначущості систематичної похибки методики. Систематична похибка становила 0.04 %, що вказує на близькість середніх результатів отриманих значень оптичних густин до номінальних, і була практично незначущою, тобто УФ-спектрофотометрична методика характеризується достатньою правильністю в усьому діапазоні концентрацій від 70 % до 130 %

Вивчення внутрішньолабораторної прецизійності проводили на шести зразках однієї серії препарату, різними хіміками-аналітиками, у різні дні, з використанням різного мірного посуду, з розрахунком значення відносного довірчого інтервалу, яке повинно бути меншим максимально припустимої невизначеності результатів аналізу: $\Delta z \leq 1.6$ (при $V = 5\%$) (табл. 3.4).

Таблиця 3.4 – Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності

№ розчину	Величина Z_i , %		
	1 дослід	2 дослід	3 дослід
1	100.05	99.92	100.09
2	99.97	100.11	99.89
3	99.99	100.05	99.98
4	100.14	100.01	100.07
5	100.04	99.94	100.05
6	100.21	99.95	99.85
Середнє Z (%)	100.07	100.00	99.99
RSD_x , %	0.09	0.07	0.10
Відносне стандартне відхилення, RSD_z (%)	0.09		
Відносний довірчий інтервал, Δ_z	$0.08 \leq 1.6$		
Критичне значення збіжності результатів Δ_{As} , %	1.6		

Результати вивчення внутрішньолабораторної прецизійності вказують на те, що величина відносного довірчого інтервалу для шести паралельних

визначень однієї серії препарату задовольняє критерій прийнятності ($\leq 1.6\%$) (див. табл. 3.4).

3.1.4 Прогноз повної невизначеності методики

Розрахунок повної невизначеності аналітичної методики складається з розрахунку невизначеності пробопідготовки (Δ_{SP}) та кінцевої аналітичної операції (Δ_{FAO}). Розрахунок невизначеності пробопідготовки для методики кількісного визначення представлено в табл. 3.5. Невизначеність кінцевої аналітичної операції для спектрофотометричного визначення складає 0.70 %.

Таблиця 3.5 – Розрахунок невизначеності пробопідготовки для методики кількісного визначення

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
Розчин порівняння метопрололу		
1) взяття наважки ФСЗ метопрололу	m_0	$0.2 \text{ мг}/50 \text{ мг} \times 100 \% = 0.40$
2) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 100.0 мл	100	0.12
3) взяття аліквоти піпеткою 1.0 мл	1.0	0.74
4) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.0 мл	25	0.23
Випробовуваний розчин		
5) взяття наважки таблеток	m_1	$0.2 \text{ мг}/98 \text{ мг} \times 100 \% = 0.20$
6) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 100.0 мл	100	0.12
7) взяття аліквоти піпеткою 1.0 мл	1.0	0.74
8) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.0 мл	25	0.23

Розрахована невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) для визначення метопрололу в таблетках склала 1.20 %. Максимальний внесок у невизначеність пробопідготовки вносять операції 3, 7 – взяття аліквоти розчину піпеткою 1 мл.

Повна невизначеність аналітичної методики (Δ_{As}) при аналізі препарату склала 1.39 %.

$$\Delta_{As} = 1.39 \% \leq \max \Delta_{As} = 1.6 \%$$

Запропонована УФ-спектрофотометрична методика визначення метопрололу в таблетках даватиме коректні результати в інших лабораторіях, прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не перевищила критичних значень ($\max \Delta_{As}$).

Результати визначення вмісту метопрололу тартрату у таблетках наведено в таблиці 3.6.

Таблиця 3.6 – Результати кількісного визначення метопрололу тартрату в таблетках

Лікарський засіб	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
Таблетки «Метопрололу тартрат» (Фармак) 50 мг серія № 10822	0.0504	$\bar{m} = 0.0502$ г $S = 8.33 \times 10^{-4}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 8.75 \times 10^{-4}$ RSD = 1.66 % $\varepsilon = 1.74$ %
	0.0509	
	0.0505	
	0.0496	
	0.0511	
	0.0489	
Таблетки «Метопрололу тартрат» (Фармак) 50 мг серія № 30519	0.0490	$\bar{m} = 0.0502$ г $S = 8.02 \times 10^{-4}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 8.42 \times 10^{-4}$ RSD = 1.60 % $\varepsilon = 1.68$ %
	0.0502	
	0.0515	
	0.0499	
	0.0502	
	0.0501	
Таблетки «Метопрололу тартрат» (Фармак) 50 мг серія № 31020	0.0487	$\bar{m} = 0.0501$ г $S = 1.19 \times 10^{-3}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 1.25 \times 10^{-3}$ RSD = 2.37 % $\varepsilon = 2.49$ %
	0.0512	
	0.0507	
	0.0490	
	0.0515	
	0.0495	

3.1.5 Робасність методики

Робасність розробленої УФ-спектрофотометричної методики визначення метопрололу в таблетках вивчали шляхом оцінювання стабільності аналізованих

розчинів в часі (впродовж 2 год). Результати вивчення стабільності випробовуваних розчинів в часі представлено в табл. 3.7. Результати вивчення стабільності, що наведено в табл. 3.7, свідчать про те, що аналізовані розчини є стабільними впродовж 2 год.

Таблиця 3.7 – Результати вивчення стабільності випробовуваного розчину метопрололу (1) та розчину ФСЗ метопрололу (2)

№	t, хв						A _{сер}	RSD _t , %
	0	20	40	60	90	120		
1	0.455	0.455	0.453	0.452	0.450	0.448	0.452	0.62
2	0.452	0.450	0.450	0.447	0.446	0.441	0.448	0.88

Підсумовуючи вище описані факти можна зробити висновок, що розроблена УФ-спектрофотометрична методика визначення метопрололу в ЛЗ є експресною, простою у виконанні, нетрудомісткою (не вимагає проведення дериватизації), недороговартісною, «зеленою» та може застосовуватися в рутинному аналізі ЛЗ метопрололу, коли час та вартість є критичними. Обмеженнями щодо застосування запропонованої УФ-спектрофотометричної методики є визначення метопрололу в комбінованих ЛФ за умови, що інший АФІ буде поглинати в діапазоні 220-230 нм.

3.2 Методологія вибору реагенту для розробки спектрофотометричних методик визначення метопрололу в субстанції та лікарських засобах

Сульфоталеїнові барвники широко застосовуються як реагенти в фармацевтичному аналізі з метою розробки спектрофотометричних методик визначення АФІ в субстанціях та ЛЗ [77-107]. В науковій літературі описано одну спектрофотометричну методику визначення метопрололу в ЛФ з використанням сульфоталеїнового барвника БТС в середовищі буферного розчину рН 3.4 з подальшою екстракцією продукту реакції хлороформом з максимумом

поглинання за довжини хвилі 413 нм [11]. Описана методика [11], яка базувалася на взаємодії метопрололу та БТС, є цікавою, проте під час ретельного аналізу цієї аналітичної методики ми звернули увагу на велику кількість взятого для аналізу метопрололу, значну кількість відходів та використання хлороформу (40 мл). Все вищесказане не відповідає принципам «зеленої» хімії (бал за методом AGREE становив 0.67). МВ та МКВ становили 0.36 мкг/мл та 1.10 мкг/мл відповідно. Ще одна спектрофотометрична методика визначення, запропонована авторами в даній статті [11], базувалася на взаємодії метопрололу з 2,3-дихлоро-5,6-диціано-1,4-бензохіноном в середовищі ацетонітрилу з утворення продукту реакції з максимумом поглинання за довжини хвилі 457 нм. МВ та МКВ становили 0.75 мкг/мл та 2.29 мкг/мл відповідно. Бал за методом AGREE становив 0.77, що позитивно характеризує дану аналітичну методику. Спектрофотометрична методика визначення метопрололу, яка базувалася на взаємодії з 2,3-дихлоро-1,4-нафтохіноном в середовищі ДМФА при нагріванні з утворенням продукту реакції з максимумом поглинання за довжини хвилі 493 нм, розроблена Запорізькою науковою школою під керівництвом проф. Васюк С.О. [12]. МВ та МКВ становили 1.38 мкг/мл та 4.49 мкг/мл відповідно. Бал за методом AGREE становив 0.58, що негативно характеризує дану аналітичну методику, проте це дало нам розуміння, що хінони також є перспективними реагентами для спектрофотометричного визначення метопрололу за умови, що інший АФІ не взаємодіятиме, що є малоімовірно при сумісному аналізі з мельдонієм. Як вже зазначалося в розділі 1.2, спектрофотометричні методики мають також і деякі недоліки, а саме часто підібрані умови проведення кількісного визначення не відповідають принципам «зеленої» хімії, є трудомісткими та довготривалими, часто вимагають нагрівання та корегування значення рН, екстракції.

В процесі проведення попередніх експериментальних досліджень з вибору оптимального реагента нами апробовано різні реагенти. Основні вимоги, які висувалися до реагента, – екологічна безпека, висока чутливість реакції, простота пробопідготовки (відсутність екстракції, нагрівання).

В процесі вибору оптимального реагенту для розробки спектрофотометричної методики апробовано барвники (метилловий червоний, метиловий синій, бромкрезоловий пурпуровий, тимоловий синій, БКЗ, БФС, БТС) та хінони (*n*-хлораніл, алізарин) [108].

На рисунку 3.3 представлено спектри поглинання, отримані при апробації метилового червоного як потенційного реагента для спектрофотометричної методики визначення метопрололу тартрату. Як видно з рис. 3.3, утворюється продукт взаємодії метопрололу тартрату та метилового червоного з максимумом поглинання за довжини хвилі 400 нм, проте необхідним є корегування рН, що буде вносити пенальті бали при розрахунку «зеленості» аналітичної методики, а також ускладнювати пробопідготовку, що є небажаним для рутинного фармацевтичного аналізу.

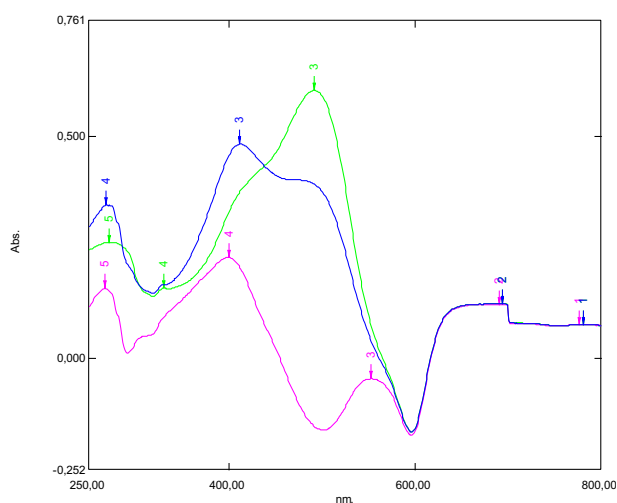


Рисунок 3.3 – Спектри поглинання продукту реакції метопрололу тартрату ($C_m=1.47 \times 10^{-3}$ M) з метиловим червоним ($C_m=1.84 \times 10^{-3}$ M) проти метанолу (синій), проти метилового червоного (рожевий) та метилового червоного проти метанолу (салатовий)

На рисунку 3.4 представлено спектри поглинання, отримані при апробації метиленового синього як потенційного реагента для спектрофотометричної методики визначення метопрололу тартрату.

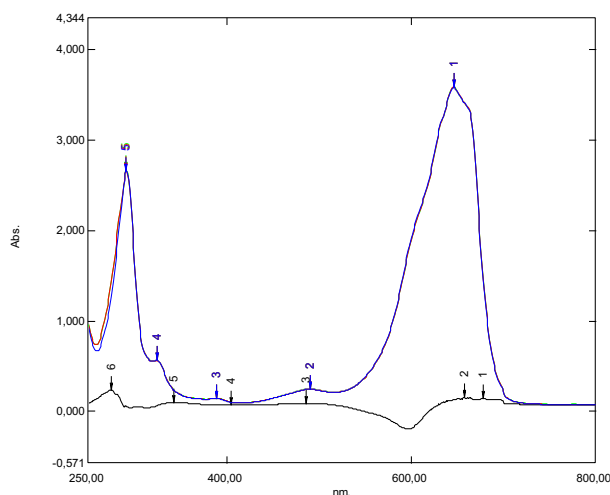


Рисунок 3.4 – Спектри поглинання продукту реакції метопрололу тартрату ($C_m=1.50 \times 10^{-3}$ M) з метиленовим синім ($C_m=1.52 \times 10^{-3}$ M) проти метанолу (червоний), проти метиленового синього (чорний) та метиленовий синій проти метанолу (синій)

Як видно з рис. 3.4, спектри наклалися, тому можна зробити висновок, що метопролол не взаємодіє з метиленовим синім. На спектрах спостерігається високе значення оптичної густини. Враховуючи, що це були попередні дослідження і ми не брали до уваги метиленовий синій як потенційний барвник, тому і не проводилося подальше розведення розчину для досягнення задовільного значення оптичної густини.

На рисунку 3.5 представлено спектри поглинання, отримані при апробації бромкрезолового пурпурового як потенційного реагента для спектрофотометричної методики визначення метопрололу тартрату. Аналогічно як і з метиленовим синім, не відбувається взаємодія метопрололу з бромкрезоловим пурпуровим.

Спектри поглинання, отримані при апробації тимолового синього як потенційного реагента для спектрофотометричної методики визначення метопрололу тартрату наведено на рис. 3.6. Аналогічно як і з метиленовим синім та бромкрезоловим пурпуровим, не відбувається взаємодія метопрололу з тимоловим синім.

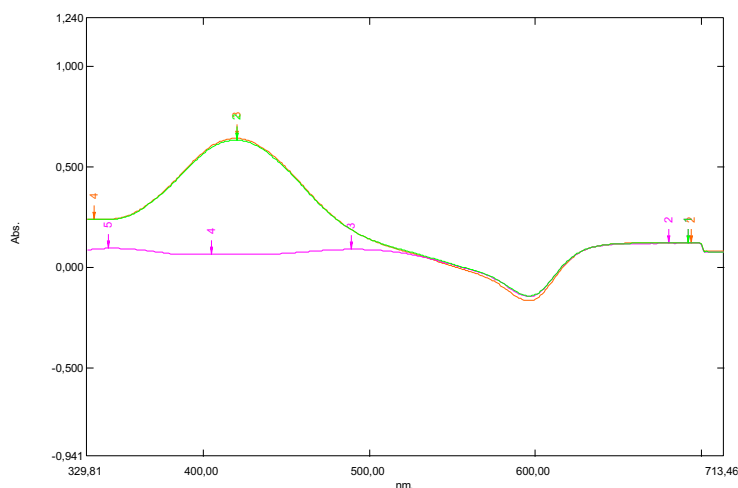


Рисунок 3.5 – Спектри поглинання продукту реакції метопрололу тартрату ($C_m=1.52 \times 10^{-4} \text{ M}$) з бромкрезоловим пурпуровим ($C_m=1.62 \times 10^{-4} \text{ M}$) проти метанолу (салатовий), проти бромкрезолового пурпурового (рожевий) та бромкрезоловий пурпуровий проти метанолу (оранжевий)

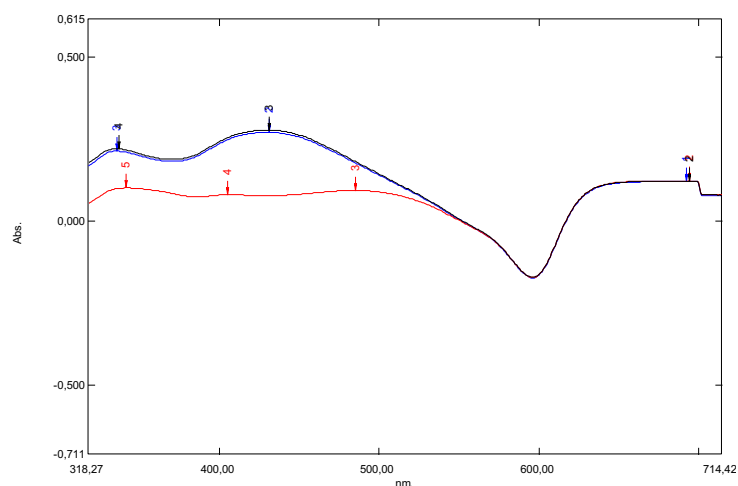


Рисунок 3.6 – Спектри поглинання продукту реакції метопрололу тартрату ($C_m=1.52 \times 10^{-4} \text{ M}$) з тимоловим синім ($C_m=1.54 \times 10^{-4} \text{ M}$) проти метанолу (червоний), проти тимолового синього (чорний) та тимоловий синій проти метанолу (синій)

БКЗ при взаємодії з метопрололу тартратом утворює продукт реакції з максимумом поглинання за довжини хвилі 624 нм [109, 110]. Спектри поглинання продукту реакції метопрололу тартрату з БКЗ представлено на рисунку 3.7.

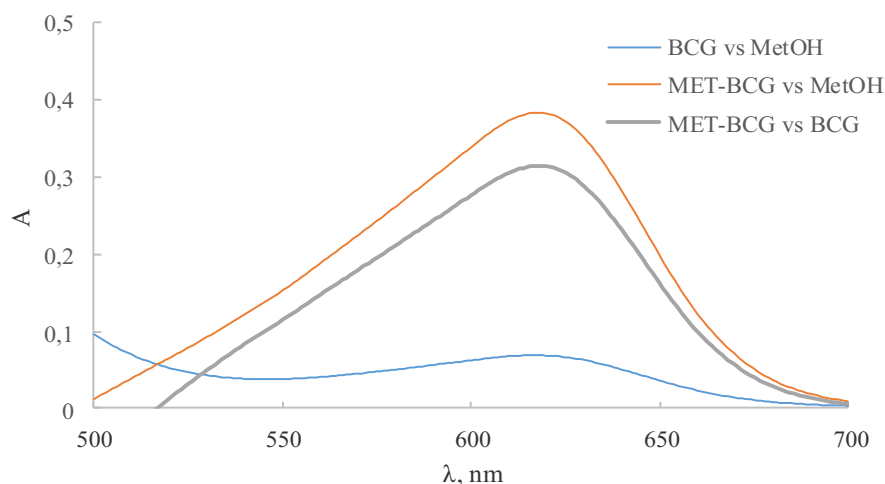


Рисунок 3.7 – Спектри поглинання продукту реакції метопрололу тартрату ($C_M=1.60 \times 10^{-4} M$) з БКЗ ($C_M=1.60 \times 10^{-4} M$) проти метанолу (червоний), проти БКЗ (сірий) та БКЗ проти метанолу (синій)

Враховуючи результати, отримані на рис. 3.7, нами взято до уваги БКЗ як реагент для подальшої розробки спектрофотометричної методики визначення метопрололу в субстанції та ЛЗ.

Ще одним апробованим нами сульфоталеїновим барвником був БФС. БФС при взаємодії з метопрололу тартратом утворює продукт реакції з максимумом поглинання за довжини хвилі 595 нм [111, 112]. Спектр поглинання продукту реакції метопрололу тартрату з БФС представлено на рисунку 3.8. Враховуючи отримані результати, обрано БФС як реагент для подальшої ще однієї розробки спектрофотометричної методики визначення метопрололу в субстанції та ЛЗ.

Як ми вже описували вище, БТС утворює з метопрололом в середовищі буферного розчину рН 3.4 з подальшою екстракцією хлороформом продукт реакції з максимумом поглинання за довжини хвилі 413 нм [11]. Нами попередньо зазначалися недоліки розробленої методики, проте БТС може бути застосований для розробки спектрофотометричної методики визначення метопрололу з модифікацією умов проведення кількісного визначення для забезпечення

відповідності принципам «зеленої» хімії [113, 114]. Спектри поглинання продукту реакції метопрололу тартрату з БТС представлено на рисунку 3.9.

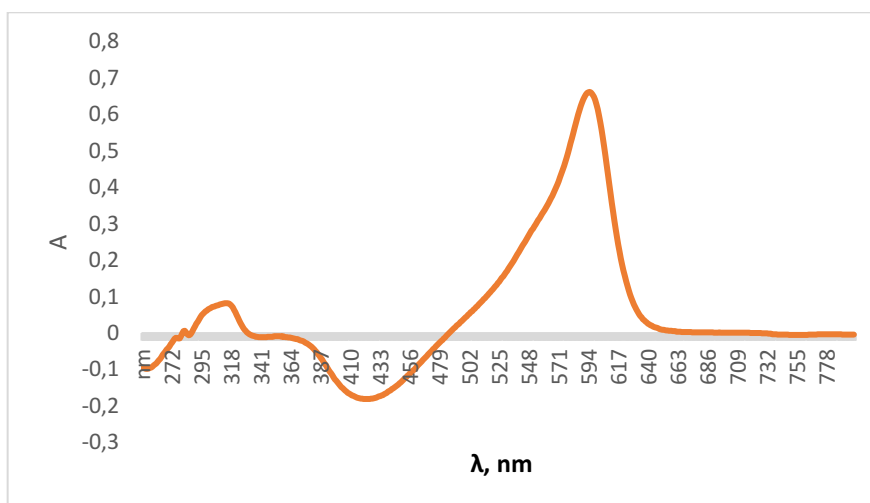


Рисунок 3.8 – Спектр поглинання продукту реакції метопрололу тартрату ($C_M=2.00 \times 10^{-4}$ M) з БФС ($C_M=2.00 \times 10^{-4}$ M)

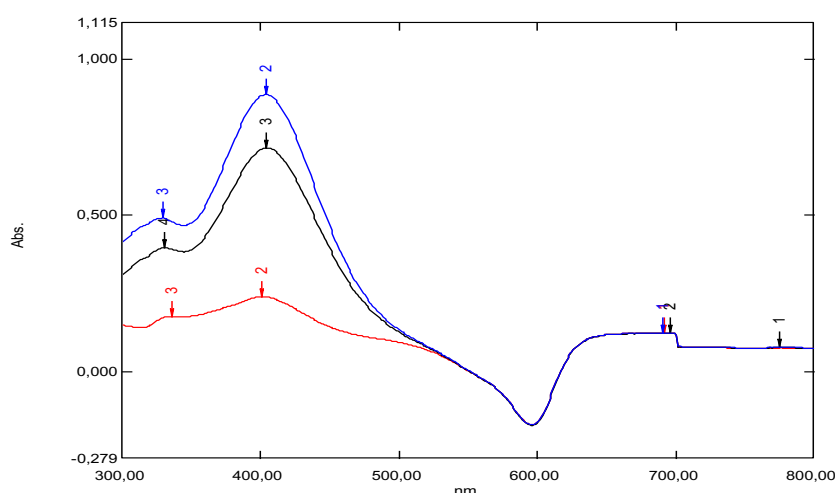





Рисунок 3.9 – Спектри поглинання продукту реакції метопрололу тартрату ($C_M=1.60 \times 10^{-4}$ M) з БТС ($C_M=1.60 \times 10^{-4}$ M) проти ацетонітрилу (синій), проти БТС (чорний) та БТС проти ацетонітрилу (червоний)

Підсумовуючи вищесказане можна зробити висновок, що з усіх апробованих барвників можна вважати потенційними реагентами для подальшої розробки спектрофотометричної методики визначення метопрололу в субстанції та ЛЗ БКЗ, БФС, БТС. Аналітичні параметри потенційних реагентів та умови проведення спектрофотометричного визначення, встановлені попередніми дослідженнями, представлено в таблиці 3.8.

Таблиця 3.8 – Аналітичні параметри та умови проведення спектрофотометричного визначення, встановлені попередніми дослідженнями

Барвник	Довжина хвилі, нм	Стехіометричні співвідношення	Середовище	Молярний показник поглинання (ϵ)	Екологічність методики (метод AGREE)
БФС	595	1:1	Метанол	2.38×10^4	
БТС	402	1:1	Ацетонітрил	1.60×10^4	
БКЗ	624	1:1	Метанол	2.59×10^4	

Як випливає з табл. 3.8, запропоновані потенційні реагенти дають високочутливі реакції з метопрололу тартратом, що протікають при кімнатній температурі, не вимагають нагрівання чи корегування значення рН. Попередньо розраховані значення балу методом AGREE свідчать про екологічну безпеку потенційних аналітичних методик. Враховуючи вищеописані факти, обрано БКЗ, БФС та БТС для подальшої розробки спектрофотометричних методик визначення метопрололу в субстанції та ЛЗ.

Як вже зазначалося вище, хінони також застосовуються як реагенти в розробці спектрофотометричних методик визначення метопрололу [11, 12]. Нами опрацьовано *n*-хлораніл та алізарин як потенційні реагенти з метою прийняття рішення щодо подальшої можливості їх застосування. *n*-хлораніл з метопрололу тартратом в середовищі ДМФА при нагріванні утворює продукт реакції з максимумами поглинання за довжини хвилі 368 нм та 519 нм, тоді як алізарин – 508 нм. Спектри поглинання продуктів реакції метопрололу тартрату з *n*-хлораніл та алізарином представлено на рисунках 3.10, 3.11.

Враховуючи той факт, що три сульфоталеїнові барвники (БКЗ, БФС, БТС) відібрано як потенційні реагенти для спектрофотометричного визначення метопрололу, ми не брали до уваги *n*-хлораніл та алізарин, оскільки взаємодія з метопрололом відбувається в середовищі ДМФА, що є не «зеленим» розчинником. Умовою проведення реакцій є нагрівання, що також негативно

позначається на тривалості, складності пробопідготовки та «зеленості» методики. Хочемо також відмітити, що зазначені реакції не є специфічними і мельдоній також взаємодіє з запропонованими хінонами, що було доведено експериментальним шляхом та описано в розділі 3.7.

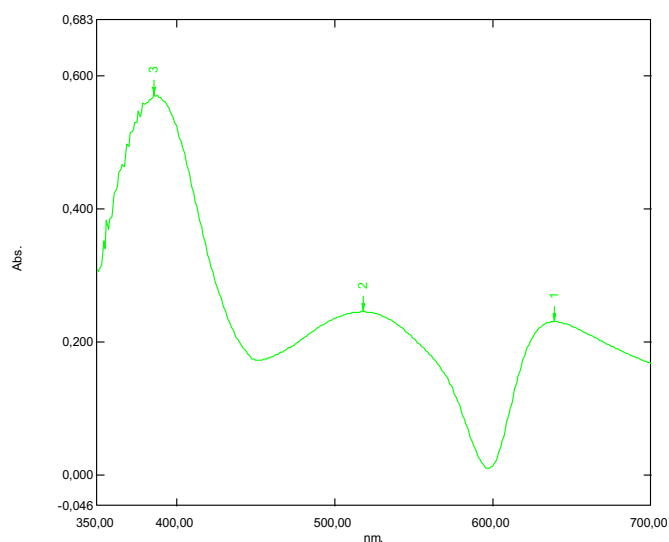


Рисунок 3.10 – Спектр поглинання продукту реакції метопрололу тартрату ($C_M=3.84 \times 10^{-3}$ М) з 1 % розчином *n*-хлоранілу в середовищі диметилформаміду

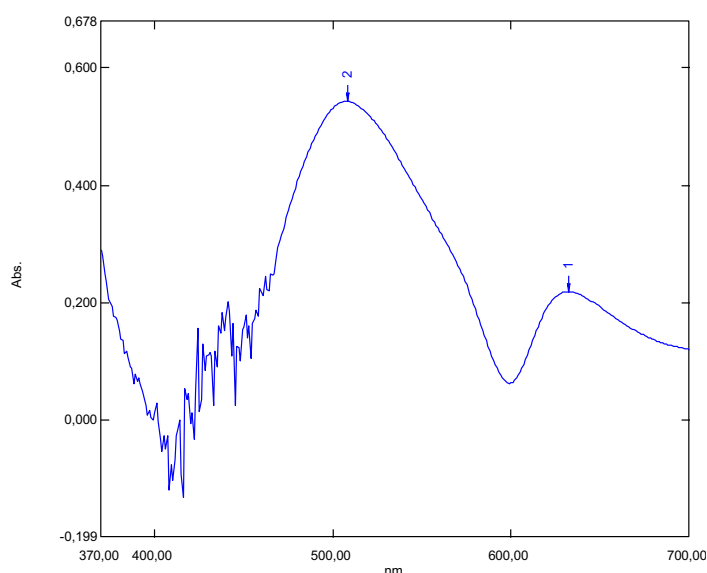


Рисунок 3.11 – Спектр поглинання продукту реакції метопрололу тартрату ($C_M=3.84 \times 10^{-3}$ М) з 0.5 % розчином алізарину в середовищі диметилформаміду

Підсумовуючи вищесказане можна зробити висновок, що нами апробовано 9 речовин з метою вибору потенційного реагента для подальшої розробки спектрофотометричних методик. З різних причин метиловий червоний, метиленовий синій, бромкрезоловий пурпуровий, тимоловий синій, *n*-хлораніл, алізарин як реагенти не бралися до уваги, оскільки вони давали негативний або незадовільний результат. Узагальнена інформація щодо методології вибору реагенту представлена в таблиці 3.9. Тому ми зупинили вибір на БКЗ, БФС та БТС та використали їх як реагенти для подальшої розробки спектрофотометричних методик.

Таблиця 3.9 – Методологія вибору реагента для розробки спектрофотометричних методик визначення метопрололу в субстанції та ЛЗ

№	Назва речовини	Концентрація	Можливість застосування	Примітка
1.	Метиловий червоний	1.84×10^{-3} М	Не застосовували	Корегування рН
2.	Метиленовий синій	1.52×10^{-3} М	Не застосовували	Не взаємодіє
3.	Бромкрезоловий пурпуровий	1.62×10^{-4} М	Не застосовували	Не взаємодіє
4.	Тимоловий синій	1.54×10^{-4} М	Не застосовували	Не взаємодіє
5.	БКЗ	1.60×10^{-4} М	Застосовували	Середовище метанолу, максимум поглинання за довжини хвилі 624 нм
6.	БФС	2.00×10^{-4} М	Застосовували	Середовище метанолу, максимум поглинання за довжини хвилі 595 нм
7.	БТС	1.60×10^{-4} М	Застосовували	Середовище ацетонітрилу, максимум поглинання за довжини хвилі 402 нм
8.	<i>n</i> -хлораніл	1 %	Не застосовували	Використання ДМФА, нагрівання
9.	Алізарин	0.5 %	Не застосовували	Використання ДМФА, нагрівання

3.3 Розробка та валідація спектрофотометричної методики визначення метопрололу в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромкрезоловим зеленим

В розділі 3.2 розглянуто можливість застосування БКЗ як реагенту для спектрофотометричного визначення метопрололу в субстанції та ЛЗ [109, 110]. При введенні метопрололу тартрату до розчину БКЗ спостерігалось зменшення смуги поглинання однократно йонізованої форми барвника з одночасним збільшенням смуги поглинання двократно йонізованої форми барвника ($\lambda_{\max} = 624 \text{ нм}$) (див. рис. 3.7).

Важливим етапом дослідження є вивчення умов проведення реакції таких як вибір розчинника, концентрації реагенту, оптимальної довжини хвилі, підбір стехіометричних співвідношень, а також вивчення стабільності отриманого продукту реакції. З метою вибору оптимального розчинника апробовано метанол, етанол, ацетонітрил, етилацетат та хлороформ, проте, беззаперечно, нами враховувалися принципи «зеленої» хімії, токсичні розчинники не бралися до уваги, але вивчалися на першому етапі проведених досліджень. На рисунку 3.12 представлено абсолютні значення абсорбції метопрололу тартрату з БКЗ (ΔA) у різних розчинниках.

Як впливає з рис. 3.12, максимальне поглинання спостерігалось в розчині метанолу та ацетонітрилу з БКЗ, тоді як етанол, хлороформ та етилацетат були непридатними. Враховуючи принципи «зеленої» хімії та отримані абсолютні значення абсорбції, обрано метанол для подальших досліджень. Оптимальна концентрація реагенту (розчину БКЗ) – $1.6 \times 10^{-4} \text{ М}$. Важливим є стабільність отриманого продукту реакції в часі. Якщо розчини є нестабільними, то подальша розробка методики є неможливою або ж можливою за умови додавання відповідних стабілізуючих речовин, що утруднює пробопідготовку та вносить корективи в пенальті бали «зеленості» аналітичної методики. В процесі проведених досліджень встановлено, що розчини є стабільними впродовж 45 хв,

проте ми рекомендуємо вимірювати оптичну густину свіжоприготовлених розчинів (рис. 3.13).

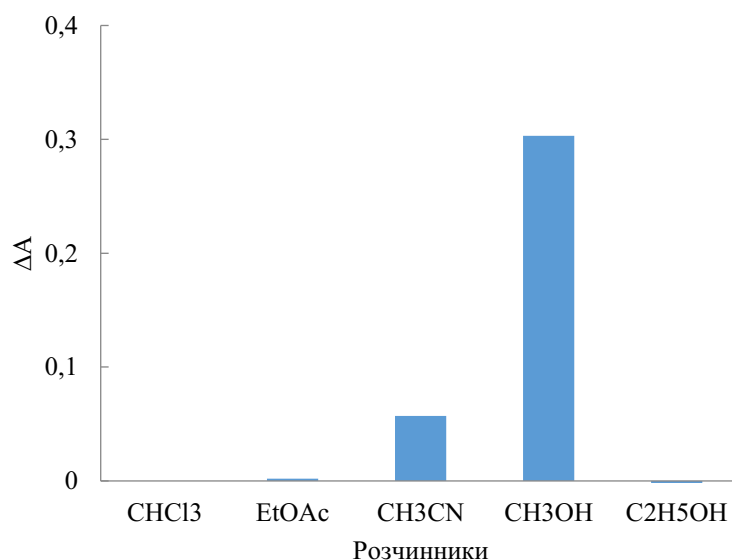


Рисунок 3.12 – Абсолютні значення абсорбції метопрололу тартрату з БКЗ у різних розчинниках ($C_m = 1.6 \times 10^{-4}$ M)

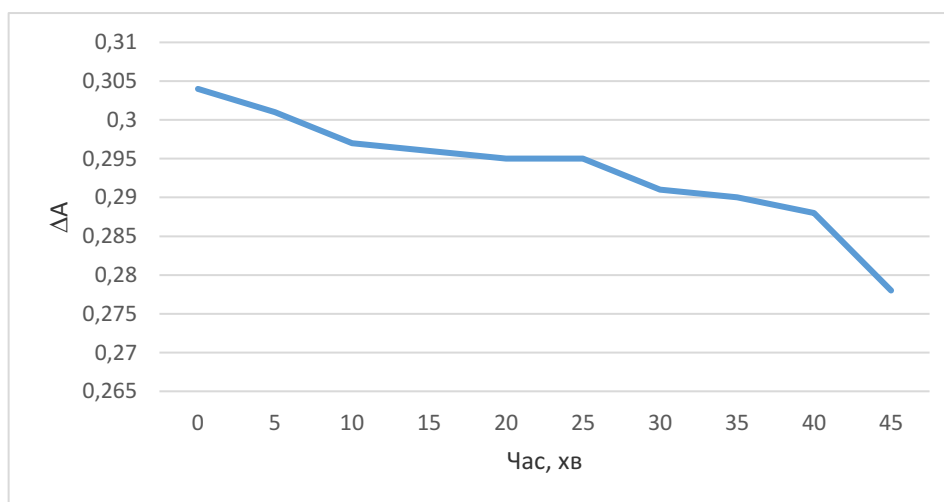


Рисунок 3.13 – Графік залежності оптичної густини від часу

Стехіометричні коефіцієнти реагуючих компонентів між метопрололу тартратом та БКЗ визначали методом неперервних змін (метод Жоба) і насичення (метод молярних співвідношень). Графік залежності абсорбції від

складу ізомолярного розчину за довжини хвилі 624 нм (метод Жоба) представлено на рисунку 3.14. Криві насичення (метод молярних співвідношень) наведено на рисунку 3.15.

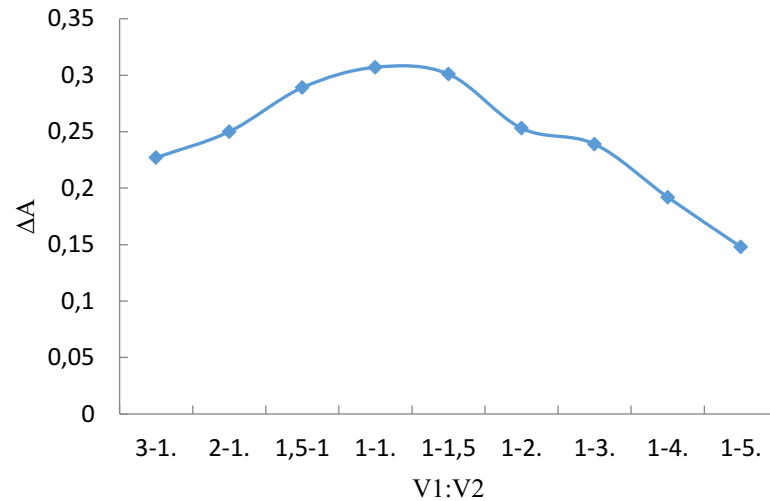


Рисунок 3.14 – Графік залежності абсорбції від складу ізомолярного розчину (V_1 – об'єм 1.6×10^{-4} розчину метопрололу тартрату, V_2 – об'єм 1.6×10^{-4} розчину БКЗ) за довжини хвилі 624 нм

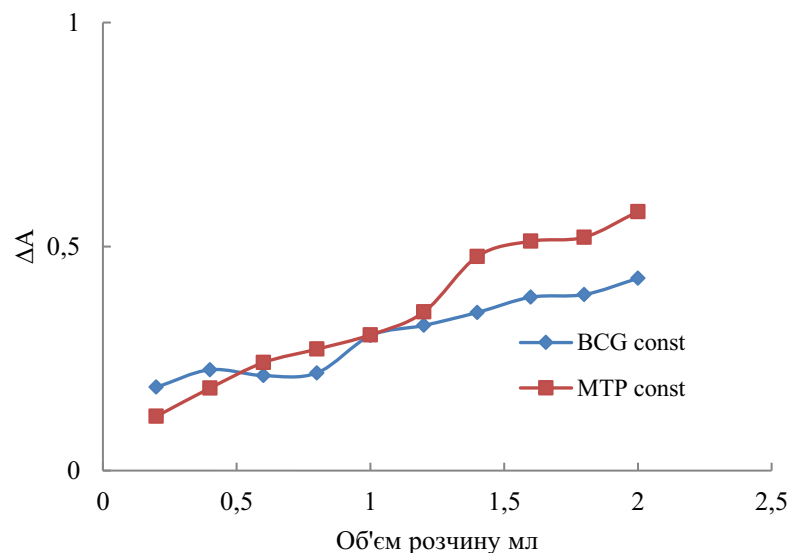


Рисунок 3.15 – Криві насичення: 1 – метопрололу тартрату при постійній концентрації БКЗ (1.00 мл 1.6×10^{-4} розчину); 2 – БКЗ при постійній концентрації метопрололу тартрату (1.00 мл 1.6×10^{-4} М розчину)

Результати, отримані на рис. 3.14, 3.15, свідчать про те, що стехіометричні співвідношення реагуючих компонентів «метопрололу тартрат – БКЗ» становлять 1:1.

Нами розраховано показники чутливості реакції метопрололу тартрату з БКЗ. Встановлено, що молярний показник поглинання (ϵ) становив 2.59×10^4 , питома поглинання (a) – 3.78×10^{-2} , коефіцієнт Сендела (Ws) – 0.026.

Запропоновану спектрофотометричну методику визначення метопрололу за реакцією з БКЗ валідовано відповідно до вимог ДФУ [74] та ICH Q2 [75] за наступними показниками: специфічність, лінійність, діапазон застосування, правильність, прецизійність та робастність.

3.3.1 Специфічність методики

З метою вивчення специфічності спектрофотометричної методики визначення метопрололу за реакцією з БКЗ готували розчин допоміжних речовин («плацебо»). Результати вивчення специфічності аналітичної методики визначення метопрололу в таблетках представлено в таблиці 3.10. Результати вивчення специфічності аналітичної методики вказують на те, що абсорбція допоміжних речовин («плацебо») є незначною (знайдене значення δ_{noise} становить 0.33 %) та не перевищує критерій прийнятності (не більше 0.5 %).

Таблиця 3.10 – Результати вивчення специфічності спектрофотометричної методики визначення метопрололу в таблетках за реакцією з БКЗ

Абсорбція плацебо (А плацебо)	Абсорбція розчину домішок ЛФ (А домішок)	Абсорбція розчину порівняння (Ast)	Знайдене значення δ_{noise} , %	Критерій прийнятності
0.001	-	0.301	0.33	не більше 0.5 %

3.3.2 Лінійність, діапазон застосування методики

Лінійність спектрофотометричної методики визначення метопрололу за реакцією з БКЗ вивчали в діапазоні концентрацій 5.47-38.30 мкг/мл відповідно до

вимог ДФУ методом найменших квадратів, використовуючи модельні розчини. Метрологічні характеристики рівняння регресійної залежності для кількісного визначення метопрололу наведено в таблиці 3.11. Параметри лінійності (табл. 3.11) відповідають вимогам ДФУ на всьому діапазоні застосування аналітичної методики (5.47-38.30 мкг/мл). МВ метопрололу становила 0.41 мкг/мл, МКВ – 1.24 мкг/мл.

Таблиця 3.11 – Метрологічні характеристики лінійної залежності

Величина	Значення	Критерій	Висновок (відповідає або не відповідає)
$b \pm (S_b)$	$0.025 \pm (0.0128)$	–	
$a \pm (S_a)$	$0.0112 \pm (0.0031)$	$ a \leq 2.6$	Відповідає
R^2	0.9979	> 0.9951	Відповідає
МВ (мкг/мл)	0.41	–	
МКВ (мкг/мл)	1.24	–	
Підпорядкування закону Бера в діапазоні концентрацій (мкг/мл)	5.47-38.30	–	

3.3.3 Правильність та прецизійність методики

Правильність та прецизійність спектрофотометричної методики визначення метопрололу за реакцією з БКЗ перевіряли шляхом приготування модельних розчинів з точно відомою концентрацією з вмістом 70-130 % від номінального. Одержані результати проведених розрахунків наведено в табл. 3.12.

Як видно з результатів, отриманих в таблиці 3.12, методика визначення метопрололу характеризується достатньою прецизійністю, отримане значення відносного довірчого інтервалу величини Δz (0.16 %) менше критичного значення для збіжності результатів (1.6 %). Виконується критерій незначущості систематичної похибки методики. Систематична похибка становила 0.06 %, що вказує на достатню близькість середніх результатів отриманих значень оптичних

густин до номінальних, і була практично незначущою, тобто спектрофотометрична методика визначення метопрололу за реакцією з БКЗ характеризується достатньою правильністю в усьому діапазоні концентрацій від 70 % до 130 %

Таблиця 3.12 – Результати аналізу модельних сумішей і їх статистична обробка для кількісного визначення

Модельні розчини	Вміст метопрололу, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100 \%$
	введено, $X_i = (C_i/C_{rs}) 100 \%$	знайдено, $Y_i = (A_i/A_{rs}) 100 \%$	
M ₁	70.01	70.07	100.09
M ₂	80.04	79.99	99.94
M ₃	89.95	89.99	100.04
M ₄	95.05	95.11	100.06
M ₅	100.01	100.09	100.08
M ₆	104.93	105.01	100.08
M ₇	110.01	110.12	100.10
M ₈	120.11	120.27	100.13
M ₉	129.97	130.05	100.06
Середнє значення, Z, %			100.06
Стандартне відхилення, S _z , %			0.07
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95 \%, 8) \cdot S_z = 2.3060 S_z, \%$			0.16
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta_{As} = 1.6 \%$			Виконується (0.16 < 1.6)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 , \%$			0.06
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta \%$			Виконується (0.06 < 0.51)
Загальний висновок про методику			Коректна

Вивчення внутрішньолабораторної прецизійності проводили на шести зразках однієї серії препарату, різними хіміками-аналітиками, у різні дні, з використанням різного мірного посуду, з розрахунком значення відносного довірчого інтервалу, яке повинно бути меншим максимально припустимої невизначеності результатів аналізу: $\Delta z \leq 1.6$ (при $V = 5 \%$) (табл. 3.13).

Таблиця 3.13 – Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності

№ розчину	Величина Z_i , %		
	1 дослід	2 дослід	3 дослід
1	100.12	99.95	100.01
2	100.03	100.14	100.19
3	99.90	99.87	100.08
4	100.09	100.08	99.81
5	99.88	100.05	100.16
6	100.16	100.02	100.06
Середнє Z (%)	100.03	100.02	100.06
RSD_x , %	0.12	0.10	0.14
Відносне стандартне відхилення, RSD_Z (%)	0.12		
Відносний довірчий інтервал, Δ_Z	$0.10 \leq 1.6$		
Критичне значення збіжності результатів Δ_{As} , %	1.6		

Результати вивчення внутрішньолабораторної прецизійності вказують на те, що величина відносного довірчого інтервалу для шести паралельних визначень однієї серії препарату задовольняє критерій прийнятності (≤ 1.6 %) (див. табл. 3.13).

3.3.4 Прогноз повної невизначеності методики

Розрахунок повної невизначеності аналітичної методики складається з розрахунку невизначеності пробопідготовки (Δ_{SP}) та кінцевої аналітичної операції (Δ_{FAO}). Розрахунок невизначеності пробопідготовки для методики кількісного визначення представлено в таблиці 3.14. Невизначеність кінцевої аналітичної операції для спектрофотометричного визначення складає 0.70 %.

Таблиця 3.14 – Розрахунок невизначеності пробопідготовки для методики кількісного визначення

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
Розчин порівняння метопрололу		
1) взяття наважки ФСЗ метопрололу	m_0	$0.2 \text{ мг}/25 \text{ мг} \times 100 \% = 0.80$
2) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 250.0 мл	250	0.08
3) взяття аліквоти піпеткою 1.0 мл	1.0	0.74
4) взяття 1.6×10^{-4} розчину БКЗ піпеткою 1.0 мл	-	0.74
5) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 10.0 мл	10	0.50
Випробовуваний розчин		
6) взяття наважки таблеток	m_1	$0.2 \text{ мг}/61 \text{ мг} \times 100 \% = 0.33$
7) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 250.0 мл	250	0.08
8) взяття аліквоти піпеткою 1.0 мл	1.0	0.74
9) взяття 1.6×10^{-4} розчину БКЗ піпеткою 1.0 мл	-	0.74
10) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 10.0 мл	10	0.50
Компенсаційний розчин		
11) взяття наважки БКЗ	-	$0.2 \text{ мг}/27.9 \text{ мг} \times 100 \% = 0.71$
12) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 250.0 мл	-	0.08

Розрахована невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) для визначення метопрололу в таблетках склала 1.99 %. Максимальний внесок у невизначеність пробопідготовки вносять операції 1 (взяття наважки ФСЗ метопрололу) та 3, 4, 8, 9 (взяття розчину піпеткою 1.0 мл). Повна невизначеність аналітичної методики (Δ_{As}) при аналізі препарату склала 2.22 %.

$$\Delta_{As} = 2.22 \% \leq \max \Delta_{As} = 2.40 \%$$

Запропонована спектрофотометрична методика визначення метопрололу в таблетках за реакцією з БКЗ даватиме коректні результати в інших лабораторіях, прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не перевищила критичних значень ($\max \Delta_{As}$).

Результати визначення вмісту метопрололу тартрату у таблетках наведено в таблиці 3.15.

Таблиця 3.15 – Результати кількісного визначення метопрололу тартрату в таблетках

Лікарський засіб	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
Таблетки «Метопрололу тартрат» (Фармак) 50 мг серія № 10822	0.0504	$\bar{m} = 0.0501$ г
	0.0505	$S = 3.6 \times 10^{-4}$
	0.0501	$t = 2.57$
	0.0495	$\Delta x = 3.78 \times 10^{-4}$
	0.0501	RDS = 0.72
	0.0499	$\varepsilon = 0.75$ %
Таблетки «Метопрололу тартрат» (Фармак) 100 мг серія № 30421	0.1004	$\bar{m} = 0.1003$ г
	0.1010	$S = 6.11 \times 10^{-4}$
	0.0995	$t = 2.57$
	0.0997	$\Delta x = 6.42 \times 10^{-4}$
	0.1009	RDS = 0.61
	0.1002	$\varepsilon = 0.64$ %

3.3.5 Робасність методики

Робасність розробленої спектрофотометричної методики визначення метопрололу в таблетках за реакцією з БКЗ вивчали шляхом оцінювання стабільності аналізованих розчинів в часі (див. рис. 3.13) та впливу кількості доданого реактиву (1.6×10^{-4} розчину БКЗ) на оптичну густину (табл. 3.16). Результати вивчення впливу кількості доданого розчину БКЗ на оптичну густину, що наведено в табл. 3.16, свідчать про те, що коливання кількості доданого реагенту (розчину БКЗ) в межах ± 10 % не впливає на значення оптичної густини.

Таблиця 3.16 – Вплив кількості доданого розчину БКЗ на оптичну густину

Об'єм 1.6×10^{-4} М розчину БКЗ, мл	% БКЗ	ΔA
0.90	90	0.297
0.95	95	0.298
1.00	100	0.302
1.05	105	0.303
1.10	110	0.307

Підсумовуючи вище описані факти можна зробити висновок, що розроблена спектрофотометрична методика визначення метопрололу в ЛЗ за реакцією з БКЗ є простою у виконанні, нетрудомісткою (без нагрівання та корегування значення рН), недороговартісною, «зеленою», неекстракційною та може застосовуватися в рутинному аналізі ЛЗ метопрололу та при проведенні арбітражного контролю.

3.4 Розробка та валідація спектрофотометричної методики визначення метопрололу в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромфеноловим синім

В розділі 3.2 розглянуто можливість застосування БФС як реагенту для спектрофотометричного визначення метопрололу в субстанції та ЛЗ [111, 112]. При введенні метопрололу тартрату до розчину БФС спостерігалось зменшення смуги поглинання однократно йонізованої форми барвника з одночасним збільшенням смуги поглинання двократно йонізованої форми барвника ($\lambda_{\max} = 595$ нм) (див. рис. 3.8).

Як вже зазначалося в розділі 3.3, важливим етапом дослідження є вивчення умов проведення реакції. З метою вибору оптимального розчинника апробовано такі розчинники як метанол, етанол, ацетонітрил, етилацетат та хлороформ. Токсичні розчинники не бралися до уваги, але вивчалися на першому етапі

проведених досліджень. На рисунку 3.16 представлено абсолютні значення абсорбції метопрололу тартрату з БФС (ΔA) у різних розчинниках.

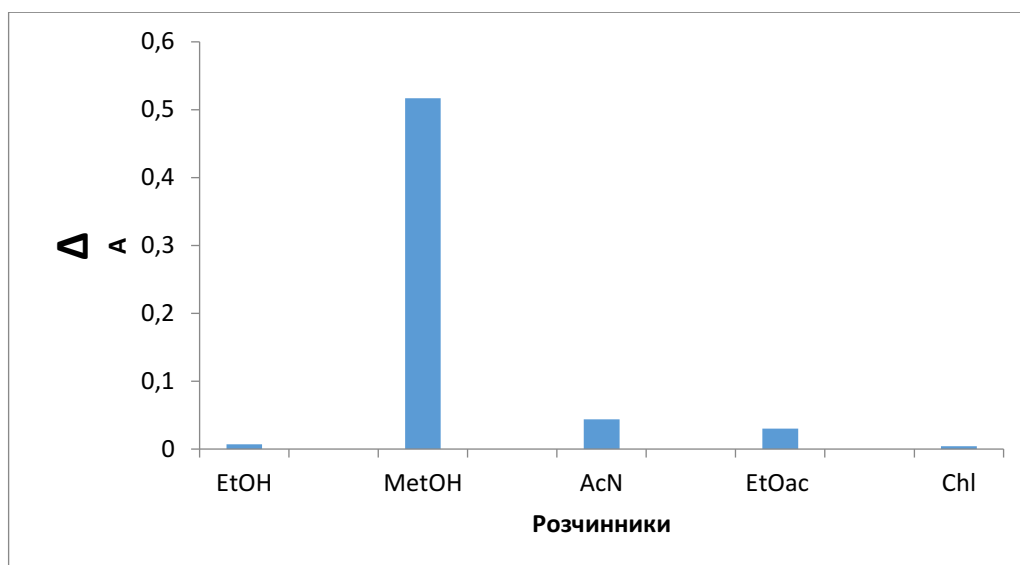


Рисунок 3.16 – Абсолютні значення абсорбції метопрололу тартрату з БФС у різних розчинниках ($C_m = 2.0 \times 10^{-4}$ М)

Як видно з рис. 3.16, максимальне поглинання спостерігалось в розчині метанолу з БФС, тоді як етанол, ацетонітрил, хлороформ та етилацетат були непридатними. Враховуючи отримані абсолютні значення абсорбції, обрано метанол для подальших досліджень. Оптимальна концентрація реагенту (розчину БФС) – 2.0×10^{-4} М. В процесі проведених досліджень встановлено, що розчини є стабільними впродовж 30 хв, проте ми рекомендуємо вимірювати оптичну густину свіжоприготовлених розчинів (рис. 3.17). Даний факт позитивно характеризує методику.

Стехіометричні коефіцієнти реагуючих компонентів між метопрололу тартратом та БФС визначали методом неперервних змін (метод Жоба) і метод насичення (метод молярних співвідношень). Графік залежності абсорбції від складу ізомолярного розчину за довжини хвилі 595 нм (метод Жоба) наведено на рисунку 3.18. Криві насичення (метод молярних співвідношень) представлено на рисунку 3.19.

Результати, одержані на рис. 3.18, 3.19, свідчать про те, що стехіометричні співвідношення реагуючих компонентів «метопрололу тартрат – БФС» становлять 1:1.

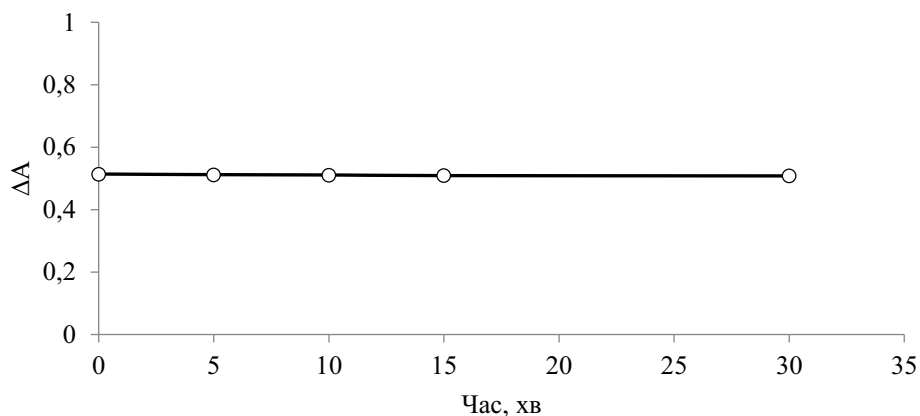


Рисунок 3.17 – Графік залежності оптичної густини від часу

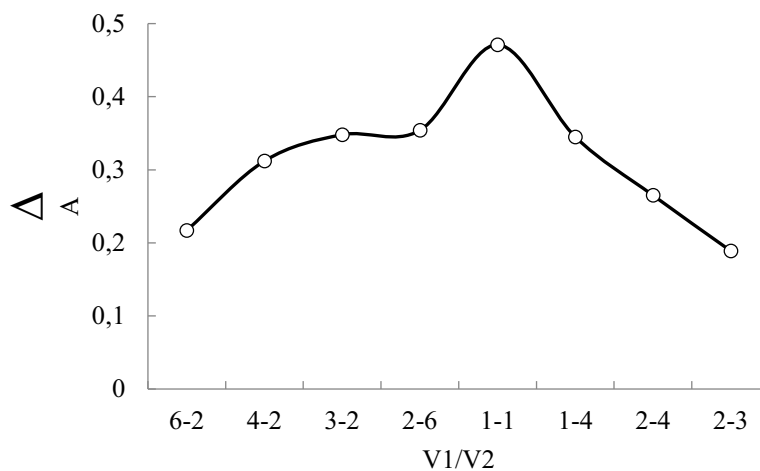


Рисунок 3.18 – Графік залежності абсорбції від складу ізомолярного розчину (V_1 – об'єм 2.0×10^{-4} розчину метопрололу тартрату, V_2 – об'єм 2.0×10^{-4} розчину БФС) за довжини хвилі 595 нм

Нами розраховано показники чутливості реакції метопрололу тартрату з БФС. Встановлено, що молярний показник поглинання (ϵ) становив 2.38×10^4 , питоме поглинання (a) – 3.48×10^{-2} , коефіцієнт Сендела (W_s) – 0.029.

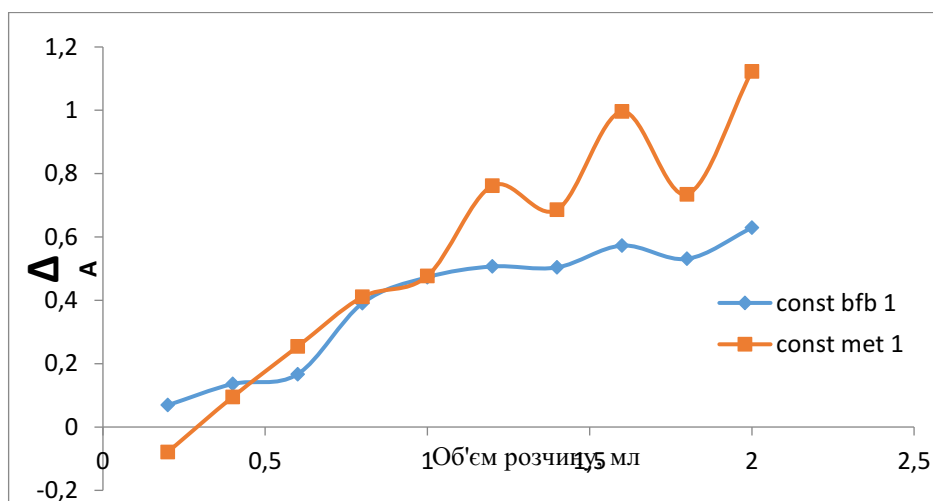


Рисунок 3.19 – Криві насичення: 1 – метопрололу тартрату при постійній концентрації БФС (1.00 мл 2.0×10^{-4} розчину); 2 – БФС при постійній концентрації метопрололу тартрату (1.00 мл 2.0×10^{-4} М розчину)

Запропоновану спектрофотометричну методику визначення метопрололу за реакцією з БФС валідовано відповідно до вимог ДФУ [74] та ІСН Q2 [75] за такими показниками як специфічність, лінійність, діапазон застосування, правильність, прецизійність та робастність.

3.4.1 Специфічність методики

З метою вивчення специфічності спектрофотометричної методики визначення метопрололу за реакцією з БФС готували розчин допоміжних речовин («плацебо»). Результати вивчення специфічності аналітичної методики визначення метопрололу в таблетках представлено в табл. 3.17.

Таблиця 3.17 – Результати вивчення специфічності спектрофотометричної методики визначення метопрололу в таблетках за реакцією з БФС

Абсорбція плацебо (А плацебо)	Абсорбція розчину домішок ЛФ (А домішок)	Абсорбція розчину порівняння (Ast)	Знайдене значення δ_{noise} , %	Критерій прийнятності
0.002	-	0.510	0.39	не більше 0.5 %

Результати вивчення специфічності аналітичної методики вказують на те, що абсорбція допоміжних речовин («плацебо») є незначною (знайдене значення δ_{noise} становить 0.39 %) та не перевищує критерій прийнятності (не більше 0.5 %).

3.4.2 Лінійність, діапазон застосування методики

Лінійність спектрофотометричної методики визначення метопрололу за реакцією з БФС вивчали в діапазоні концентрацій 9.56-15.02 мкг/мл відповідно до вимог ДФУ методом найменших квадратів, використовуючи модельні розчини. Метрологічні характеристики рівняння регресійної залежності для кількісного визначення метопрололу представлено в табл. 3.18. Параметри лінійності (табл. 3.18) відповідають вимогам ДФУ на всьому діапазоні застосування аналітичної методики (9.56-15.02 мкг/мл). МВ метопрололу становила 0.81 мкг/мл, МКВ – 2.47 мкг/мл.

Таблиця 3.18 – Метрологічні характеристики лінійної залежності

Величина	Значення	Критерій	Висновок (відповідає або не відповідає)
$b \pm (S_b)$	0.0373 ± (0.0086)	–	
$a \pm (S_a)$	0.0038 ± (0.0092)	$ a \leq 2.6$	Відповідає
R^2	0.9984	> 0.9979	Відповідає
МВ (мкг/мл)	0.81	–	
МКВ (мкг/мл)	2.47	–	
Підпорядкування закону Бера в діапазоні концентрацій (мкг/мл)	9.56-15.02	–	

3.4.3 Правильність та прецизійність методики

Правильність та прецизійність спектрофотометричної методики визначення метопрололу за реакцією з БФС перевіряли шляхом приготування модельних розчинів з точно відомою концентрацією з вмістом 70-130 % від номінального. Отримані результати проведених розрахунків представлено в таблиці 3.19.

Таблиця 3.19 – Результати аналізу модельних сумішей і їх статистична обробка для кількісного визначення

Модельні розчини	Вміст метопрололу, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100 \%$
	введено, $X_i = (C_i / C_{rs}) 100 \%$	знайдено, $Y_i = (A_i / A_{rs}) 100 \%$	
M ₁	70.02	70.05	100.04
M ₂	80.01	79.98	99.96
M ₃	89.55	89.59	100.04
M ₄	96.05	96.11	100.06
M ₅	99.99	100.06	100.08
M ₆	104.92	105.00	100.08
M ₇	111.01	111.12	100.10
M ₈	122.22	122.31	100.07
M ₉	129.95	130.03	100.06
Середнє значення, Z, %			100.05
Стандартне відхилення, S _z , %			0.06
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95 \%, 8) \cdot S_z = 2.3060 S_z, \%$			0.14
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta A_s = 1.6 \%$			Виконується (0.14 < 1.6)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 , \%$			0.05
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta \%$			Виконується (0.05 < 0.51)
Загальний висновок про методику			Коректна

Як впливає з результатів, одержаних в табл. 3.19, методика визначення метопрололу характеризується достатньою прецизійністю, отримане значення відносного довірчого інтервалу величини Δz (0.14 %) менше критичного значення для збіжності результатів (1.6 %). Виконується критерій незначущості систематичної похибки методики. Систематична похибка становила 0.05 % та була практично незначущою, тобто спектрофотометрична методика визначення метопрололу за реакцією з БФС характеризується достатньою правильністю в усьому діапазоні концентрацій від 70 % до 130 %

Вивчення внутрішньолабораторної прецизійності проводили на шести зразках однієї серії препарату, різними хіміками-аналітиками, у різні дні, з

використанням різного мірного посуду, з розрахунком значення відносного довірчого інтервалу, яке повинно бути меншим максимально припустимої невизначеності результатів аналізу: $\Delta z \leq 1.6$ (при $V = 5\%$) (табл. 3.20).

Таблиця 3.20 – Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності

№ розчину	Величина Z_i , %		
	1 дослід	2 дослід	3 дослід
1	100.15	100.10	100.08
2	100.07	100.04	100.11
3	99.98	100.19	99.92
4	99.95	99.92	99.97
5	99.92	100.08	100.05
6	99.99	100.01	100.09
Середнє Z (%)	100.01	100.06	100.04
RSD_x , %	0.09	0.09	0.08
Відносне стандартне відхилення, RSD_z (%)	0.09		
Відносний довірчий інтервал, Δ_z	$0.06 \leq 1.6$		
Критичне значення збіжності результатів Δ_{As} , %	1.6		

Результати вивчення внутрішньолабораторної прецизійності показують, що величина відносного довірчого інтервалу для шести паралельних визначень однієї серії препарату задовольняє критерій прийнятності ($\leq 1.6\%$) (див. табл. 3.20).

3.4.4 Прогноз повної невизначеності методики

Розрахунок невизначеності пробопідготовки для методики кількісного визначення представлено в таблиці 3.21. Невизначеність кінцевої аналітичної операції для спектрофотометричного визначення складає 0.70% .

Розрахована невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) для визначення метопрололу в таблетках склала 1.87% . Максимальний внесок у невизначеність

пробопідготовки вносять операції 3, 4, 8, 9 (взяття розчину піпеткою 1.0 мл). Повна невизначеність аналітичної методики (Δ_{As}) при аналізі препарату склала 2.00 %.

$$\Delta_{As} = 2.00 \% \leq \max \Delta_{As} = 2.40 \%$$

Таблиця 3.21 – Розрахунок невизначеності пробопідготовки для методики кількісного визначення

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
Розчин порівняння метопрололу		
1) взяття наважки ФСЗ метопрололу	m_0	$0.2 \text{ мг}/34.15 \text{ мг} \times 100 \% = 0.59$
2) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 250.0 мл	250	0.08
3) взяття аліквоти піпеткою 1.0 мл	1.0	0.74
4) взяття 2.0×10^{-4} розчину БФС піпеткою 1.0 мл	-	0.74
5) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 10.0 мл	10	0.50
Випробовуваний розчин		
б) взяття наважки таблеток	m_1	$0.2 \text{ мг}/67 \text{ мг} \times 100 \% = 0.30$
7) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 250.0 мл	250	0.08
8) взяття аліквоти піпеткою 1.0 мл	1.0	0.74
9) взяття 2.0×10^{-4} розчину БФС піпеткою 1.0 мл	-	0.74
10) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 10.0 мл	10	0.50
Компенсаційний розчин		
11) взяття наважки БФС	-	$0.2 \text{ мг}/33.5 \text{ мг} \times 100 \% = 0.60$
12) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 250.0 мл	-	0.08

Прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не перевищила критичних значень ($\max \Delta_{As}$).

Результати визначення вмісту метопрололу тартрату у таблетках наведено в таблиці 3.22.

Таблиця 3.22 – Результати кількісного визначення метопрололу тартрату в таблетках

Лікарський засіб	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
Таблетки «Метопрололу тартрат» (Фармак) 50 мг серія № 10822	0.0503	$\bar{m} = 0,0501\text{г}$ $S = 4.18 \times 10^{-4}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 3.39 \times 10^{-4}$ $RDS = 0.83$ $\varepsilon = 0.87 \%$
	0.0506	
	0.0502	
	0.0494	
	0.0501	
	0.0498	
Таблетки «Метопрололу тартрат» (Фармак) 100 мг серія № 30421	0.1005	$\bar{m} = 0.1003 \text{ г}$ $S = 6.07 \times 10^{-4}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 6.37 \times 10^{-4}$ $RDS = 0.6$ $\varepsilon = 0.63 \%$
	0.1008	
	0.0994	
	0.0998	
	0.1010	
	0.1003	

3.4.5 Робасність методики

Робасність запропонованої спектрофотометричної методики визначення метопрололу в таблетках за реакцією з БФС вивчали шляхом оцінювання стабільності розчинів в часі (див. рис. 3.17) та впливу кількості доданого реактиву (2.0×10^{-4} розчину БФС) на оптичну густину (табл. 3.23). Результати вивчення впливу кількості доданого розчину БФС на оптичну густину, що наведено в табл. 3.23, свідчать про те, що коливання кількості доданого реагенту (2.0×10^{-4} М розчину БФС) в межах $\pm 10 \%$ не впливає на значення оптичної густини.

Підсумовуючи вище описані факти можна зробити висновок, що запропонована спектрофотометрична методика визначення метопрололу в ЛЗ за реакцією з БФС є нетрудомісткою (без нагрівання та корегування значення рН),

простою у виконанні, недороговартісною, «зеленою», неекстракційною та може застосовуватися в рутинному аналізі ЛЗ метопрололу та при проведенні арбітражного контролю, як і спектрофотометрична методика визначення метопрололу в ЛЗ за реакцією з БКЗ.

Таблиця 3.23 – Вплив кількості доданого розчину БФС на оптичну густину

Об'єм 2.0×10^{-4} М розчину БФС, мл	% БФС	ΔA
0.90	90	0.468
0.95	95	0.469
1.00	100	0.471
1.05	105	0.472
1.10	110	0.474

3.5 Розробка та валідація спектрофотометричної методики визначення метопрололу в субстанції та лікарських засобах за реакцією з бромтимоловим синім

В розділі 3.2 розглянуто можливість застосування БТС як реагенту для спектрофотометричного визначення метопрололу в субстанції та ЛЗ [113, 114]. При введенні метопрололу тартрату до розчину БТС спостерігалось збільшення смуги поглинання однократно йонізованої форми барвника ($\lambda_{\max} = 402$ нм) з одночасним зменшенням смуги поглинання двократно йонізованої форми барвника (див. рис. 3.8).

З метою вибору розчинника апробовано такі розчинники як метанол, етанол, ацетонітрил, етилацетат та хлороформ. Токсичні розчинники не бралися до уваги, проте вивчалися на першому етапі проведених досліджень. На рис. 3.20 представлено абсолютні значення абсорбції метопрололу тартрату з БТС (ΔA) у різних розчинниках.

Як впливає з рисунка 3.20, максимальне поглинання спостерігалось в розчині ацетонітрилу з БТС, тоді як метанол, етанол, хлороформ та етилацетат

були непридатними. Враховуючи одержане високе абсолютне значення абсорбції та відповідність принципам «зеленої» хімії, обрано ацетонітрил для проведення подальших досліджень. Оптимальна концентрація реагенту (розчину БТС) – 1.6×10^{-4} М. Встановлено, що розчини є стабільними впродовж 45 хв, проте ми рекомендуємо вимірювати оптичну густину свіжоприготовлених розчинів (рис. 3.21).

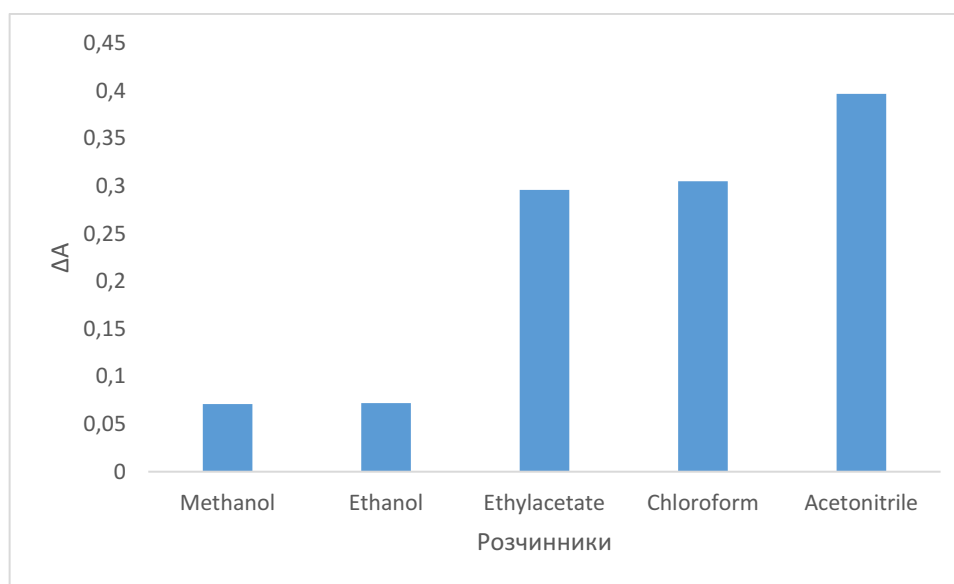


Рисунок 3.20 – Абсолютні значення абсорбції метопрололу тартрату з БТС у різних розчинниках ($C_m = 1.6 \times 10^{-4}$ М)

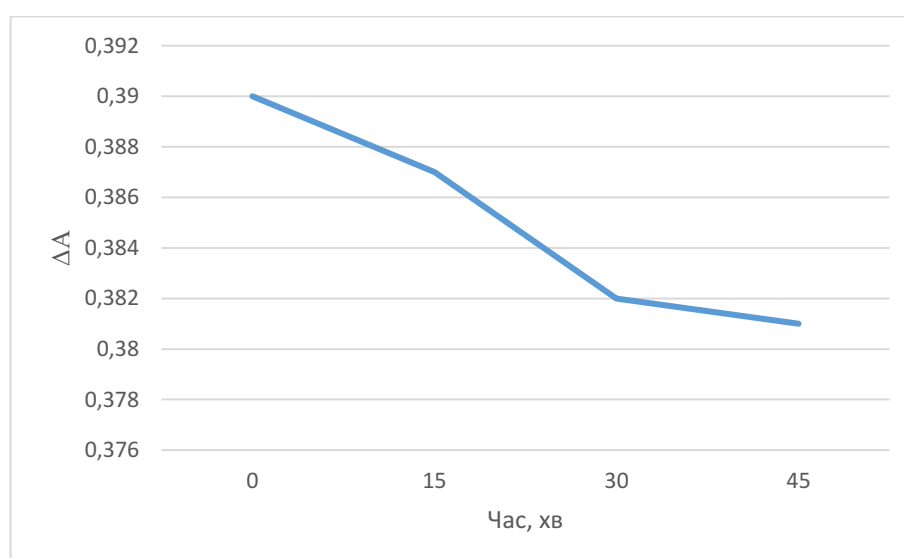


Рисунок 3.21 – Графік залежності оптичної густини від часу

Стехіометричні коефіцієнти реагуючих компонентів між метопрололу тартратом та БТС визначали методом неперервних змін (метод Жоба) і метод насичення (метод молярних співвідношень). Графік залежності абсорбції від складу ізомолярного розчину за довжини хвилі 402 нм (метод Жоба) наведено на рисунку 3.22. Криві насичення (метод молярних співвідношень) представлено на рисунку 3.23.

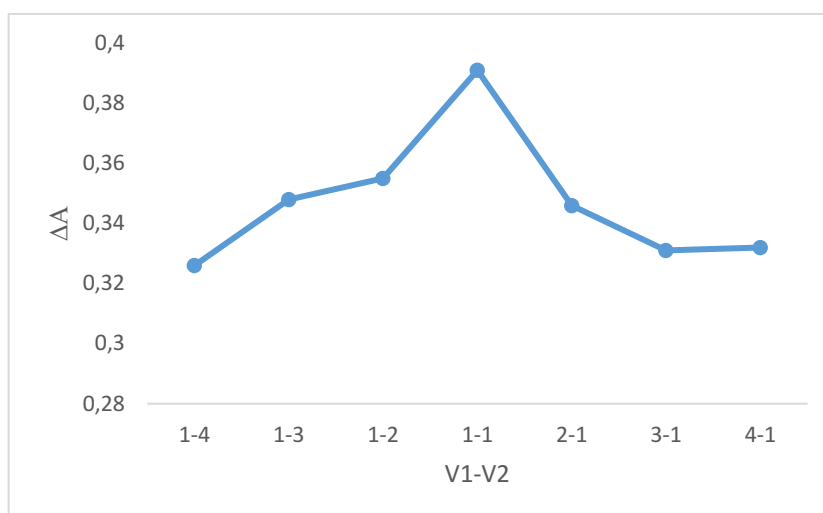


Рисунок 3.22 – Графік залежності абсорбції від складу ізомолярного розчину (V_1 – об’єм 1.6×10^{-4} розчину метопрололу тартрату, V_2 – об’єм 1.6×10^{-4} розчину БТС) за довжини хвилі 402 нм

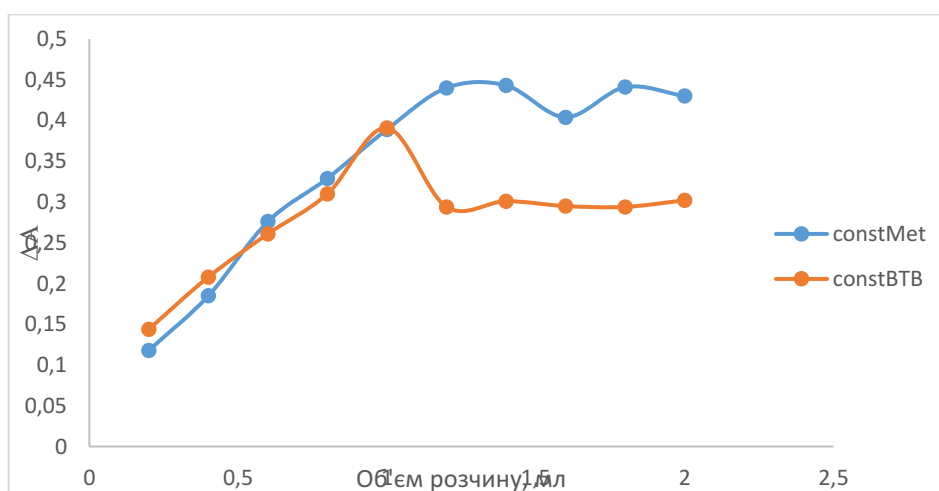


Рисунок 3.23 – Криві насичення: 1 – метопрололу тартрату при постійній концентрації БТС (1.00 мл 1.6×10^{-4} розчину); 2 – БТС при постійній концентрації метопрололу тартрату (1.00 мл 1.6×10^{-4} М розчину)

Результати, отримані на рис. 3.22, 3.23, свідчать про те, що стехіометричні співвідношення реагуючих компонентів «метопрололу тартрат – БТС» становлять 1:1.

Встановлено, що молярний показник поглинання (ϵ) становив 1.60×10^4 , коефіцієнт Сендела (W_s) – 0.043.

Розроблену спектрофотометричну методику визначення метопрололу за реакцією з БТС валідовано відповідно до вимог ДФУ [74] та ІСН Q2 [75] за наступними показниками: специфічність, лінійність, діапазон застосування, правильність, прецизійність та робастність.

3.5.1 Специфічність методики

З метою вивчення специфічності спектрофотометричної методики визначення метопрололу за реакцією з БТС готували розчин допоміжних речовин («плацебо»). Результати вивчення специфічності аналітичної методики визначення метопрололу в таблетках представлено в табл. 3.24. Результати вивчення специфічності аналітичної методики вказують на те, що абсорбція допоміжних речовин («плацебо») є незначною (знайдене значення δ_{noise} становить 0.26 %) та не перевищує критерій прийнятності (не більше 0.5 %).

Таблиця 3.24 – Результати вивчення специфічності спектрофотометричної методики визначення метопрололу в таблетках за реакцією з БТС

Абсорбція плацебо (А плацебо)	Абсорбція розчину домішок ЛФ (А домішок)	Абсорбція розчину порівняння (A_{st})	Знайдене значення δ_{noise} , %	Критерій прийнятності
0.001	-	0.390	0.26	не більше 0.5 %

3.5.2 Лінійність, діапазон застосування методики

Лінійність спектрофотометричної методики визначення метопрололу за реакцією з БТС вивчали в діапазоні концентрацій 16.00-24.00 мкг/мл відповідно до вимог ДФУ методом найменших квадратів, використовуючи модельні

розчини. Метрологічні характеристики рівняння регресійної залежності для кількісного визначення метопрололу представлено в таблиці 3.25. Параметри лінійності (табл. 3.25) відповідають вимогам ДФУ на всьому діапазоні застосування аналітичної методики (16.00-24.00 мкг/мл). МВ метопрололу становила 1.90 мкг/мл, МКВ – 5.78 мкг/мл.

Таблиця 3.25 – Метрологічні характеристики лінійної залежності

Величина	Значення	Критерій	Висновок (відповідає або не відповідає)
$b \pm (S_b)$	$0.0199 \pm (0.0016)$	–	
$a \pm (S_a)$	$0.0721 \pm (0.0115)$	$ a \leq 2.6$	Відповідає
R^2	0.9990	> 0.9968	Відповідає
МВ (мкг/мл)	1.90	–	
МКВ (мкг/мл)	5.78	–	
Підпорядкування закону Бера в діапазоні концентрацій (мкг/мл)	16.00-24.00	–	

3.5.3 Правильність та прецизійність методики

Правильність та прецизійність спектрофотометричної методики визначення метопрололу за реакцією з БТС перевіряли шляхом приготування модельних розчинів з точно відомою концентрацією з вмістом 70-130 % від номінального. Отримані результати проведених розрахунків представлено в таблиці 3.26.

Як випливає з результатів, одержаних в табл. 3.26, методика визначення метопрололу характеризується достатньою прецизійністю, отримане значення відносного довірчого інтервалу величини Δz (0.53 %) менше критичного значення для збіжності результатів (1.6 %). Систематична похибка становила 0.13 % та була практично незначущою, тобто спектрофотометрична методика визначення метопрололу за реакцією з БТС характеризується достатньою правильністю в усьому діапазоні концентрацій від 70 % до 130 %

Таблиця 3.26 – Результати аналізу модельних сумішей і їх статистична обробка для кількісного визначення

Модельні розчини	Вміст метопрололу, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100 \%$
	введено, $X_i = (C_i/C_{rs}) 100 \%$	знайдено, $Y_i = (A_i/A_{rs}) 100 \%$	
M ₁	70.05	69.94	99.84
M ₂	80.09	79.93	99.80
M ₃	90.11	89.90	99.77
M ₄	95.54	95.74	100.21
M ₅	100.09	100.01	99.92
M ₆	105.15	105.32	100.16
M ₇	110.51	110.27	99.76
M ₈	120.62	120.20	99.65
M ₉	130.44	130.12	99.75
Середнє значення, Z, %			99.87
Стандартне відхилення, S _z , %			0.23
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95 \%, 8) \cdot S_z = 2.3060 S_z \%$			0.53
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta_{As} = 1.6 \%$			Виконується (0.53 < 1.6)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 $, %			0.13
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta \%$			Виконується (0.13 < 0.51)
Загальний висновок про методику			Коректна

Вивчення внутрішньолабораторної прецизійності проводили на шести зразках однієї серії препарату, різними хіміками-аналітиками, у різні дні, з використанням різного мірного посуду, з розрахунком значення відносного довірчого інтервалу, яке повинно бути меншим максимально припустимої невизначеності результатів аналізу: $\Delta z \leq 1.6$ (при $V = 5 \%$) (табл. 3.27).

Результати вивчення внутрішньолабораторної прецизійності вказують на те, що величина відносного довірчого інтервалу для шести паралельних

визначень однієї серії препарату задовольняє критерій прийнятності ($\leq 1.6\%$) (табл. 3.27).

Таблиця 3.27 – Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності

№ розчину	Величина Z_i , %		
	1 дослід	2 дослід	3 дослід
1	99.89	100.15	100.05
2	100.15	100.01	99.92
3	99.95	100.22	99.98
4	100.19	99.95	99.90
5	100.11	100.02	99.87
6	100.12	100.07	100.02
Середнє Z (%)	100.07	100.07	99.96
RSD_x , %	0.12	0.10	0.07
Відносне стандартне відхилення, RSD_Z (%)	0.10		
Відносний довірчий інтервал, Δ_Z	$0.09 \leq 1.6$		
Критичне значення збіжності результатів Δ_{As} , %	1.6		

3.5.4 Прогноз повної невизначеності методики

Розрахунок невизначеності пробопідготовки для методики кількісного визначення представлено в таблиці 3.28. Невизначеність кінцевої аналітичної операції для спектрофотометричного визначення складає 0.70 %.

Розрахована невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) для визначення метопрололу в таблетках склала 1.99 %. Максимальний внесок у невизначеність пробопідготовки вносять операції 11 (взяття наважки БТС) та 3, 4, 8, 9 (взяття розчину піпеткою 1.0 мл). Повна невизначеність аналітичної методики (Δ_{As}) при аналізі препарату склала 2.11 %. Прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не перевищила критичних значень ($\max \Delta_{As}$).

$$\Delta_{As} = 2.11 \% \leq \max \Delta_{As} = 2.40 \%$$

Таблиця 3.28 – Розрахунок невизначеності пробопідготовки для методики кількісного визначення

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
Розчин порівняння метопрололу		
1) взяття наважки ФСЗ метопрололу	m_0	$0.2 \text{ мг}/27.40 \text{ мг} \times 100 \% = 0.73$
2) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 250.0 мл	250	0.08
3) взяття аліквоти піпеткою 1.0 мл	1.0	0.74
4) взяття 2.0×10^{-4} розчину БТС піпеткою 1.0 мл	-	0.74
5) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 10.0 мл	10	0.50
Випробовуваний розчин		
6) взяття наважки таблеток	m_1	$0.2 \text{ мг}/68 \text{ мг} \times 100 \% = 0.29$
7) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 250.0 мл	250	0.08
8) взяття аліквоти піпеткою 1.0 мл	1.0	0.74
9) взяття 2.0×10^{-4} розчину БТС піпеткою 1.0 мл	-	0.74
10) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 10.0 мл	10	0.50
Компенсаційний розчин		
11) взяття наважки БТС	-	$0.2 \text{ мг}/24.98 \text{ мг} \times 100 \% = 0.80$
12) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 250.0 мл	-	0.08

Результати визначення вмісту метопрололу тартрату у таблетках наведено в таблиці 3.29.

Таблиця 3.29 – Результати кількісного визначення метопрололу тартрату в таблетках

Лікарський засіб	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
Таблетки «Метопрололу тартрат» (Фармак) 50 мг серія № 10822	0.0505	$\bar{m} = 0.0498$ г
	0.0501	$S = 9.17 \times 10^{-4}$
	0.0511	$t = 2.57$
	0.0490	$\Delta x = 9.63 \times 10^{-4}$
	0.0487	RDS = 1.84
	0.0495	$\varepsilon = 1.93$ %
Таблетки «Метопрололу тартрат» (Фармак) 100 мг серія № 30421	0.1009	$\bar{m} = 0.1000$ г
	0.1001	$S = 1.08 \times 10^{-3}$
	0.0985	$t = 2.57$
	0.1012	$\Delta x = 1.14 \times 10^{-3}$
	0.1004	RDS = 1.08
	0.0989	$\varepsilon = 1.14$ %

3.5.5 Робастність методики

Робастність розробленої спектрофотометричної методики визначення метопрололу в таблетках за реакцією з БТС вивчали шляхом оцінювання стабільності розчинів в часі (рис. 3.21) та впливу кількості доданого реактиву (1.6×10^{-4} розчину БТС) на оптичну густину (табл. 3.30).

Таблиця 3.30 – Вплив кількості доданого розчину БТС на оптичну густину

Об'єм 1.6×10^{-4} М розчину БТС, мл	% БТС	ΔA
0.90	90	0.388
0.95	95	0.389
1.00	100	0.391
1.05	105	0.392
1.10	110	0.395

Результати вивчення впливу кількості доданого розчину БТС на оптичну густину, що наведено в табл. 3.30, свідчать про те, що коливання кількості доданого реагенту (1.6×10^{-4} М розчину БТС) в межах ± 10 % не впливає на значення оптичної густини.

Підсумовуючи вище описані факти можна зробити висновок, що розроблена спектрофотометрична методика визначення метопрололу в ЛЗ за реакцією з БТС є «зеленою», простою у виконанні, нетрудомісткою (без нагрівання та корегування значення рН), недороговартісною, неекстракційною та може застосовуватися в рутинному аналізі ЛЗ метопрололу та при проведенні арбітражного контролю, як і спектрофотометричні методики визначення метопрололу в ЛЗ за реакціями з БКЗ та БФС. Якщо порівнювати запропоновану спектрофотометричну методику визначення метопрололу в ЛЗ за реакцією з БТС з описаною в наукових джерелах [11], можна зробити висновок, що заміна розчинника на ацетонітрил та відсутність екстракції дає розробленій методиці більше перспектив у застосуванні.

3.6 Порівняльний аналіз впливу на навколишнє середовище спектрофотометричних методик визначення метопрололу в субстанції та лікарських засобах

Попередньо ще на етапі розробки спектрофотометричних методик, нами оцінено «зеленість» методик у розділі 3.2. Як видно з табл. 3.8, бал за методом AGREE всіх трьох методик становив 0.79. Тому ми приступили до детальнішого вивчення «зеленості» вже розроблених трьох спектрофотометричних методик визначення метопрололу в субстанції та ЛЗ, а також порівняння їх екологічної безпеки з описаними у науковій літературі спектрофотометричними методиками визначення метопрололу в ЛЗ. В табл. 3.30 представлено результати порівняння «зеленості» розроблених спектрофотометричних методик визначення метопрололу в ЛЗ з описаними в науковій літературі методом аналітичної екошкали [69].

Як впливає з отриманих у таблиці 3.30 результатів, найвищий бал за методом аналітичної еко-шкали має розроблена нами УФ-спектрофотометрична методика визначення метопрололу в субстанції та ЛЗ (90 бали). Це пояснюється відсутністю реагентів і застосуванням одного розчинника метанолу.

Таблиця 3.30 – Порівняння «зеленості» розроблених спектрофотометричних методик визначення метопрололу в ЛЗ з описаними в науковій літературі методом аналітичної екошкали

№	Аналітична методика	Умови проведення кількісного визначення	Реагент/параметр	Пенальті бали
1	2	3	4	5
1.	Розроблена УФ-спектрофотометрична методика [76]	Метанол, $\lambda_{\max} = 224$ нм	Метанол Професійні шкідливості Обладнання Втрати Кількість пенальті балів Кількість балів	2 0 0 8 10 90
2.	Розроблена спектрофотометрична методика за реакцією з БКЗ [109, 110]	1.6×10^{-4} М розчин БКЗ, метанол, $\lambda_{\max} = 624$ нм	БКЗ Метанол Професійні шкідливості Обладнання Втрати Кількість пенальті балів Кількість балів	1 3 0 0 8 12 88
3.	Розроблена спектрофотометрична методика за реакцією з БФС [111, 112]	2.0×10^{-4} М розчин БФС, метанол, $\lambda_{\max} = 595$ нм	БФС Метанол Професійні шкідливості Обладнання Втрати Кількість пенальті балів Кількість балів	1 3 0 0 8 12 88
4.	Розроблена спектрофотометрична методика за реакцією з БТС [113, 114]	1.6×10^{-4} М розчин БТС, ацетонітрил, $\lambda_{\max} = 402$ нм	БТС Ацетонітрил Професійні шкідливості Обладнання Втрати Кількість пенальті балів Кількість балів	1 3 0 0 8 12 88
5.	Спектрофотометрична методика за реакцією з БТС [11]	0.1 % розчин БТС, метанол, буферний розчин рН 3.4, хлороформ, $\lambda_{\max} = 413$ нм	БТС Метанол Калію гідроген фталат Кислота хлоридна Хлороформ Професійні шкідливості Обладнання Втрати Кількість пенальті балів Кількість балів	1 2 4 4 4 3 0 8 26 74

Продовження таблиці 3.30

1	2	3	4	5
6.	Спектрофотометрична методика за реакцією з 2,3-дихлоро-5,6-диціано-1,4-бензохіноном [11]	0.1 % розчин 2,3-дихлоро-5,6-диціано-1,4-бензохінону, метанол, ацетонітрил, $\lambda_{\text{max}} = 457 \text{ нм}$	2,3-дихлоро-5,6-диціано-1,4-бензохінон Метанол Ацетонітрил Професійні шкідливості Обладнання Втрати Кількість пенальті балів Кількість балів	1 2 2 0 0 8 13 87
7.	Спектрофотометрична методика за реакцією з 2,3-дихлоро-1,4-нафтохіноном [12]	4 % розчин 2,3-дихлоро-1,4-нафтохінону, ДМФА, нагрівання $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 хв, $\lambda_{\text{max}} = 493 \text{ нм}$	2,3-дихлоро-1,4-нафтохінону Диметилформамід Професійні шкідливості Обладнання Втрати Кількість пенальті балів Кількість балів	1 6 5 0 8 20 80
8.	Спектрофотометрична методика за реакцією з сіллю купруму (II) [10]	0.5 % розчин купруму (II) хлориду, Брітон-Робертсон буферний розчин рН 6.0, метанол, нагрівання $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 4 год, $\lambda_{\text{max}} = 675 \text{ нм}$	Купруму (II) хлорид Кислота борна Кислота фосфорна Кислота оцтова Натрію гідроксид Метанол Професійні шкідливості Обладнання Втрати Кількість пенальті балів Кількість балів	1 4 4 4 4 2 5 0 8 32 68
9.	Спектрофотометрична методика за реакцією з калію перманганатом [15]	0.015 М розчин калію перманганату, 0.6 М розчин натрію гідроксиду, $\lambda_{\text{max}} = 610 \text{ нм}$	Калію перманганат Натрію гідроксид Професійні шкідливості Обладнання Втрати Кількість пенальті балів Кількість балів	2 2 3 0 8 15 85

Високі бали мають також розроблені нами спектрофотометричні методики визначення метопрололу в субстанції та ЛЗ за реакціями з БКЗ, БФС, БТС (88 балів). Даний факт пояснюється застосуванням одного реагента (БКЗ/БФС/БТС) та нетоксичного розчинника (метанолу/ацетонітрилу), відсутність нагрівання,

корегування значення рН та екстракції. Підсумовуючи проведене вивчення «зеленості» методик з застосуванням методу аналітичної еко-шкали, можна зробити висновок, що всі чотири розроблені спектрофотометричні методики є «зеленими» та переважають за екологічністю раніше опубліковані методики


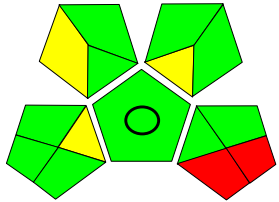

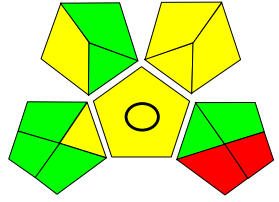

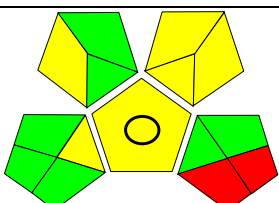

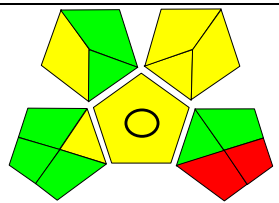
Наступними методами вивчення «зеленості» методик були метод AGREE [70] та GAPI [71]. Це досить нові методи вивчення «зеленості». Великі досягнення у розробці методів та їх впровадженні у вигляді програмних забезпечень мають науковці з Гданського технічного університету. В табл. 3.31 представлено результати порівняння «зеленості» розроблених спектрофотометричних методик визначення метопрололу в ЛЗ з описаними в науковій літературі методами AGREE та GAPI.

Як вже зазначалося раніше, ще на етапі попередньої розробки спектрофотометричних методик, ми вивчали їх «зеленість» методом AGREE. У табл. 3.8 показано, що бал за методом AGREE становив 0.79. Це досить добрий показник, тому ми і приступили до подальшої розробки методик. Після розробки спектрофотометричних методик, нами ретельно проаналізовано «зеленість» з використанням методу AGREE. Як видно з табл. 3.31, бал розроблених нами чотирьох спектрофотометричних методик становив 0.76. На етапі планування, ми працювали з низькими концентраціями реагенту та кількостями метопрололу тартрату (близько 5-10 мг), проте при подальшому розрахунку невизначеності пробопідготовки, отримано значення перевищене критичне значення ($\max \Delta_{As}$). Тому прийнято рішення збільшити наважку метопрололу та об'єм розчину розчинника, що негативно відзначилося на операції 7 при кінцевому розрахунку балу за методом AGREE. Проте отриманий бал 0.76 є достатньо високим та цілком задовольняє принципи «зеленої» хімії.


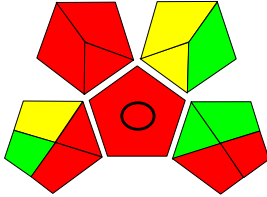

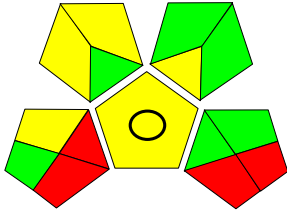

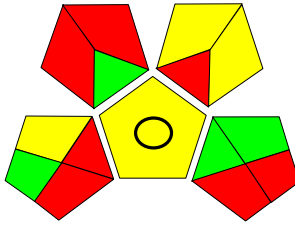

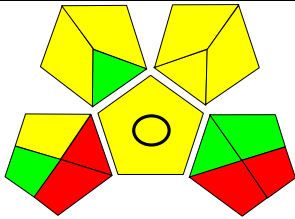

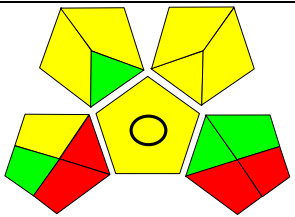
Як впливає з таблиці 3.31, розроблені спектрофотометричні методики визначення метопрололу показали кращий результат, оскільки при розробці методик не використовувалися токсичні розчинники та мінімізувалася пробопідготовка. Беззаперечно, найвищі бали «зеленості» має УФ-

спектрофотометрична методика визначення метопрололу в субстанціях та ЛЗ, оскільки не вимагається додавання реагенту.

Таблиця 3.31 – Порівняння «зеленості» розроблених спектрофотометричних методик визначення метопрололу в ЛЗ з описаними в науковій літературі методами AGREE та GAPI

№	Аналітична методика	Умови проведення кількісного визначення	Піктограма та бал за методом AGREE	Піктограма GAPI
1	2	3	4	5
1.	Розроблена УФ-спектрофотометрична методика [76]	Метанол, $\lambda_{\max} = 224$ нм		
2.	Розроблена спектрофотометрична методика за реакцією з БКЗ [109, 110]	1.6×10^{-4} М розчин БКЗ, метанол, $\lambda_{\max} = 624$ нм		
3.	Розроблена спектрофотометрична методика за реакцією з БФС [111, 112]	2.0×10^{-4} М розчин БФС, метанол, $\lambda_{\max} = 595$ нм		
4.	Розроблена спектрофотометрична методика за реакцією з БТС [113, 114]	1.6×10^{-4} М розчин БТС, ацетонітрил, $\lambda_{\max} = 402$ нм		

Продовження таблиці 3.31

1	2	3	4	5
5.	Спектрофотометрична методика за реакцією з БТС [11]	0.1 % розчин БТС, метанол, буферний розчин рН 3.4, хлороформ, $\lambda_{\text{max}} = 413 \text{ нм}$		
6	Спектрофотометрична методика за реакцією з 2,3-дихлоро-5,6-диціано-1,4-бензохіноном [11]	0.1 % розчин 2,3-дихлоро-5,6-диціано-1,4-бензохінону, метанол, ацетонітрил, $\lambda_{\text{max}} = 457 \text{ нм}$		
7	Спектрофотометрична методика за реакцією з 2,3-дихлоро-1,4-нафтохіноном [12]	4 % розчин 2,3-дихлоро-1,4-нафтохінону, ДМФА, нагрівання 95 °С 10 хв, $\lambda_{\text{max}} = 493 \text{ нм}$		
8	Спектрофотометрична методика за реакцією з сіллю купруму (II) [10]	0.5 % розчин купруму (II) хлориду, Брітон-Робертсон буферний розчин рН 6.0, метанол, нагрівання 35 °С 4 год, $\lambda_{\text{max}} = 675 \text{ нм}$		
9	Спектрофотометрична методика за реакцією з калію перманганатом [15]	0.015 М розчин калію перманганату, 0.6 М розчин натрію гідроксиду, $\lambda_{\text{max}} = 610 \text{ нм}$		

Підсумовуючи вище описані факти, можна зробити висновок, що всі запропоновані спектрофотометричні методики визначення метопрололу в субстанції та ЛЗ є «зеленими», а отже розроблені з дотримання принципів «зеленої» хімії.

3.7 Методологія вибору реагенту для розробки спектрофотометричних методик визначення мельдонію в субстанції та лікарських засобах

Як уже зазначалося розділі 1, молекула 3-(2,2,2-триметилгідрозин-2-іум-1-іл)пропіонату складна для визначення, оскільки має малу молекулярну масу, проте має велику полярність без будь-яких хромофорів і це ускладнює розробку аналітичних методик, особливо спектрофотометричних. В науковій літературі описано тільки одну спектрофотометричну методику визначення мельдонію в лікарських формах за реакцією з *n*-хлоранілом при нагріванні в середовищі ДМФА з утворенням забарвленої сполуки з максимумом поглинання за довжини хвилі 556 нм [53]. Представлена аналітична методика має ряд недоліків, а саме трудомісткість (нагрівання), використання токсичного розчинника (ДМФА), проте розуміючи складність розробки спектрофотометричних методик визначення мельдонію, ця методика заслуговує уваги, а також показує можливість застосування хінонів як реагентів в аналізі мельдонію. Нами відтворено, запропоновану запорізькою науковою школою під керівництвом проф. Васюк С.О., аналітичну методику. Спектри поглинання продукту реакції представлено на рисунку 3.24. *n*-хлораніл в середовищі ДМФА при нагріванні давав реакцію з мельдонієм з утворенням продукту реакції за довжини хвилі максимуму поглинання 535 нм, хоча в науковій роботі [53] описано утворення продукту реакції з максимум поглинання за довжини хвилі 556 нм. Необхідно відзначити, що метопролол також взаємодіє з *n*-хлоранілом за тих же самих умов, що описано в розділі 3.2 (див. рис. 3.10).

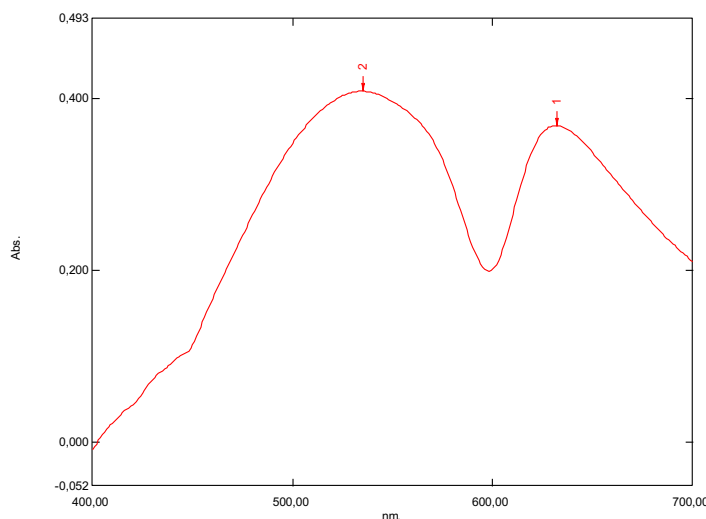


Рисунок 3.24 – Спектр поглинання продукту реакції мельдонію ($C_M=7.30 \times 10^{-3} \text{ M}$) з 1 % розчином *n*-хлоранілу

Спектри поглинання продуктів реакції метопрололу, мельдонію з *n*-хлоранілом наведено на рисунку 3.25. Тому дана методика можлива за умов визначення мельдонію в субстанції та монокомпонентних ЛЗ.

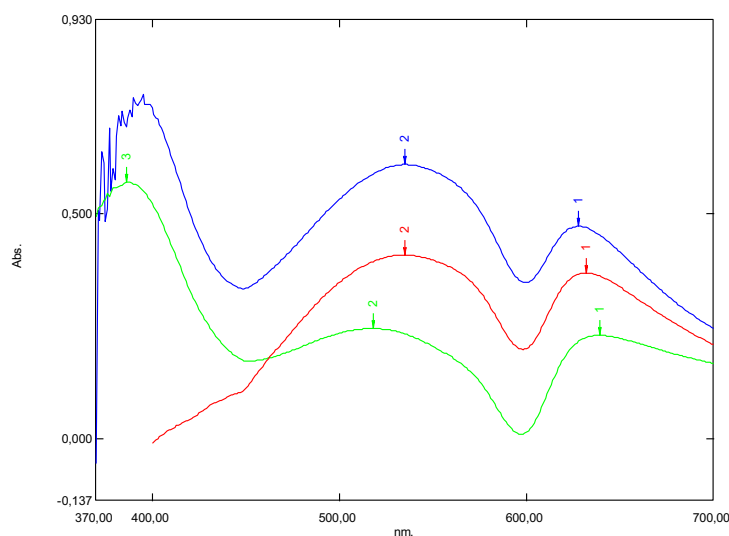


Рисунок 3.25 – Спектри поглинання продуктів реакції мельдонію ($C_M=7.30 \times 10^{-3} \text{ M}$) (червоний), метопрололу ($C_M=3.84 \times 10^{-3} \text{ M}$) (салатовий) та їх суміші (синій) з 1 % розчином *n*-хлоранілу

З отриманих на рисунках 3.24, 3.25 результатів, ми зацікавилися хінонами як перспективними реагентами для подальшої розробки спектрофотометричної методики визначення мельдонію в субстанції та ЛЗ. Алізарин, 1,2-

дигідроксоантрахінон, є одним з найвідоміших органічних барвників, тому ми припустили, що він може взаємодіяти з мельдонієм. Попереднім розчинником обрано ДМФА. Попередніми умовами проведення взаємодії було нагрівання при 95 °С впродовж 20 хв. Спектри поглинання продукту реакції мельдонію з алізарином представлено на рис. 3.26.

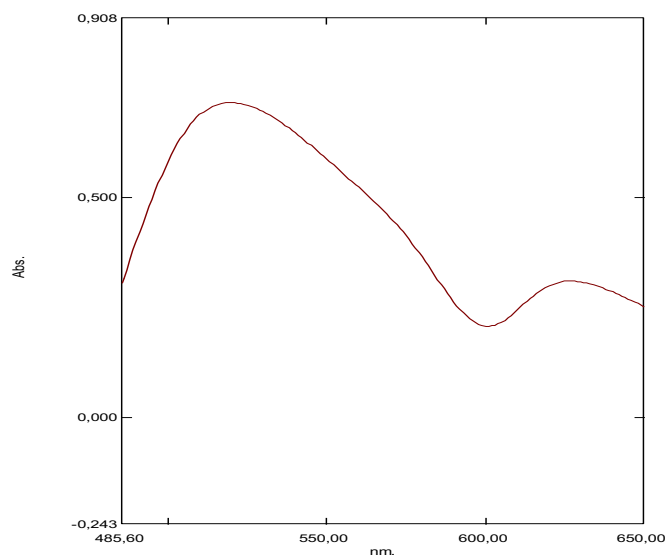


Рисунок 3.26 – Спектр поглинання продукту реакції мельдонію ($C_m=6.25 \times 10^{-3}$ M) з 0.8 % розчином алізарину

Як видно з спектру, представленого на рис. 3.26, алізарин при нагріванні в середовищі ДМФА взаємодіє з мельдонієм та утворює продукт реакції з максимумом поглинання за довжини хвилі 517 нм. Утворений продукт реакції був стабільним в часі. Молярний показник реакції був достатньо високим. Алізарин також взаємодіє з метопрололом (див. рис. 3.11), що описано в розділі 3.2. Спектри поглинання продуктів реакції мельдонію, метопрололу та їх суміші з алізарином наведено на рисунку 3.27. Тому дана методика можлива за умов визначення мельдонію в субстанції та монокомпонентних ЛЗ.

Нами також апробовано лужний розчин купруму (II) сульфату та нінгідрин як потенційні реагенти для розробки спектрофотометричних методик визначення мельдонію. Купруму (II) сульфат та нінгідрин не взаємодіяли з мельдонієм.

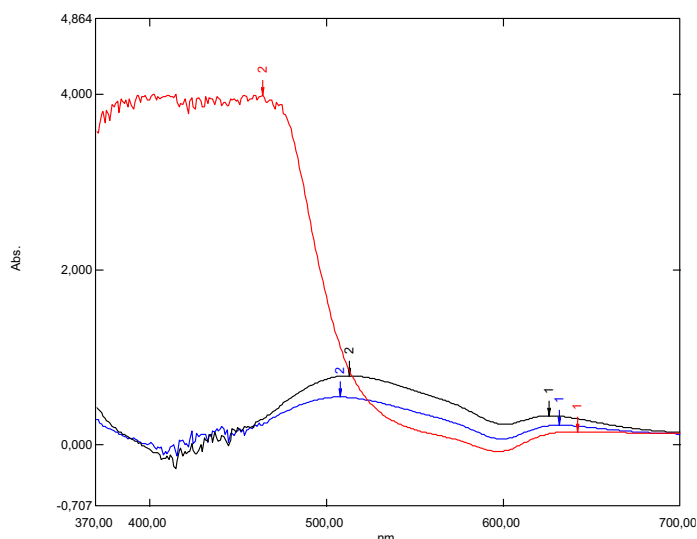


Рисунок 3.27 – Спектри поглинання продукту реакції мельдонію ($C_M=7.30 \times 10^{-3}$ M), метопрололу ($C_M=3.84 \times 10^{-3}$ M) та їх суміші з 0.5 % розчином алізарину

Враховуючи той факт, що нами запропоновано та розроблено спектрофотометричні методики визначення метопрололу за реакціями з сульфоталейновими барвниками (розділ 3.1-3.5), нами апробовано можливість взаємодії мельдонію з БФС. Сульфоталейновий барвник (БФС) давав реакцію з мельдонієм з утворенням продукту реакції з максимумом поглинання за довжини хвилі 595 нм (рис. 3.28), проте, при проведенні подальших досліджень виникали проблеми з лінійністю аналітичної методики. Цей реагент потребує подальшого детальнішого вивчення.

Нами узагальнено всі апробовані потенційні реагенти у таблиці 3.32.

Попередні результати вивчення «зеленості» методом AGREE вказують на те, що застосування алізарину та п-хлоранілу дає бал 0.57, що не є відмінним результатом. Вказане значення балу отримано через використання ДМФА та нагрівання впродовж 20 хв, проте алізарин як потенційний реагент потребує подальшого вивчення, оскільки представлені умови визначення є попередніми. Підсумовуючи вище описані факти та результати, отримані в таблиці 3.32, можна зробити висновок, що для подальших досліджень з розробки спектрофотометричної методики визначення мельдонію в субстанції та ЛЗ обрано алізарин як реагент [115, 116].

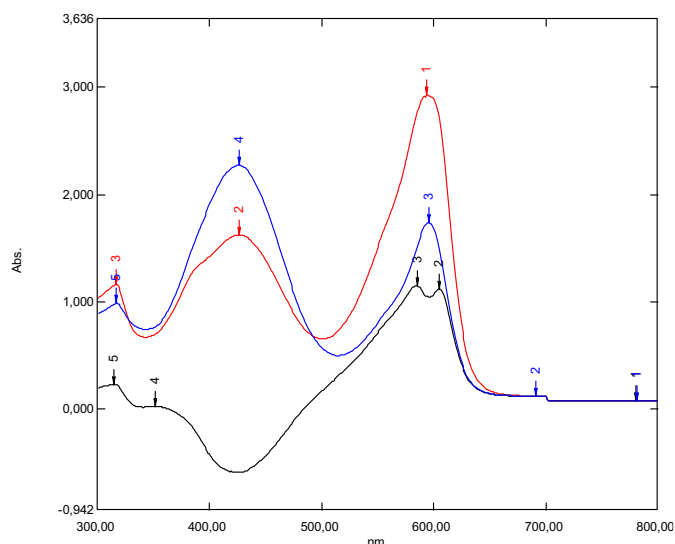





Рисунок 3.28 – Спектри поглинання продукту реакції мельдонію ($C_M=7.60 \times 10^{-3} \text{ M}$) з БФС ($C_M=9.60 \times 10^{-3} \text{ M}$) проти метанолу (червоний), проти БФС (чорний) та БФС проти метанолу (синій)

Таблиця 3.32 – Вибір реагентів та аналітичні параметри реакцій для спектрофотометричного визначення мельдонію

Реагент	Концентрація реагенту	Умови проведення реакції	Довжина хвилі, нм	Екологічність методики (метод AGREE)
БФС	$9.6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	CH_3OH	595	
Купруму (II) сульфат	0.1 %	NaOH	-	-
<i>n</i> -хлораніл	1 %	ДМФА, нагрівання	535	
Алізарин	0.8 %	ДМФА, нагрівання	517	
Нінгідрин	0.2 %	H_2O , нагрівання	-	-

3.8 Розробка та валідація спектрофотометричної методики визначення мельдонію в субстанції та лікарських засобах за реакцією з алізарином

Експериментальним шляхом (розділ 3.7) для подальшої розробки спектрофотометричної методики визначення мельдонію в субстанції та ЛЗ як реагент обрано алізарин.

Алізарин є дигідроксіантрахіноном, що є антрацен-9,10-діоном, у якому дві гідроксигрупи розташовані в положеннях 1 і 2 [117]. Враховуючи фізико-хімічні властивості алізарину, розчинником для подальших досліджень обрано ДМФА. Необхідним та перспективним є подальше вивчення умов проведення взаємодії мельдонію з алізарином (вибір концентрації реагенту, часу та температури нагрівання, співвідношення реагуючих компонентів) для розробки спектрофотометричної методики. Для встановлення оптимальної концентрації реагенту (алізарину) проаналізовано концентрації від 0.1 % до 1.0 %. Графік залежності оптичної густини від концентрації розчину алізарину наведено на рисунку 3.29.



Рисунок 3.29 – Графік залежності оптичної густини від концентрації розчину алізарину

Як впливає з рисунка 3.29, результатами експериментального визначення концентрацією реагенту (розчину алізарину) обрано концентрацію 0.8 %. Важливою умовою проведення реакції є нагрівання.

На рисунку 3.30 представлено графік залежності оптичної густини від часу нагрівання. Як випливає з результатів, представлених на рис. 3.30, оптимальним часом нагрівання є 20 хв.

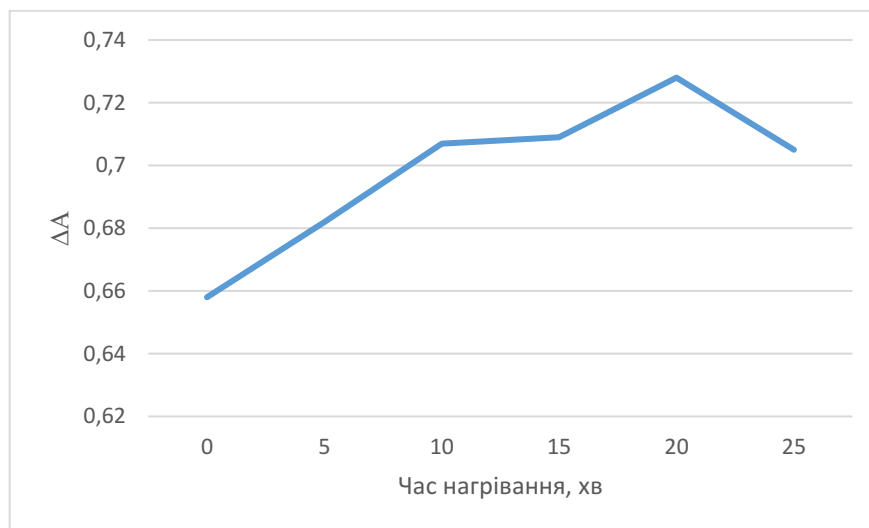


Рисунок 3.30 – Графік залежності оптичної густини від часу нагрівання

На рисунку 3.31 наведено графік залежності оптичної густини від температури нагрівання. Встановлено, що оптимальною температурою нагрівання є 95 °С.

Важливою умовою подальшої розробки аналітичної методики є вивчення стабільності аналізованих розчинів в часі. Встановлено, що розчини є стабільними впродовж 45 хв, проте рекомендовано вимірювати оптичну густину свіжоприготовлених розчинів (рис. 3.32).

Стехіометричні коефіцієнти реагуючих компонентів визначали методом неперервних змін (метод Жоба) і метод насичення (метод молярних співвідношень). Графік залежності абсорбції від складу ізомолярного розчину за довжини хвилі 517 нм (метод Жоба) представлено рис. 3.33. Криві насичення (метод молярних співвідношень) наведено на рисунку 3.34.

Результати, отримані на рисунках 3.33, 3.34, свідчать про те, що стехіометричні співвідношення реагуючих компонентів «метопролол – алізарин» становлять 1:1.

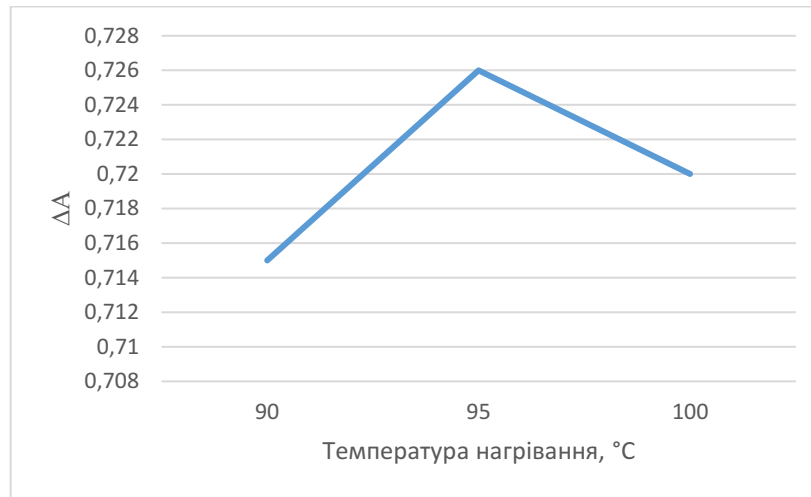


Рисунок 3.31 – Графік залежності оптичної густини від температури нагрівання

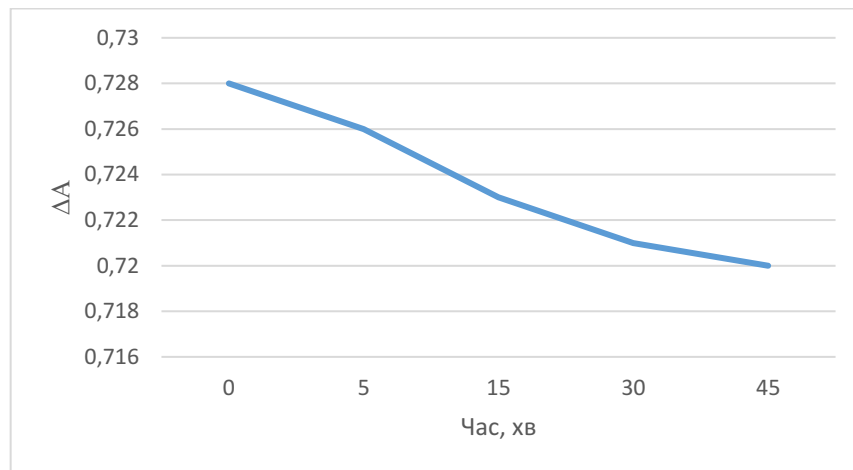


Рисунок 3.32 – Графік залежності оптичної густини від часу

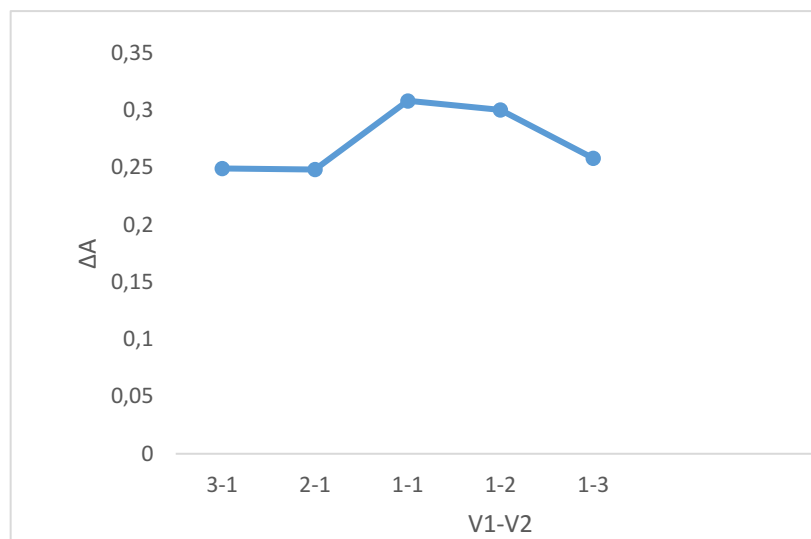


Рисунок 3.33 – Графік залежності абсорбції від складу ізомольярного розчину (V_1 – об'єм 7.0×10^{-3} розчину мьелдонію, V_2 – об'єм 7.0×10^{-3} розчину алізарину) за довжини хвилі 517 нм

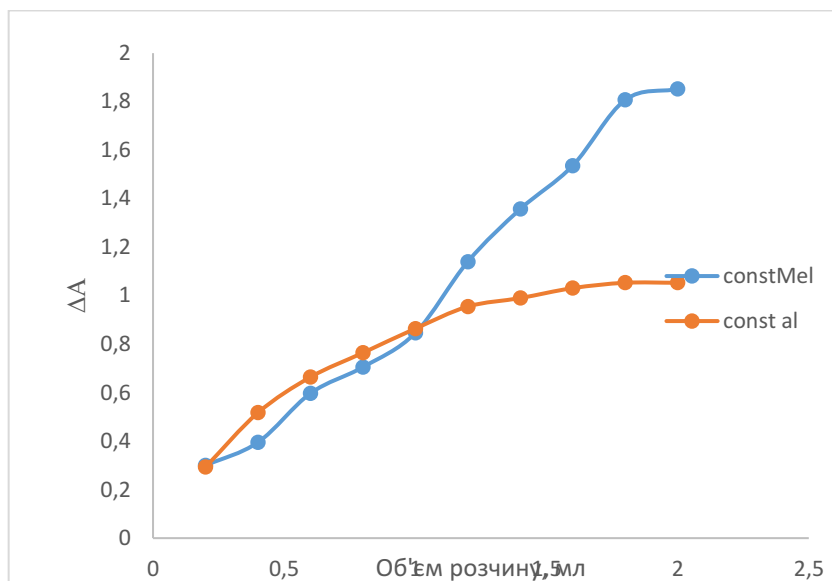


Рисунок 3.34 – Криві насичення: 1 – мельдонію при постійній концентрації алізарину (1.00 мл 7.0×10^{-3} розчину); 2 – алізарину при постійній концентрації мельдонію (1.00 мл 7.0×10^{-3} М розчину)

Розраховано показники чутливості реакції мельдонію з алізарином. Встановлено, що молярний показник поглинання (ϵ) становив 1.38×10^3 , питома поглинання (a) – 7.58×10^{-2} , коефіцієнт Сендела (Ws) – 0.14.

Підсумовуючи вище описані факти з вибору оптимальних умов проведення кількісного визначення мельдонію встановлено, що оптимальним розчинником є диметилформамід, концентрація розчину алізарину – 0.8 %, час нагрівання – 20 хв, температура нагрівання – 95 °С [116].

Запропоновану спектрофотометричну методику визначення мельдонію за реакцією з алізарином валідовано відповідно до вимог ДФУ [74] та ІСН Q2 [75] за наступними показниками: специфічність, лінійність, діапазон застосування, правильність, прецизійність та робастність.

3.8.1 Специфічність методики

З метою вивчення специфічності спектрофотометричної методики визначення мельдонію за реакцією з алізарином готували розчин допоміжних речовин («плацебо»). Результати вивчення специфічності аналітичної методики визначення мельдонію в капсулах представлено в таблиці 3.33.

Таблиця 3.33 – Результати вивчення специфічності спектрофотометричної методики визначення мельдонію в капсулах за реакцією з алізарином

Абсорбція плацебо (А плацебо)	Абсорбція розчину домішок ЛФ (А домішок)	Абсорбція розчину порівняння (Ast)	Знайдене значення δ_{noise} , %	Критерій прийнятності
0.001	-	0.305	0.33	не більше 0.5 %

Результати вивчення специфічності аналітичної методики вказують на те, що абсорбція допоміжних речовин («плацебо») є незначною (знайдене значення δ_{noise} становить 0.33 %) та не перевищує критерій прийнятності (не більше 0.5 %).

3.8.2 Лінійність, діапазон застосування методики

Лінійність спектрофотометричної методики визначення мельдонію за реакцією з алізарином вивчали в діапазоні концентрацій 0.146-0.438 мг/мл відповідно до вимог ДФУ методом найменших квадратів, використовуючи модельні розчини. Метрологічні характеристики рівняння регресійної залежності для кількісного визначення мельдонію представлено в таблиці 3.34.

Таблиця 3.34 – Метрологічні характеристики лінійної залежності

Величина	Значення	Критерій	Висновок (відповідає або не відповідає)
$b \pm (S_b)$	$0.0003 \pm (0.0001)$	–	
$a \pm (S_a)$	$0.264 \pm (0.0035)$	$ a \leq 2.6$	Відповідає
R^2	0.9998	> 0.9992	Відповідає
МВ (мкг/мл)	38.50	–	
МКВ (мкг/мл)	116.67	–	
Підпорядкування закону Бера в діапазоні концентрацій (мг/мл)	0.146-0.438	–	

Параметри лінійності (табл. 3.34) відповідають вимогам ДФУ на всьому діапазоні застосування аналітичної методики (0.146-0.438 мг/мл). МВ мельдонію становила 38.50 мкг/мл, МКВ – 116.67 мкг/мл.

3.8.3 Правильність та прецизійність методики

Правильність та прецизійність спектрофотометричної методики визначення мельдонію за реакцією з алізарином перевіряли шляхом приготування модельних розчинів з точно відомою концентрацією з вмістом 70-130 % від номінального. Отримані результати проведених розрахунків представлено в таблиці 3.35.

Таблиця 3.35 – Результати аналізу модельних сумішей і їх статистична обробка для кількісного визначення

Модельні розчини	Вміст мельдонію, %		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	69.88	69.99	100.16
M ₂	80.44	80.16	99.65
M ₃	90.58	90.09	99.46
M ₄	95.04	95.47	100.45
M ₅	100.05	100.09	100.04
M ₆	104.85	105.11	100.25
M ₇	110.21	110.35	100.13
M ₈	120.05	120.24	100.16
M ₉	129.85	130.08	100.18
Середнє значення, Z, %			100.06
Стандартне відхилення, S _z , %			0.33
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95 \%, 8) \cdot S_z = 2.3060 S_z, \%$			0.76
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta_{As} = 1.6 \%$			Виконується (0.76 < 1.6)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 , \%$			0.06
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta \%$			Виконується (0.06 < 0.51)
Загальний висновок про методику			Коректна

Як впливає з результатів, одержаних в таблиці 3.35, методика визначення мельдонію за реакцією з алізарином характеризується достатньою прецизійністю, отримане значення відносного довірчого інтервалу величини Δz (0.76 %) менше критичного значення для збіжності результатів (1.6 %). Систематична похибка становила 0.16 % та була практично незначущою.

Вивчення внутрішньолабораторної прецизійності проводили на шести зразках однієї серії препарату, різними хіміками-аналітиками, у різні дні, з використанням різного мірного посуду, з розрахунком значення відносного довірчого інтервалу, яке повинно бути меншим максимально припустимої невизначеності результатів аналізу: $\Delta z \leq 1.6$ (при $V = 5\%$) (табл. 3.36).

Таблиця 3.36 – Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності

№ розчину	Величина Z_i , %		
	1 дослід	2 дослід	3 дослід
1	100.18	100.25	99.95
2	100.05	100.17	99.98
3	99.91	100.11	100.18
4	99.87	100.21	99.97
5	100.05	99.98	100.10
6	100.01	100.14	100.09
Середнє Z (%)	100.01	100.14	100.05
RSD_x , %	0.11	0.09	0.09
Відносне стандартне відхилення, RSD_z (%)	0.10		
Відносний довірчий інтервал, Δz	0.09 \leq 1.6		
Критичне значення збіжності результатів Δ_{As} , %	1.6		

Результати вивчення внутрішньолабораторної прецизійності свідчать те, що величина відносного довірчого інтервалу для шести паралельних визначень однієї серії задовольняє критерій прийнятності ($\leq 1.6\%$) (див. табл. 3.36).

3.8.4 Прогноз повної невизначеності методики

Розрахунок невизначеності пробопідготовки для методики кількісного визначення представлено в таблиці 3.37. Невизначеність кінцевої аналітичної операції для спектрофотометричного визначення складає 0.70 %.

Таблиця 3.37 – Розрахунок невизначеності пробопідготовки для методики кількісного визначення

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
Розчин порівняння мельдонію		
1) взяття наважки ФСЗ мельдонію дигідрату	m_0	$0.2 \text{ мг}/33.53 \text{ мг} \times 100 \% = 0.60$
2) розчинення у воді піпеткою 5.0 мл	-	0.69
3) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.0 мл	25	0.23
4) взяття аліквоти піпеткою 1.0 мл	0.3	0.74
5) взяття 0.8 % розчину алізарину піпеткою 1.0 мл	-	0.74
6) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 10.0 мл	10	0.50
Випробовуваний розчин		
7) взяття наважки грануляту капсул	m_1	$0.2 \text{ мг}/70 \text{ мг} \times 100 \% = 0.29$
8) розчинення у воді піпеткою 5.0 мл	-	0.69
9) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.0 мл	25	0.23
10) взяття аліквоти піпеткою 1.0 мл	0.3	0.74
11) взяття 0.8 % розчину алізарину піпеткою 1.0 мл	-	0.74
12) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 10.0 мл	10	0.50
Компенсаційний розчин		
13) взяття наважки алізарину	-	$0.2 \text{ мг}/80.40 \text{ мг} \times 100 \% = 0.25$
14) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 10.0 мл	-	0.50

Розрахована невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) для визначення мельдонію в капсулах склала 2.12 %. Максимальний внесок у невизначеність пробопідготовки вносять операції 4, 5, 10, 11 (взяття розчину піпеткою 1.0 мл). Повна невизначеність аналітичної методики (Δ_{As}) при аналізі препарату склала 2.23 %. Прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не перевищила критичних значень ($\max\Delta_{As}$).

$$\Delta_{As} = 2.23 \% \leq \max\Delta_{As} = 2.40 \%$$

Результати визначення вмісту мельдонію в капсулах представлено в таблиці 3.38.

Таблиця 3.38 – Результати кількісного визначення мельдонію в капсулах

Лікарський засіб	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
Капсули «Метамакс» (Дарниця) 250 мг серії № NS 20222	0.2491	$\bar{m} = 0.2505$ г
	0.2509	$S = 1.43 \times 10^{-3}$
	0.2485	$t = 2.57$
	0.2515	$\Delta x = 1.50 \times 10^{-3}$
	0.2510	RDS = 0.57
	0.2522	$\varepsilon = 0.60 \%$
Капсули «Вазопро» (Фармак) 500 мг серія № 20321	0.5082	$\bar{m} = 0.5032$ г
	0.5029	$S = 3.33 \times 10^{-3}$
	0.5055	$t = 2.57$
	0.4992	$\Delta x = 3.49 \times 10^{-3}$
	0.5034	RDS = 0.66
	0.5002	$\varepsilon = 0.69 \%$

3.8.5 Робасність методики

Робасність запропонованої спектрофотометричної методики визначення мельдонію в капсулах за реакцією з алізарином вивчали шляхом оцінювання стабільності розчинів в часі (див. рис. 3.32) та впливу кількості доданого реактиву (0.8 % розчину алізарину) на оптичну густину (табл. 3.39). Результати вивчення впливу кількості доданого 0.8 % розчину алізарину на оптичну густину, що представлено в табл. 3.39, свідчать про те, що коливання

кількості доданого реагенту (0.8 % розчину алізарину) не впливає на значення оптичної густини.

Таблиця 3.39 – Вплив кількості доданого 0.8 % розчину алізарину на оптичну густину

Об'єм 0.8 % розчину алізарину, мл	ΔA
0.1	0.262
0.2	0.286
0.3	0.305
0.4	0.327
0.5	0.346

Підсумовуючи вище описані факти можна зробити висновок, що розроблена спектрофотометрична методика визначення мельдонію в ЛЗ за реакцією з алізарином є простою у виконанні, недороговартісною та може застосовуватися в рутинному аналізі ЛЗ мельдонію та при проведенні арбітражного контролю.

3.8.6 Розрахування впливу аналітичної методики на навколишнє середовище

Розрахування оцінки впливу аналітичної методики на навколишнє середовище проводили трьома методами такими як метод аналітичної екошкали, метод AGREE, метод GAPI. Попередньо ще на етапі розробки спектрофотометричних методик, ми розуміли, що бал «зеленості» аналітичної методики не буде високим (методом AGREE 0.57) (див. табл. 3.32), оскільки використовувався розчинник ДМФА та було нагрівання, проте, як зазначалося в розділі 3.6., альтернатив серед спектрофотометричних методик не було. У таблиці 3.40 представлено результати порівняння «зеленості» методом аналітичної екошкали [69] розробленої спектрофотометричної методики визначення мельдонію в ЛЗ за реакцією з алізарином з описаною в науковій літературі спектрофотометричною методикою

визначення мельдонію за реакцією з *n*-хлораналілом [53]. Як впливає з отриманих у таблиці 3.40 результатів, обидві спектрофотометричні методики мають бал 81.


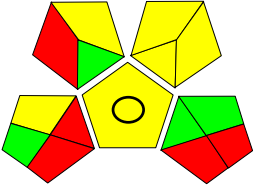

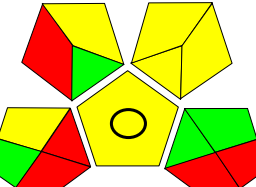
Таблиця 3.40 – Порівняння «зеленості» методом аналітичної екошкали розробленої спектрофотометричної методики визначення мельдонію в ЛЗ за реакцією з алізарином з описаною в науковій літературі спектрофотометричною методикою за реакцією з *n*-хлораналілом

№	Аналітична методика	Умови проведення кількісного визначення	Реагент/параметр	Пенальті бали
1.	Розроблена спектрофотометрична методика за реакцією з алізарином [116]	0.8 % розчин алізарину, ДМФА, нагрівання 95 °С 20 хв, $\lambda_{\text{max}} = 517$ нм	Алізарин	2
			Диметилформамід	4
			Професійні шкідливості	5
			Обладнання	0
			Втрати	8
			Кількість пенальті балів	19
Кількість балів	81			
2.	Спектрофотометрична методика за реакцією з <i>n</i> -хлораналілом [53]	1 % розчин <i>n</i> -хлоранілу, ДМФА, нагрівання 95 °С 20 хв, $\lambda_{\text{max}} = 556$ нм	<i>n</i> -хлораніл	2
			Диметилформамід	4
			Професійні шкідливості	5
			Обладнання	0
			Втрати	8
			Кількість пенальті балів	19
Кількість балів	81			

Наступними методами вивчення «зеленості» методик були метод AGREE [70] та GAPI [71]. У таблиці 3.41 представлено результати порівняння «зеленості» методами AGREE та GAPI розробленої спектрофотометричної методики визначення мельдонію в ЛЗ за реакцією з алізарином з описаною в науковій літературі спектрофотометричною методикою визначення мельдонію за реакцією з *n*-хлораналілом [53].

У таблиці 3.41 показано, що обидві спектрофотометричні методики мали бал за методом AGREE 0.56. Як впливає з табл. 3.41, «зеленість» розробленої нами методики та описаної в науковій літературі [53] є ідентичними, оскільки умови проведення кількісного визначення мельдонію є подібними (використання ДМФА як розчинника та нагрівання впродовж 20 хв при температурі 95 °С).

Таблиця 3.41 – Порівняння «зеленості» розробленої спектрофотометричної методики визначення мельдонію в ЛЗ за реакцією з алізарином з описаною в науковій літературі спектрофотометричною методикою визначення мельдонію за реакцією з *n*-хлоранілом методами AGREE та GAPI

№	Аналітична методика	Умови проведення кількісного визначення	Піктограма та бал за методом AGREE	Піктограма GAPI
1.	Розроблена спектрофотометрична методика за реакцією з алізарином [116]	0.8 % розчин алізарину, ДМФА, нагрівання 95 °С 20 хв, $\lambda_{\text{max}} = 517$ нм		
2.	Спектрофотометрична методика за реакцією з <i>n</i> -хлоранілом [51]	1 % розчин <i>n</i> -хлоранілу, ДМФА, нагрівання 95 °С 20 хв, $\lambda_{\text{max}} = 556$ нм		

Підсумовуючи вище описані факти, можна зробити висновок, що розроблена спектрофотометрична методика визначення мельдонію в ЛЗ за реакцією з алізарином не є достатньо «зеленою», а отже створює певну небезпеку для навколишнього середовища, тому, все ж таки, актуальною залишається розробка ВЕРХ методики визначення мельдонію в субстанції та ЛЗ. Проте,

незважаючи на описаний факт, дана методика може застосовуватися для проведення арбітражного контролю.

Висновки до розділу 3

1. Розроблено УФ-спектрофотометричну методику визначення метопрололу в субстанції та монокомпонентних ЛЗ. Обмеженнями щодо застосування запропонованої УФ-спектрофотометричної методики є визначення метопрололу в комбінованих ЛФ за умови, що інший АФІ буде поглинати в діапазоні 220-230 нм.

2. Запропоновано методологію вибору реагенту для розробки спектрофотометричних методик визначення метопрололу в субстанції та ЛЗ. В процесі вибору оптимального реагенту для розробки спектрофотометричних методик апробовано барвники (метилловий червоний, метиловий синій, бромкрезоловий пурпуровий, тимоловий синій, БКЗ, БФС, БТС) та хінони (*n*-хлораніл, алізарин). Для подальшої розробки спектрофотометричних методик визначення метопрололу відібрано БКЗ, БФС, БТС як потенційні реагенти.

3. Розроблено та валідовано спектрофотометричні методики кількісного визначення метопрололу тартрату в субстанції та ЛЗ за реакцією з БКЗ, БФС, БТС, експериментально обґрунтовано оптимальні умови утворення продуктів взаємодії метопрололу тартрату з БКЗ, БФС, БТС – вибір концентрації реагента (1.6×10^{-4} М розчину БКЗ, 2.0×10^{-4} М розчину БФС, 1.6×10^{-4} М розчину БТС), органічного розчинника (БКЗ, БФС – метанол, БТС – ацетонітрил), аналітичної довжини хвилі (БКЗ – 624 нм, БФС – 595 нм, БТС – 402 нм), встановлено коефіцієнти стехіометричних співвідношень «метопрололу тартрату–БКЗ/БФС/БТС» (1:1) та показники чутливості реакції.

4. Запропоновані спектрофотометричні методики визначення метопрололу показали відмінний результат «зеленості» методами аналітичної еко-шкали, AGREE, GAPI, оскільки при розробці методик не використовувалися токсичні розчинники та мінімізувалася пробопідготовка. Всі чотири розроблені спектрофотометричні методики визначення метопрололу в субстанції та ЛЗ переважають за екологічністю раніше опубліковані методики.

5. Розроблені спектрофотометричні методики визначення метопрололу в субстанції та ЛЗ є «зеленими», простими у виконанні, нетрудомісткими (без нагрівання та корегування значення рН), недороговартісними та можуть застосовуватися в рутинному аналізі ЛЗ метопрололу та при проведенні арбітражного контролю.

6. Запропоновано методологію вибору реагенту для розробки спектрофотометричних методик визначення мельдонію в субстанції та ЛЗ. В процесі вибору оптимального реагенту для розробки спектрофотометричної методики апробовано *n*-хлораніл, алізарин, БФС, нінгідрин, купруму (II) сульфат. Для подальшої розробки спектрофотометричної методики визначення мельдонію як реагент відібрано алізарин.

7. Розроблено та валідовано спектрофотометричну методику кількісного визначення мельдонію в субстанції та ЛЗ за реакцією з алізарином, експериментально встановлено оптимальні умови проведення кількісного визначення (концентрація розчину алізарину – 0.8 %, об'єм 0.8 % розчину алізарину – 0.5 мл, аналітична довжина хвилі – 517 нм, час нагрівання – 20 хв, температура – (95 ± 2) °C), стехіометричні співвідношення реагуючих компонентів «мельдоній-алізарин» (1:1) та показники чутливості реакції.

8. Запропонована спектрофотометрична методика визначення мельдонію в субстанції та ЛЗ за реакцією з алізарином не є достатньо «зеленою», тому актуальною залишається розробка ВЕРХ методики визначення мельдонію в субстанції та ЛЗ. Проте, незважаючи на описаний факт, дана методика може застосовуватися для проведення арбітражного контролю.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в наукових працях автора [76, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116].

РОЗДІЛ 4

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ ХРОМАТОГРАФІЧНИХ МЕТОДИК ВИЗНАЧЕННЯ МЕТОПРОЛОЛУ ТА МЕЛЬДОНІУ В СУБСТАНЦІЯХ ТА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ

4.1 Розробка та валідація ВЕРХ-методик кількісного визначення мельдонію в субстанції та лікарських засобах

У розділі 3 розроблено та описано спектрофотометричні методики визначення метопрололу та мельдонію в субстанціях та ЛЗ, проте запропоновані методики мають певні обмеження, а саме можливість застосування тільки для аналізу метопрололу та мельдонію в субстанціях та монокомпонентних ЛЗ, а також застосування ДМФА та нагрівання (спектрофотометрична методика визначення мельдонію за реакцією з алізарином). Тому, беззаперечно, є необхідність в розробці ВЕРХ методик.

Для визначення мельдонію та його домішок в ЛФ розроблено три хроматографічні методики [50, 51, 52]. Всі вони мають подібні недоліки, зумовлені часом розробки цих методик (2008, 2006, 2005 роки). На сьогоднішній день підходи до розробки хроматографічних методик дещо змінилися. Виробниками впроваджено в практику нові хроматографічні колонки, використовуються інші підходи до підбору рухомих фаз та умов хроматографування [118-147]. Дослідження з використання солей хаотропних аніонів є досить перспективними підходом у розробці ВЕРХ методик [148-153]. Основна ідея для перевірки хаотропного ефекту при розробці методу ВЕРХ виникла з експериментів та їх результатів, описаних у практичних рекомендаціях «ВЕРХ для вчених-практиків» [124], що застосовано в нашій роботі.

На початку концептуалізації розробки ВЕРХ методики визначення мельдонію в субстанції та ЛФ опрацьовано основні проблеми, які планувалося вирішити. Як ми вже згадували раніше, мельдоній – непростий аналіт для аналізу через низьку молекулярну масу та високу полярність. Використання солей

хаотропних аніонів у рухомій фазі показало певні переваги в розробці ВЕРХ методик, такі як збільшення утримування N-вмісних молекул у колонці, особливо в кислому рН-середовищі, та покращення симетрії піків [154, 155]. Хаотропний аніон гексафторфосфату є найсильнішим у ряді хаотропних аніонів Гофмейстера [152, 153]. Розуміючи описані вище факти, ми розпочали дослідження з першого підходу, який передбачав використання короткої хроматографічної колонки Agilent Zorbax C-18 SB (4.6 мм i.d. X 150 мм, 3.5 мкм) та рухомої фази, що складається з 0.25% KPF_6 – 0.1% H_3PO_4 95% – 5% ACN. Отриману хроматограму представлено на рисунку 4.1.

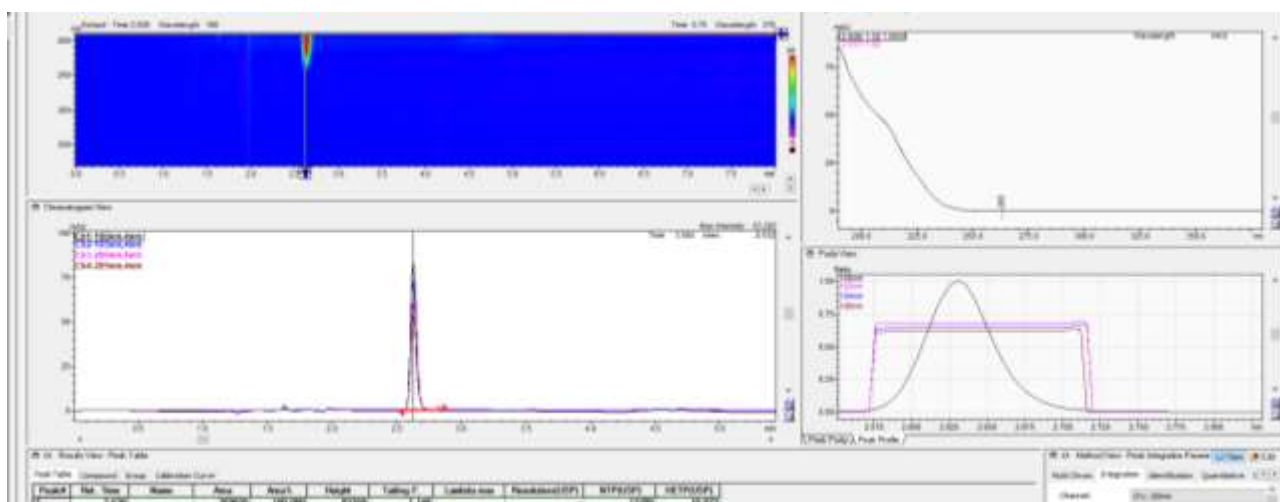


Рисунок 4.1 – Типова хроматограма розчину ФСЗ мельдонію (5 мг/мл), отримана з використанням хроматографічної колонки Agilent Zorbax C-18 SB (4.6 мм i.d. X 150 мм, 3.5 мкм) та рухомої фази, що складається з 0.25% KPF_6 – 0.1% H_3PO_4 95% – 5% ACN при 4 різних довжинах хвиль, праворуч ілюструється піковий УФ-спектр і графічний розрахунок чистоти

Як видно з хроматограм на рис. 4.1, профіль елюювання цієї колонки та рухомої фази показали відмінне утримування. Для вибору оптимальної довжини хвилі апробовано чотири різні довжини хвилі (190 нм, 195 нм, 200 нм, 205 нм) (рис.4.2). Аналізуючи рисунок 4.2, можна зробити висновок, що всі довжини хвиль є придатними для визначення мельдонію. Повну 3-D хроматограму розчину ФСЗ мельдонію представлено на рисунку 4.3.

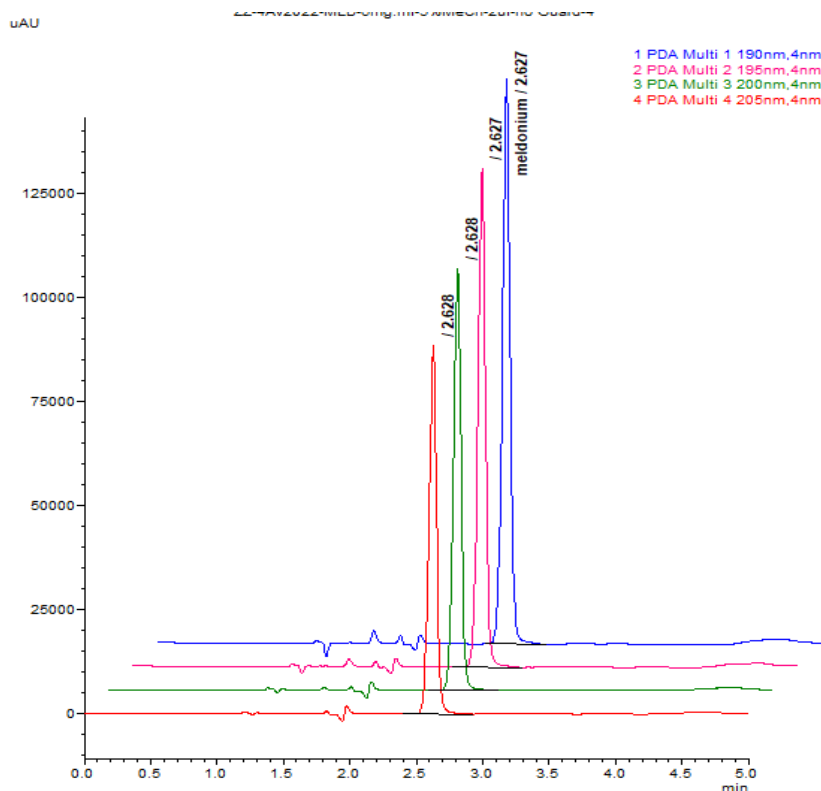


Рисунок 4.2 – Порівняння розміру піку розчину ФСЗ мельдонію з використанням 4 довжин хвиль УФ детектування

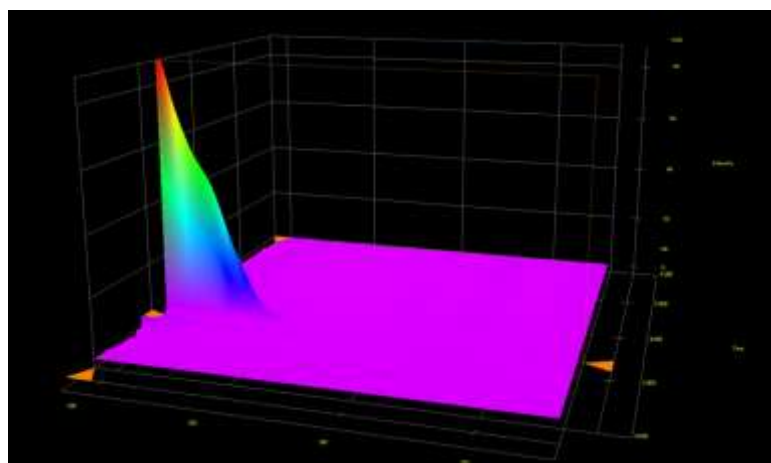


Рисунок 4.3 – 3-D хроматограма розчину ФСЗ мельдонію

Результати перевірки селективності методики представлено на рисунку 4.4. Отримані результати свідчать про відсутність інтерференції інших компонентів (рухома фаза, допоміжні речовини).

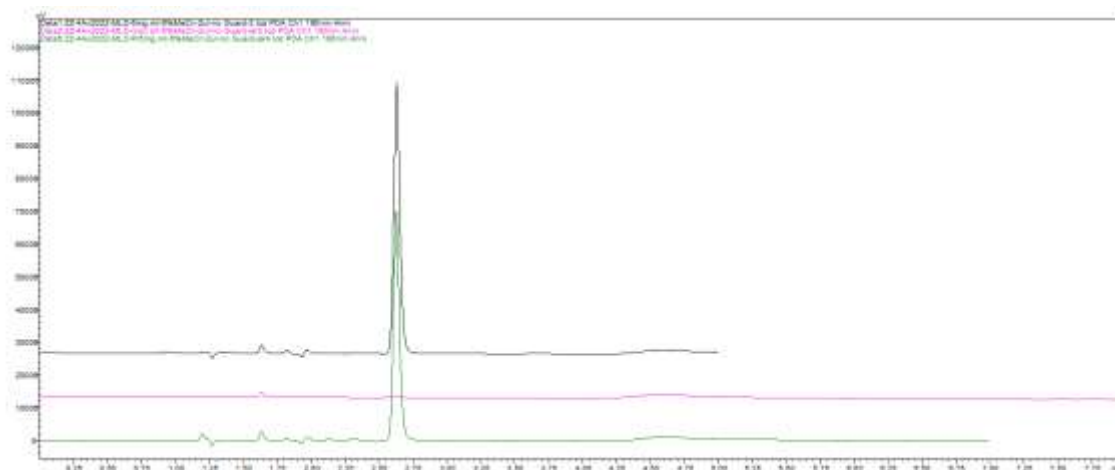


Рисунок 4.4 – Хроматограми, що ілюструють селективність методики (знизу – розчин ФСЗ мельдонію, посередині – рухома фаза, зверху – випробовуваний розчин з капсул мельдонію)

Підводячи підсумок усіх експериментів із використанням першої рухомої фази з використанням чотирьох довжин хвиль (рис. 4.5), зробили висновок, що навіть одна довжина хвилі УФ детектування є достатньою.

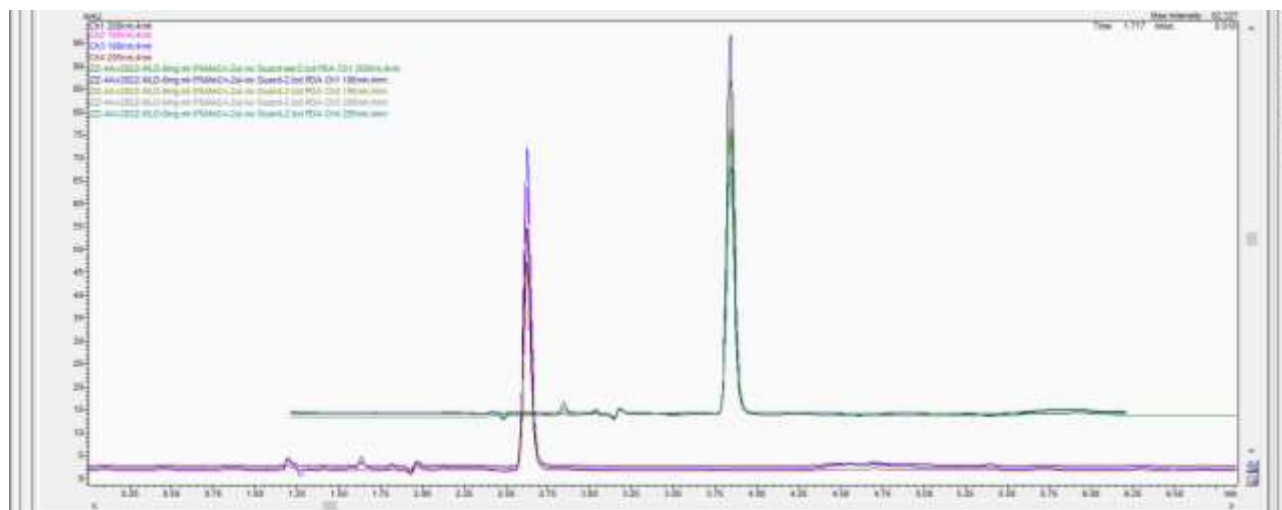


Рисунок 4.5 – Накладені хроматограми з 4-канальними одночасними моніторингами випробовуваного розчину мельдонію та розчину ФСЗ мельдонію з використанням першої рухомої фази

Аналізуючи вищеописані факти щодо першого підходу, можна зробити висновок про придатність запропонованої хроматографічної колонки Agilent

Zorbax C-18 SB (150 мм x 4.6 мм, 3.5 мкм) та рухомої фази з використанням однієї солі хаотропного аніону (KPF_6) для розробки експрес ВЕРХ-методики визначення мельдонію в субстанції та ЛФ.

Враховуючи позитивні результати, отримані в першому підході, ми продовжили пошуки можливості використання інших солей хаотропних аніонів у рухомій фазі. Загальновідомим фактом є те, що біс(трифторметансульфоніл)імід є сильнішим хаотропним іоном, ніж гексафторфосфат. Тому ми перейшли до другого підходу, який передбачав використання тієї ж колонки, що й у першій концепції Agilent Zorbax C-18 SB (150 мм x 4.6 мм, 3.5 мкм) і рухомої фази, що складається з 0.3% біс(трифторметан)сульфоніміду літію 97% – 0.1% 85% H_3PO_4 80% – 20% ACN. Порівняння збільшення часу утримування мельдонію відповідно до хаотропної сили двох найсильніших хаотропних солей, з першою рухомою фазою з KPF_6 і 5% ACN, що елююється приблизно за 2.65 хв, і найсильнішою описаною речовиною біс-(трифторметан)сульфонімід літію, проілюстровано на рисунку 4.6.

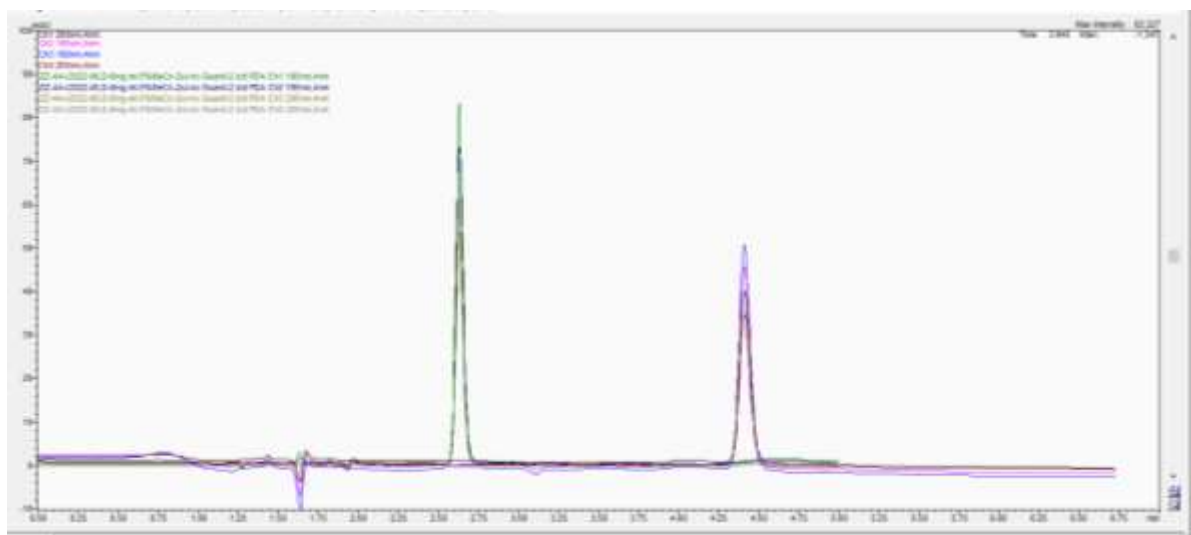


Рисунок 4.6 – Хроматограми з порівнянням часу збільшення утримування мельдонію відповідно до хаотропної сили двох найсильніших хаотропних солей, з першою рухомою фазою з KPF_6 і 5% ацетонітрилу, що елююється приблизно за 2.65 хв, і найсильнішою хаотропною сіллю біс-(трифторметан)сульфонімід літію

Як видно з хроматограм на рисунку 4.6, використання солі хаотропного аніону (біс-(трифторметан)сульфонід літію) подовжило час утримування мельдонію до 4.4 хв і дозволило отримати відмінну хроматограму із задовільними параметрами хроматографічної системи. Нами виконано накладання 4-х каналів одночасного моніторингу випробовуваного розчину мельдонію та розчину ФСЗ мельдонію з другою рухомою фазою (рис. 4.7).

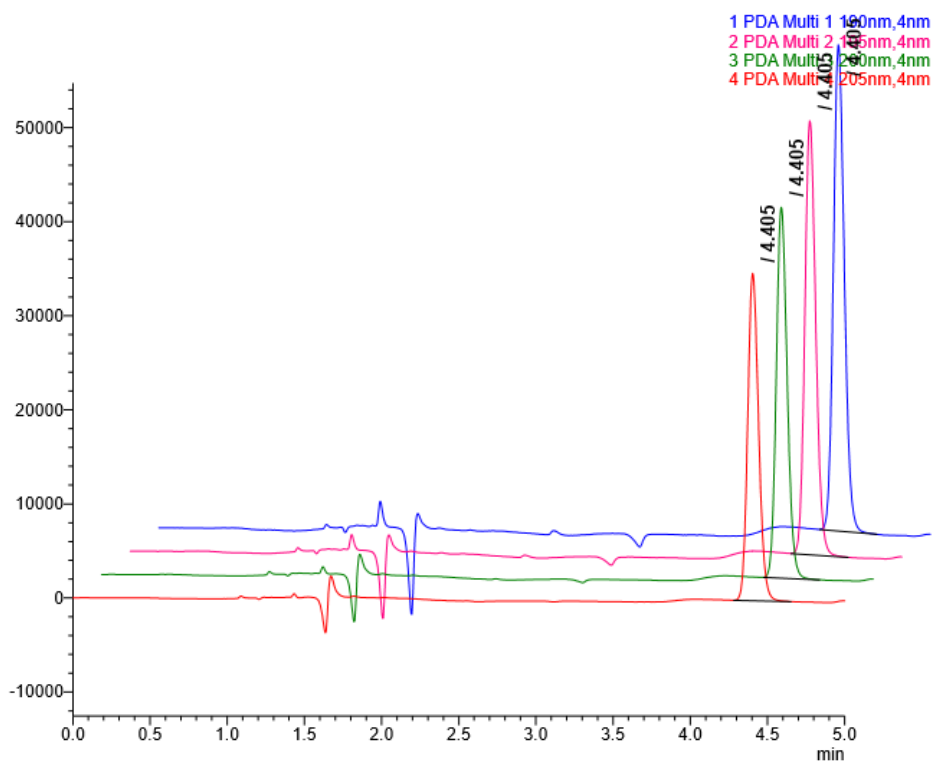


Рисунок 4.7 – Накладені хроматограми з 4-канальними одночасними моніторингами випробовуваного розчину мельдонію та розчину ФСЗ мельдонію з другою рухомою фазою з 0.3% біс-(трифторметан)сульфонід літію для порівняння висот піків та чутливості методики

На рисунку 4.8 показано накладення 4-канальної хроматограми, УФ-спектр поглинання мельдонію та пік однорідності чистоти, запропонований програмними розрахунками. Параметри хроматографічної системи, яка представлена на рисунку 4.8, підтверджують висновки та результати цього дослідження щодо впливу хаотропних солей на N-вмісну молекулу шляхом збільшення їх утримування та покращення форми піку та однорідності навіть на колонці без

деактивації основи. Тому описаний другий підхід також може бути використаний для розробки ВЕРХ методики визначення мельдонію в субстанції та ЛЗ.

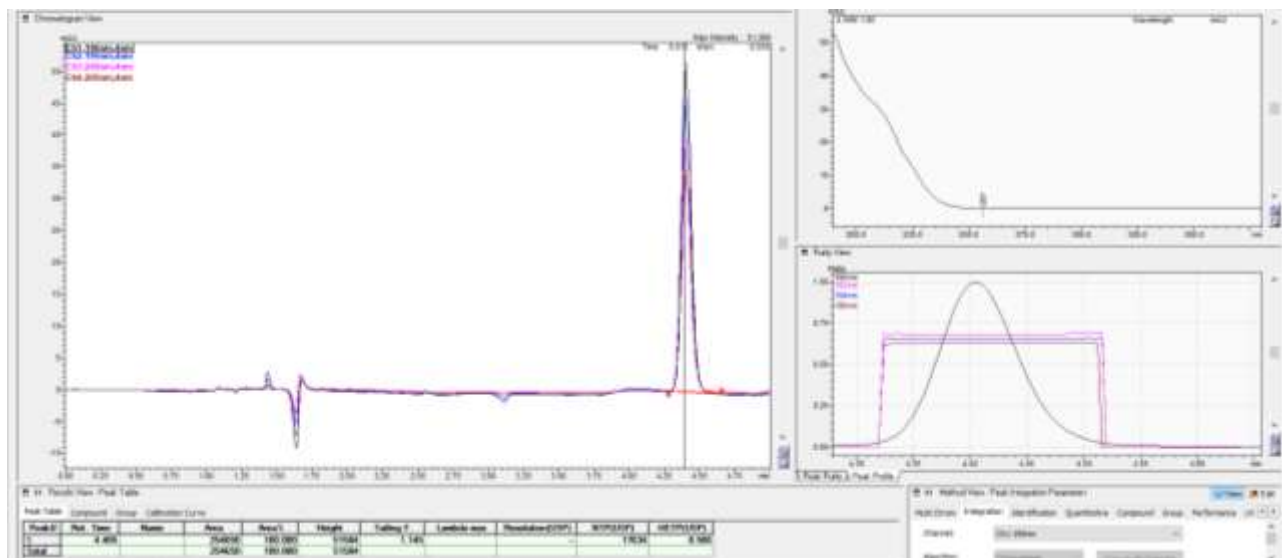




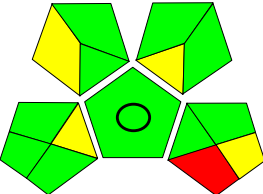
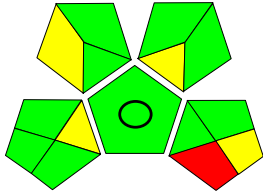
Рисунок 4.8 –Хроматограма розчину ФСЗ мельдонію з другою рухомою фазою, з найсильнішою сіллю хаотропного аніону, з контрольованим УФ-спектром, піком однорідності

Враховуючи обмеженість інформації в наукових публікаціях за останні 10 років щодо розробки ВЕРХ методики визначення мельдонію в ЛФ, нами поставлено за мету запропонувати підхід та розробити експресну, «зелену» ВЕРХ-методику. У процесі створення новітніх наукових підходів до розробки ВЕРХ методик та з власного досвіду ми звернули увагу на можливість використання солей хаотропного аніону в рухомій фазі. Для дослідження обрано хроматографічну колонку Agilent Zorbax C-18 SB 150 мм x 4.6 мм 3.5 мкм з урахування характеристик колонки. Враховуючи значні переваги введення солей хаотропних аніонів у рухому фазу, нами запропоновано два підходи з використанням двох різних солей – гексафторфосфату калію та біс-(трифторметан)сульфоніміду літію. Обидві рухомі фази включали, крім хаотропу, використання АСН та регулювання рН за допомогою 0.1 % 85 % розчину H_3PO_4 . Довжину хвилі детектування (190 нм, 195 нм, 200 нм, 205 нм) підбирали експериментальним шляхом. Підсумовуючи, нами отримано результати, які представлено в таблицях 4.1, 4.2.

Таблиця 4.1 – Порівняльна характеристика отриманих варіацій

Варіація	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Колонка	Agilent Zorbax C-18 SB 150 мм x 4.6 мм 3.5 мкм							
Рухома фаза	0.25% калію гексафторофосфат (V) – 0.1% 85% H ₃ PO ₄ 95% – 5% ACN				0.3% біс-(трифторометан)сульфаміду літію 97% – 0.1% 85% H ₃ PO ₄ 80% – 20% ACN			
Швидкість потоку, мл/хв	1.0							
Температура колонки, °С	32							
Довжина хвилі, нм	190	195	200	205	190	195	200	205
Час утримування, хв	2.63	2.63	2.63	2.63	4.05	4.05	4.05	4.05
Діапазон застосування, мг/мл	2.00-25.00							
МВ, мг/мл	0.0210	0.0239	0.0280	0.0310	0.0280	0.0330	0.0390	0.0554
МКВ, мг/мл	0.0638	0.0723	0.0848	0.0940	0.0850	0.1000	0.1182	0.1679
<i>a</i>	0.1288	0.0746	0.8994	0.6199	0.5114	0.7264	0.6742	0.9473
Критерій	<i>a</i> ≤ 2.6							
<i>S_a</i>	0.0200	0.0226	0.0294	0.0326	0.0270	0.0322	0.0444	0.0518
<i>b</i>	3.1369	3.1141	3.4675	3.4675	3.1811	3.2189	3.7571	3.0856
<i>S_b</i>	0.2617	0.5623	0.6739	0.3869	0.4728	0.5782	0.8463	0.5493
R ²	1	1	1	0.9999	1	1	1	0.9999
Критерій	> 0.9981	> 0.9967	> 0.9974	> 0.9990	> 0.9959	> 0.9991	> 0.9949	> 0.9961

Продовження таблиці 4.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Бал за методом AGREE								
Баз за аналітичною екошколою	Калію гексафторофосфат 2 Кислота фосфорна 4 Ацетонітрил 2 Професійні шкідливості 0 Обладнання 0 Втрати 3 Кількість пенальті балів 11 Кількість балів 89				Біс-(трифторометан)сульфаміду літію 2 Кислота фосфорна 4 Ацетонітрил 4 Професійні шкідливості 0 Обладнання 0 Втрати 3 Кількість пенальті балів 13 Кількість балів 87			
GAPI								

4.1.1 Валідація аналітичних методик та порівняльна оцінка впливу аналітичних методик на навколишнє середовище

Валідацію аналітичної методики проводили відповідно до вимог ДФУ [74]. Порівняльну характеристику запропонованих варіацій наведено в таблиці 4.1, результати внутрішньо- та міжлабораторної правильності та прецизійності – у таблиці 4.2.

Таблиця 4.2 – Результати вивчення внутрішньо – та міжлабораторної правильності та прецизійності

Варіація	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Знайдено, % (RSD, %)								
Внутрішньо-лабораторна правильність та прецизійність	99.81 (0.38)	98.27 (0.89)	98.78 (0.56)	99.32 (0.17)	98.77 (0.90)	99.28 (0.49)	98.78 (0.99)	99.85 (0.11)
	99.36 (0.09)	99.46 (0.78)	99.11 (0.13)	99.56 (0.38)	98.84 (0.69)	99.86 (0.10)	99.05 (0.85)	99.74 (0.72)
	99.12 (0.56)	99.56 (0.26)	98.99 (0.78)	99.19 (0.49)	99.81 (0.18)	99.53 (0.10)	98.97 (0.93)	99.64 (0.26)
Міжлабораторна правильність та прецизійність	98.95 (0.67)	99.11 (0.99)	99.56 (0.36)	98.90 (0.95)	98.70 (0.48)	99.85 (0.58)	99.28 (0.30)	98.95 (0.94)
	99.36 (0.56)	98.54 (0.67)	99.91 (0.25)	99.75 (0.40)	99.56 (0.17)	98.67 (0.14)	99.11 (0.74)	99.01 (0.70)
	99.62 (0.37)	99.35 (0.68)	98.92 (0.47)	98.70 (0.92)	99.26 (0.20)	99.93 (0.11)	98.98 (0.94)	99.16 (0.47)

Результати вивчення лінійності (див. табл. 4.1) показали зв'язок між отриманими площами піків та використаними концентраціями мельдонію, а також вказали на високу чутливість запропонованих варіацій. Аналізуючи результати, представлені в табл. 4.1, 4.2, можна зробити висновок, що всі запропоновані варіації є «зеленими» та експресними, проте, враховуючи отримані результати МВ та МКВ, ми пропонуємо застосовувати перший підхід (1 варіація) з рухомою фазою, що складалася з 0.25 % калію гексафторофосфату (V), 0.1 % 85 % H_3PO_4 95 %, 5 % ACN, та довжину хвилі детектування 190 нм. Результати вивчення впливу розроблених підходів на навколишнє середовище

методами аналітичної еко-шкали, AGREE та GAPI (див. табл. 4.1) вказують на те, що всі 8 варіацій є «зеленими».

Для підтвердження коректності ВЕРХ методики проводили прогнозування повної невизначеності методики. Невизначеність кінцевої аналітичної операції складала 1.18 %. Розрахунок невизначеності пробопідготовки мельдонію в капсулах наведено у таблиці 4.3.

Таблиця 4.3 – Розрахунок невизначеності пробопідготовки мельдонію в капсулах

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
Розчин порівняння мельдонію		
1) взяття наважки ФСЗ мельдонію дигідрату	m_0	$0.2 \text{ мг}/60 \text{ мг} \times 100 \% = 0.33$
2) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 10.0 мл	10	0.50
Випробовуваний розчин		
3) взяття наважки капсул	m_2	$0.2 \text{ мг}/102 \text{ мг} \times 100 \% = 0.20$
4) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 10.0 мл	10	0.50

Згідно з таблицею 4.3, невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) мельдонію в капсулах становить 0.81 %. Розподіл невизначеності пробопідготовки за операціями для кількісного визначення капсул мельдонію вказує на те, що найбільшу невизначеність в пробопідготовку вносить операції 2 та 4 – доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 10.0 мл (0.50 %).

Повна невизначеність аналітичної методики (Δ_{AS}) визначення мельдонію в капсулах становить 1.43 % ($\Delta_{AS} = 1.43 \% \leq \max \Delta_{AS} = 2.4 \%$).

Прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не перевищувала критичного значення ($\max \Delta_{AS}$), що свідчить про те, що запропонована ВЕРХ-

методика визначення мельдонію в капсулах даватиме коректні результати в інших лабораторіях.

Результати визначення вмісту мельдонію у капсулах (1 варіація) наведено в таблиці 4.4.

Таблиця 4.4 – Результати кількісного визначення мельдонію в капсулах

Лікарський засіб	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
Капсули «Метамакс» (Дарниця) 250 мг серії № NS 20222	0.2503	$\bar{m} = 0.2515$ г $S = 2.03 \times 10^{-3}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 2.14 \times 10^{-3}$ RDS = 0.81 $\varepsilon = 0.85 \%$
	0.2518	
	0.2552	
	0.2495	
	0.2503	
0.2517		
Капсули «Вазопро» (Фармак) 500 мг серія № 20321	0.5053	$\bar{m} = 0.5027$ г $S = 1.80 \times 10^{-3}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 1.89 \times 10^{-3}$ RDS = 0.36 $\varepsilon = 0.38 \%$
	0.5014	
	0.5028	
	0.5009	
	0.5012	
0.5042		

Враховуючи незначну кількість інформації щодо розробки методик визначення мельдонію, ми можемо запропонувати наші методики з застосуванням менш складного обладнання для лабораторій контролю якості для проведення рутинного аналізу.

4.2 Розробка та валідація ВЕРХ-методик одночасного кількісного визначення метопрололу та мельдонію в бінарній суміші та лікарських засобах

В науковій літературі не описано жодної аналітичної методики одночасного кількісного визначення метопрололу та мельдонію. Тому, виникла потреба в розробці простої, економічно доступної, експресної та «зеленої» аналітичної методики одночасного визначення метопрололу та мельдонію.

Нашою метою було вивчити можливості та проблеми, які виникають в розробці ВЕРХ методик одночасного визначення АФІ різної полярності (метопрололу та мельдонію) в ЛЗ, та розробити ВЕРХ методики одночасного визначення метопрололу та мельдонію в ЛЗ з використанням менш складного обладнання та обмеженого бюджету [156, 157].

На початку розробки ВЕРХ методики одночасного кількісного визначення метопрололу та мельдонію виникли основні проблеми. Перша – це різниця в хімічній структурі та фізико-хімічних властивостях метопрололу та мельдонію. Як вже зазначалося у розділі 2.1, метопрололу тартрат, є водорозчинною молекулою (0.402 мг/мл) з $\log P = 1.8$, pK_a (найсильніша кислота) = 14.09, pK_a (найсильніша основа) = 9.67 [2]. ЄФ регламентує виявлення домішок метопрололу методом рідинної хроматографії з використанням нерухомої фази октадецилсилільного силікагелю для хроматографії (5 мкм) та рухомої фази, що складається з 3.9 г амонію ацетату Р у 810 мл води Р, 2.0 мл триетиламіну Р, 3.0 мл кислоти фосфорної Р, 10.0 мл кислоти оцтової льодяної Р та 146 мл ацетонітрилу Р, детектування за довжини хвилі 280 нм [3]. Мельдонію дигідрат є водорозчинною молекулою (20.2 мг/мл) з $\log P = -2.6$, pK_a (найсильніша кислота) = 4.14 [7]. Як зазначалося раніше, мельдоній — амонію бетаїн, який є бета-аланінатом, у якому один із атомів водню аміногрупи заміщений триметиламіногрупою. Мельдоній є полярною сполукою без будь-яких хромофорів. Цей факт неунеможливує його визначення звичайними методами оберненофазової ВЕРХ/УФ. ЄФ пропонує для виявлення домішок мельдонію застосовувати методику ВЕРХ/МС з використанням нерухомої фази октадецилсилільного силікагелю для хроматографії (5 мкм) і градієнтного елюювання рухомої фази (рухома фаза А – 0.1 % розчин гептафтормасляної кислоти Р у воді для хроматографії Р, рухома фаза Б – 0.1 % розчин гептафтормасляної кислоти Р у метанолі Р), детектування – режим моніторингу множинних реакцій (МРМ), режим сканування 50–300 m/z [3]. Метод ВЕРХ/МС є дорогим, непридатним для звичайних, високопродуктивних аналізів в лабораторіях контролю якості ЛЗ. Оскільки мельдоній має слабкі

характеристики УФ-поглинання, використання ацетатів і триетіламіну є недостатнім для створення рухомої фази, призначеної для використання з УФ та флуоресцентним детектором, оскільки вони мають високі граничні значення, що забороняє їх використання в якості модифікаторів елюентів. Це особливо стосується гептафтормасляної кислоти як компонента в складі рухомої фази для хроматографічного визначення мельдонію відповідно до вимог ЄФ [3], як істотно важливого в цій методиці іон-парного агента.

Фізико-хімічні властивості АФІ проявляються досить по-різному, значно відмінній взаємодії, продиктованій взаємодіями полярності з алкільними ланцюгами октилсилану С-8 або октадецилсилану С-18, зв'язаними з сіліка частинками найбільш часто використовуваної хроматографічної колонки з оберненою фазою. Після відмови використання варіантів класичного обернено-фазового алкільного ланцюга колонок С-8 і С-18 та колонок ВЕРХ на основі фенільних частинок, припущено, що полярна цвітер-іонна структура мельдонію не створює ароматичного кільця в структурі, тому наступним логічним механізмом вищої полярності є ціано або ціано-пропіл-зв'язані частинки фази в ціано- або ціано-пропілових колонках CN.

4.2.1 Застосування першого підходу на колонці LiChrospher 125 CN (5 мкм) та LiChroSpher 250 CN (5 мкм)

Нами розпочато розробку першого підходу, використовуючи ціано колонку із вмістом вуглецю приблизно 6.6 % та вищою активною поверхнею приблизно 350 м²/г, діапазоном рН 2–7.5, з меншою кількістю теоретичних тарілок на метр (15000–40000) (колонки LiChrospher 125 CN (5 мкм), LiChroSpher 250 CN (5 мкм)). Застосовуючи колонки LiChrospher CN двох розмірів різної довжини 125 мм та 250 мм, виконано експресні аналізи з короткою колонкою 125 мм з метою скорочення часу та витрат розчинників. Хроматограму, отриману із застосуванням 125-мм колонки LiChrospher CN та апробовану з іншими типами рухомих фаз, що містять ACN і воду, підкислену 0.07 % TFA, представлено на рисунку 4.9.

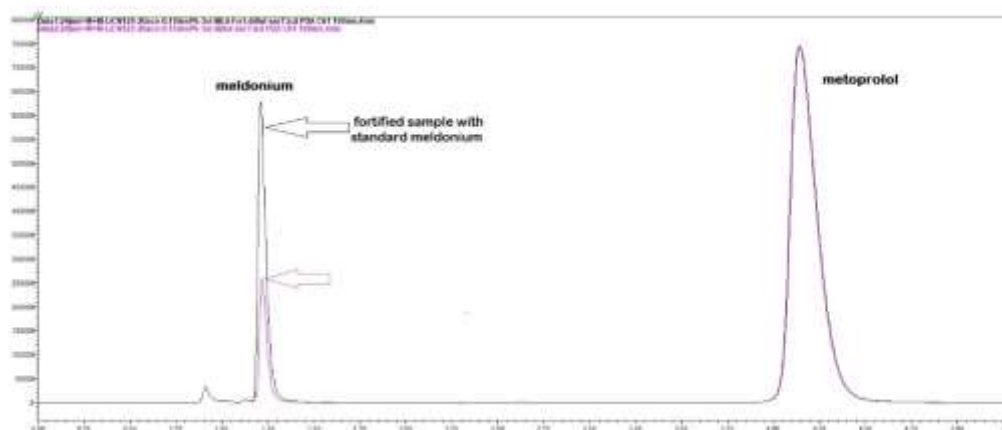


Рисунок 4.9 – Хроматограма, отримана з використанням колонки LiChrospher 100 CN 125 × 4 мм, рухомої фази – 20 % АСN і 80 % 12 мМ (0.15 %) $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Shimadzu LC-40)

Типові хроматограми з використанням колонки LiChrospher CN 125 мм × 4 мм та рухомої фази, що складалася з 20 % АСN та 80 % 13 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, представлено на рис. 4.9–4.14. Всі концентрації стандартів та зразків були доведені до концентрації 2.5 мг/мл мeldonію та 0.5 мг/мл метопрололу. Нами отримано відмінні пікові симетрії обох піків на запропонованій хроматографічній колонці (рис. 4.9). Рис. 4.10 ілюструє 3-D хроматограму аналітів з характерним увігнутим експоненціальним УФ-спектром мeldonію та двома максимумами метропрололу. Перший пік мeldonію елюювався близько 1.25 хв та демонстрував незадовільний УФ-спектр, значення якого експоненціально зменшувалося зі збільшенням довжини хвилі від 190 нм до приблизно 230–235 нм, у той час як метопролол демонстрував інтенсивні два піки. Коротка колонка LiChrospher CN розміром 125 мм × 4 мм продемонструвала відмінний баланс маси навіть при високих концентраціях аналітів, особливо мeldonію, введених у колонку, завдяки створенню ідеальної лінійності, що представлено на рис. 4.11. Залежність розміру та форми піку мeldonію та метопрололу за 4 різних довжин хвиль проілюстровано накладенням на 4 довжини хвилі УФ-спектром ізольованих піків аналітів, «увігнутою» формою мeldonію та формою подвійних максимумів поглинання метопрололу, що показано на рисунку 4.12.

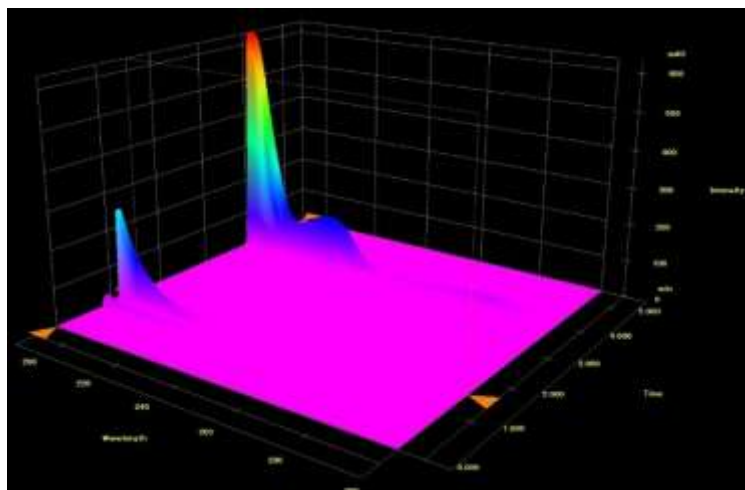


Рисунок 4.10 – 3-D хроматограма, отримана з використанням колонки LiChrospher 125 мм × 4 мм та рухомої фази, що складалася з 20 % ACN та 80 % 13 мМ NH₄H₂PO₄



Рисунок 4.11 – Хроматограми за умов вивчення лінійності, отримані з використанням короткої колонки LiChrospher 125 мм × 4 мм

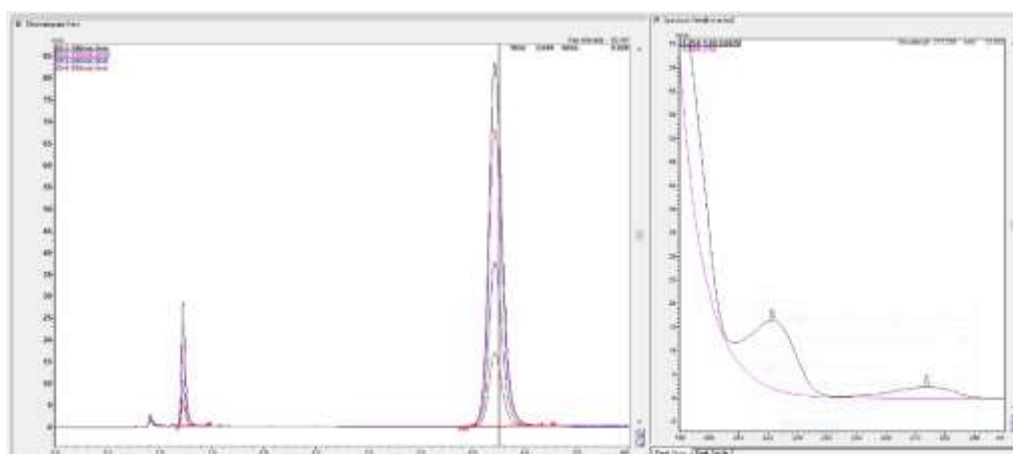


Рисунок 4.12 – Типові хроматограми суміші мельдонію (час утримування 1.25 хв) та метопрололу (час утримування 4.21 хв) з відповідними УФ-спектрами

Рисунок 4.13 ілюструє результати, отримані використанням 15 довжин хвиль, розраховані зміни хроматограми з обома аналітами, з метою отримання висновку щодо чутливості методики для обох піків. Обидва піки аналіту були дуже чутливими до зміни довжини хвилі, таким чином безпосередньо впливаючи на методику визначення чутливості для обох аналітів.

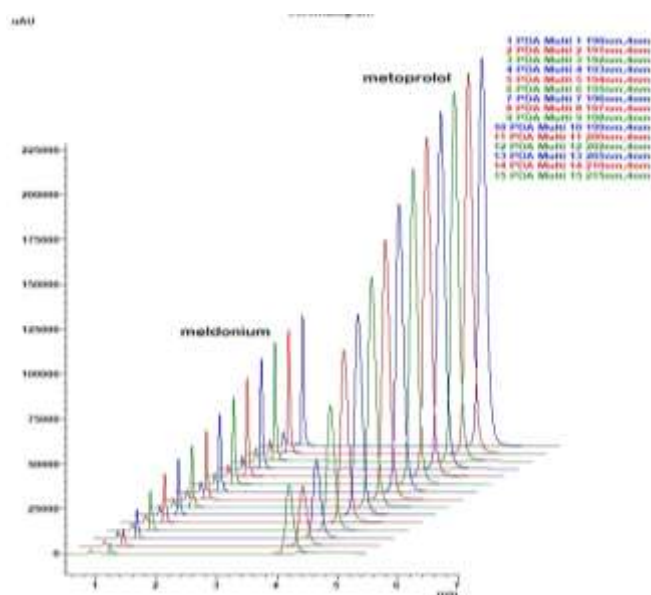


Рисунок 4.13 – Хроматограми, отримані з використанням колонки LiChrospher CN 125 мм × 4 мм, рухомої фази – 20 % ACN та 80 % 13 мМ NH₄H₂PO₄ з 15 накладених довжин хвиль, залежно від розмірів піків з кроком 1 нм в УФ-хвилі

Пошук варіації складу рухомої фази за формою хроматограми та піків дав змогу отримати хроматограми на рис. 4.14.

На рисунку 4.15 показано хроматограму модельної суміші 2.5 мг/мл мельдонію та 0.5 мг/мл метопрололу, отриману з використанням 45 % ACN та 55 % розведеною TFA як елюента, з УФ-спектрами праворуч. Спостерігається видиме відмінне утримування мельдонію, досить малий пік та менша висота піку, що збільшується зі зменшенням довжини хвилі в нижчому УФ-діапазоні. У той час як початковий рівень був відмінним, зміни розміру піку мельдонію були незначними та великими щодо піку метопрололу. Іншою видимою зміною була форма УФ-спектру мельдонію, тоді як УФ-спектр метопрололу не змінився.

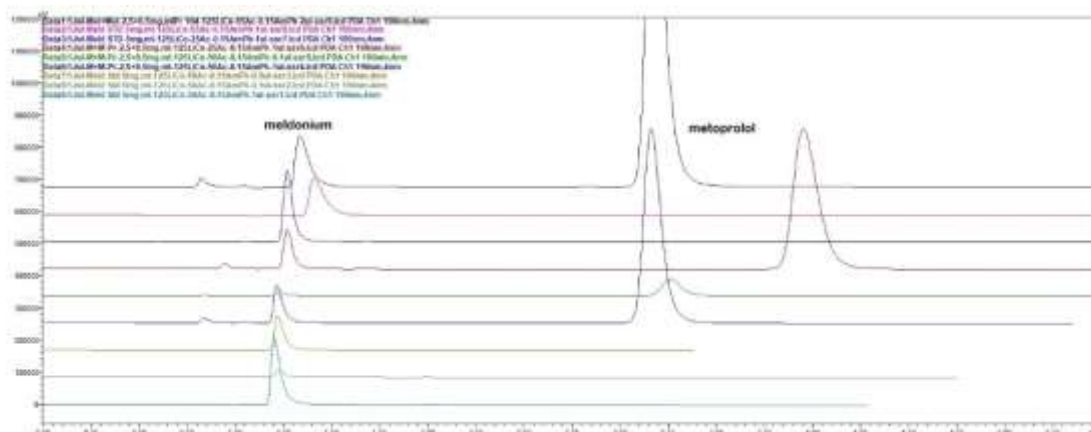


Рисунок 4.14 – Хроматограми, отримані за умов вивчення варіацій відсоткового вмісту АСН та 13 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ у складі рухомої фази (на колонці LiChrospher CN 125 мм \times 4 мм)

На наступному рисунку показано базові обмеження хроматограм у видимому шумі, спричиненому високим граничним значенням УФ для ТФА, приблизно 205–210 нм, що ускладнює його використання в цій УФ-області. Як видно з хроматограми на рис. 4.16, незважаючи на те, що базова лінія була значно іншою, зміни в піку мельдонію були незначними, і вони не мали увігнутої форми, як у випадку з амонію дигідрогенфосфатом, що використовується в рухомих фазах. Описані вище факти підтверджують придатність 125-мм колонки шляхом отримання хроматограм із подвоєним часом утримування аналітів.

На рис. 4.17 представлено хроматограму, отриману з використанням колонки LiChrospher CN 250 мм \times 4 мм та 15 хвильовими каналами за ідентичних робочих параметрів ВЕРХ, що й у попередній колонці 125 мм \times 4 мм. Екстрагований УФ-спектр по правій стороні взято з мельдонію (чорний) і першого елюйованого сусіднього невідомого піку (рожевий) для підтвердження їх відмінності. Два екстраговані піки були з першого елюйованого неінтегрованого малого піку з t_R приблизно 1.7, з характерним увігнутим УФ-спектром мельдонію.

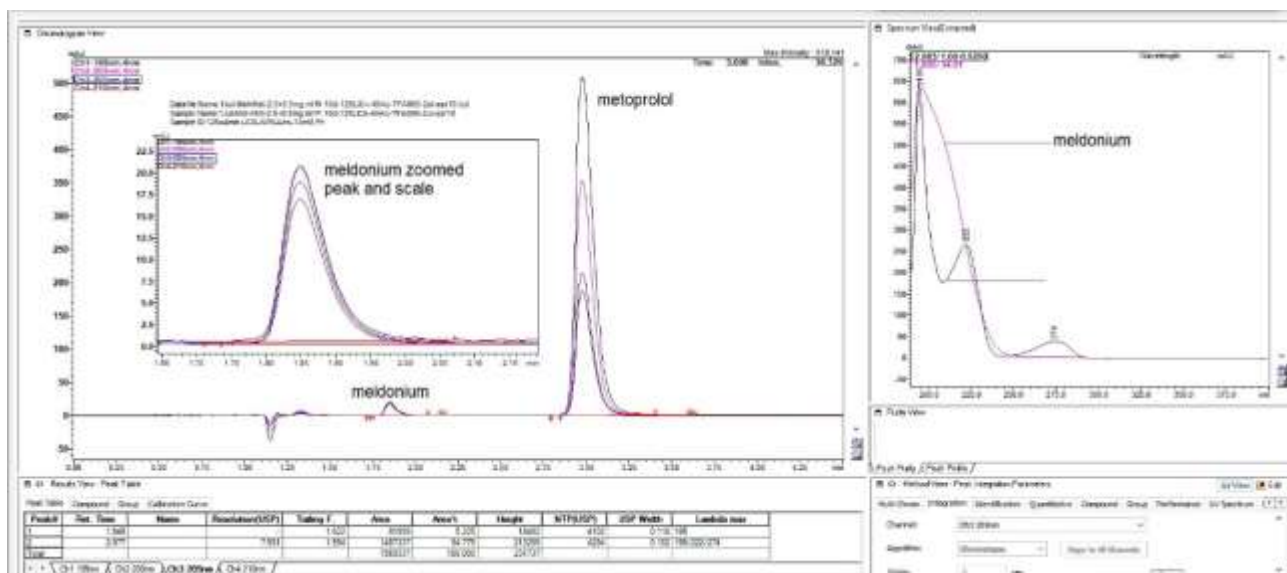


Рисунок 4.15 – Хроматограма, отримана з використанням колонки LiChrospher CN 125 мм × 4 мм та рухомої фази з 45 % ACN і 55 % TFA 0.065 %

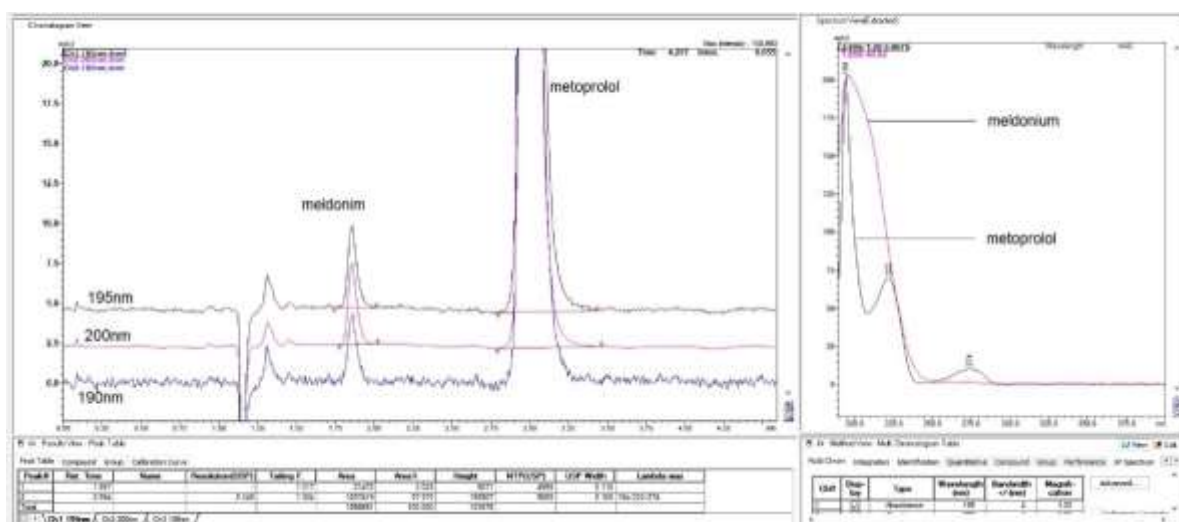


Рисунок 4.16 – Хроматограма, отримана з використанням колонки LiChrospher CN 125 мм × 4 мм, що показує базову шумову залежність від довжини хвилі з рухомою фазою (розведеною TFA)

На рис. 4.18 показано, що навіть за наявності 40 % ACN у рухомій фазі, хроматограма мала зовсім іншу форму та сильніші взаємодії, що призводило до значно вищого утримування. Крім того, форми піків були спотворені та перекошені для хвостового піку мельдонію та набагато менше для метопрололу. На рис. 4.18 показано хроматограму з аналітами в повному розмірі обох, а також

накладене збільшене зображення піку мельдонію для кращої видимості, як функцію послідовного накладеного збільшення зареєстрованих довжин хвиль 190–215 нм. Обидва піки були хвостами, спостерігалася сильна асиметрія для мельдонію. У правій частині рис. 4.18 представлено УФ-спектри аналітів.

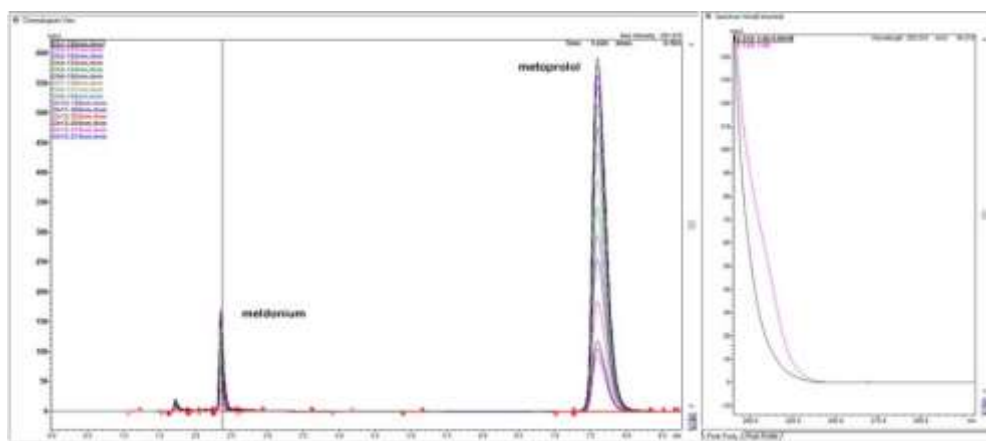


Рисунок 4.17 – Хроматограми, отримані з використанням 15 довжин хвиль, колонки LiChrospher 100 CN 250 мм × 4 мм та рухомої фази – 20 % ACN та 13 мМ NH₄H₂PO₄

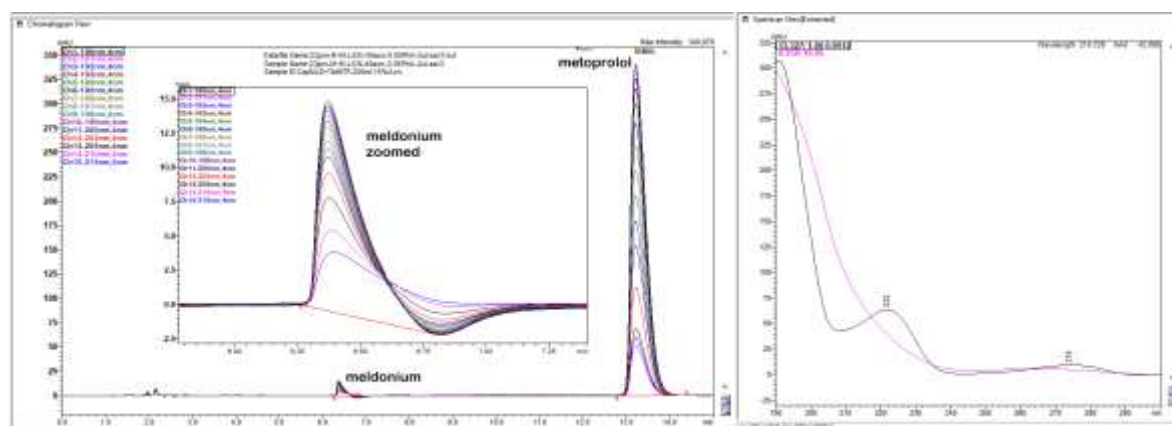


Рисунок 4.18 – Хроматограми, отримані з використанням колонки LiChrospher CN 250 мм × 4 мм та рухомої фази, що складалася з 40 % ACN і 60 % 0.05 % NH₄H₂PO₄ з УФ- спектрами мельдонію та метопрололу

Хроматограми на рис. 4.19 підтверджують селективність колонки LiChrospher CN 250 мм × 4 мм, коли в рухомій фазі використовувався 25 % ACN та 75 % 0.065 % TFA, одночасно порівнюючи за двох довжин хвиль 200 нм та

210 нм (верхні хроматограми – стандартний розчин мельдонію, середні хроматограми – суміш стандартів мельдонію та метопрололу у концентраціях 2.5 мг/мл та 0.5 мг/мл, нижні хроматограми – розчинники). На хроматограмах видно два симетричні піки мельдонію та метопрололу. Використання TFA дає змогу отримати відмінні хроматограми, навіть при вищих концентраціях.

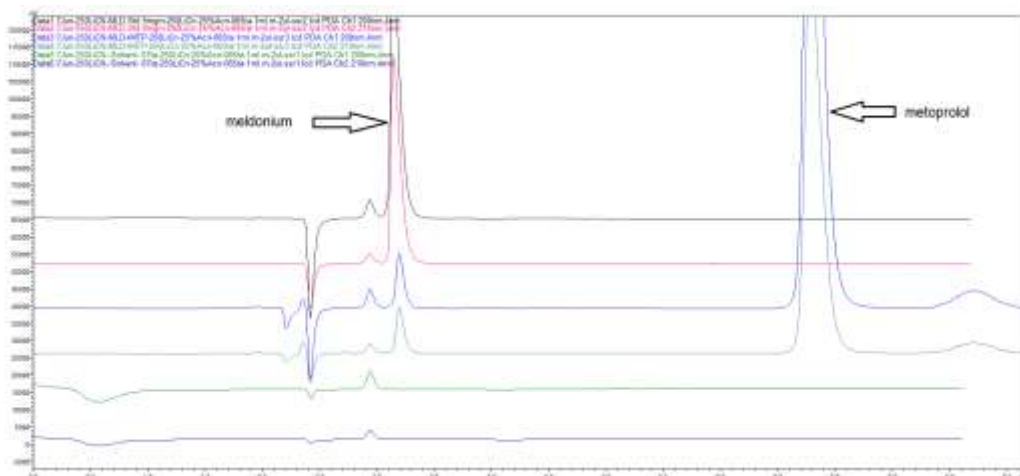


Рисунок 4.19 – Хроматограми, що підтверджують селективність колонки LiChrospher CN 250 мм × 4 мм, отримані з використанням рухомої фази 25 % ACN та 75 % 0.065 % TFA за двох довжин хвиль 200 нм і 210 нм

На рисунку 4.20 представлено хроматограму, отриману з використанням колонки LiChrospher 250 мм × 4 мм та рухомої фази – 55 % розведеною TFA і 45% ACN за 2 довжин хвиль 195 нм/210 нм. Параметри роботи та моніторингу наведено в таблиці праворуч. Зміни розташування піків мельдонію та метопрололу при різних варіаціях компонентів рухомої фази (відсоткового вмісту ацетонітрилу 25–70 %) представлено на рисунку 4.21. Використання розведеної TFA у складі рухомих фаз генерує значно менші зміни розміру піку як у функції змін зменшення довжини хвилі для мельдонію. Встановлено, що сильніше кисле середовище генерує менші прирости гіперхромних ефектів на мельдоній, порівняно з наявністю амонію дигідрофосфату з рН приблизно 4.5, який збільшується на 0.2 % при наявності всіх 10 % ACN.

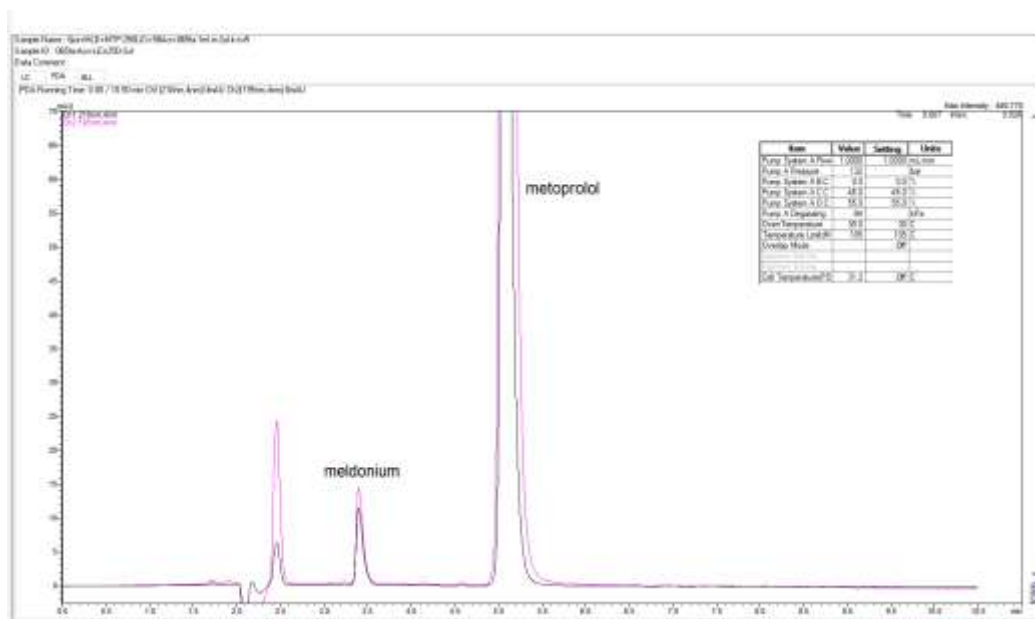


Рисунок 4.20 – Хроматограма, отримана з використанням колонки LiChrospher 250 мм × 4 мм та рухомої фази – 55 % розведеної TFA і 45 % ACN при 2 довжинах хвиль – 195 нм та 210 нм (параметри роботи та моніторингу представлено в таблиці праворуч)

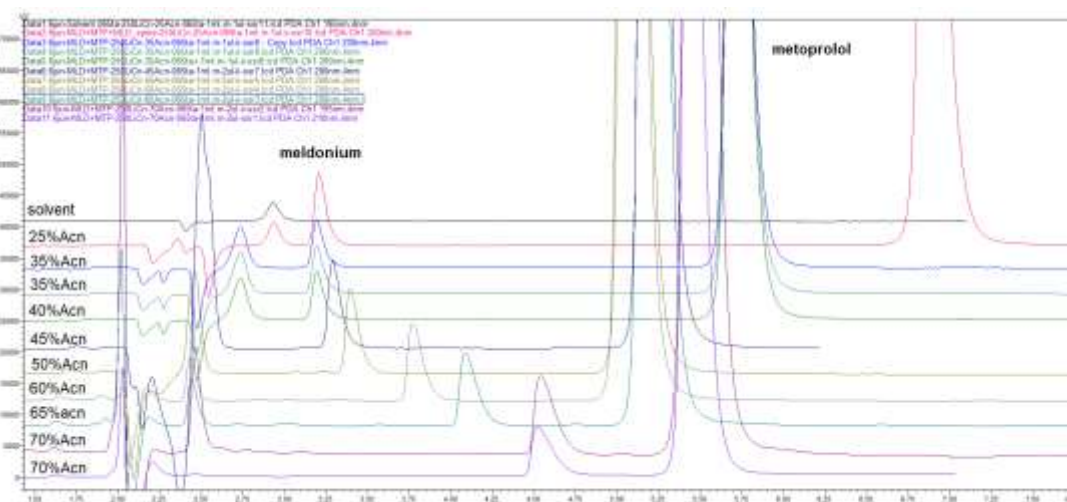


Рисунок 4.21 – Хроматограми, отримані за умов вивчення варіацій компонентів рухомої фази на колонці LiChrospher CN 250 мм × 4 мм (варіація відсоткового вмісту ацетонітрилу 25–70 %)

Підсумовуючи все вище описане, можна зробити висновок, що перша концепція базувалася на використанні колонок LiChrospher 125 CN (5 мкм) та

LiChroSpher 250 CN (5 мкм). Відомим фактом є те, що колонка з ціанопропіловим зв'язком може функціонувати як матриця з оберненою фазою, підкоряючись механізму оберненої фази, але вона може працювати як колонка з нормальною фазою та підкорятися механізму нормальної фази, коли рухома фаза перевищує 50 % і вище. Залежно від структури та розчинності аналітів хроматограми можуть змінюватися. Опис результатів, отриманих з усіма протестованими колонками, буде відповідати нашому підходу, починаючи з рухомих фаз, що складаються з ацетонітрилу та солі амонію дигідрогенфосфату, після експериментів, проведених з рухомими фазами з розведеними кислотами, TFA або H_3PO_4 , і без солей, буфера. Чітко видно елюювання раннього, першого аналіту мельдонію та пізнього елюйованого піку метопрололу, враховуючи той факт, що хроматограми на рисунках 4.9–4.17 були виконані на колонці LiChrospher 100 CN 125 мм × 4 мм (5 мкм), а на рис. 4.17 представлено хроматограма за ідентичних умов із використаною колонкою LiChrospher 100 CN розміром 250 мм × 4 мм (5 мкм), лише подвійної довжини, для перевірки кореляції «концентрація аналіту – форма піку». Якщо 13 мМ амоній фосфату замінено розведеною TFA 0.065 %, отримано інший результат. Розділення мельдонію та метопрололу можна краще регулювати, щоб знизити до мінімально допустимого, розміри піків мельдонію були значно меншими та мало залежали від довжини хвилі в нижчому діапазоні 195–210 нм. Чутливість методики нижча з TFA у складі рухомої фази через його високе граничне УФ-поглинання, що збільшує шум базової лінії. Можливість застосування короткої колонки LiChrospher CN підтверджено подвоєною довжиною LiChrospher CN 250 мм × 4 мм, з метою забезпечення «області близькості до піку мельдонію» для наявності забруднення, що приховує пік, та контролюється за допомогою ДМД детектора. Чітко спостерігається збільшення висоти піків обох аналітів із зменшенням довжини хвилі, з більшим впливом на пік мельдонію, що є логічним порівняно зі УФ спектрами (рис. 4.17). Довшу колонку LiChrospher CN довжиною 250 мм у подальших експериментах елюювали розведеною 0.1 % H_3PO_4 замість буфера $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Хроматограма на рис. 4.18 підтверджує можливість колонки CN

затримувати та довше утримувати аналіти, якщо необхідно, за кислого значення рН. Спільною особливістю використання фосфатних солей і розведеної H_3PO_4 була можливість вимірювання та реєстрації за нижчої довжини УФ-хвилі до 190 нм, без проблем рівності базової лінії. Це було результатом високої УФ-прозорості H_3PO_4 та АСН. Основними відмінностями між застосуванням $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ та H_3PO_4 були сильні пікові спотворення мельдонію та його УФ-спектр без увігнутої форми, більш висока УФ-прозорість та набагато більше утримування обох аналітів із розведеною H_3PO_4 . Цей елюент забезпечує великий час утримування для обох АФІ на цій колонці, але з високою ймовірністю спотворення піку мельдонію. Наявність $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ зі значенням рН приблизно рН=4.5 дає симетричний пік з коротшими утримуваннями для мельдонію та відмінну рівність базової лінії, УФ-прозорість. Інша суттєва відмінність полягає в значно вищих пікових відмінностях мельдонію залежно від довжини хвилі при роботі з амонію дигідрогенфосфатом при помірно кислому значенні рН порівняно з випадками з кислим високим значенням рН при використанні H_3PO_4 у складі рухомої фази. Якщо використовувався розведений розчин 0.065–0.07 % ТФА, то отримано інші факти. Органічна кислота, ТФА, функціонує як підкислювач та найкоротша молекула іонної пари, але з вищими граничними значеннями приблизно 205–210 нм, що обмежує довжину хвилі моніторингу детектора. Моніторинг зі зниженням нижче 197 нм швидко збільшує короточасні та довгострокові шуми базової лінії. Як видно з рис. 4.20, на якому представлено хроматограму LiChrospher 250 мм × 4 мм, з 55 % розчином ТФА та 45 % АСН за 2 довжин хвиль, 195 нм/210 нм, окрім відмінної симетрії піків, за цих умов збільшується відсоток елюювання, що дуже важливо для часу утримування та чутливості методики. Використання розведеної ТФА у рухомих фазах (рис. 4.21) генерує менші зміни розмірів піків як у функції змін зменшення довжини хвилі для мельдонію. Загальний висновок полягає в тому, що більш сильніше кисле середовище генерує менші прирости гіперхромних ефектів на мельдоній, порівняно з наявністю амонію дигідрогенфосфату з рН приблизно 4.5, збільшеним на 0.2 % при наявності 10 % АСН.

4.2.2 Застосування другого підходу на колонці Waters Spherisob CN RP 250 мм × 4.6 мм, 5 мкм

Нами проведено експериментальні дослідження з використання колонки Waters Spherisob CN RP 250 мм × 4.6 мм (5 мкм), в результаті яких отримано різні хроматограми, що було очікувано через різні характеристики колонок від різних постачальників, як описано вище. Перші хроматограми, які ми отримали за допомогою цієї колонки з використанням 50 % ACN та $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ у співвідношенні 50:50 за 5 довжин хвиль з УФ- спектрами мельдонію та метопрололу справа, продемонстровано на рисунку 4.22.

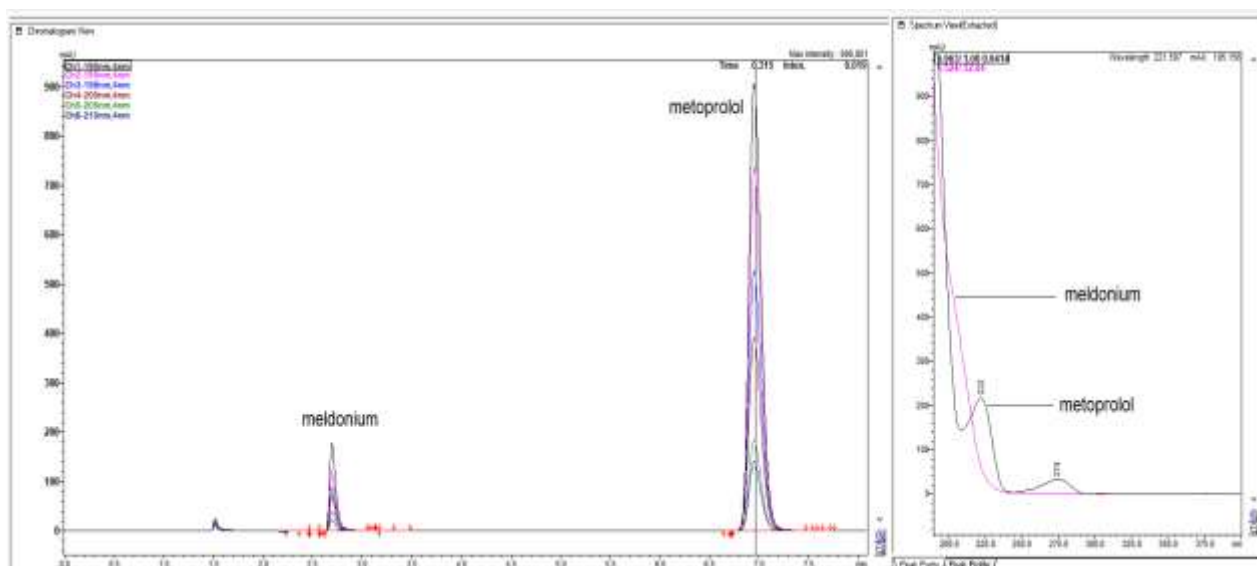


Рисунок 4.22 – Хроматограми, отримані з використанням колонки Waters Spherisob CNRP 250 × 4.6 мм (5 мкм) та рухомої фази – 50 % ACN та 0.15 % $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ у співвідношенні 50:50 за 5 довжин хвиль

На рисунку 4.23 представлено хроматограми, отримані в тих самих умовах, але з розширеним виглядом піків мельдонію з параметрами придатності хроматографічної системи, наведеними нижче в таблиці, за 5 довжин хвиль.

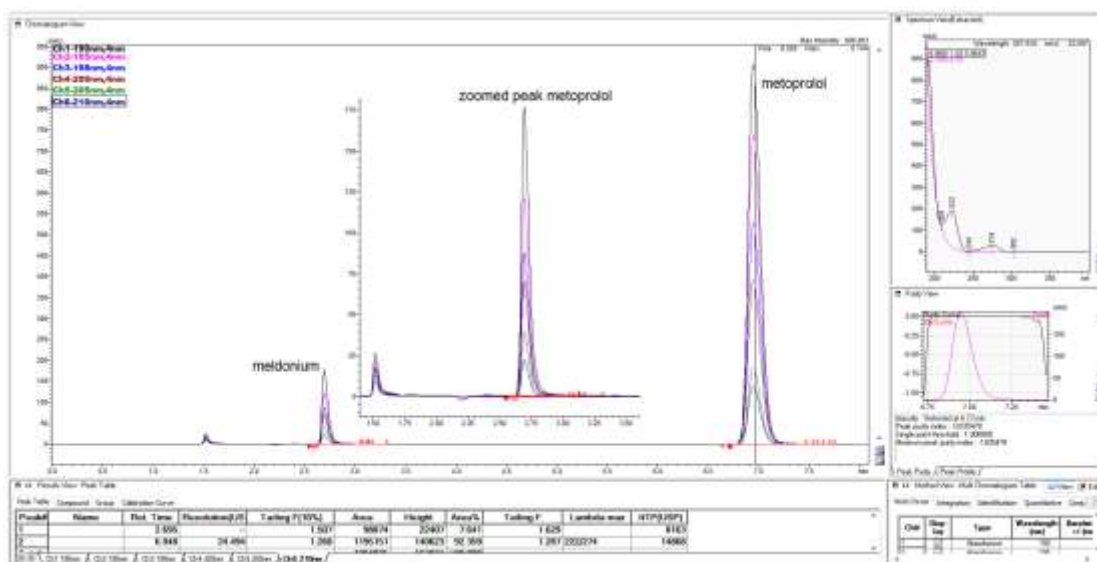


Рисунок 4.23 – Хроматограми, що демонструють розширене зображення піків мельдонію з параметрами придатності хроматографічної системи, наведеними нижче в таблиці, за 5 довжин хвиль

Встановлено, що видимість підвищення піку мельдонію на хроматограмі залежить від довжини хвилі, як показано на рисунку 4.24. Це в основному зосереджено на розмірі піку мельдонію, причому видимі пікові збільшення висоти піку метопрололу. Повний вигляд хроматограм, отриманих з використанням рухомої фази – 50 % ACN та 50 % $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, представлено на рисунку 4.25, з прямим порівнянням змін розміру піків як функції поглинання. Подальше збільшення відсотка ACN до 70 % у рухомій фазі з амонію дигідрофосфату дало змогу отримати хроматограми, зображені на рисунку 4.26, з видимим збільшенням часу утримування обох аналітів, з піками значної висоти, що збільшуються зі зменшенням довжини хвилі.

На рисунку 4.27 представлено хроматограми, отримані з використанням 50 % ACN та 50 % розведеної TFA, з повнорозмірною хроматограмою піку мельдонію за 4 довжин хвиль. Ефекти близькості піків мельдонію та метопрололу були помітними з значеннями симетрії піків, видимою стійкістю розміру піку мельдонію до зміни висоти, розміру порівняно з метопрололом. Права частина рисунка показує УФ-спектри мельдонію та метопрололу. Параметри придатності хроматографічної системи наведено в таблиці нижче на рисунку.

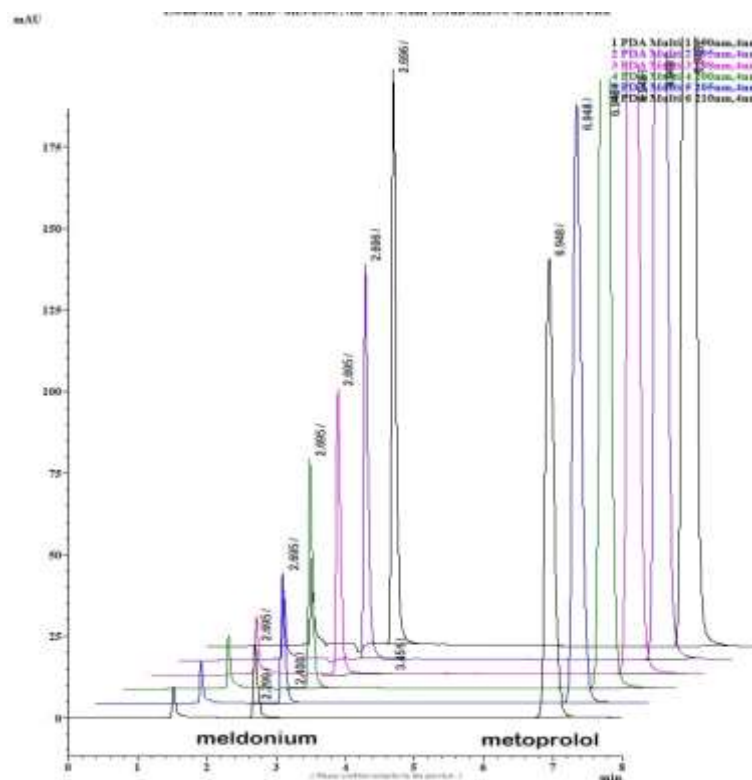


Рисунок 4.24 – Хроматограми модельної суміші 2.5 мг/мл мельдонію та 0.5 мг/мл метопрололу, отримані з використанням колонки Water Spherisorb CN RP-250 мм × 4.6 мм та рухомої фази – 0.15 % $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ та 50 % ACN

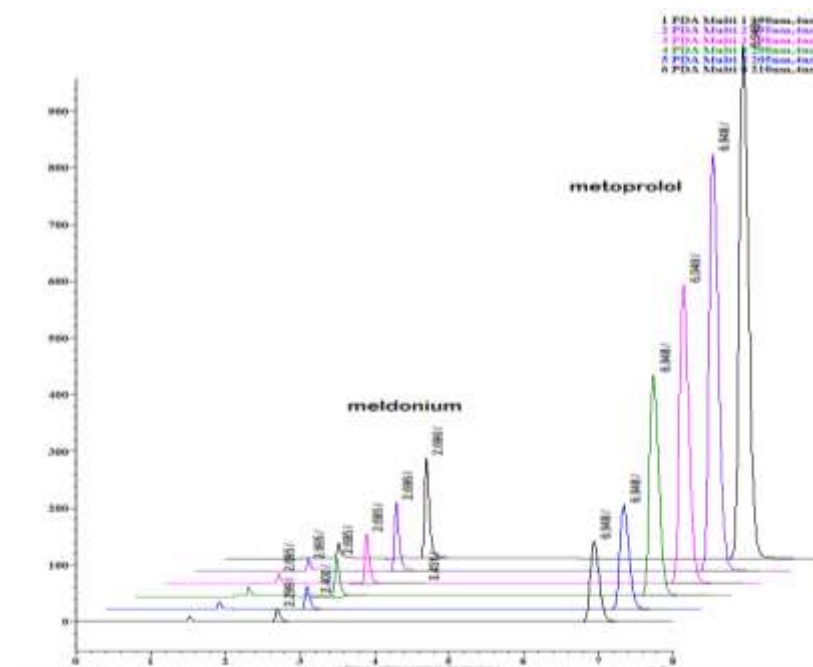


Рисунок 4.25 – Повний вигляд хроматограм, отриманих з використанням колонки Water Spherisorb CN RP-250 мм × 4.6 мм та рухомої фази – 0.15 % $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ та 50 % ACN

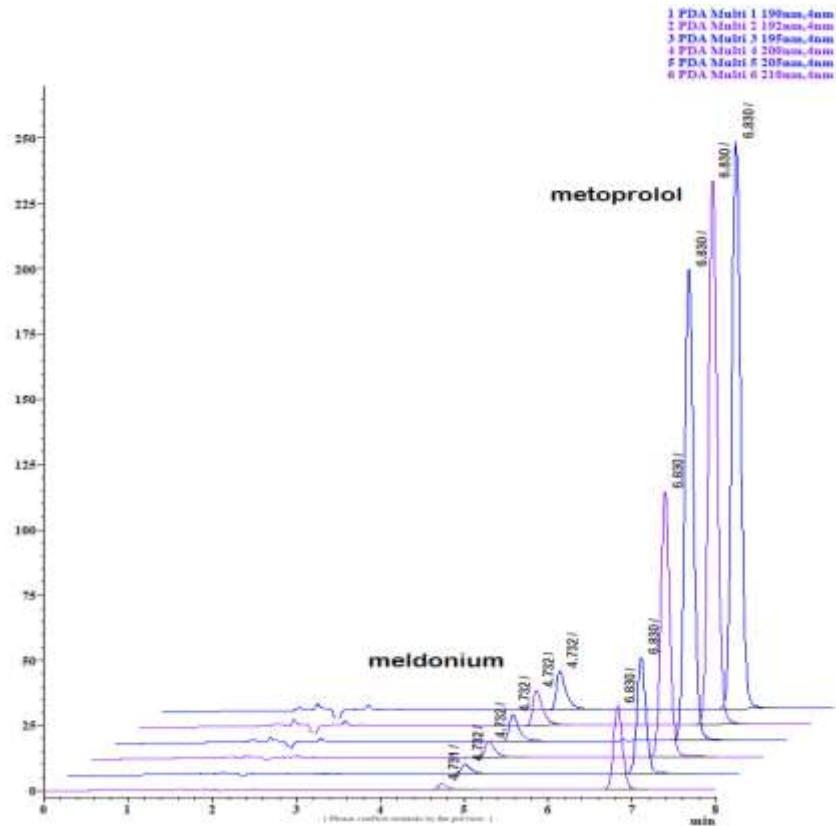


Рисунок 4.26 – Хроматограми модельної суміші 2.5 мг/мл мельдонію та 0.5 мг/мл метопрололу, отримані з використанням колонки Water Spherisorb CN RP-250 мм × 4.6 мм та рухомої фази – 0.15 % $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ та 70 % ACN

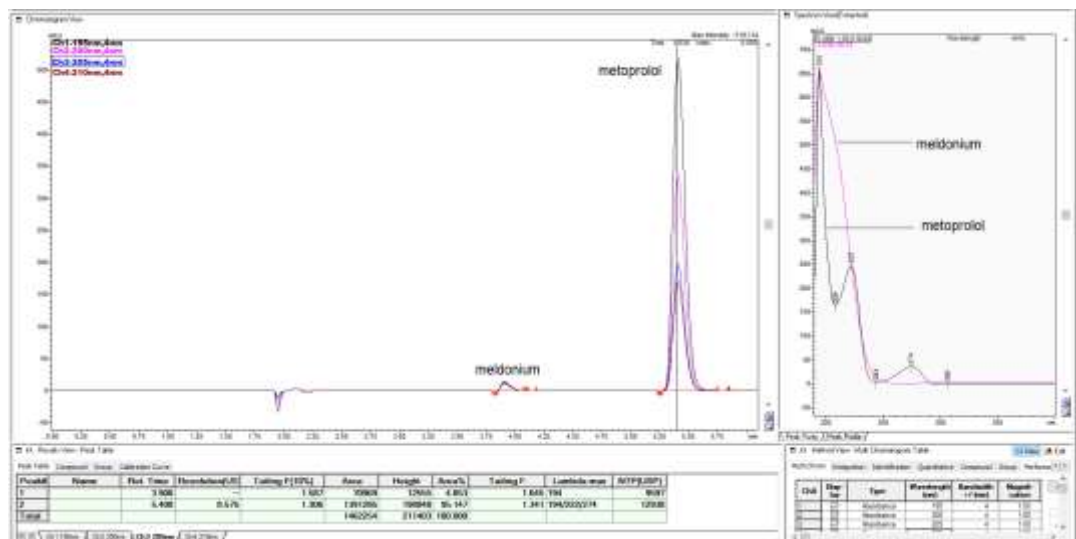


Рисунок 4.27 – Хроматограми, отримані з використанням колонки Water Spherisorb CN RP-250 мм × 4.6 мм та рухомої фази – 50 % ACN та 50 % TFA за 4 довжин хвиль

Рисунок 4.28 демонструє ті самі хроматограми з розширеним та збільшеним виглядом і шкалою змін розміру піку мельдонію для кращого порівняння. Верхня частина рисунку 4.28 ілюструє рівність базової лінії залежно від моніторингу та вимірювання довжини хвилі.

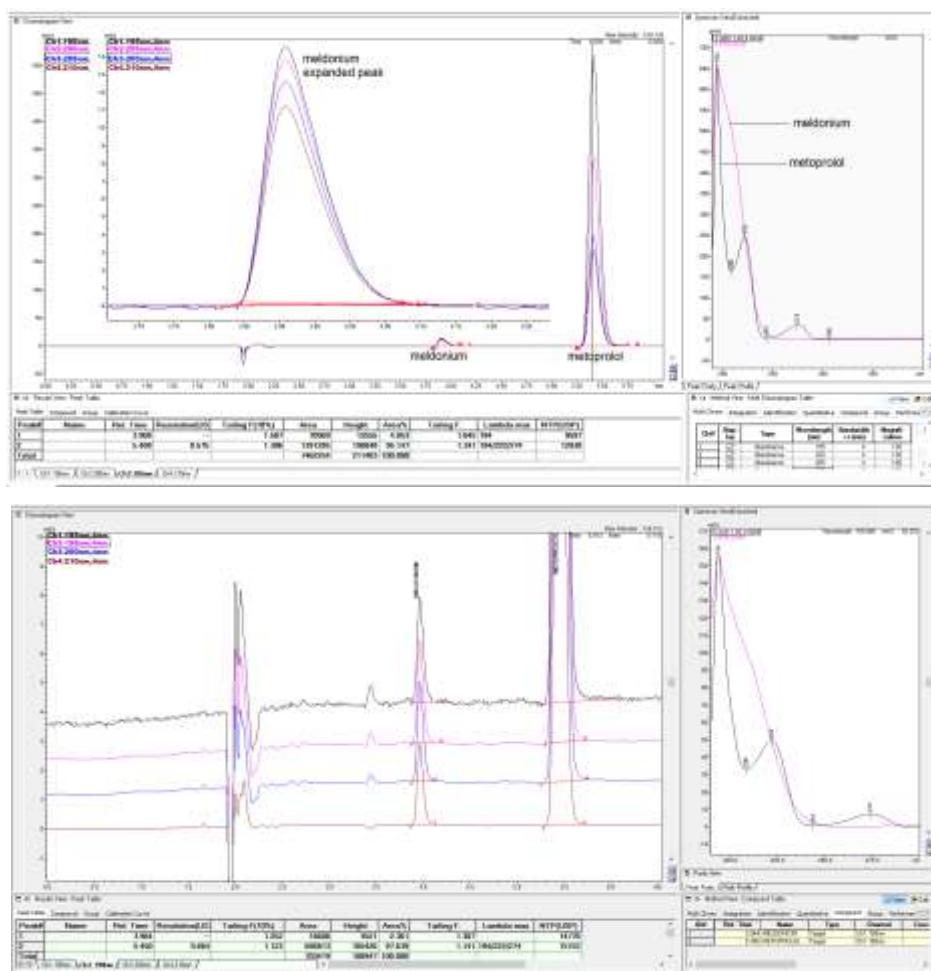


Рисунок 4.28 – Хроматограми, отримані з використанням 50 % ACN та 50 % розведеної TFA, з повнорозмірною хроматограмою внизу та вставленим розгорнутим зображенням піку мельдонію в збільшеній шкалі вище, за 4 довжин хвиль

На рисунку 4.29 наведено хроматограми з накладенням за різних довжин хвиль у повному масштабі, з покращеною видимістю невеликого збільшення висоти піку мельдонію порівняно зі значним збільшенням піку метопрололу. Нами одночасно проведено моніторинг за довжини хвилі 195 нм та 200 нм, перевіряючи можливість трансферу методики та правильність. Під час

тестування зразків і стандартів зі цільовими концентраціями 2.5 мг/мл мельдонію та 0.5 мг/мл метопрололу були отримані наступні хроматограми.

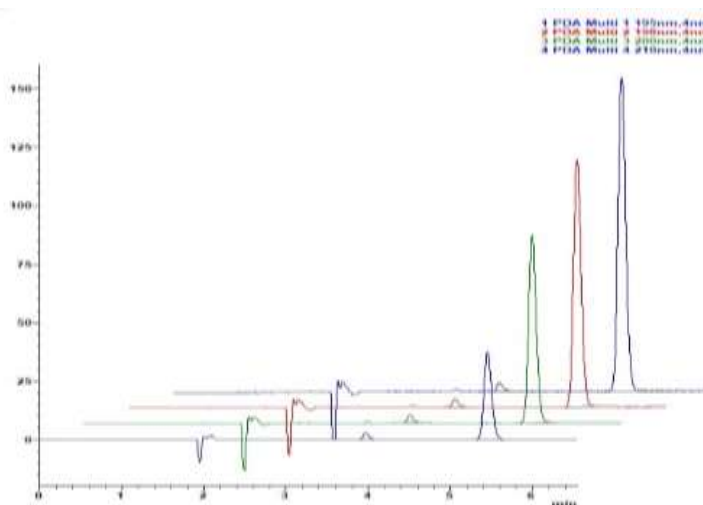


Рисунок 4.29 – Хроматограми з накладенням в 3-вимірній перспективі 4-х каналів за різних довжин хвиль

На рис. 4.30 представлено хроматограму, отриману з використанням 50 % ACN і 50 % розведеної TFA за довжин хвиль 195 нм та 200 нм. На рис. 4.30 показано результати перевірки лінійності зі зміною об'ємів інжекції 1–6 мкм. Як видно з рис. 4.30, продемонстровано ідеальну лінійність, але піки, отримані інжекцією 6 мкм, демонстрували спотворення піку мельдонію, швидше за все, в результаті перевантаження масою.

На рисунку 4.31 представлено повну хроматограму ліворуч та розгорнутий вигляд хроматограм із такою ж лінійністю, накладених праворуч при моніторингу за довжини хвилі 195 нм, з параметрами придатності хроматографічної системи внизу в таблиці. Легко помітити спотворений пік мельдонію при введенні 6 мкм.

Рисунок 4.32 демонструє ту саму лінійність зразка за довжини хвилі 200 нм, у повному масштабі зліва та в розширеному масштабі з правого боку хроматограм, накладених на лінійність.

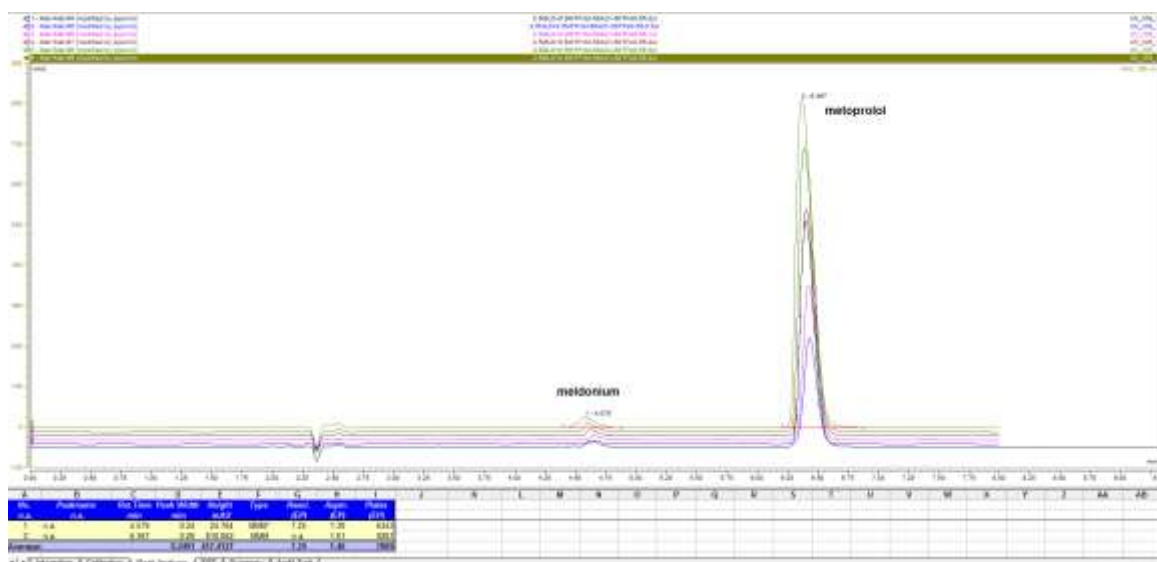


Рисунок 4.30 – Хроматограми, отримані з використанням колонки Waters Spherisorb CN RP-250 мм × 4.6 мм та рухомої фази – 50 % ACN та 50 % розведеної TFA за довжини хвилі 195 нм, з параметрами придатності хроматографічної системи в таблиці нижче, за умов вивчення лінійності

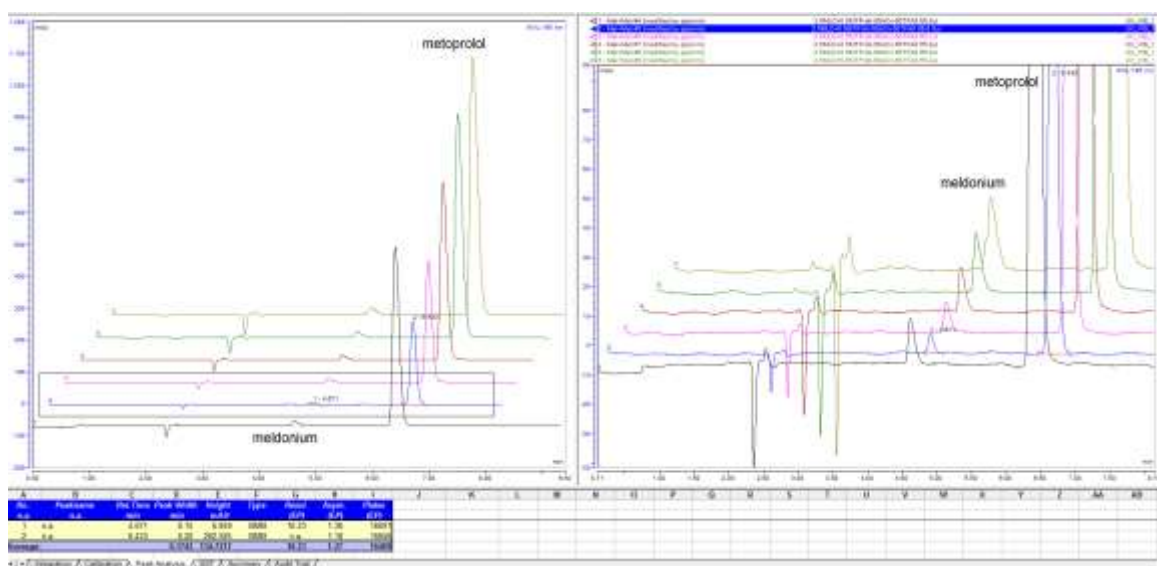


Рисунок 4.31 – Накладені хроматограми та розширена збільшена вісь Y накладених хроматограм за умов вивчення лінійності, отримані з використанням колонки Waters Spherisorb CN RP-250 мм × 4.6 мм та рухомої фази – 50 % ACN та 50 % розведеної TFA за довжини хвилі 195 нм, з параметрами придатності хроматографічної системи в таблиці нижче

Підсумовуючи вище описані факти, можна зробити висновок, що другий підхід базувався на використанні хроматографічної колонки Waters Spherisob CN RP 250 мм × 4.6 мм, 5 мкм. Під час детального аналізу рис. 4.22, 4.23 можна побачити, що першою видимою різницею був більший хвіст піку мельдонію порівняно з колонками LiChrospher CN. Гіперхромний ефект обох аналітів був пропорційним, за наявності $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ також був помітний, особливо на збільшеній шкалі, вставленій у вигляді піку мельдонію над стандартною повною хроматограмою, але з майже вдвічі більшим вмістом ACN. Якщо замінити $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ у рухомій фазі на розведену TFA, помічено подібні спостереження, як і з колонками LiChrospher CN. Піки мельдонію та метопрололу були близькими за значного збільшення утримування мельдонію, що супроводжувалося піковим приростом хвоста, але в меншій мірі порівняно з LiChrospher. По-друге, збільшення піку мельдонію було невеликим порівняно з піком метопрололу в залежності від зменшення довжини хвилі, такий самий висновок отримано, як і для попередньо протестованих колонок LiChrospher.

4.2.3 Застосування третього підходу на колонці Zorbax CN-SB 250 мм × 4.6 мм, 5 мкм

Перспективною рухомою фазою була рухома фаза, що складалася з 20–25 % ACN та 13 мМ (0.15 %) $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. На рис. 4.34 продемонстровано хроматограми, отримані з використанням колонки Zorbax CN-SB 250 мм × 4.6 мм (5 мкм) за 15 довжин хвиль ліворуч, та УФ- спектри – праворуч. Нижче хроматограм наведено таблиці з інтеграцією та параметрами придатності хроматографічної системи для введеного зразка з концентрацією мельдонію 2.5 мг/мл та 0.5 мг/мл метопрололу. Рис. 4.34 вказує на те, що запропонована колонка продемонструвала ідеальну симетрію піку мельдонію ($F=1.13$) та асиметричне хвостове пікове значення метопрололу ($F=2.1$), вперше порівняно з іншими попередньо перевіченими колонками. Для кращого порівняння варіації висоти піку мельдонію в залежності від довжини хвилі ту саму хроматограму з

рисунка 4.34 показано зі збільшеним піком та масштабуванням піку мельдонію та продемонстровано на рисунку 4.35.

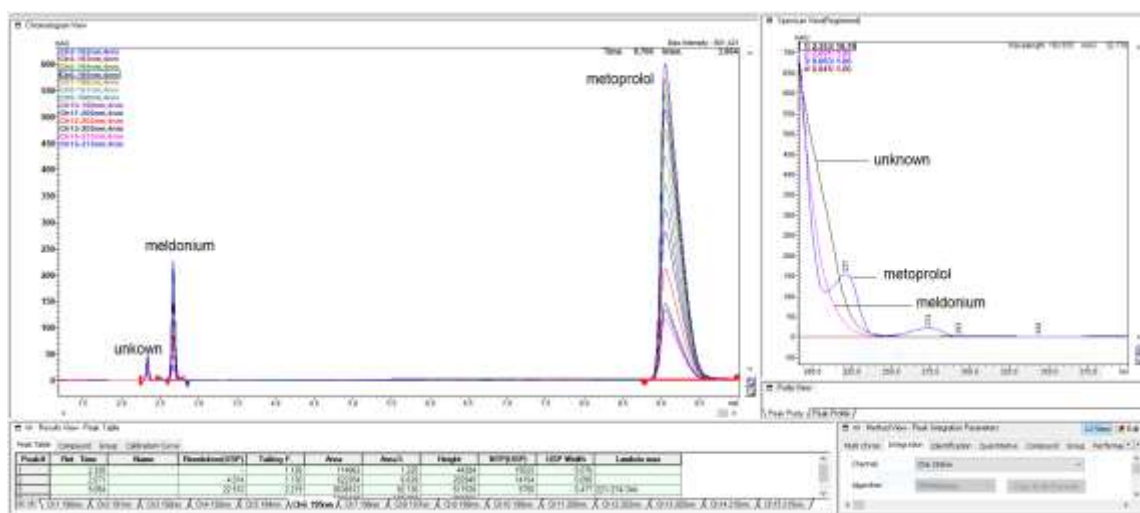


Рисунок 4.34 – Хроматограми, отримані за умов тестування колонки Zorbax CN-SB 250 мм × 4.6 мм, 5 мкм та рухомої фази, що складалася з 20 % ACN та 80 % 13 мМ (0.15 %) розчину NH₄H₂PO₄ за 15 довжин хвиль

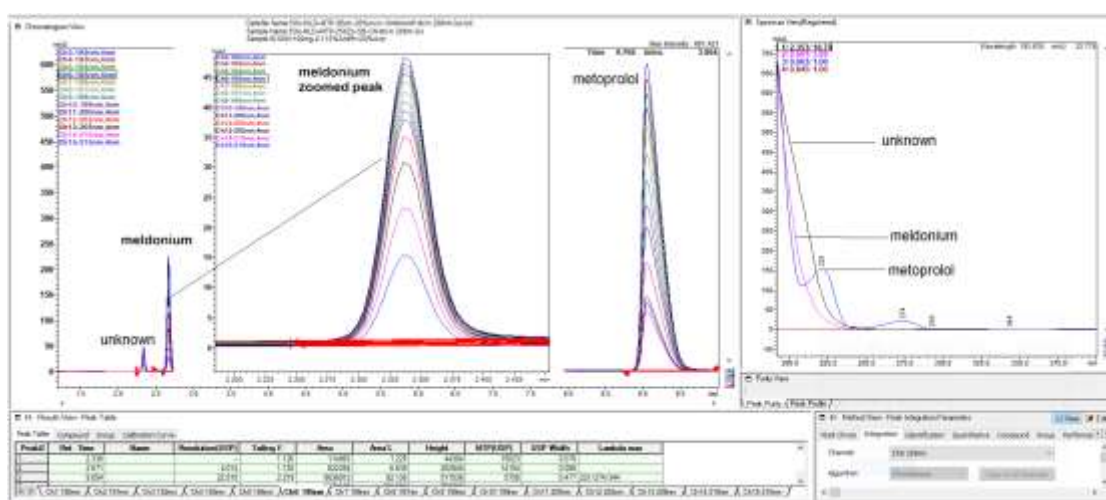


Рисунок 4.35 – Хроматограми, отримані за умов тестування колонки Zorbax CN-SB 250 мм × 4.6 мм, 5 мкм та рухомої фази, що складалася з 20 % ACN та 80 % 13 мМ (0.15 %) розчину NH₄H₂PO₄ за 15 довжин хвиль з збільшеним піком мельдонію для кращої видимості в порівнянні з метопрололом

На рисунку 4.36 представлено хроматограми, отримані з використанням Zorbax CN-SB 250 мм × 4.6 мм та рухомої фази – 50 % ACN та 50 % 13 мМ

(0.15 %) $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ за 15 довжин хвиль. Рисунок 4.37 демонструє ті самі хроматограми, що рисунок 4.36, але з розширеним видом піку мельдонію та підтверджує наше припущення щодо ефективності ВЕРХ методики із використанням рухомої фази – 50 % ACN та 50 % 13 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ за 15 довжин хвиль.

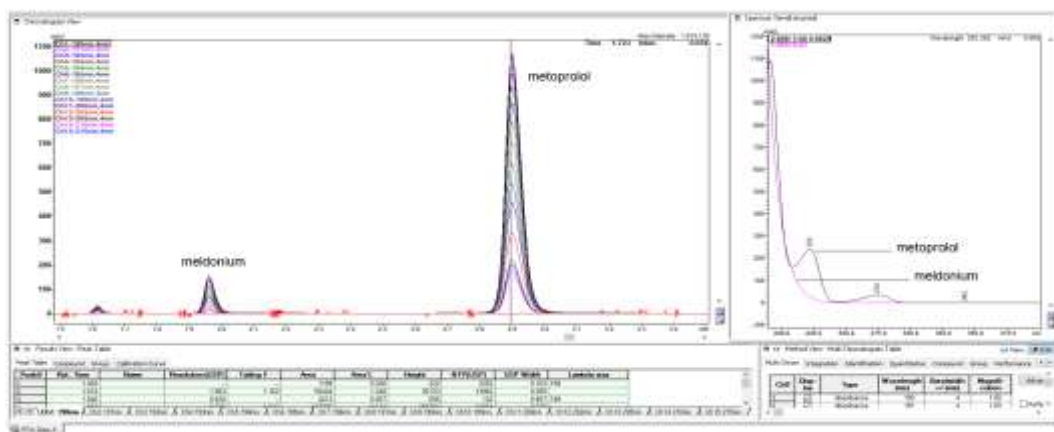


Рисунок 4.36 – Хроматограми, отримані за умов тестування колонки Zorbax CN-SB 250 мм × 4.6 мм, 5 мкм та рухомої фази, що складалася з 50 % ACN та 50 % 13 мМ (0.15 %) розчину $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ за 15 довжин хвиль

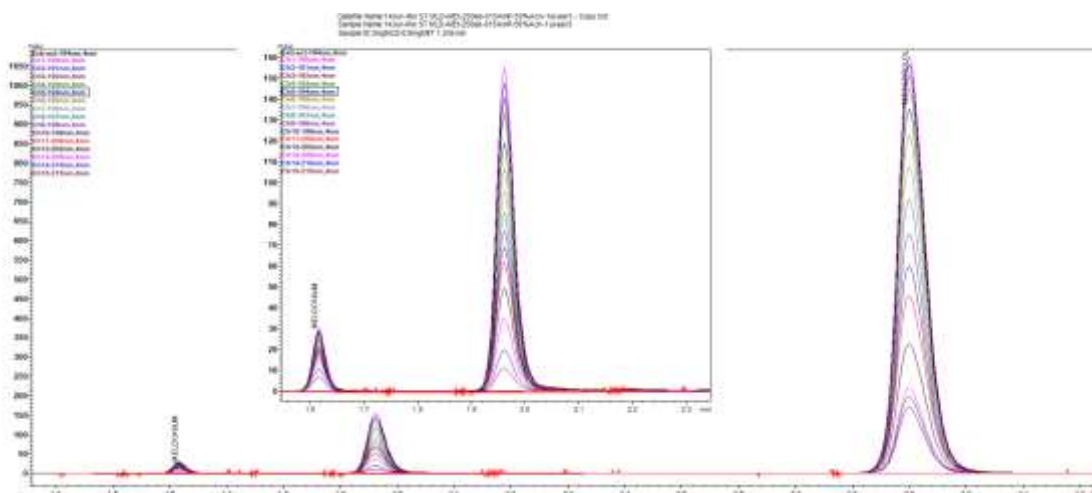


Рисунок 4.37 – Хроматограми, отримані за умов тестування колонки Zorbax CN-SB 250 мм × 4.6 мм, 5 мкм та рухомої фази, що складалася з 50 % ACN та 50 % 13 мМ (0.15 %) розчину $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ за 15 довжин хвиль з збільшеним піком мельдонію для кращої видимості в порівнянні з метопрололом

На рисунку 4.38 показано повний масштаб хроматограми та масштабування піку мельдонію для кращої видимості і порівняння за 4 різних довжин хвиль. Всі хроматограми отримані з використанням колонки Zorbax CN-SB та рухомої фази – 60 % ACN та 40 % 13 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, швидкістю потоку 1.2 мл/хв.

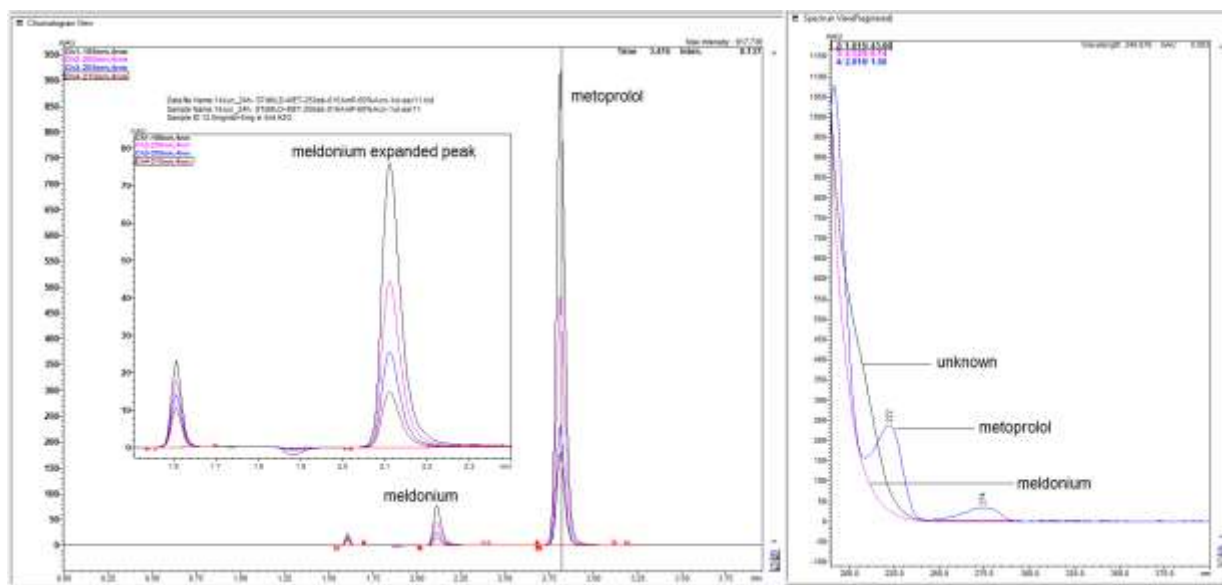


Рисунок 4.38 – Хроматограми, отримані за умов тестування колонки Zorbax CN-SB 250 мм × 4.6 мм, 5 мкм та рухомої фази, що складалася з 60 % ACN та 40 % 13 мМ (0.15 %) розчину $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ за 15 довжин хвиль з збільшеним піком мельдонію для кращої видимості в порівнянні з метопрололом

Рисунок 4.39 ілюструє утримування аналітів як функцію складу рухомої фази та її рН. Накладання рухомої фази змінює експериментальні дослідження для формування результатів хроматограми у випробуваннях з рухомою фазою, що складається з ACN та $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. У перших експериментах з детектором Agilent 1126-II-PDA при відтворенні описаних вище умов експерименту з використання рухомої фази – 50 % ACN та 50 % 13 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, колонки Zorbax CN-SB та швидкості потоку 1.0 мл/хв отримали хроматограму, зображену на рис. 4.40. Комбінований дисплей містив витягнуту хроматограму за довжини

хвилі 197 нм та 3-D хроматограми як діаграму ліворуч і витягнуті УФ-спектри мельдонію та метопрололу праворуч.

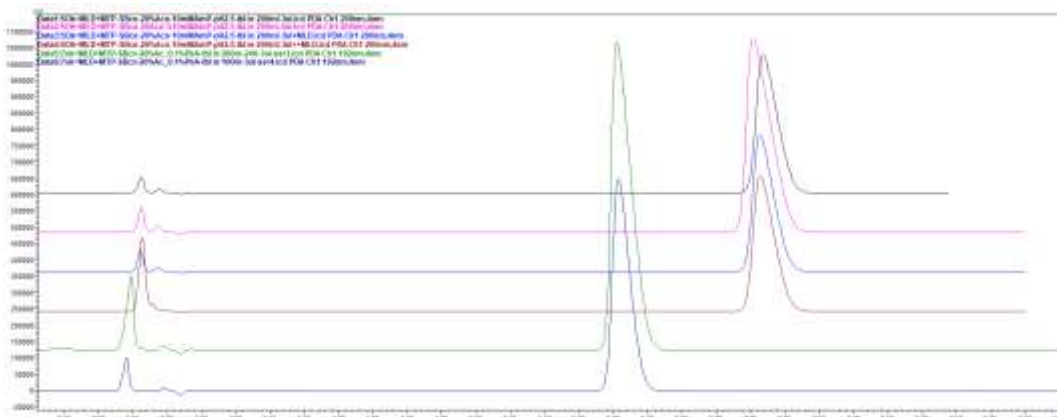


Рисунок 4.39 – Хроматограми, отримані за умов тестування колонки Zorbax CN-SB 250 мм × 4.6 мм, 5 мкм та рухомої фази, що складалася з ACN, 13 мМ розчину $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ та 0.08 % H_3PO_4 з метою ілюстрації утримування аналітів як функцію складу рухомої фази та її рН

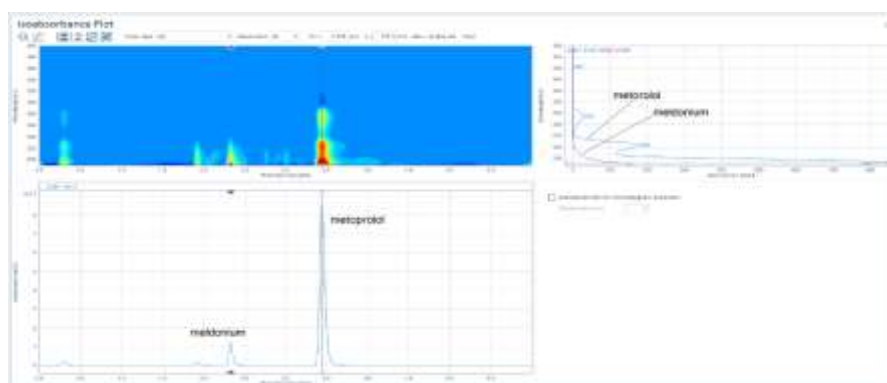


Рисунок 4.40 – 3-D хроматограма, отримана за довжини хвилі 197 нм та рухомої фази – 50 % ACN та 50 % 13 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, колонки Zorbax CN-SB 250 мм × 4.6 мм, 5 мкм, та УФ-спектри аналітів

Ідентичність піку мельдонію для вивчення селективності перевірено та підтверджено шляхом порівняння стандарту мельдонію та модельної суміші мельдонію з метопрололом. Отримані хроматограми представлено на рисунку 4.41. Селективність на накладених хроматограмах на рисунку 4.42 є результатом інжекції стандарту мельдонію 5 мг/мл, стандартного розчину мельдонію зі слідами метопрололу в модельній суміші. Відносно невелику зміну

утримування мельдонію в широкому діапазоні змін ацетонітрилу в складі рухомої фази проілюстровано на рисунку 4.43.

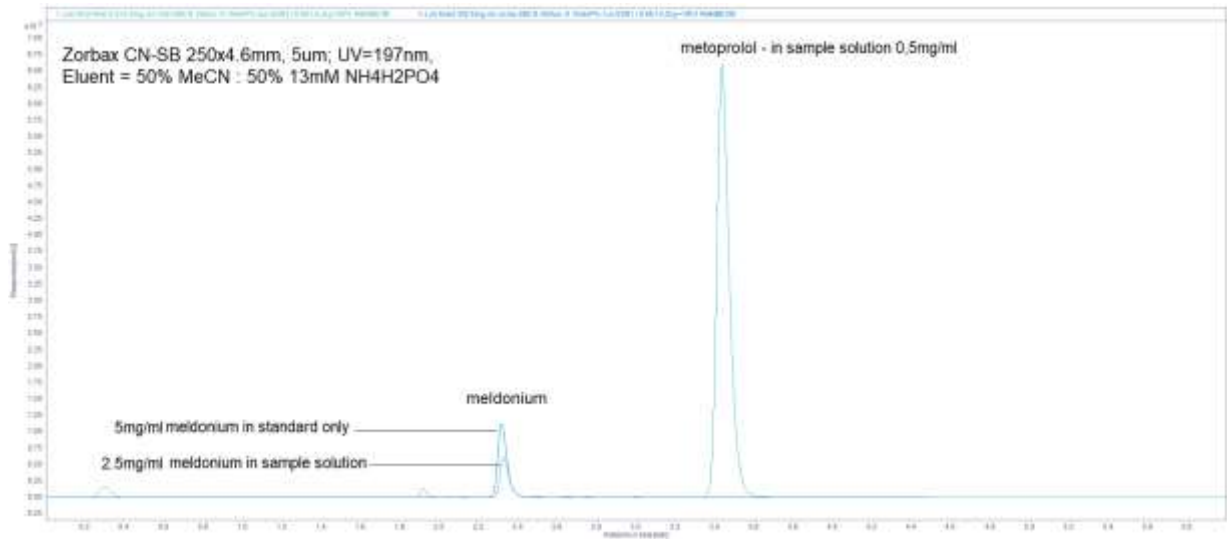


Рисунок 4.41 – Хроматограми, отримані з використанням колонки Zorbax CN-SB 250 мм × 4.6 мм та рухомої фази – 50 % ACN та 50 % $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ за умов підтвердження ідентичності мельдонію та метопрололу

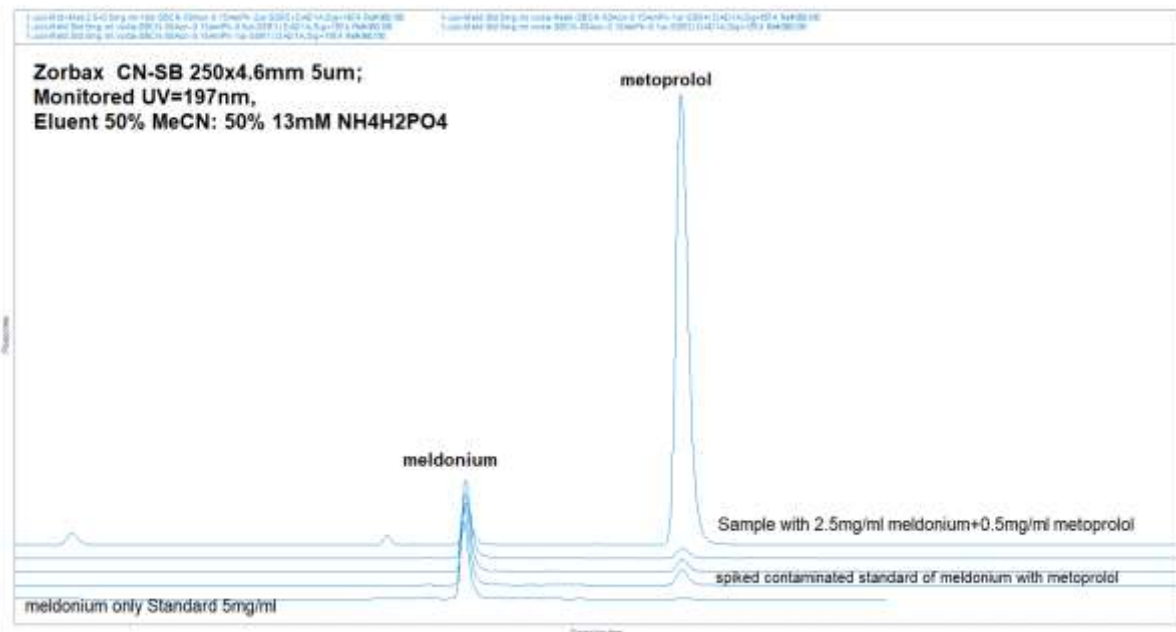


Рисунок 4.42 – Накладені хроматограми стандартного розчину мельдонію, стандартного розчину мельдонію, забрудненого слідами метопрололу, та модельної суміші з 2.5 мг/мл мельдонію та 0.5 мг/мл метопрололу, отримані з використанням рухомої фази – 50 % ACN та 50 % 13 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ та колонки Zorbax CN-SB 250 мм × 4.6 мм

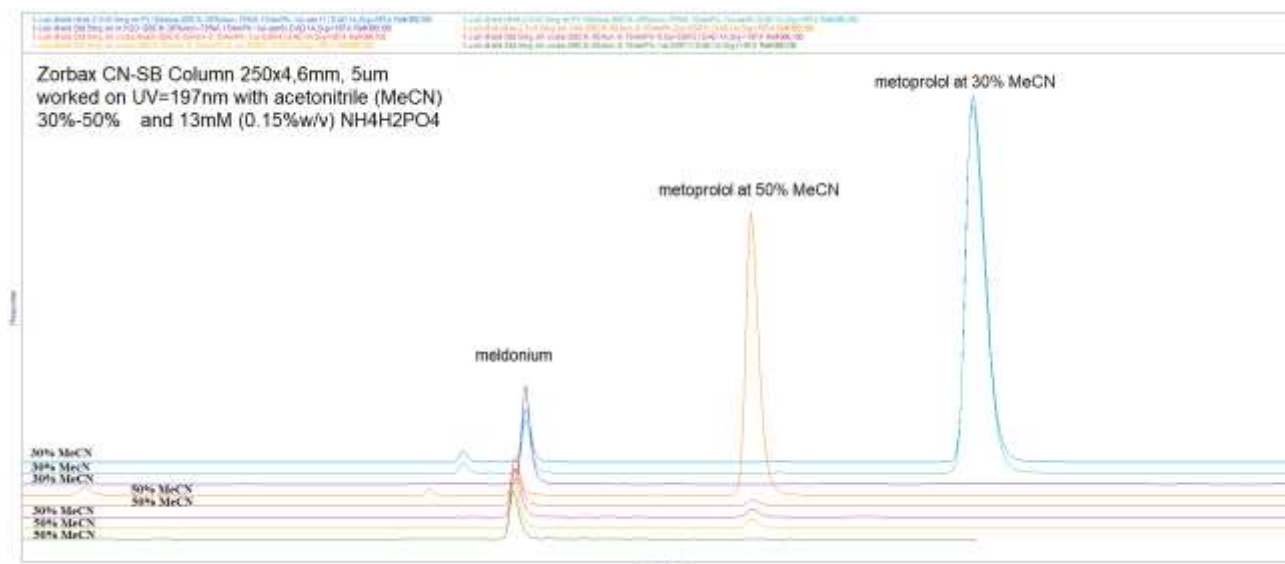


Рисунок 4.43 – Хроматограми, що ілюструють зміну утримування мельдонію в широкому діапазоні змін ацетонітрилу в складі рухомої фази

Відмінності між рисунками 4.44, 4.45 були лише способом представлення спектрів у роздільній та загальній накладеній шкалі з нормалізацією для кращої видимості та порівняння. Другим піком є мельдоній на хроматограмі на рисунку 4.44, а останній найвищий пік – метопролол, третій і четвертий піки – нові. З чотирьох представлених УФ-спектрів другий зверху – пік екстрагованого мельдонію, а четвертий знизу – пік метопрололу. Найбільш ефективно розділення було досягнуто менш ніж за 4 хв (рис. 4.45). З метою збільшення роздільної здатності піків ми зменшили вміст АСН до 30 % з 70 % 13 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ та досягли кращої функції роздільної здатності, збільшення утримування та загального часу хроматографування близько 5 хв, що представлено на рисунку 4.46. Повнорозмірне порівняльне зображення нижче та розгорнутий вигляд накладених хроматограм угорі наведено завдяки 2 інжекціям свіжоприготованих зразків з 2.5 мг/мл мельдонію та 0.5 мг/мл метопрололу, які не містили другий і третій піки, оскільки вони були продуктами деградації внаслідок зберігання зразків впродовж 3 днів за кімнатних умов. Першими піками зі збільшенням розмірів були мельдоній, останнім – метопролол. Вказана методика стала нашим фаворитом надійного визначення

мельдонію та метопрололу в лікарських формах за наявності продуктів деградації.

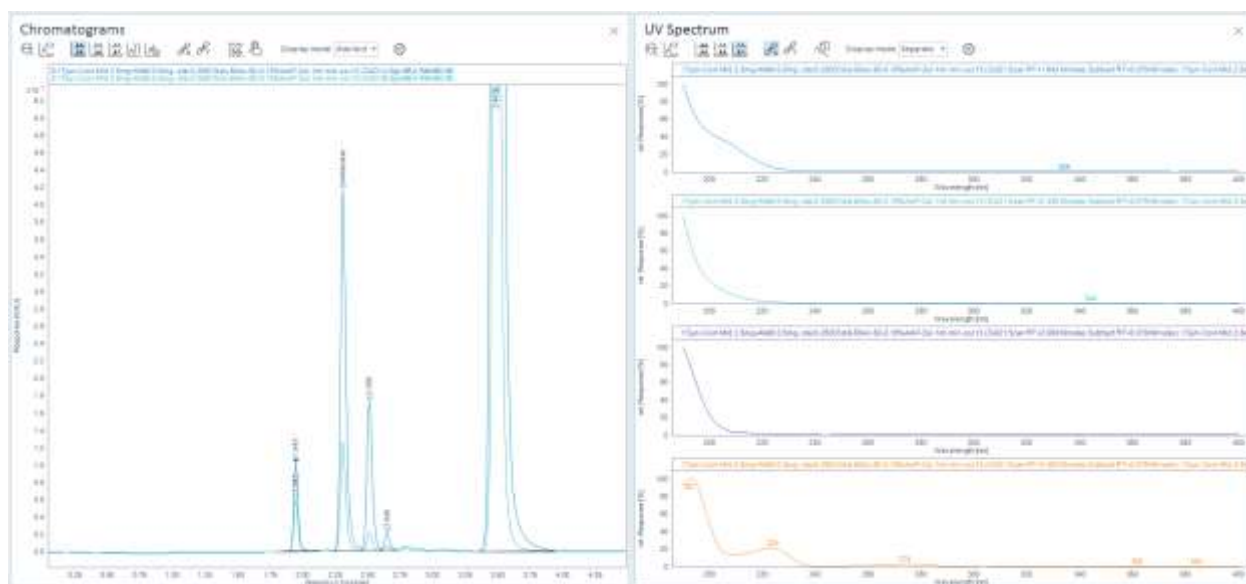


Рисунок 4.44 – Хроматограми, отримані з використанням рухомої фази – 50 % ACN та 50 % 13 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ за двох довжин хвиль 195 нм та 205 нм, (накладені ліворуч, а їхні відповідні УФ-спектри – праворуч)

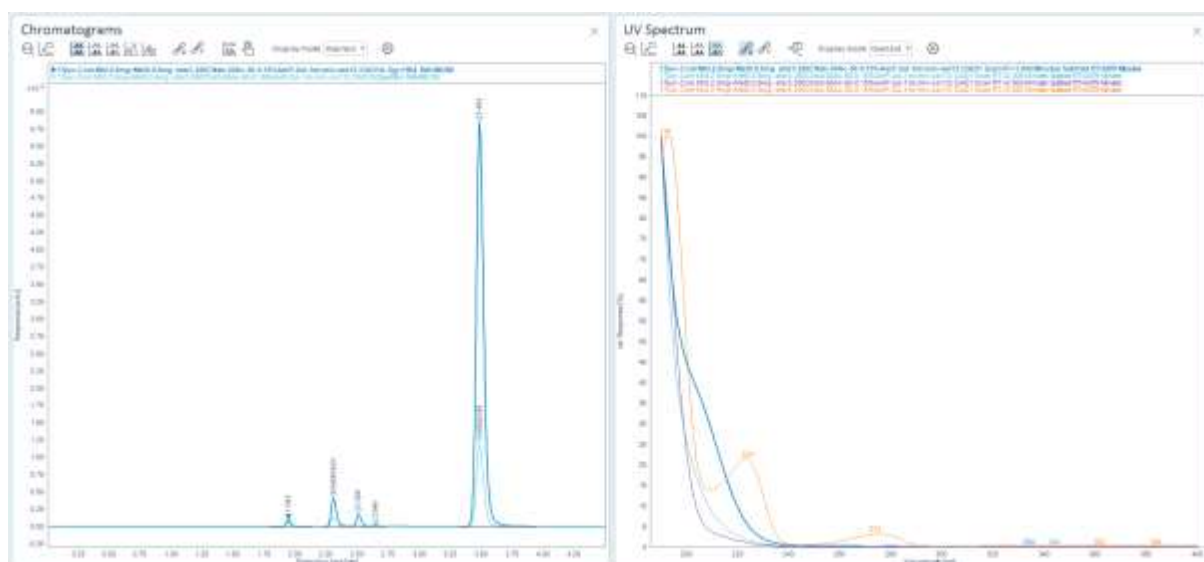


Рисунок 4.45 – Хроматограми, отримані з використанням рухомої фази – 50 % ACN та 50 % 13 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (другий пік – мельдоній, останній найвищий пік – метопролол, третій та четвертий піки – нові)

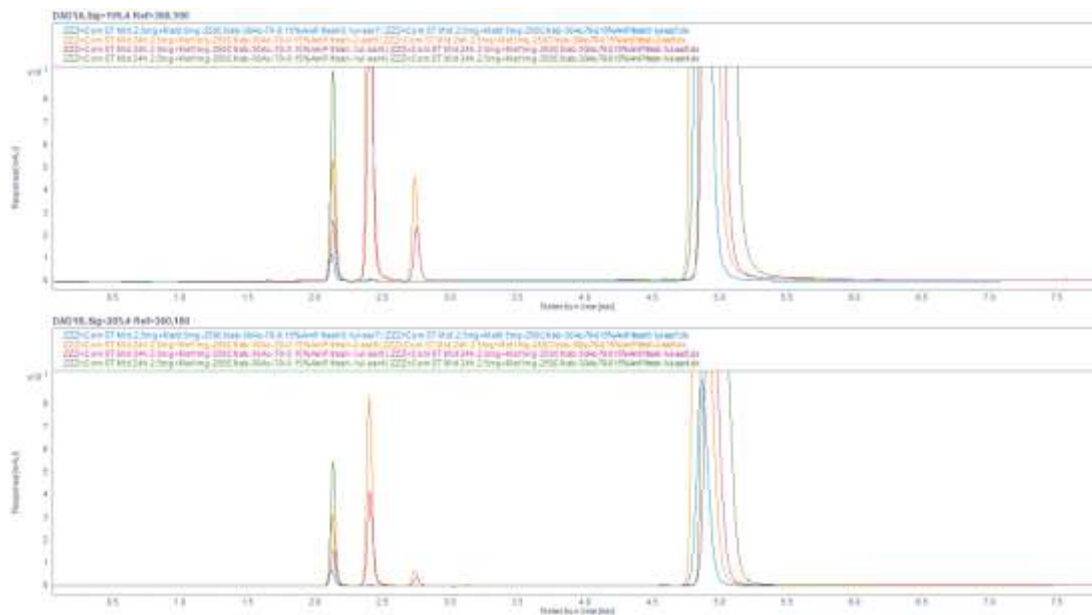


Рисунок 4.46 – Хроматограми, отримані використанням рухомої фази – 30 % ACN та 70 % 13 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ за двох довжин хвиль (перший пік – мельдоній, другий і третій – продукти деградації, останній – метопролол)

На рисунку 4.47 представлено порівняння хроматограм, отриманих з використанням 30 % ACN та нижче – 50 % ACN, з їх повним і збільшеним масштабуванням, з витягнутим УФ-спектром чотирьох розділених і інтегрованих піків, у вигляді накладання з правого боку. Першим піком був мельдоній, а останнім піком був метопролол, тоді як піки в середині були продуктами деградації, наявними лише в інкубованих зразках впродовж 3 днів за кімнатних умов. Вплив різних використовуваних фосфатних солей показано на рисунку 4.48, на якому представлено порівняння у вигляді заміни рухомої фази 70 % 13 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ на 70 % 13 мМ KH_2PO_4 у поєднанні з 30 % ACN. Набір накладених хроматограм містить свіжоприготований зразок 2.5 мг/мл мельдонію з 0.5 мг/мл метопрололу, елюйований $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Зразки, які зберігалися впродовж 3 днів, приготувані з $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ та KH_2PO_4 , мали нижчу висоту піку, і єдиною видимою зміною було поширення піку метопрололу в більшу ширину, що підтверджує перевагу використання амонію дигідрофосфату. Подальші експериментальні дослідження з колонкою Zorbax CN-SB проводили з використанням розведених кислотами без використання фосфатних солей.

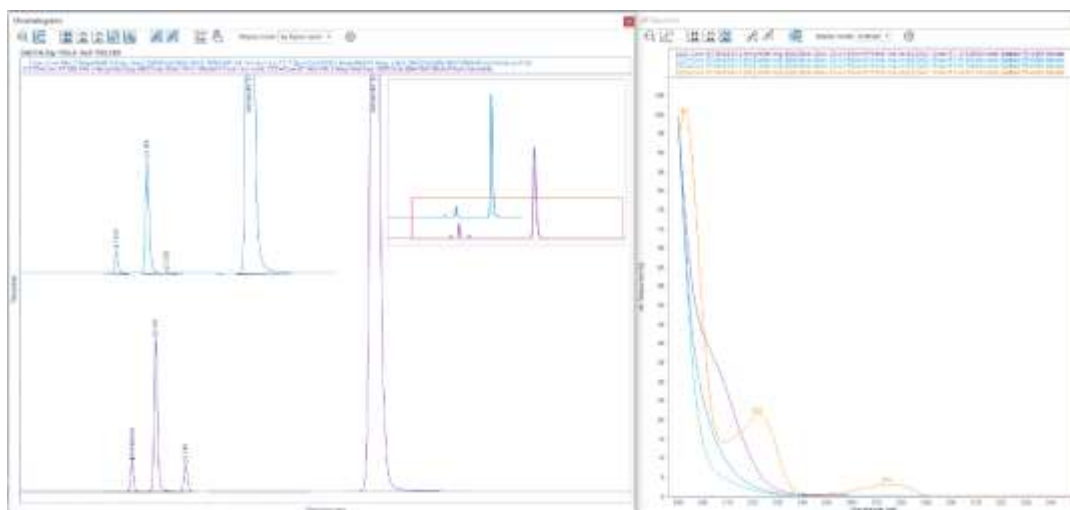


Рисунок 4.47 – Хроматограми, отримані використанням АСN до 50 % (верхня хроматограма) та з 30 % АСN (нижня хроматограма) з 13 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$

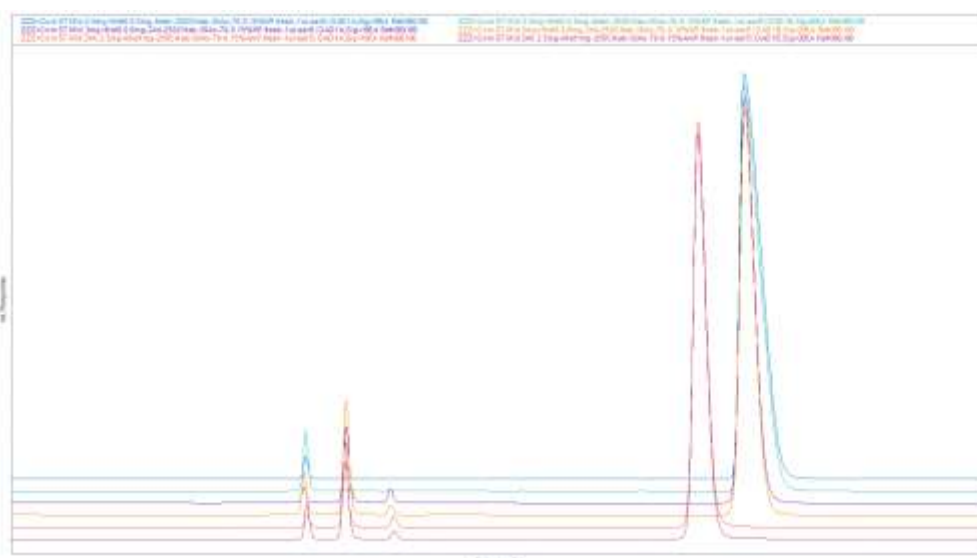


Рисунок 4.48 – Хроматограми, отримані шляхом використання вмісту АСN до 30 % з 70 % 13 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ на останніх двох нижніх хроматограмах і замінені на 13 мМ KH_2PO_4 над ними; останні верхні хроматограми були зроблені зі свіжого зразка, приготовленого з 13 мМ KH_2PO_4 70% та 30 % АСN, з помітним розкидом по ширині та невеликим зсувом утримування піку метопрололу

Першим вибором був 0.1 % розчин H_3PO_4 80 % та 20 % АСN, що проілюстровано на рисунку 4.49 за 13 різних довжин хвилі. Пік мельдонію

вставлено як збільшене та перемасштабовано для вищевказаної повної немасштабованої хроматограми для більш легкого порівняння змін цього піку з піком метопрололу. Хроматограми, отримані за допомогою цієї рухомої фази, генерують високу асиметрію піків обох аналітів, з випереджаючим спотворенням піку мeldonію та хвостом піку метопрололу, що представлено на рисунку 4.50 за 13 довжин хвиль. Встановлено значне збільшення піку мeldonію як функції зменшення довжини хвилі, чого не було раніше. Метопролол продемонстрував значні зміни розміру піку порівняно з мeldonієм. Через випередження піку мeldonію цей приріст площі не слідував за приростом висоти. Якщо H_3PO_4 замінено на розведену 0.07 % TFA, то з'являються суттєві зміни вигляду хроматограми з формами піків та утримуваннями. На рисунку 4.50 продемонстровано поведінку піків аналітів у часі утримання та формах як функцію змін відсоткового вмісту ACN у 60–65–70–75–80 % ACN, створюючи карту руху піків елювання мeldonію та метопрололу за X-шкалою.

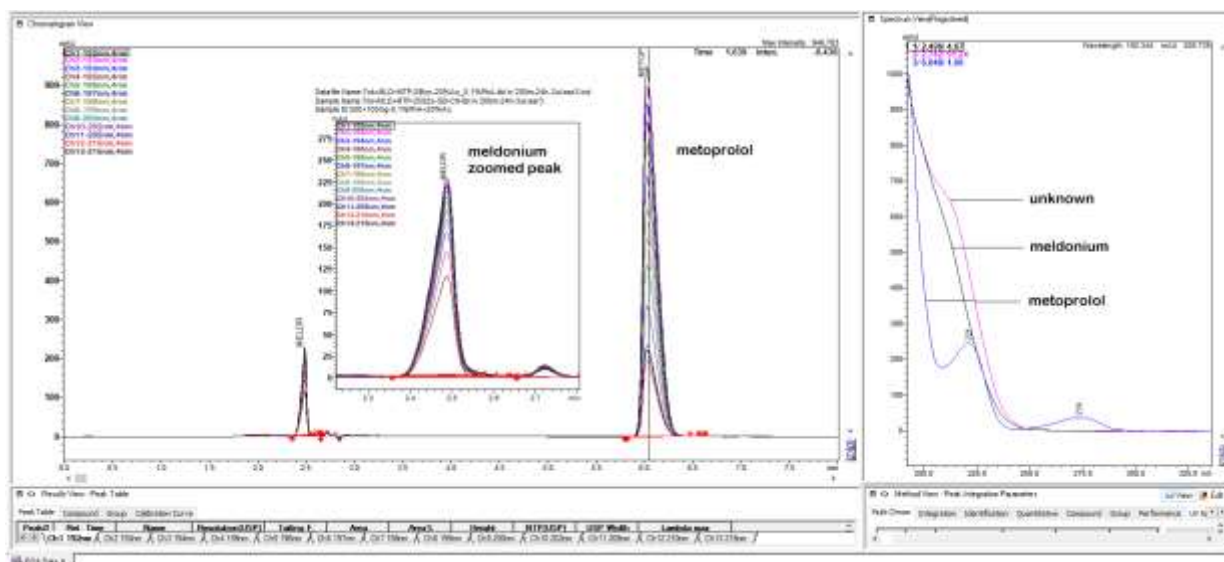


Рисунок 4.49 – Хроматограми, отримані з використанням розведених кислот, без використання фосфатних солей (0.1 % H_3PO_4 80 % та 20 % ACN за 13 різних довжин хвиль)

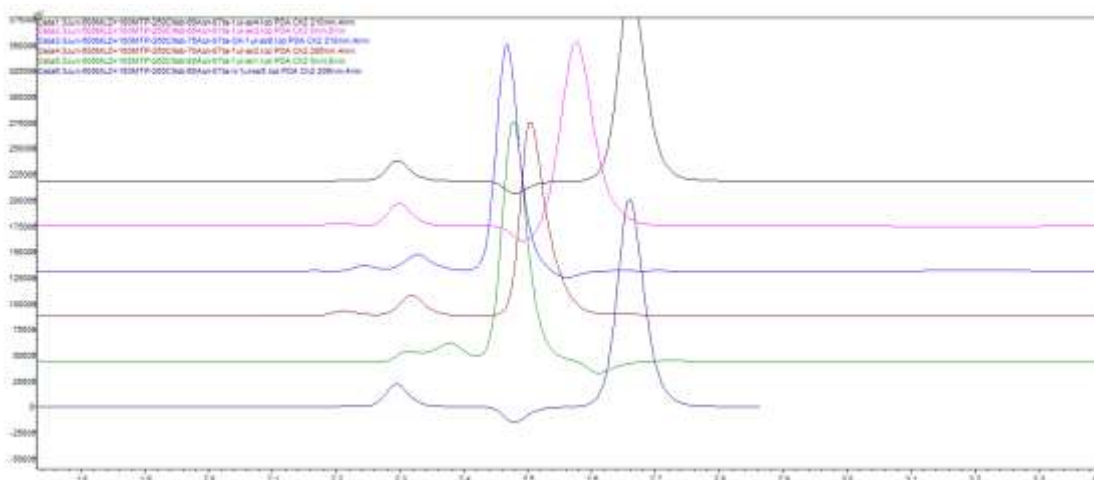


Рисунок 4.50 – Хроматограми з TFA за умов вивчення функції змін відсоткового вмісту ACN у 60–65–70–75–80 % ACN, створення карти руху піку елюювання мельдонію та метопрололу на X-шкалі 60–80 % збільшення ACN

Хроматограми, отримані з використанням рухомої фази – 70 % ACN та 30 % 0.07 % TFA, представлено на рисунку 4.51. З рис. 4.51 впливає короткий час хроматографування, що триває менше ніж 3 хв, з усіма піками ідеальної форми, але без вражаючої роздільної здатності між ними. На рисунку 4.52 представлено хроматограми з високою роздільною здатністю, що підтверджує ідентичність піків з легко розпізнаваним характерним УФ-спектром мельдонію, позначеним маркувальним трикутником розташований на осі, що представляє час утримування. Найпростішим способом покращити дану ситуацію з цією рухомою фазою була робота з колонкою з меншим діаметром частинок, від 5 мкм до 3.5 мкм. Це збільшить роздільну здатність приблизно на 20 %, що може бути цілком задовільним. Навіть із цією колонкою 5 мкм запропонована методика може бути застосована для визначення мельдонію та метопрололу у рутинних аналізах. Це була відмінна хроматограма з хроматографічної точки зору, краще елюювання мельдонію до метопрололу, окрім величезних відмінностей у полярностях. Короткий час утримування створює короткі швидкості та менш розсіяні піки зі збільшенням параметрів чутливості методики.

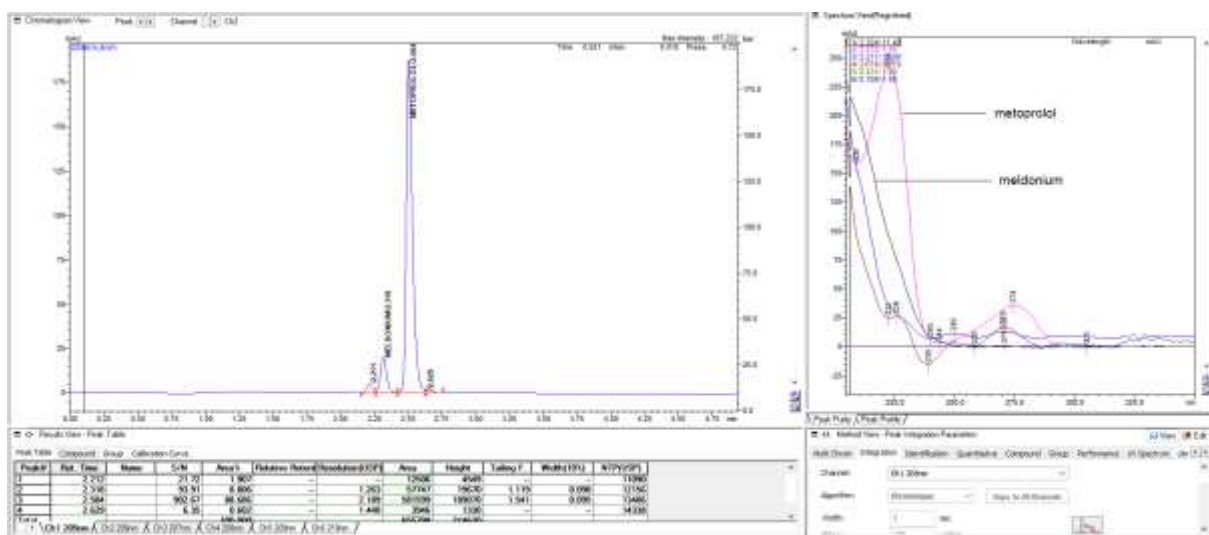


Рисунок 4.51 – Хроматограми, отримані використанням рухомої фази – 70 % ACN та 30 % 0.07 % TFA

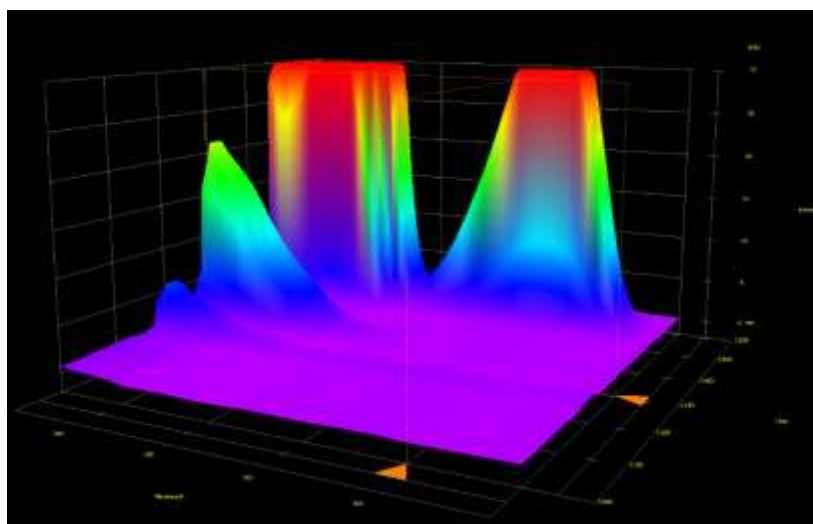


Рисунок 4.52 – 3 D- хроматограма з високою роздільною здатністю, що підтверджує ідентичність піків з легко розпізнаваним характерним УФ спектром мeldonію, позначеним маркувальним трикутником, розташованим на осі, що представляє час утримування

Зменшення відсотка ACN до 60 % показало невелике збільшення утримування для обох аналітів з піками відмінної форми, але зі зникненням невеликих піків і появою негативного піку між мeldonієм і метопрололом, представленим на хроматограмі на рисунку 4.53. Ця ситуація може мати негативний роздільний вплив на менші піки, ховаючись нижче видимого на

хроматограмі. Подальше збільшення ACN до 80 %, показано на рисунку 4.54, скерувало появу хроматограми з дещо збільшеним утримуванням, що з'явилося на нових піках та мeldonium, відокремленому піку метопрололу та з негативним піком на базовій лінії, елююючим після правого за метопрололом, ставлячи під загрозу визначення правильності методики.

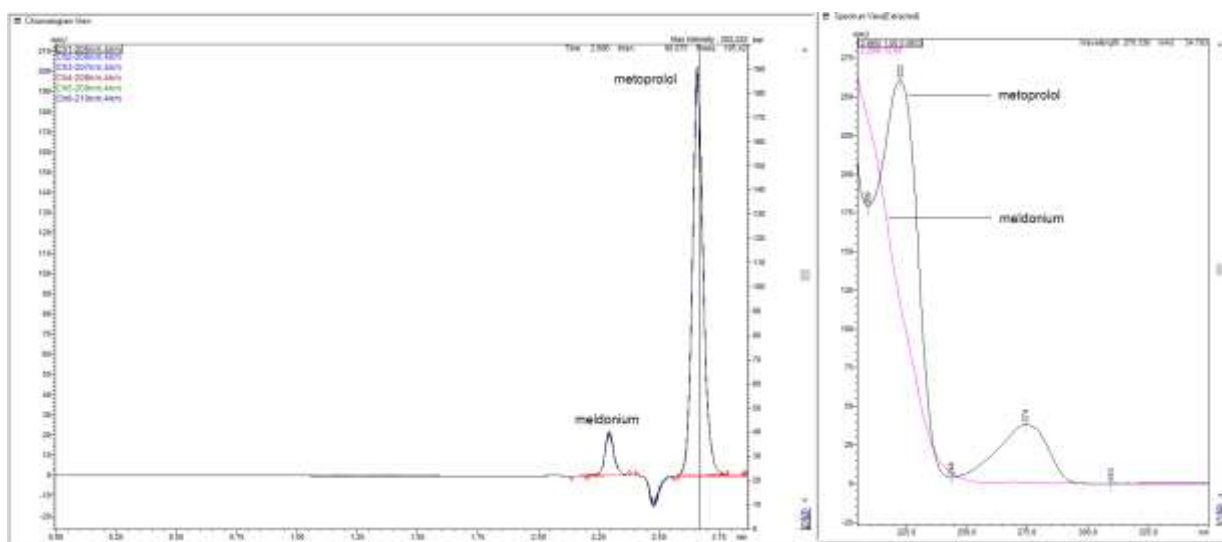


Рисунок 4.53 – Хроматограми, отримані з використанням 60 % ACN в складі рухомої фази

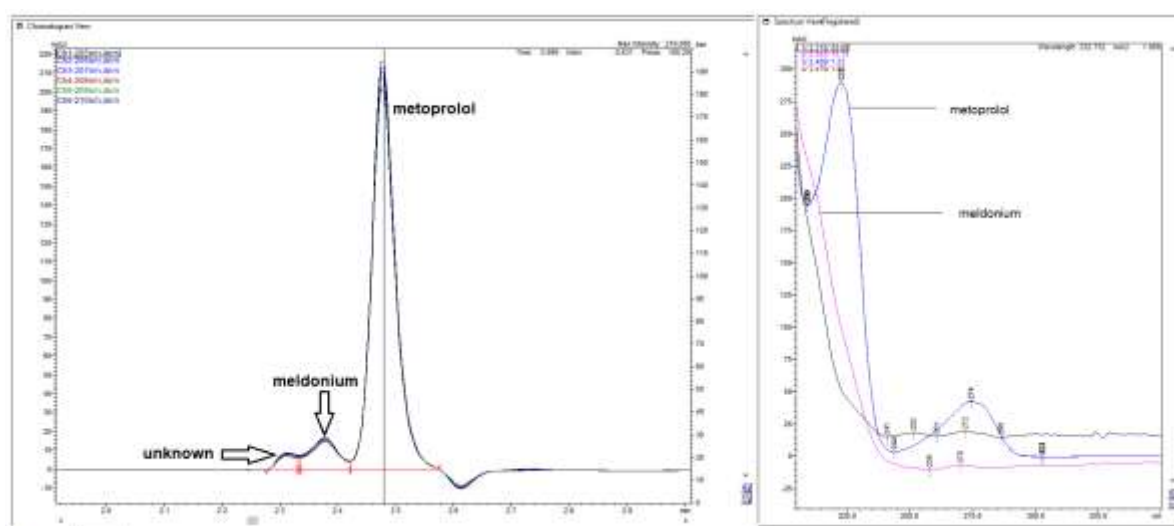


Рисунок 4.54 – Хроматограми, отримані з використанням 80 % ACN в складі рухомої фази

Дві найбільш ілюстративні хроматограми змінюються через подвоєний відсоток ACN у рухомих фазах, що показано на рисунку 4.55. Рухома фаза з 80 % ACN коелює мельдоній з першим піком і проміжком позаду, що загрожує інтеграції піку метопрололу. Зменшення ACN до 30 % у рухомих фазах збільшує поділ усіх піків із подвоєнням утримування метопрололу, але в цьому випадку розрив у базовій лінії ставить під загрозу правильність визначення мельдонію. Вказаний факт був проблемою, яку можна вирішити шляхом використання рухомої фази з розчинником, проте підвищена наявність ацетонітрилу зменшує розчинення обох аналітів.

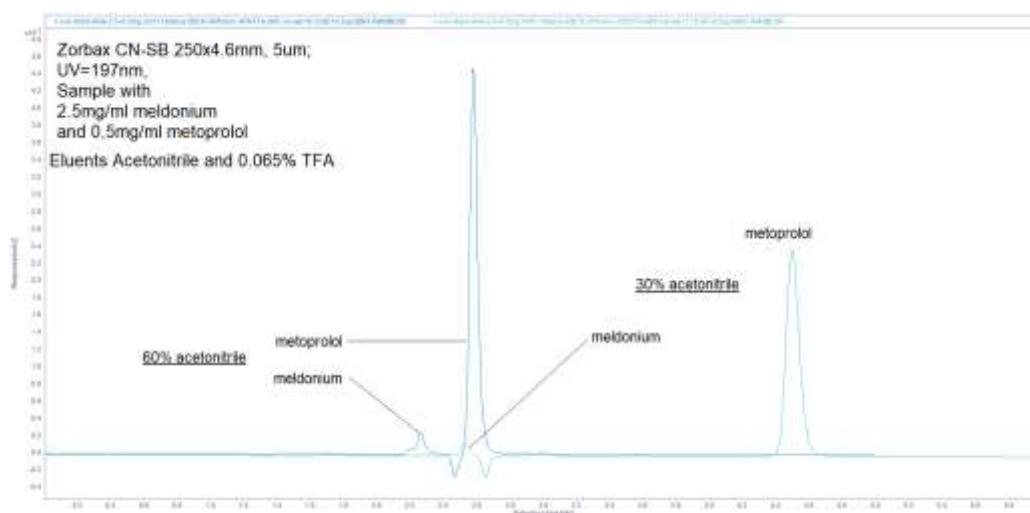


Рисунок 4.55 – Дві хроматограми, отримані з використанням колонки Zorbax CN-SB та рухомої фази з подвоєним відсотком ACN (TFA забезпечує величезне наближення піку метопрололу до мельдонію, знижуючи їх розділення до низьких значень, що наближаються до 2)

Нами проведено численні експериментальні дослідження для перевірки симетрії піків при різному відсотковому вмісті ацетонітрилу в поєднанні з розведеною TFA, як показано на рисунку 4.56. Коли ми перевіряли вплив модифікаторів неорганічної рухомої фази з сталою частиною 20 % ACN та 80 % інших неорганічних компонентів, ми отримали хроматограми, представлені на рисунку 4.57 (колонка Zorbax CN-SB 250 мм × 4.6 мм, рухома фаза – 20 % ACN та 80 % H_3PO_4 (верхні 2 хроматограми), з підкисленим 13 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ до

pH=2.5 (середні 4 хроматограми) і з невідкисленим 13.3 мМ розчином $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$). Висока кислотність елюентів показала асиметрію піків деяких піків.

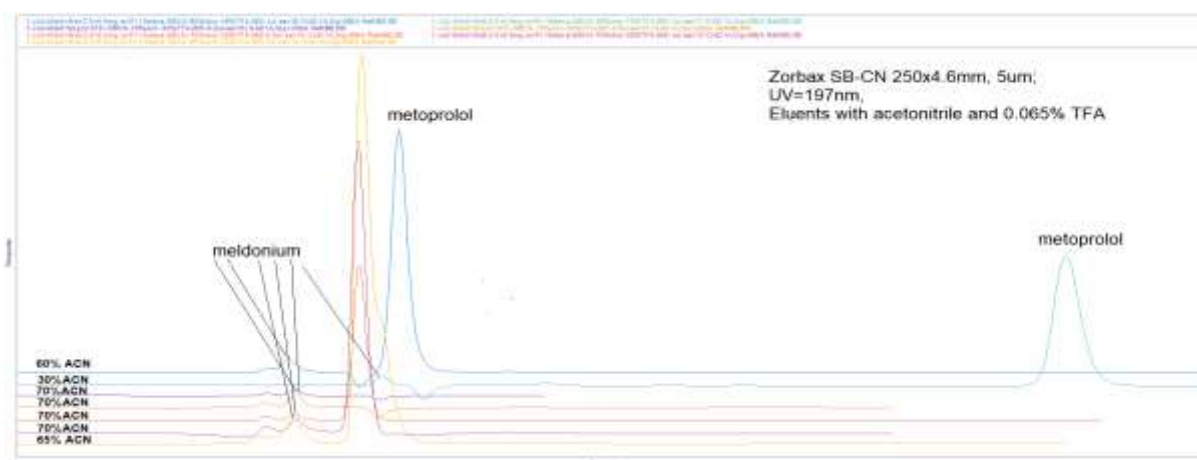


Рисунок 4.56 – Хроматограми, отримані з використанням різних відсотків АСН та розведеної ТФА

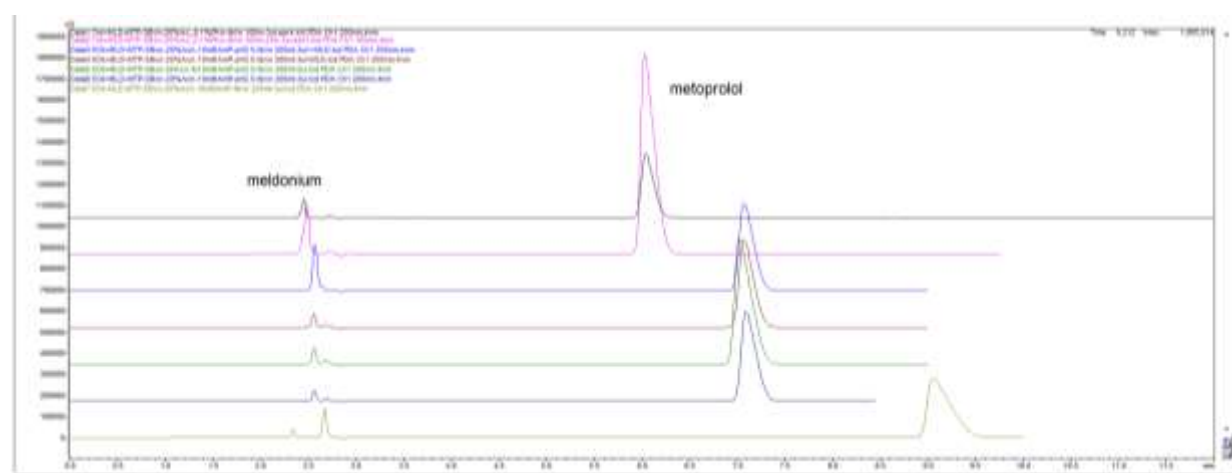


Рисунок 4.57 – Хроматограми, отримані з використанням 20 % АСН та 80 % H_3PO_4 (верхні 2 хроматограми), з підкисленим до pH=2.5 13 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (середні 4 хроматограми) та з невідкисленим 13.3 мМ розчином $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$

Як вже зазначалося, висока кислотність елюентів показала більш високу ймовірність пікової асиметрії деяких піків. Короткий огляд хроматограм зразка 2.5 мг/мл мельдонію та 0.5 мг/мл метопрололу, з різними відсотками АСН та різною неорганічною частиною, що складається з 0.065 % ТФА або 15 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, представлено на рисунку 4.58. Огляд піків утримування

та відображення форми може допомогти у виборі найбільш правильної рухомої фази.

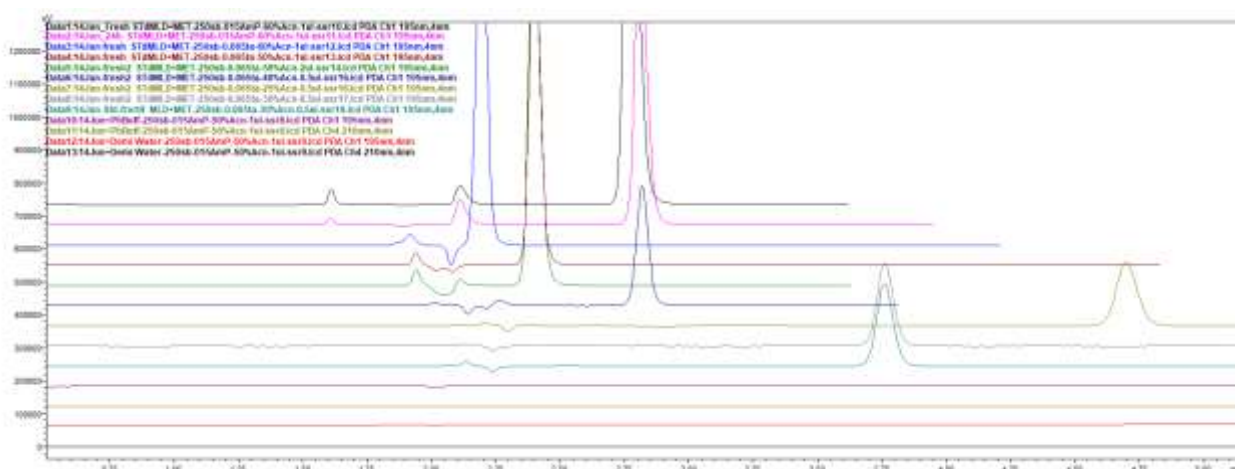


Рисунок 4.58 – Короткий підсумковий огляд хроматограм зразка 2.5 мг/мл мельдонію та 0.5 мг/мл метопрололу з різними відсотками ACN та різною неорганічною частиною, що складається з 0.065 % TFA або 15 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$

На рисунку 4.59 представлено зведене пікове відображення мельдонію та метопрололу внаслідок різної зміни відсоткового вмісту ACN та вибору неорганічного модифікатора рухомої фази. Рис. 4.59 підтверджує необхідність використання колонки CN-суано Zorbax CN-SB 250 мм × 4.6 мм для одночасного визначення мельдонію та метопрололу. Численні комбінації ACN з 0.15 % $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ були представлені накладеними за 195 нм і 200 нм, порівняно з останніми двома хроматограмами внизу, які були зроблені на колонці C18 Xterra 100 мм × 4 мм з 10 % ACN, без елюювання метопрололу до 20 хв.

Останнім експериментальним дослідженням було тестування методики за наявності інших бета-блокаторів (бісопролол). Отримані хроматограми представлено на рисунку 4.60. Отримані результати розширюють сферу застосування методики з можливістю одночасного визначення мельдонію та метопрололу за наявності інших бета-блокаторів.

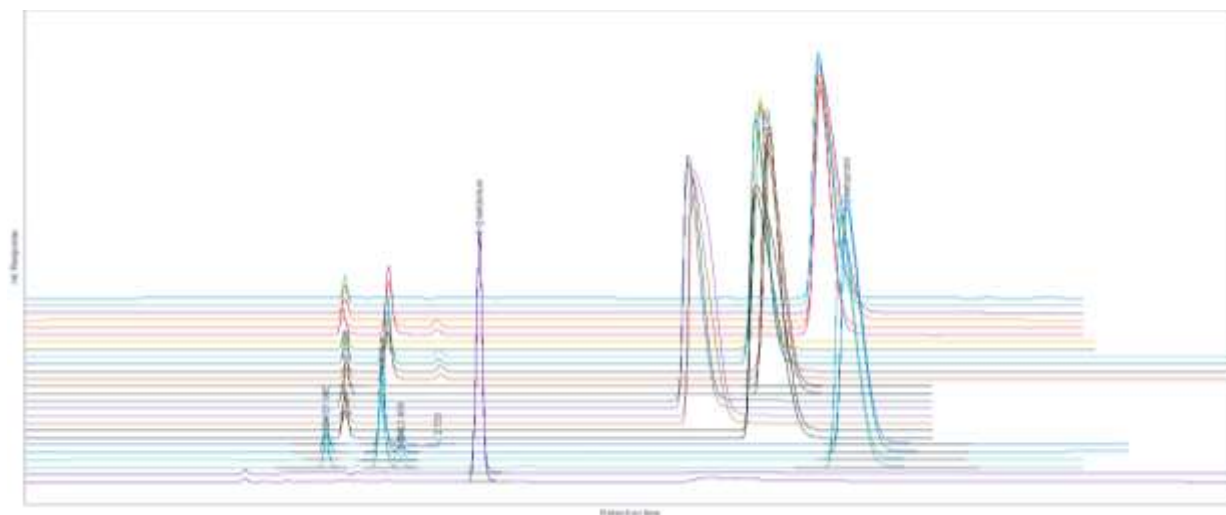


Рисунок 4.59 – Хроматограми, отримані з використанням колонки CN-суано Zorbax CN-SB 250 мм × 4.6 мм для одночасного визначення мельдонію з метопрололом (комбінації ACN з 0.15 % $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ представлено накладеними за 195 нм і 200 нм, порівняно з останніми двома хроматограмами внизу, які зроблені на колонці C18 Xterra 100 мм × 4 мм з 10 % ACN та не елюють метопролол до 20 хв)

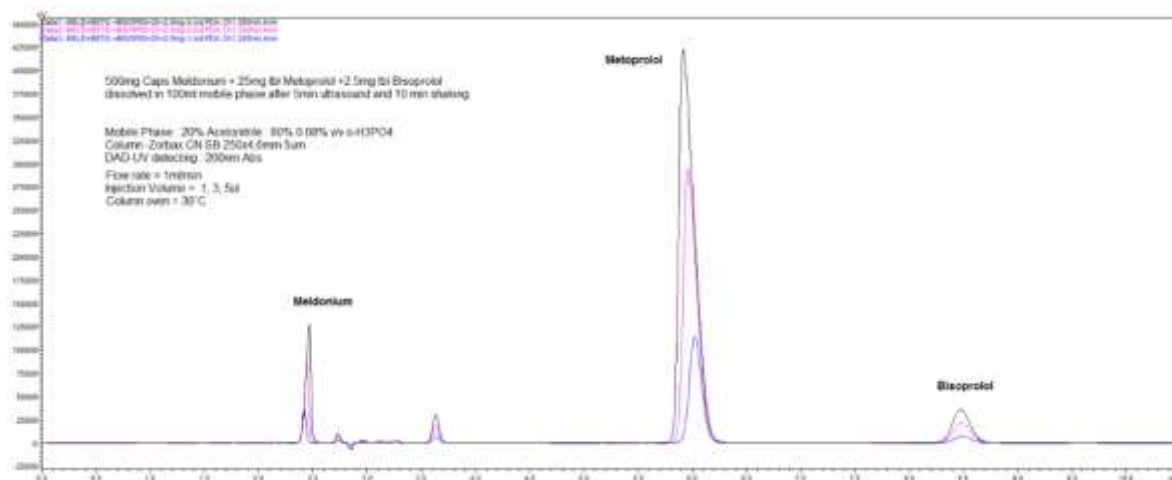


Рисунок 4.60 – Хроматограми, отримані з використанням колонки Zorbax CN-SB з 3 чітко розділеними АРІ мельдонію, метопрололу та бісопрололу

Підсумовуючи вище описане, можна відмітити, що третій підхід базувався на використанні колонки Zorbax CN-SB 250 мм × 4.6 мм, 5 мкм. Нами перевірена та апробована ця колонка, оскільки її хімічний склад дозволяє та надає перевагу рухомій фазі середньої та високої кислотності відповідно до специфікацій

виробника. Крім цієї функції, ця колонка генерує найбільшу кількість теоретичних тарілок, що означає, що найвища ефективність повинна бути створена для розділених піків. Ідеальна симетрія піку мельдонію перевершує пік метопрололу, що вказує на зміну рухомої фази. Якщо вміст органічного розчинника збільшити до 50 %, з'являється різниця у хроматограмі, що продемонстровано на рис. 4.36. Зазначена рухома фаза дала симетричний пік ідеальної форми для мельдонію ($F=1.31$) та метопрололу ($F=1.36$), час хроматографування – менше 3.5 хв. Ця стратегія, сукупність експериментальних хроматографічних умов рухомої фази та колонки, створила найкоротшу за часом, ефективну методику визначення мельдонію та метопрололу у лікарських формах. Подальше збільшення відсотка органічного розчинника АСН у рухомій фазі до 60 % з 40 % 13 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ не змінює істотно хроматограму з часом утримування аналітів, за винятком деякого погіршення пікової симетрії мельдонію, з скорочення часу хроматографування менше 3 хв. Підкислення рухомої фази $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ до $\text{pH}=2.5$ проявляє деяку деформацію піку, перекис піку мельдонію, порівняно з непідкисленим розчином буферної солі в рухомій фазі. У подальшій експериментальній роботі ми перевірили застосовуваність та селективність методики ВЕРХ із застосуванням зразків, які зберігалися за кімнатної температури 24–72 год, для перевірки можливості визначення продуктів деградації. Ці експерименти проводилися на іншій системі ВЕРХ Agilent 1260-II з детектором PDA з зниженням швидкості потоку до 1.0 мл/хв, таким чином час хроматографування збільшився приблизно до 3.6 хв. При зміні від 30 % до 50 % АСН в складі рухомої фази утримування мельдонію змінювалося приблизно на 10 %, тоді як утримування метопрололу подвоювалося. Відсотки АСН у рухомих фазах були позначені праворуч на кожній хроматограмі. Наступний рисунок ілюструє зразки з постійними концентраціями аналітів, доведених до вмісту мельдонію 2.5 мг/мл і метопрололу 0.5 мг/мл, а під час тестування та експериментальної роботи зразки витримували за кімнатної температури впродовж 3 днів. На хроматограмах, які спостерігалися за двома різними довжинами хвиль, що накладаються, показали

додаткові піки, які підтверджують можливість цією методикою визначати нові піки як продукти деградації. Хроматограми, одержані на колонці Zorbax CN-SB 250 мм × 4.6 мм, за двох довжин хвиль 195 нм і 205 нм, накладені ліворуч, а їхні відповідні УФ-спектри – праворуч. З рухомою фазою, що складається з 50 % АСN та 50 % 13ММ NH₄H₂PO₄, найбільш ефективного розділення було досягнуто менш ніж за 4 хв. Другим піком був мельдоній на хроматограмі, а останнім найвищим піком був метопролол, третій і четвертий пік з'явилися знову. З 4 представлених УФ-спектрів, другий зверху був екстрагований пік мельдонію, а четвертий внизу був пік метопрололу. Рисунок 4.44 містить накладення піків свіжого зразка стандартів мельдонію та метопрололу, і в них відсутні другий і третій піки продуктів деградації мельдонію, тоді як інші представлені зразки готували та зберігали за кімнатної температури впродовж 3 днів, вони мають другий і третій пік з УФ- спектри, подібні до мельдонію, за двох довжин хвиль 195 та 205 нм. Третій продукт деградації був непомітний завдяки покращеній роздільній здатності та збільшеному часу хроматографування. Дослідження були виконані із запланованими збільшеннями різних об'ємів інжекції для перевірки впливу кількості аналіту на форми піків. Перший пік був мельдонієм, тоді як другий і третій були відсутні у свіжих стандартах мельдонію, а останній елюював найвищий пік метопрололу.

Ці особливості свідчать про недоцільність використання оберненофазової С-8 або С-18, оскільки в одному попередньому тесті з колонкою RP Select В 75 × 4 мм (С-8), коефіцієнти хроматографічної ємності отримали різницю в утримуваності більш ніж у 20–30 разів, що робить методику безцінною, із збільшенням часу хроматографування з наступним зменшенням правильності. Досить тривале утримування з факторами ємності К', що відрізняються більше ніж у 20–30 разів, уможливорює небажане розширення ширини піків за рахунок поздовжньої дифузії зони елюювання піків. Збільшення відсотка органічних розчинників, у даному випадку ацетонітрилу, зменшує час утримування метопрололу, але елює мельдоній у об'ємі пустоти/часі колонки. Таким чином, будь-який намір оптимізувати рухому фазу за допомогою колонок на основі С-8

або C-18 є непрактичним. Навіть якщо шукати коротшу колонку RP або ліганди з найменшим вмістом вуглецю та щільністю зв'язку, неможливо отримати відповідну практичну високопродуктивну методику одночасного визначення мельдонію та метопрололу. Використовувати фенільні колонки було недоцільним через невідповідну структуру мельдонію, відсутність фенольних кілець у молекулі. Від використання іонообмінних колонок відмовилися через відомі особливості, повільне врівноваження, широкі піки, низьку чутливість і параметри придатності хроматографічної системи. Використання колонки CN-ціано дало нам можливість керувати утримуванням аналіту та чутливістю, особливо у випадках, коли компоненти в складі рухомої фази сильно обмежені для нижчої вимірюваної УФ-області 190–205–210 нм. Тестування багатьох рухомих фаз і колонок дозволило нам керувати елююванням аналіту зі зміною їх появи в положенні елюювання, що є цікавим і важливим у тестуванні ЛЗ з різними допоміжними речовинами, або вирішити проблеми з коелюція у випадку з біологічними зразками.

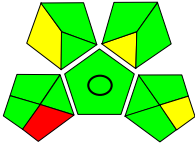
4.2.4 Валідація аналітичних методик та порівняльний аналіз впливу аналітичних методик на навколишнє середовище

В результатів проведених експериментальних досліджень, описаних у пунктах 4.2.1-4.2.3, сформульовано 12 варіацій. Порівняння між запропонованими варіаціями представлено в таблиці 4.5, результати внутрішньо- та міжлабораторної правильності та прецизійності – в таблицях 4.6, 4.7. Аналізуючи таблиці 4.5-4.7, можна зробити висновок, що найбільш оптимальні з точки зору чутливості та екологічності – варіації 9 та 10. Це було досягнуто використанням колонки Zorbax CN SB (4.6 мм × 250 мм, 5 мкм) та рухомої фази ACN – 0.15 % $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (50:50 та 60:40). Хотілося б зазначити, що екологічність методики ВЕРХ обмежена ідеальними «зеленими» значеннями через обмежену розчинність гідрофобних аналітів.

Таблиця 4.5 – Порівняльна характеристика запропонованих варіацій

Варіація	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Діапазон застосування, мг/мл	0.2–1.0 – метопролол 1.0–5.0 – мельдоній											
Рухома фаза	ACN– 0.15% NH ₄ H ₂ PO ₄ (20:80)	ACN– 0.065% TFA (45:55)	ACN– 0.15% NH ₄ H ₂ PO ₄ (20:80)	ACN– 0.065% TFA (25:75)	ACN– 0.065% TFA (45:55)	ACN– 0.15% NH ₄ H ₂ P O ₄ (50:50)	ACN– 0.065% TFA (50:50)	ACN– 0.15% NH ₄ H ₂ PO ₄ (20:80)	ACN– 0.15% NH ₄ H ₂ PO ₄ (50:50)	ACN– 0.15% NH ₄ H ₂ PO ₄ (60:40)	ACN–0.07% TFA (40:60)	ACN– 0.07% TFA (30:70)
Хроматографіч на колонка	LiChrospher [®] 125 CN (5 мкм) (4 мм i.d. × 125 мм, 5 мкм)		LiChrospher [®] 250 CN (5 мкм) (4 мм i.d. × 250 мм, 5 мкм)			Waters Spherisorb CNRP (4.6 мм i.d. × 250 мм, 5 мкм)		Zorbax CN SB (4.6 мм i.d. × 250 мм, 5 мкм)				
Час хрома- тографування, хв	5.5	4	9	8.5	7	8	6	10	3.5	3.5	5	3
Швидкість потoku, мл/хв	1.0					1.2		1.0				
Довжина хвилі, нм	200					200, 210		200		210		
МВ/МКВ, мг/мл	0.011/0.035 – мельдоній 0.00022/0.00075 – метопролол	0.032/0.011 – мельдоній 0.00041/0.00175 – метопролол	0.011/0.035 – мельдоній 0.00022/0.00075 – метопролол	0.043/0.133 – мельдоній 0.00038/0.00157 – метопролол	0.039/0.180 – мельдоній .00039/0.00143 – метопролол	0.015/0.047 – мельдоній 0.00022/0.0008 – метопролол	0.051/0.153 – мельдоній 0.00043/0.00164 – метопролол	0.017/0.056 – мельдоній 0.00016/0.00051 – метопролол	0.021/0.059 – мельдоній 0.00016/0.00052 – метопролол	0.017/0.056 – мельдоній 0.00019/0.00066 – метопролол	0.045/0.161 – мельдоній 0.0045/0.0015 – метопролол	0.052/ 0.173 – мельдоній 0.0053/0.0018 – метопролол

Продовження таблиці 4.5

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Рівняння регресії, коефіцієнт кореляції (R^2)	$y=16700x+9814.12$ 0.9998	$y=15963x+5987.53$ 0.9999	$y=13753x+5492.891$.0000	$y=19784x+8905.7$ 5 0.9999	$y=17906x+7859.94$ 0.9999	$y=18945x+7896.5$ 7 0.9997	$y=17834x+7894.3$ 8 1.0000	$y=18563x+9473.84$ 0.9997	$y=15978x+6739.97$ 0.9999	$y=17890x+6491.23$ 0.9997	$y=18856x+7819.78$ 1.0000	$y=17829x+6743.19$ 0.9998
Критерій до R	> 0.9981	> 0.9991	> 0.9985	> 0.9971	> 0.9980	> 0.9974	> 0.9989	> 0.9990	> 0.9982	> 0.9980	> 0.9977	> 0.9988
Крирій до a	≤ 2.6											
Бал (метод AGREE)	0.76	0.69	0.74	0.67	0.68	0.75	0.68	0.74	0.77	0.77	0.68	0.69
Бал (метод аналітичної екошкали)	89											
GAPI												

Таблиця 4.6 – Результати вивчення внутрішньолaborаторної правильності та прецизійності

Варіація	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Аналіт	Mean, % (RSD, %)											
Мельдоній	99.86 (0.32)	99.67 (0.39)	100.48 (0.21)	100.87 (0.40)	99.56 (0.30)	100.09 (0.20)	100.36 (0.31)	100.03 (0.34)	100.15 (0.28)	100.09 (0.29)	99.89 (0.41)	100.14 (0.40)
	99.84 (0.38)	99.42 (0.42)	99.47 (0.46)	100.67 (0.31)	100.05 (0.24)	100.17 (0.41)	100.51 (0.27)	99.84 (0.44)	100.22 (0.34)	100.17 (0.21)	99.75 (0.23)	100.09 (0.35)
	100.12 (0.28)	99.53 (0.45)	100.32 (0.35)	100.76 (0.34)	100.18 (0.29)	100.15 (0.34)	100.60 (0.20)	100.01 (0.42)	100.11 (0.40)	99.81 (0.33)	99.69 (0.34)	100.29 (0.38)
Метопролол	99.97 (0.22)	100.35 (0.27)	99.47 (0.25)	100.13 (0.29)	99.55 (0.35)	100.78 (0.45)	99.90 (0.18)	99.45 (0.44)	99.56 (0.31)	100.22 (0.37)	100.05 (0.22)	100.01 (0.27)
	99.84 (0.41)	99.95 (0.39)	99.67 (0.30)	100.35 (0.40)	99.78 (0.39)	100.66 (0.37)	100.17 (0.33)	99.48 (0.20)	99.77 (0.37)	100.45 (0.38)	100.01 (0.30)	100.18 (0.29)
	100.53 (0.36)	99.56 (0.27)	99.70 (0.27)	100.22 (0.28)	99.70 (0.23)	100.56 (0.29)	100.12 (0.28)	99.67 (0.31)	99.65 (0.40)	100.30 (0.31)	100.10 (0.27)	100.15 (0.35)

Таблиця 4.7 – Результати вивчення міжлабораторної правильності та прецизійності

Варіація	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Аналіт	Mean, % (RSD, %)											
Мельдо- ній	99.56 (0.21)	100.05 (0.30)	100.10 (0.26)	100.01 (0.22)	100.15 (0.20)	99.61 (0.48)	99.93 (0.28)	100.06 (0.32)	100.15 (0.16)	100.05 (0.18)	100.14 (0.30)	100.18 (0.26)
	99.51 (0.30)	100.02 (0.36)	99.93 (0.19)	99.64 (0.36)	100.01 (0.29)	99.82 (0.45)	99.84 (0.20)	100.27 (0.40)	100.22 (0.40)	100.22 (0.41)	99.95 (0.13)	100.12 (0.25)
	99.89 (0.34)	99.67 (0.24)	100.18 (0.26)	100.05 (0.42)	100.24 (0.36)	99.89 (0.38)	100.06 (0.25)	100.20 (0.23)	100.11 (0.35)	99.86 (0.20)	99.80 (0.23)	100.34 (0.44)
Метопро- лол	100.18 (0.28)	100.06 (0.25)	99.83 (0.22)	99.91 (0.17)	99.70 (0.30)	100.03 (0.26)	99.95 (0.37)	99.97 (0.40)	99.56 (0.24)	100.12 (0.27)	100.17 (0.12)	99.69 (0.42)
	100.24 (0.22)	99.78 (0.28)	99.50 (0.29)	99.83 (0.32)	99.91 (0.26)	100.14 (0.17)	100.08 (0.31)	99.51 (0.44)	99.77 (0.31)	100.09 (0.18)	100.12 (0.28)	99.93 (0.15)
	100.13 (0.36)	99.85 (0.20)	99.89 (0.24)	99.63 (0.38)	99.95 (0.29)	100.25 (0.20)	100.17 (0.44)	99.89 (0.37)	99.65 (0.33)	100.01 (0.22)	100.03 (0.35)	99.74 (0.31)

Примітка. Критерії

$\bar{z} - 100$	≤ 0.49
	≤ 0.51
ΔZ	≤ 1.6
Δ_{intra}	≤ 1.6

Зменшення відсотка органічного розчинника може безпосередньо впливати на форму піку, що означає погіршення правильності та чутливості методики. Використання колонки HILIC є незадовільним у деяких молекулах з низькою розчинністю у воді, і помилки у визначенні є ймовірнішими. Відповідно, оптимальним було б взяти стаціонарну фазу з коротшим зв'язаним алкілним ланцюгом, щоб швидше елюювати аналіти з меншою кількістю використаних органічних матеріалів та кращими коефіцієнтами «зеленості», але це завжди пов'язано з деякими перешкодами, розчинністю аналітів, задовільним утримуванням для відповідного часу хроматографування, селективністю та чутливістю. Валідацію аналітичних методик проводили відповідно до вимог ДФУ. Результати вивчення валідації аналітичних методик представлено в таблицях 4.5-4.7. Робастність вивчалася на етапі розробки ВЕРХ методик, що детально описано в пункті 4.2.3.

Результати вивчення впливу розроблених методик на навколишнє середовище методами аналітичної еко-шкали, AGREE та GAPI (див. табл. 4.5) вказують на те, що всі 12 варіацій є «зеленими». Враховуючи результати, отримані при валідації аналітичних методик та «зеленості» методик, ми рекомендуємо 9 (рухома фаза – ACN – 0.15 % $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (60:40), хроматографічна колонка – Zorbax CN SB) та 10 (рухома фаза – ACN – 0.15 % $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (50:50), хроматографічна колонка – Zorbax CN SB) варіації як оптимальні, оскільки стостерігається низьке значення MB та МКВ, експресність (час хроматографування 3.5 хв), бал за методом AGREE – 0.77.

Для підтвердження коректності ВЕРХ методик проводили прогнозування повної невизначеності методики. Невизначеність кінцевої аналітичної операції складала 1.18 %. Розрахунок невизначеності пробопідготовки мельдонію та метопрололу наведено у таблиці 4.8.

Згідно з таблицею 4.8, невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) мельдонію та метопрололу становить 0.27 %. Розподіл невизначеності пробопідготовки за операціями вказує на те, що найбільшу невизначеність в

пробопідготовку вносить операція 2 – взяття наважки ФСЗ метопрололу тартрату (0.20 %).

Таблиця 4.8 – Розрахунок невизначеності пробопідготовки мельдонію та метопрололу

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
Розчин порівняння мельдонію та метопрололу		
1) взяття наважки ФСЗ мельдонію дигідрату	m_0	$0.2 \text{ мг}/500 \text{ мг} \times 100 \% = 0.04$
2) взяття наважки ФСЗ метопрололу тартрату	m_0	$0.2 \text{ мг}/100 \text{ мг} \times 100 \% = 0.20$
3) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 200.0 мл	200	0.10
Випробовуваний розчин		
4) взяття наважки грануляту капсул мельдонію	m_1	$0.2 \text{ мг}/805 \text{ мг} \times 100 \% = 0.02$
5) взяття наважки порошку розтертих таблеток метопрололу	m_2	$0.2 \text{ мг}/178 \text{ мг} \times 100 \% = 0.11$
6) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 200.0 мл	200	0.10

Повна невизначеність аналітичної методики (Δ_{As}) визначення мельдонію та метопрололу становить 1.21 % ($\Delta_{As} = 1.21 \% \leq \max \Delta_{As} = 2.4 \%$).

Прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не перевищувала критичного значення ($\max \Delta_{As}$), тому можна зробити висновок, що запропоновані ВЕРХ-методики визначення мельдонію та метопрололу даватимуть коректні результати в інших лабораторіях.

Результати визначення вмісту мельдонію у капсулах та метопрололу в таблетках (9 варіація) наведено в таблицях 4.9, 4.10.

Таблиця 4.9 – Результати кількісного визначення мельдонію в капсулах

Лікарський засіб	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
Капсули «Метамакс» (Дарниця) 250 мг серії № NS 20222	0.2486	$\bar{m} = 0.2502$ г
	0.2506	$S = 1.57 \times 10^{-3}$
	0.2515	$t = 2.57$
	0.2479	$\Delta x = 1.65 \times 10^{-3}$
	0.2517	RDS = 0.63
	0.2508	$\varepsilon = 0.66$ %
Капсули «Вазопро» (Фармак) 500 мг серія № 20321	0.4983	$\bar{m} = 0.5010$ г
	0.5036	$S = 3.01 \times 10^{-3}$
	0.5011	$t = 2.57$
	0.4994	$\Delta x = 3.16 \times 10^{-3}$
	0.4981	RDS = 0.60
	0.5055	$\varepsilon = 0.63$ %

Таблиця 4.10 – Результати кількісного визначення метопрололу в таблетках

Лікарський засіб	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
Таблетки «Метопрололу тартрат» (Фармак) 50 мг серія № 10822	0.0498	$\bar{m} = 0.0503$ г
	0.0495	$S = 1.10 \times 10^{-3}$
	0.0509	$t = 2.57$
	0.0511	$\Delta x = 1.16 \times 10^{-3}$
	0.0518	RDS = 2.19
	0.0489	$\varepsilon = 2.30$ %
Таблетки «Метопрололу тартрат» (Фармак) 100 мг серія № 30421	0.1027	$\bar{m} = 0.1007$ г
	0.1018	$S = 2.32 \times 10^{-3}$
	0.0981	$t = 2.57$
	0.0986	$\Delta x = 2.43 \times 10^{-3}$
	0.1037	RDS = 2.30
	0.0995	$\varepsilon = 2.41$ %

Висновки до розділу 4

1. У роботі представлено підходи до розробки та валідації хроматографічних методик кількісного визначення мельдонію та метопрололу в субстанції та ЛЗ.

2. З метою розробки ВЕРХ-методик визначення мельдонію в субстанції та ЛЗ апробовано дві рухомі фази (0.25 % KPF_6 – 0.1 % 85 % H_3PO_4 95 % – 5 % ACN та 0.3 % біс-(трифторометан)сульфаміду літію 97 % – 0.1 % 85 % H_3PO_4 80 % – 20 % ACN) та хроматографічну колонку Agilent Zorbax C-18 SB (4.6 мм i.d. X 150 мм, 3.5 мкм).

3. Хаотропний ефект аніонів (KPF_6 та біс-(трифторометан)сульфаміду літію) на мельдоній вплинув на міграційну поведінку аналіту. Обидві рухомі фази включали, крім хаотропу, використання ацетонітрилу та регулювання рН за допомогою 0.1 % розчину 85% H_3PO_4 . Довжину хвилі детектування (190 нм, 195 нм, 200 нм, 205 нм) підбирали експериментальним шляхом. В результаті проведених досліджень, запропоновано 2 підходи та отримано 8 ВЕРХ варіацій. Валідація аналітичних методик показала їх придатність для цілей фармацевтичного аналізу.

4. З метою розробки ВЕРХ методики одночасного визначення двох аналітів із різницею в полярностях (мельдоній та метопролол) апробовано три хроматографічні колонки та різні рухомі фази з низьким та високим відсотком ACN , що сформульовано в 3 підходи та 12 ВЕРХ варіацій.

5. Всі три хроматографічні колонки (LiChrospher 100 CN двох розмірів (4 мм × 250 мм, 5 мкм), (4 мм × 125 мм, 5 мкм), Waters Spherisorb CNRP (4.6 мм × 250 мм, 5 мкм), ZORBAX StableBond CN (4.6 мм × 250 мм, 5 мкм)) були придатними для одночасного визначення мельдонію та метопрололу за різних умов щодо складу рухомої фази. Використання фосфатного буфера забезпечує стабільні та відтворювані результати з високою чутливістю для обох аналітів, що забезпечується високою УФ-прозорістю ACN та фосфату і дозволяє проводити визначення в коротшому діапазоні довжин хвиль 190–195–200 нм. Чутливість з УФ- детектором для мельдонію приблизно в 11-20 разів вища порівняно з

методиками з використанням розведеної TFA, залежно від обраної порівняльної довжини хвилі. Підкислення рухомої фази викликає погіршення симетрії піків, особливо мельдонію. Збільшення відсотка ACN з обома типами неорганічних частин рухомої фази, фосфатного буфера та розведеної TFA, як наближається, закриття піків із зменшенням надмірної роздільної здатності, а потім розширення ширини піку, що знижує чутливість методики, особливо для мельдонію. Розмір, площа та висота піку менш чутливі до змін у моніторингу довжини хвилі за наявності TFA порівняно з H_3PO_4 , тоді як наявність 13 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ викликає значні зміни в обох розмірах піків, мельдонію та метопрололу. Використання комбінації ACN з розведеною H_3PO_4 забезпечує чутливе вимірювання за найнижчої довжини хвилі 190 нм, так само, як і з комбінаціями $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Однак наявність навіть розведеної 0.065–0.07 % TFA не дозволяє проводити чутливі вимірювання в діапазонах нижче 195 нм через високі граничні значення кислоти.

6. В разі необхідності використання методики для ВЕРХ/МС, комбінація рухомих фаз із розведеною TFA є рекомендованою для всіх перевірених CN-ціаноколонок, з перевагою Zorbax CN-SB, яка є найбільш стабільною в кислому значенні рН. У разі потреби використання методики для ВЕРХ визначення з УФ, PDA, флуоресцентним детектором, комбінація $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ з ACN є рекомендованим варіантом вибору рухомої фази, що забезпечує високопродуктивний аналіз для лабораторій контролю якості. Варіації рухомих фаз легко повторно оптимізуються для точного налаштування пікових положень елюювання та досягнення роздільної здатності.

7. Оскільки методики з $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ та H_3PO_4 з вибраним найкращим вибором CN-колонки набагато чутливіші до мельдонію в 10–17 разів порівняно з методиками з розведеною TFA, перші рекомендовані для рутинних високопродуктивних аналізів мельдонію та метопрололу у ЛЗ, тоді як друга група з TFA ідеально підходить для аналізу біологічних зразків з застосуванням ВЕРХ/МС, де МС детектор підвищуватиме чутливість методики.

8. Враховуючи результати, отримані при валідації аналітичних методик та вивченні «зеленості», ми рекомендуємо 9 (рухома фаза – ACN – 0.15 % $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (60:40), хроматографічна колонка – Zorbax CN SB) та 10 (рухома фаза – ACN – 0.15 % $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (50:50), хроматографічна колонка – Zorbax CN SB) варіації як оптимальні, оскільки стостерігається низьке значення МВ та МКВ, експресність (час хроматографування 3.5 хв), бал за методом AGREE – 0.77.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в наукових публікаціях автора [154, 155, 156, 157].

РОЗДІЛ 5

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ ВЕРХ-МС/МС МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ МЕТОПРОЛОЛУ ТА МЕЛЬДОНІЮ В ПЛАЗМІ КРОВІ

5.1 Розробка ВЕРХ-МС/МС методики визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові

Одною із сфер застосування методик аналізу є визначення аналітів в біологічних рідинах, що є актуальним для проведення фармакокінетичних досліджень та біоеквівалентності ЛЗ [158-162]. Біоаналітична методика визначення метопрололу та мельдонію, запропонована нами, ґрунтується на методі ВЕРХ/МС/МС аналітів в випробовуваних розчинах, отриманих з зразків плазми після попереднього осадження білків. Для виконання даного дослідження взято 350 мг мельдонію та 50 мг метопрололу як прогнозоване оптимальне співвідношення для одночасного застосування.

Нами розроблено оригінальну біоаналітичну методику визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові методом ВЕРХ/МС/МС з використанням внутрішніх стандартів, проведена оптимізація хроматографічної колонки, рухомої фази та швидкості потоку, що є важливими для отримання відмінного розділення піків, та впливає на правильність, прецизійність та чутливість методики [163-168]. Для оптимізації ефективної хроматографічної роздільної здатності метопрололу та мельдонію проведено попередні експериментальні дослідження доцільності використання різних сумішей розчинників, таких як АСН, MeOH та FA. Різні аналітичні колонки апробовано для отримання задовільної роздільної здатності. Роздільна здатність піків метопрололу досягалася за допомогою колонки Discovery C18 50 мм × 2.1 мм, 5 мкм та мельдонію – ZORBAX HILIC Plus 50 мм × 2.1 мм, 3.5 мкм. Зразки метопрололу хроматографували в градієнтному режимі (елюент А (АСН – H₂O – FA, 5:95:0.1), елюент В (АСН – FA, 100:0.1)). Початковий вміст елюенту В становить 0 %, що лінійно збільшується на 1.0 хв до 100 % і до 1.11 хв

повертається до початкових 0 %. Рухому фазу подавали зі швидкістю потоку 0.4 мл/хв в камеру мас-спектрометра ESI. Об'єм інжекції становив 5 мкл. Зразки мельдонію хроматографували в ізократичному режимі, використовуючи як рухому фазу H₂O – ACN – амонію форміатний буфер 200 мМ (20:75:5). Використовувані внутрішні стандарти – бетанехол (“Єнамін”, ≥95 %, ВЕРХ), бісопролол (“Moehs Catalana, S.L., Іспанія”, ≥98 %, ВЕРХ).

Метою оптимізації вилучення зразків є головним чином досягнення високого відновлення вилучення з незначними або низькими матричними ефектами для підвищення чутливості та правильності аналізу ВЕРХ-МС/МС. Процедура недостатнього екстрагування зменшує стійкість методики через ендogenous інтерференцію в екстрактах проби. Отримане значення НМКВ було достатнім для кількісного визначення метопрололу та мельдонію для проведення фармакокінетичних досліджень з низькою дозою.

MRM-параметри наведено в таблиці 5.1. Як видно з табл. 5.1, m/z для метопрололу становить 268.2, мельдонію – 147.0.

Таблиця 5.1 – MRM-параметри

Назва аналіту	Parent, m/z	Daughter, m/z	Time, ms	DP, V	FP, V	EP, V	CE, V	CXP, V
Метопролол	268.2	116.2	50	21	150	11	27	20
Бісопролол (BC)	326.4	116.2	50	46	260	11	27	20
Мельдоній	147.0	59.0	100	16	120	11	25	10
Бетанехол (BC)	161.3	102.2	100	66	370	11	19	8

ВЕРХ-хроматограми, одержані за умов кількісного визначення метопрололу, наведено на рисунку 5.1, мельдонію – на рисунку 5.2.

За даних умов пік метопрололу та мельдонію елюються близько 1.39 хв та 1.18 хв, відповідно. Загальний час хроматографування складав 2 хв, тому розроблена біоаналітична методика визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові є експресною. Запропоновані хроматографічні умови зменшують

час хроматографування, що відповідно знижує вартість аналізу та підвищує бал екологічності методики.

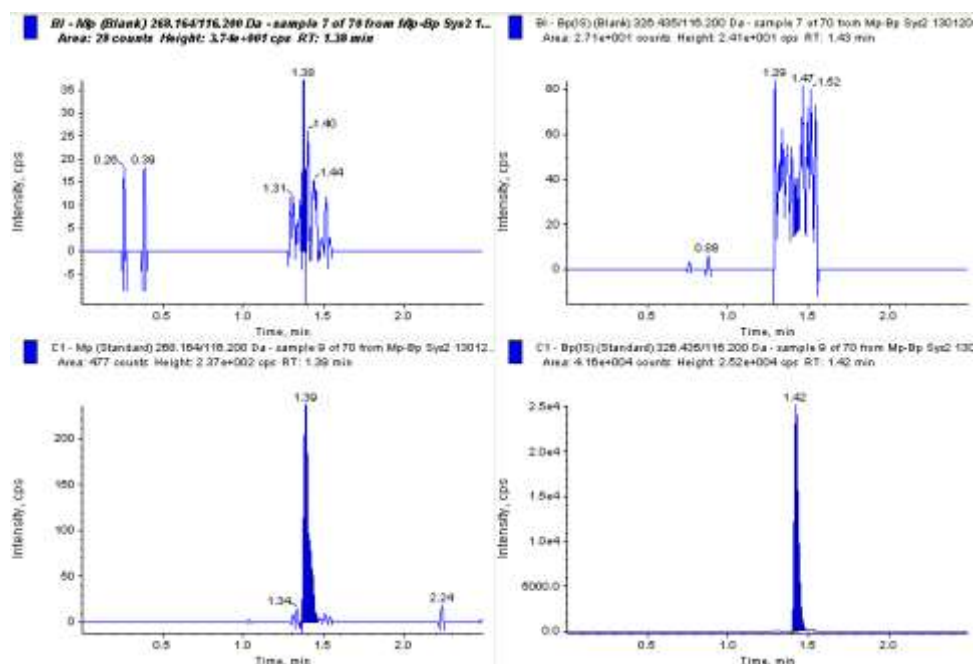


Рисунок 5.1 – Типові хроматограми, одержані за умов кількісного визначення метопрололу в плазмі крові методом ВЕРХ-МС/МС

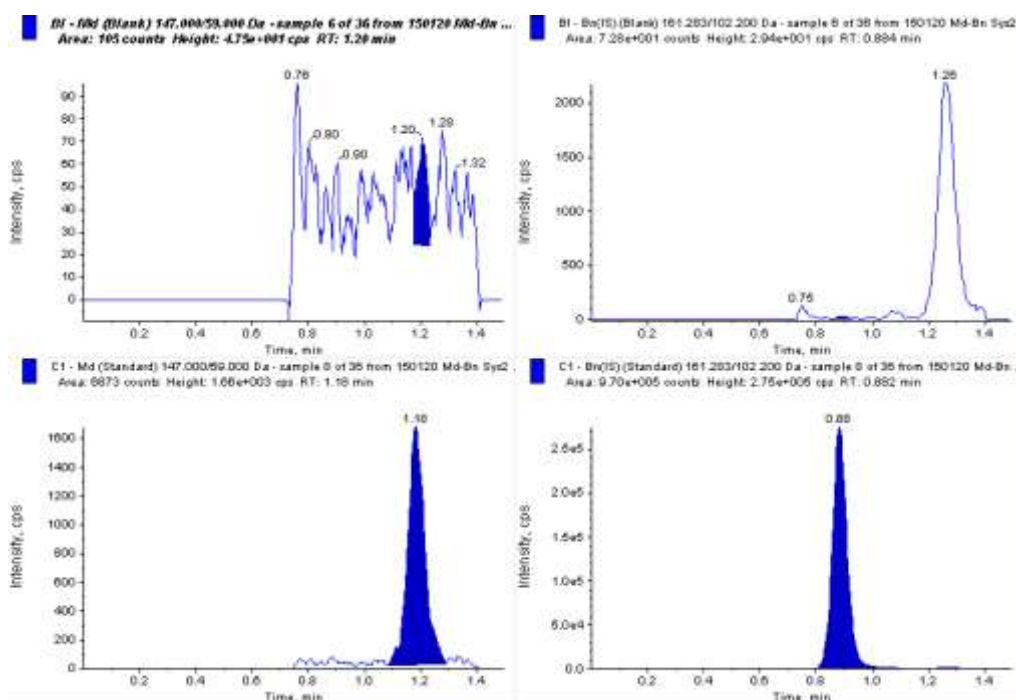


Рисунок 5.2 – Типові хроматограми, одержані за умов кількісного визначення мельдонію в плазмі крові методом ВЕРХ-МС/МС

5.2 Валідація ВЕРХ-МС/МС методики визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові

Придатність біоаналітичної методики підтверджено валідаційними характеристиками, які висуваються до біоаналітичних методик [169-174].

5.2.1 Специфічність/селективність

Для визначення селективності протестовано зразки бланкової плазми крові з метою забезпечення відсутності ендогенних впливів при визначенні часу утримування метопрололу та мельдонію. Також проаналізовано зразки плазми на рівні НМКВ. Результати вивчення валідаційного параметру «специфічність/селективність» представлено в таблиці 5.2.

Таблиця 5.2 – Результати вивчення валідаційного параметра «специфічність/селективність» біоаналітичної методики визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові

№	НМКВ (метопролол)		% впливу	НМКВ (мельдоній)		% впливу
	Площа піку	Час утримування, хв		Площа піку	Час утримування, хв	
1	422	1.38	відсутній	6671	1.18	відсутній
2	430	1.39	відсутній	6702	1.19	відсутній
3	442	1.39	відсутній	8184	1.18	відсутній
4	456	1.38	відсутній	8319	1.18	відсутній
5	461	1.38	відсутній	7001	1.18	відсутній
6	441	1.39	відсутній	8915	1.18	відсутній
7	439	1.38	відсутній	8299	1.18	відсутній
8	434	1.38	відсутній	8218	1.19	відсутній
9	425	1.38	відсутній	8144	1.18	відсутній
10	440	1.39	відсутній	8111	1.17	відсутній

На хроматограмах зразків бланкової плазми не виявлялися піки з часом утримування, що співпадали би з часом утримування метопрололу та мельдонію. Критерій прийнятності аналізу зразків QC повинен бути в межах 20 % (при НМКВ –25 %) від номінальної концентрації, тому висновок щодо розробленої методики до валідаційного параметра «специфічність/селективність» – коректна.

5.2.2 Лінійність/калібрувальна модель

Лінійність калібрувальної кривої оцінюється за калібрувальним стандартом метопрололу та мельдонію, приготовлених на плазмі крові, використовуючи алгоритм розрахунків параметрів лінійної регресії методом найменших квадратів у системі координат «відношення площей хроматографічних піків аналіту або внутрішнього стандарту до концентрації». Калібрувальні криві та результати вивчення валідаційного параметру «лінійність/калібрувальна модель» представлено на рисунках 5.3, 5.4 та у таблицях 5.3, 5.4.

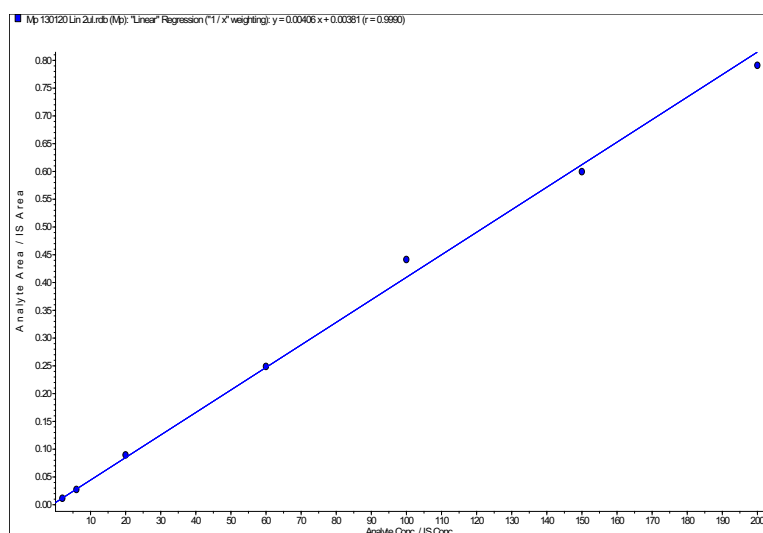


Рисунок 5.3 – Калібрувальна крива визначення метопрололу в плазмі крові

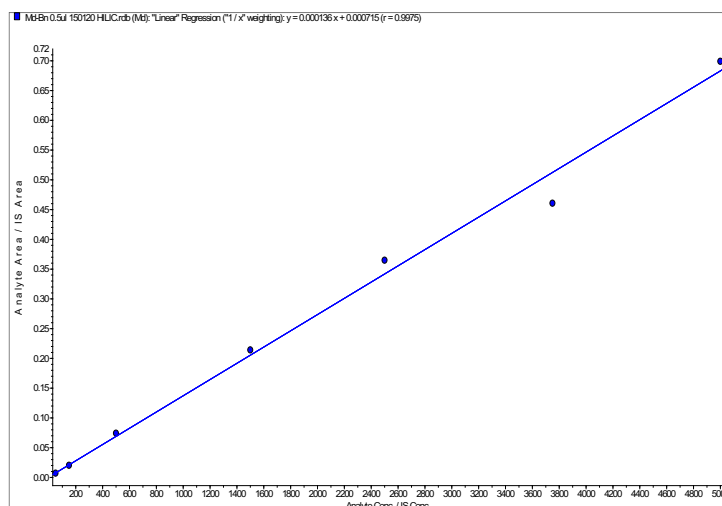


Рисунок 5.4 – Калібрувальна крива визначення мельдонію в плазмі крові

Таблиця 5.3 – Результати вивчення валідаційного параметру «лінійність/калібрувальна модель» кількісного визначення метопрололу

№	Час утримування	Площа піку	Час утримування ВС	Площа піку ВС	Знайдено (нг/мл)	Правильність (%)
1	1.39	477	1.42	41628	1.88	94.2
2	1.39	1140	1.42	41686	5.80	96.7
3	1.38	3781	1.42	42269	21.1	105.6
4	1.39	8418	1.42	33834	60.4	100.7
5	1.39	15900	1.43	36032	108	107.9
6	1.38	22205	1.42	37040	147	97.9
7	1.39	25498	1.43	32239	194	97.0
Відповідність критеріям прийнятності для НМКВ					1.88-194 нг/мл Відповідає	
Відповідність критеріям прийнятності для калібрувальних розчинів з концентраціями більшими, ніж НМКВ					< ± 15 % Відповідає	

Як випливає з результатів, отриманих на рисунках 5.3, 5.4 та у таблицях 5.3, 5.4, доведено лінійну залежність між концентрацією та площею хроматографічних піків метопрололу та мельдонію в діапазоні концентрацій 2 нг/мл – 200 нг/мл та 50 нг/мл – 5000 нг/мл, відповідно. Рівняння регресії метопрололу – $Y=0.00406x+0.00381$, коефіцієнт кореляції становить 0.9990.

Рівняння регресії мельдонію – $Y=0.000136x+0.000715$, коефіцієнт кореляції становить 0.9975. Розроблена методика є коректною.

Таблиця 5.4 – Результати вивчення валідаційного параметру «лінійність/калібрувальна модель» кількісного визначення мельдонію

№	Час утримування	Площа піку	Час утримування ВС	Площа піку ВС	Знайдено (нг/мл)	Правильність (%)
1	1.18	6873	0.88	969969	46.7	93.4
2	1.17	19588	0.88	965267	143	95.6
3	1.18	83404	0.88	1123760	539	107.7
4	1.17	223503	0.87	1043670	1564	104.3
5	1.18	383768	0.88	1051750	2669	106.7
6	1.18	464236	0.88	1007760	3371	89.9
7	1.18	761442	0.88	1089190	5118	102.4
Відповідність критеріям прийнятності для НМКВ					46.7-5118 нг/мл Відповідає	
Відповідність критеріям прийнятності для калібрувальних розчинів з концентраціями більшими, ніж НМКВ					< ± 15 % Відповідає	

5.2.3 Правильність та прецизійність

Правильність та прецизійність біоаналітичної методики вивчається під час аналізу однієї серії та трьох серій для кожного із QC-зразків. Правильність розраховується як відсоток відхилення знайденої концентрації від номінального значення, тоді як прецизійність виражається у вигляді коефіцієнта варіації (CV, %) для кожної серії зразків. Результати вивчення валідаційних параметрів «правильність та прецизійність» наведено в таблицях 5.5, 5.6.

Як впливає з результатів, отриманих у таблиці 5.5, значення коефіцієнту варіації в межах циклу метопрололу – 0.331 – 0.619 %, міжсерійного коефіцієнта варіації – 0.332 – 0.615 %. Відповідно до Настанов [167, 168] значення коефіцієнту варіації не повинно перевищувати 15 % для зразків QC, за виключенням LLOQ, для якої не повинно перевищувати 20 %, тому коефіцієнти варіації в обох випадках відповідали критерію прийнятності.

Таблиця 5.5 – Результати вивчення валідаційного параметру «правильність та прецизійність» кількісного визначення метопрололу

День	Внутрішньосерійна прецизійність		Міжсерійна прецизійність	
	Mean	CV, %	Mean	CV, %
1	98.80	0.378	101.71	0.332
2	100.41	0.619	98.98	0.390
3	100.63	0.331	100.53	0.615
Відповідність критеріям прийнятності для НМКВ			< ± 20 % Відповідає	
Відповідність критеріям прийнятності для розчинів з концентраціями більшими, ніж НМКВ			< ± 15 % Відповідає	

Таблиця 5.6 – Результати вивчення валідаційного параметру «правильність та прецизійність» кількісного визначення мельдонію

День	Внутрішньосерійна прецизійність		Міжсерійна прецизійність	
	Mean	CV, %	Mean	CV, %
1	99.23	0.353	101.79	0.514
2	101.17	0.719	99.57	0.349
3	100.82	0.376	100.13	0.674
Відповідність критеріям прийнятності для НМКВ			< ± 20 % Відповідає	
Відповідність критеріям прийнятності для розчинів з концентраціями більшими, ніж НМКВ			< ± 15 % Відповідає	

Як випливає з результатів, отриманих в таблиці 5.6, значення коефіцієнту варіації в межах циклу мельдонію – 0.353 – 0.719 %, міжсерійного коефіцієнта варіації – 0.349 – 0.674 %. Коефіцієнти варіації в обох випадках відповідали критерію прийнятності.

5.2.4 Ступінь ізолювання та ефект матриці

Завданням вивчення валідаційного параметру «ефект матриці» є вивчення впливу біологічної матриці (в нашому випадку плазми крові) на ефективність

іонізації аналіту та внутрішнього стандарту. Результати вивчення валідаційного параметру матричного ефекту представлено в таблицях 5.7, 5.8.

Таблиця 5.7 – Результати вивчення валідаційного параметру «ефект матриці» кількісного визначення метопрололу

№	НМКВ
1	2.19
2	2.20
3	1.94
4	2.56
5	2.66
Mean	2.31
SD	0.295
% CV	12.8
Відповідність критеріям прийнятності	< ± 15 % Відповідає

Таблиця 5.8 – Результати вивчення валідаційного параметру «ефект матриці» кількісного визначення мельдонію

№	НМКВ
1	43.7
2	47.0
3	52.1
4	50.9
5	45.0
Mean	47.7
SD	3.65
% CV	7.7
Відповідність критеріям прийнятності	< ± 15 % Відповідає

Як випливає з таблиць 5.7, 5.8, найнижча концентрація метопрололу складала 2.31 нг/мл, мельдонію – 47.70 нг/мл, відповідно. % CV для НМКВ склав 12.8 % and 7.7 % відповідно, що не виходило за допустимі значення 15 %.

Ступінь ізолювання метопрололу та мельдонію з плазми крові як біологічної матриці визначається порівнянням площей піків проб, екстрагованих з зразків, з площами піків неекстрагованих зразків, прийнятих за 100 %. Як критерії прийнятності використовується кутовий коефіцієнт лінійної залежності та відносний довірчий інтервал. Результати вивчення ступеня ізолювання представлено в таблицях 5.9, 5.10.

Таблиця 5.9 – Результати вивчення валідаційного параметру «ступеня ізолювання» кількісного визначення метопрололу

№	LQC	MQC	HQC
1	5.88	61.6	147
2	5.78	63.6	144
3	6.22	66.3	147
4	5.94	65.1	147
5	5.88	66.1	140
Mean	5.94	64.5	145
SD	0.167	1.96	3.08
% CV	2.8	3.0	2.1
% Mean Recovery	99.0	107.5	96.8
Відповідність критеріям прийнятності	Δ R, r <± 20% Відповідає		

Таблиця 5.10 – Результати вивчення валідаційного параметру «ступеня ізолювання» кількісного визначення метопрололу

№	LQC	MQC	HQC
1	139	1400	3331
2	142	1575	3690
3	148	1584	3700
4	138	1530	3377
5	139	1424	3363
Mean	141	1503	3492
SD	4.09	85.6	186
% CV	2.9	5.7	5.3
% Mean Recovery	94.1	100.2	93.1
Відповідність критеріям прийнятності	Δ R, r <± 20 % Відповідає		

Згідно з результатами, отриманими у таблицях 5.9, 5.10, ступінь ізолювання метопрололу складає в LQC, MQC, HQC 99.0 %, 107.5 % , 96.8 %, мельдонію в LQC, MQC and HQC – 94.1 %, 100.2 % , 93.1 %, що задовільняє критерії прийнятності.

5.2.5 Стабільність

Вивчення стабільності біоаналітичної методики проведене з метою підтверження того, що кожен етап дослідження не впливає на концентрацію аналіту. Результати вивчення стабільності представлено в таблиці 5.11.

Таблиця 5.10 – Результати стабільності біоаналітичної методики визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові

Номинальна концентрація, нг/мл	Вид стабільності	Mean \pm SD (n=6)	Прецизійність (% CV)
Метопролол – 5.94	0 год	5.94 \pm 0.43	2.24
	7 год (bench-Top)	5.92 \pm 0.37	2.34
	22 год (in-injector)	5.91 \pm 0.39	2.46
	3 цикли	5.90 \pm 0.41	2.36
Мельдоній– 141	0 год	141 \pm 0.33	3.09
	7 год (bench-Top)	141 \pm 0.25	2.55
	22 год (in-injector)	140 \pm 0.49	3.17
	3 цикли	140 \pm 0.39	2.17
Метопролол - 145	0 год	145 \pm 0.49	2.09
	7 год (bench-Top)	144 \pm 0.51	3.31
	22 год (in-injector)	144 \pm 0.42	2.31
	3 цикли	142 \pm 0.51	3.06
Мельдоній – 3492	0 год	3492 \pm 0.51	3.12
	7 год (bench-Top)	3491 \pm 0.31	2.32
	22 год (in-injector)	3491 \pm 0.24	2.07
	3 цикли	3489 \pm 0.61	3.27
Критерій прийнятності			< \pm 5 % Відповідає

Як випливає з результатів, отриманих в таблиці 5.11, середня концентрація QC-зразків знаходиться в діапазоні 85.00–115.00 % від середньої концентрації свіжоприготовлених розчинів, що свідчить про те, що отримані результати відповідають критеріям прийнятності.

5.3 Розрахування впливу аналітичної методики на навколишнє середовище

Розрахування впливу аналітичної методики на навколишнє середовище біоаналітичної методики проводили трьома методами такими як метод аналітичної еко-шкали, метод AGREE, метод GAPI. Бал аналітичної екошкали становить 78. На рисунку 5.5 представлено результати вивчення «зеленості» методами AGREE та GAPI розробленої біоаналітичної методики визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові.

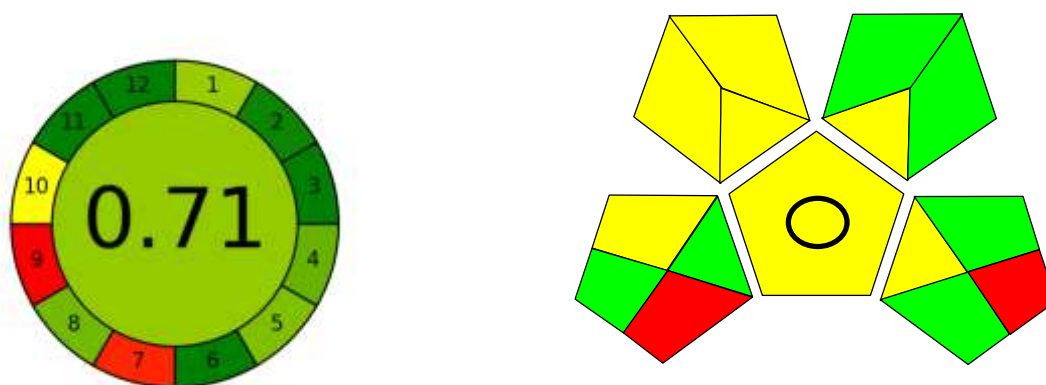


Рисунок 5.5 – Піктограми «зеленості» методами AGREE та GAPI

На рис. 5.5 показано, що біоаналітична методика мала бал за методом AGREE 0.71. Підсумовуючи вище описані факти, можна зробити висновок, що запропонована біоаналітична методика визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові є екологічно безпечною. Розроблена біоаналітична методика визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові має практичне значення і може

бути застосована в практичній роботі лабораторіями з вивчення фармакокінетики та біоеквівалентності ЛЗ, які містять метопролол та мельдоній.

Висновки до розділу 5

1. Теоретично та практично обґрунтовано можливість застосування ВЕРХ МС/МС для кількісного визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові.

2. Для оптимізації ефективної хроматографічної роздільної здатності метопрололу та мельдонію проведено попередні експериментальні дослідження доцільності використання різних сумішей розчинників, таких як АСN, MeOH та FA. Роздільна здатність піків метопрололу досягалася за допомогою колонки Discovery C18 50 мм × 2.1 мм, 5 мкм та мельдонію – ZORBAX HILIC Plus 50 мм × 2.1 мм, 3.5 мкм. Зразки метопрололу хроматографували в градієнтному режимі (елюент А (АСN – H₂O – FA, 5:95:0.1), елюент В (АСN – FA, 100:0.1)). Зразки мельдонію хроматографували в ізократичному режимі, використовуючи як рухома фазу H₂O – АСN – амонію форміатний буфер 200 мМ (20:75:5).

3. Проведено валідацію біоаналітичної методики. Результати вивчення всіх валідаційних параметрів вказують на відповідність критеріям прийнятності.

4. Запропонована біоаналітична методика визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові є екологічно безпечною, що підтверджено результатами вивчення «зеленості» методами аналітичної еко-шкали, AGREE та GAPI.

5. Розроблена біоаналітична методика визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові має практичне значення і може бути застосована в практичній роботі лабораторіями з вивчення фармакокінетики та біоеквівалентності ЛЗ, які містять метопролол та мельдоній.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в наукових публікаціях автора [163, 164, 165, 166, 167, 168].

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне та експериментальне вирішення актуального наукового завдання, що полягає в розробці експресних, простих у виконанні, доступних та валідованих спектрофотометричних і хроматографічних методик визначення метопрололу та мельдонію в субстанціях, ЛЗ та плазмі крові.

1. Проведено критичний аналіз оригінальних наукових публікацій, що дозволяє узагальнити інформацію щодо цілей, завдань, особливостей досліджень, ускладнень, які виникають під час розробки та валідації аналітичних і біоаналітичних методик визначення метопрололу та мельдонію в субстанціях, ЛЗ та плазмі крові. Описано підходи до застосування принципів «зеленої» та «білої» хімії в розробці аналітичних і біоаналітичних методик. Запропоновано «Дерево рішень» щодо вибору методик аналізу метопрололу та мельдонію в ЛЗ та плазмі крові і методологію розробки аналітичної та біоаналітичної методики визначення метопрололу і мельдонію в ЛЗ та плазмі крові.

2. Розроблено та валідовано УФ-спектрофотометричну методику визначення метопрололу тартрату в субстанції та монокомпонентних ЛЗ. Запропонована УФ-спектрофотометрична методика визначення метопрололу в ЛЗ є експресною, простою у виконанні, нетрудомісткою (не вимагає проведення дериватизації), недороговартісною, «зеленою» та може застосовуватися в рутинному аналізі ЛЗ метопрололу, коли час та вартість є критичними. Обмеженнями щодо застосування запропонованої УФ-спектрофотометричної методики є аналіз метопрололу в комбінованих ЛФ за умови, що інший АФІ буде поглинати в діапазоні 220-230 нм.

3. Описано методологію вибору реагенту для розробки спектрофотометричної методики визначення метопрололу в субстанції та ЛЗ. Для подальшої розробки спектрофотометричних методик визначення метопрололу як реагенти відібрано БКЗ, БФС, БТС. Розроблено та валідовано спектрофотометричні методики кількісного визначення метопрололу тартрату в

субстанції та ЛЗ за реакцією з БКЗ, БФС, БТС, експериментально обґрунтовано оптимальні умови утворення продуктів взаємодії метопрололу тартрату з БКЗ, БФС, БТС – вибір концентрації реагента (1.6×10^{-4} М розчину БКЗ, 2.0×10^{-4} М розчину БФС, 1.6×10^{-4} М розчину БТС), органічного розчинника (БКЗ, БФС – метанол, БТС – ацетонітрил), аналітичної довжини хвилі (БКЗ – 624 нм, БФС – 595 нм, БТС – 402 нм), встановлено коефіцієнти стехіометричних співвідношень «метопрололу тартрату–БКЗ/БФС/БТС» (1:1) та показники чутливості реакції. Запропоновані спектрофотометричні методики визначення метопрололу показали відмінний результат «зеленості» методами аналітичної еко-шкали, AGREE, GAPI, оскільки при розробці методик не використовувалися токсичні розчинники та мінімізувалася пробопідготовка. Всі чотири розроблені спектрофотометричні методики визначення метопрололу в субстанції та ЛЗ переважають за екологічністю раніше опубліковані методики. Запропоновані спектрофотометричні методики визначення метопрололу в субстанції та ЛЗ є «зеленими», простими у виконанні, нетрудомісткими (без нагрівання та корегування значення рН), недороговартісними та можуть застосовуватися в рутинному аналізі лікарських засобів на основі метопрололу та при проведенні арбітражного контролю.

4. Запропоновано методологію вибору реагенту для розробки спектрофотометричних методик визначення мельдонію в субстанції та ЛЗ. Для подальшої розробки спектрофотометричної методики визначення мельдонію відібрано алізарин. Розроблено та валідовано спектрофотометричну методику кількісного визначення мельдонію в субстанції та ЛЗ за реакцією з алізарином, експериментально встановлено оптимальні умови проведення кількісного визначення (концентрація розчину алізарину – 0.8 %, об'єм 0.8 % розчину алізарину – 0.5 мл, аналітична довжина хвилі – 517 нм, час нагрівання – 20 хв, температура – (95 ± 2) °С), стехіометричні співвідношення реагуючих компонентів «мельдоній-алізарин» (1:1) та показники чутливості реакції. Запропонована спектрофотометрична методика визначення мельдонію в субстанції та ЛЗ за реакцією з алізарином не є достатньо «зеленою», тому

актуальною залишається розробка ВЕРХ методики визначення мельдонію в субстанції та ЛЗ. Проте, незважаючи на описаний факт, дана методика може застосовуватися для проведення арбітражного контролю.

5. З метою розробки ВЕРХ-методик визначення мельдонію в субстанції та ЛЗ апробовано дві рухомі фази (0.25 % KPF_6 – 0.1 % 85 % H_3PO_4 95 % – 5 % ACN та 0.3 % біс-(трифторометан)сульфаміду літію 97 % – 0.1 % 85 % H_3PO_4 80 % – 20 % ACN) та хроматографічну колонку Agilent Zorbax C-18 SB (4.6 мм i.d. X 150 мм, 3.5 мкм). Хаотропний ефект аніонів (KPF_6 та біс-(трифторометан)сульфаміду літію) на мельдоній вплинув на міграційну поведінку аналіту. Обидві рухомі фази включали, крім хаотропу, використання ацетонітрилу та регулювання рН за допомогою 0.1% розчину 85 % H_3PO_4 . Довжину хвилі детектування (190 нм, 195 нм, 200 нм, 205 нм) підбирали експериментальним шляхом. В результаті проведених досліджень, запропоновано 2 концепції та отримано 8 ВЕРХ варіацій. Валідація аналітичних методик показала їх придатність для цілей фармацевтичного аналізу.

6. З метою розробки ВЕРХ методики одночасного визначення двох аналітів із різницею в полярностях (мельдоній та метопролол), апробовано три хроматографічні колонки та різні склади рухомих фаз з низьким та високим відсотком ACN, що сформульовано в 12 ВЕРХ варіацій та 3 підходи. Всі три хроматографічні колонки (LiChrospher 100 CN двох розмірів (4 мм × 250 мм, 5 мкм), (4 мм × 125 мм, 5 мкм), Waters Spherisorb CNRP (4.6 мм × 250 мм, 5 мкм), ZORBAX StableBond CN (4.6 мм × 250 мм, 5 мкм)) були придатними для одночасного визначення мельдонію та метопрололу за різних умов щодо складу рухомої фази. Використання фосфатного буфера забезпечує стабільні та відтворювані результати з високою чутливістю для обох аналітів, що забезпечується високою УФ-прозорістю ACN та фосфату і дозволяє проводити визначення в коротшому діапазоні довжин хвиль 190–195–200 нм. Чутливість з УФ-детектором для мельдонію приблизно в 11-20 разів вища порівняно з методиками з використанням розведеної TFA, залежно від обраної порівняльної довжини хвилі. Підкислення рухомої фази викликає погіршення симетрії піків,

особливо мельдонію. Збільшення відсотка АСН з обома типами неорганічних частин рухомої фази, фосфатного буфера та розведеної ТФА, дає закриття піків із зменшенням надмірної роздільної здатності, а потім розширення ширини піку, що знижує чутливість методики, особливо для мельдонію. Розмір, площа та висота піку менш чутливі до змін у моніторингу довжини хвилі за наявності ТФА порівняно з H_3PO_4 , тоді як наявність 13 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ викликає значні зміни в обох розмірах піків, мельдонію та метопрололу. Використання комбінації АСН з розведеною H_3PO_4 забезпечує чутливе вимірювання за нижчої довжини хвилі 190 нм, так само, як і з комбінаціями $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Однак наявність навіть розведеної 0.065–0.07 % ТФА не дозволяє проводити чутливі вимірювання в діапазонах нижче 195 нм через високі граничні значення органічної кислоти.

7. В разі необхідності використання методики для ВЕРХ/МС, комбінація рухомих фаз із розведеною ТФА є рекомендованою для всіх перевірених CN-ціанокколонок, з перевагою Zorbax CN-SB, яка є найбільш стабільною в кислому значенні рН. У разі потреби використання методики для ВЕРХ визначення з УФ, PDA, флуоресцентним детектором, комбінація $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ з АСН є рекомендованим варіантом вибору рухомої фази, що забезпечує високопродуктивний аналіз для лабораторій контролю якості. Обидві варіації рухомих фаз повторно оптимізуються для точного налаштування пікових положень елюювання та досягнення роздільної здатності. Оскільки методики з $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ та H_3PO_4 з кращим вибором CN-колонки чутливіші до мельдонію в 10–17 разів порівняно з методиками з розведеною ТФА, перші рекомендовані для рутинних високопродуктивних аналізів мельдонію та метопрололу у ЛФ, тоді як друга група з ТФА ідеально підходить для аналізу біологічних зразків з застосуванням ВЕРХ/МС, де МС детектор підвищуватиме чутливість методики. Враховуючи результати, отримані при валідації аналітичних методик та вивченні «зеленості», ми рекомендуємо 9 (рухома фаза – АСН – 0.15 % $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (60:40), хроматографічна колонка – Zorbax CN SB) та 10 (рухома фаза – АСН – 0.15 % $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (50:50), хроматографічна колонка – Zorbax CN SB)

варіації як оптимальні, оскільки стостерігається низьке значення МВ та МКВ, експресність (час хроматографування – 3.5 хв), бал за методом AGREE – 0.77.

8. Теоретично та практично обґрунтовано можливість застосування ВЕРХ-МС/МС для кількісного визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові. Для оптимізації ефективної хроматографічної роздільної здатності метопрололу та мельдонію проведено попередні експериментальні дослідження доцільності використання різних сумішей розчинників, таких як АСН, MeOH та FA. Роздільна здатність піків метопрололу досягалася за допомогою колонки Discovery C18 50 мм × 2.1 мм, 5 мкм та мельдонію – ZORBAX HILIC Plus 50 мм × 2.1 мм, 3.5 мкм. Зразки метопрололу хроматографували в градієнтному режимі (елюент А (АСН – H₂O – FA, 5:95:0.1), елюент В (АСН – FA, 100:0.1)). Зразки мельдонію хроматографували в ізократичному режимі, використовуючи як рухоми фазу H₂O – АСН – амонію форміатний буфер 200 мМ (20:75:5). Проведено валідацію біоаналітичної методики. Результати вивчення всіх валідаційних параметрів вказують на відповідність критеріям прийнятності. Запропонована біоаналітична методика визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові є екологічно безпечною, що підтверджено результатами вивчення «зеленості» методами аналітичної еко-шкали, AGREE та GAPI. Розроблена біоаналітична методика визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові може бути застосована лабораторіями з вивчення фармакокінетики та біоеквівалентності ЛЗ, які містять метопролол та мельдоній.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Beta-Blocker Evaluation in Survival Trial. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00000560> (accessed on 7 July 2023)
2. Metoprolol tartrate. Available from: <https://go.drugbank.com/salts/DBSALT000862> (accessed on 7 July 2023).
3. European Pharmacopoeia. 11th ed. 2022. Available from: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph.-eur.-11th-edition> (accessed on 4 August 2023)
4. Dambrova M, Liepinsh E, Kalvinsh I. Mildronate: Cardioprotective action through carnitine-lowering effect. *Trends Cardiovasc Med.* 2002;12(6):275-9.
5. Sjakste N, Kalvinsh I. Mildronate: An antiischemic drug with multiple indications. *Pharmacologyonline* 2006;1:1-18.
6. Hughes D. Meldonium and the WADA Prohibited List. *Australian Prescriber.* 2016;39(3):102.
7. Meldonium: Uses, Interactions, Mechanism of Action. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB13723> (accessed on 5 August 2023)
8. Volynskiy D, Vakaliuk I. Use of meldonium in the treatment of patients with coronary artery disease and concomitant arterial hypertension. *EUREKA: Health Sciences.* 2019;6:9-14.
9. US Pharmacopeia. Available from: <https://www.usp.org/> (accessed on 4 August 2023)
10. Cesme, M, Tarinc, D, Golcu, A. Spectrophotometric Determination of metoprolol tartrate in pharmaceutical dosage forms on complex formation with Cu(II). *Pharmaceutics.* 2011;4(7):964-75.
11. Nabil AF, Eman MS. Spectrophotometric determination of metoprolol in pharmaceutical formulation by charge transfer complexation. *Int J Chem Stud.* 2015;3(2):24-9.
12. Donchenko A, Vasyuk S. Spectrophotometric determination of metoprolol tartrate in pure and dosage forms. *J Fac Pharm Ankara.* 2018;42(1):33-42.

13. Yilmaz B. Determination of metoprolol in pharmaceutical preparations by zero-,first-, second- and third- order derivative spectrophotometric method. *Int J of Pharma and BioSci.* 2010;12:1-15.

14. Jadhav AS, Tarkase KN, Deshpande AP. Quantitative determination of metoprolol succinate in bulk and tablet dosage form through comparative study of UV and derivative Spectroscopy. *Der Pharm Lett.* 2012;4(3):763-7.

15. Rahman N, Rahman H, Aami SN. Validated kinetic spectrophotometric method for the determination of metoprolol tartrate in pharmaceutical formulations. *Chem Pharm Bull.* 2005;53(8):942-8.

16. Vachhani KH, Patel SA. (Development and Validation of Spectrophotometric Method for Simultaneous Determination of Metoprolol Succinate and Olmesartan Medoxomil in Tablet Dosage Form. *Asian Journal of Pharmacy and Life Science.* 2011;1(3):224-31.

17. Vora BN, Parmar RR, Nayak PP, Shah DA. Development and validation of the simultaneous UV spectrophotometric method for estimation of metoprolol succinate and olmesartan medoxomil in the tablet dosage form. *Pharmaceutical methods.* 2012;3(1):44-7.

18. Patel ES, Hinge MA, Patel AA. Development and Validation of UV Spectrophotometric Methods for Simultaneous Estimation of Trimetazidine hydrochloride and Metoprolol succinate in Tablet Dosage Form *J Pharm Sci Bioscientific Res.* 2016;6(6):773-84.

19. Hussain S, Munjewar RR, Farooqui M. Development and validation of a simultaneous HPLC method for quantification of amlodipine besylate and metoprolol tartrate in tablets. *J PharmaSciTech.* 2012;1(2):1-5.

20. Singh BK, Patel DK, Ghosh SK. Development of Reverse-Phase HPLC method for simultaneous analysis of metoprolol succinate and hydrochlorothiazide in a tablet formulation. *Trop J Pharm Res.* 2009;8(6):539-43.

21. Prasad PH, Patel PM, Vijaysree D, Reddy YS, Ranjith KB. Simultaneous estimation of metoprolol tartrate and chlorthalidone by using RP-HPLC and method development as per ICH guidelines. *Der Pharma Chem.* 2013;5(5):139-43.

22. Mahaparale SP, Gonjari ID, Jayaveera KN. Stability indicating HPLC method for simultaneous estimation of metoprolol succinate and telmisartan. *J Liq Chromatogr Relat.* 2013;36(18):2601-11.

23. Braza AJ, Modamio P, Lastra CF, Marino EL. Development, validation and analytical error function of two chromatographic methods with fluorometric detection for the determination of bisoprolol and metoprolol in human plasma. *Biomed Chromatogr.* 2002;16(8):517-22.

24. Chiu FCK, Damani LA, Li RC, Tomlinson B. Efficient high-performance liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of metoprolol and two main metabolites in human urine by solid-phase extraction and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* 1997;696(1):69-74.

25. Johnson RD, Lewis RJ. Quantitation of atenolol, metoprolol, and propranolol in postmortem human fluid and tissue specimens via LC/APCI-MS. *Forensic Sci Int.* 2006;156(2-3):106-17.

26. Jensen BP, Sharp CF, Gardiner SJ, Begg EJ. Development and validation of a stereoselective liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for quantification of S and R-metoprolol in human plasma. *J Chromatogr B.* 2008;865(1-2):48-54.

27. Gowda KV, Mandal U, Selvan PS, Solomon WDS, Ghosh A, Sarkar AK, et al. Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of metoprolol tartrate and ramipril in human plasma. *J Chromatogr B.* 2007;858(1-2):13-21.

28. Albers S, Elshoff JP, Volker C, Richter A, Laer S. HPLC quantification of metoprolol with solid-phase extraction for the drug monitoring of pediatric patients. *Biomed Chromatogr.* 2005;19(3):202-7.

29. Thakker N, Shinde G, Dharamsi A, Choudhari V, Pawar S. Development and Validation of Bioanalytical Method for Simultaneous Estimation of Olmesartan medoximil and Metoprolol succinate by UHPLC-MS/MS

in human plasma. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2022;15(7):2909-16.

30. Thakker N, Shinde G, Dharamsi A, Choudhari V. Development and Validation of SI/RS-UHPLC-PDA Method for Olmesartan Medoxomil and Metoprolol Succinate-Related Substance. *Turkish Journal of Pharmaceutical Science*. 2023;20(1):39-47.

31. Hinge MA, Mahida RJ, Sojitra P S. Development and validation of an RP-HPLC method for simultaneous determination of trimetazidine hydrochloride and metoprolol succinate. *International Journal of Chemistry and pharmaceutical analysis*. 2015;2(2):77-83.

32. Olabemiwo O M, Mahesh P, Rao N, Rao VJ. Development and Validation of RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Metoprolol Succinate and Olmesartan Medoxomil in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form. *Asian Journal of Chemistry*. 2012;24(6):2762.

33. Wang H, Zhao X, Xu J, Wang P, Chen X, Liao X, Zhan C. Analysis of β -blockers and β 2-agonists in environmental and biological samples by magnetic solid-phase extraction combined with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*. 2022;45(13):2321-33.

34. Soni S, Ram V, Verma D, Verma A. Analytical method development and validation of metoprolol succinate by high performance liquid chromatography and ultraviolet spectroscopy technique. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2021;14(2):931-7.

35. Younes OM, Ali FA, Assaf ZA. Enantioseparation of Metoprolol Tartrate using HPLC by Adding Methyl beta Cyclodextrin to the mobile Phase (As Chiral Additive). *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2018;11(9):3937-42.

36. Elmongy H, Ahmed H, Wahbi AA, Amini A, Colmsjö A, Abdel-Rehim M. Determination of metoprolol enantiomers in human plasma and saliva samples

utilizing microextraction by packed sorbent and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 2016;30(8):1309-17.

37. Jain N, Jain DK, Jain R, Patel P, Patel VK, Jain SK. Simultaneous estimation of metoprolol succinate and lacidipine in binary combination using high performance liquid chromatographic method. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;9(3):193-202.

38. Iram M, Shobha Rani RH. Estimation of metoprolol in human plasma by HPLC method. *Int J Pharm Pharma Sci*. 2015;7(1):442-6.

39. Lv Y-F, Hu X, Bi K-S. Determination of mildronate in human plasma and urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2007;852(1-2):35-9.

40. Peng Y, Yang J, Wang Z, Wang J, Liu Y, Luo Z, Wen A. Determination of mildronate by LC–MS/MS and its application to a pharmacokinetic study in healthy Chinese volunteers. *Journal of Chromatography B*. 2010;878(5-6):551-6.

41. Pidpruzhnykov YV, Sabko VE, Iurchenko VV, Zupanets IA. UPLC-MS/MS method for bioequivalence study of oral drugs of meldonium. *Biomedical Chromatography*. 2011;26(5):599-605.

42. Görgens C, Guddat S, Dib J, Geyer H, Schänzer W, Thevis M. Mildronate (Meldonium) in professional sports—monitoring doping control urine samples using hydrophilic interaction liquid chromatography–high resolution/high accuracy mass spectrometry. *Drug testing and analysis*. 2015;7(11-12):973-9.

43. Oliveira D, de Araújo A, Ribeiro W, Silva D, Duarte AC, de Sousa V, Pereira HG. Screening method of mildronate and over 300 doping agents by reversed-phase liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021;195:113870.

44. Sahartova O, Shatz V, Kalviš I. HPLC analysis of mildronate and its analogues in plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1993;11(10):1045-7.

45. Kim Y, Jeong D, Min H, Sung C, Park JH, Son J, Kim KH. Method for screening and confirming meldonium in human urine by high-resolution mass

spectrometry and identification of endogenous interferences for anti-doping testing. *Mass Spectrometry Letters*. 2017;8(2):39-43.

46. Görgens C, Guddat S, Bosse C, Geyer H, Pop V, Schänzer W, Thevis M. The atypical excretion profile of meldonium: Comparison of urinary detection windows after single- and multiple-dose application in healthy volunteers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017;138:175-9.

47. Cai L-J, Zhang J, Peng W-X, Zhu R-H, Yang J, Cheng G, Wang X-M. Determination of Mildronate in Human Plasma and Urine by UPLC–Positive Ion Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Chromatographia*. 2011;73(7-8):659-65.

48. Tretzel L, Görgens C, Geyer H, Thomas A, Dib J, Guddat S, et al. Analyses of Meldonium (Mildronate) from Blood, Dried Blood Spots (DBS), and Urine Suggest Drug Incorporation into Erythrocytes. *International Journal of Sports Medicine*. 2016;37(6):500-2.

49. Forsdahl G, Jančić-Stojanović B, Anđelković M, Dikić N, Geisendorfer T, Jeitler V, Gmeiner G. Urinary excretion studies of meldonium after multidose parenteral application. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018;161:289-95. doi:

50. Hmelnickis J, Pugovičs O, Kažoka H, Viksna A, Susinskis I, Kokums K. Application of hydrophilic interaction chromatography for simultaneous separation of six impurities of mildronate substance. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008;48(3):649-56.

51. Lü RF, Cao GY, Hu X, Zhang JR. HPLC Assay and determination of related substance for mildronate injection. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2006;26(3):358-60.

52. Cao G, Lu R, Hu X. Determination of mildronate and related substances by HPLC-ELSD. *Chinese pharmaceutical journal*. 2005;40(11):864.

53. Donchenko A, Nahorna N, Vasyuk S. Development and validation of spectrophotometric method for the determination of meldonium dihydrate in dosage forms. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2018;4(14):23-7.

54. Raccary B, Loubet P, Peres C, Sonnemann G. Evaluating the environmental impacts of analytical chemistry methods: from a critical review towards a proposal using a life cycle approach. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2022;147:116525.

55. Martínez J, Cortés JF, Miranda R. Green chemistry metrics, a review. *Processes*. 2022;10(7):1274.

56. Ballester-Caudet A, Campíns-Falcó P, Pérez B, Sancho R, Lorente M, Sastre G, González C. A new tool for evaluating and/or selecting analytical methods: Summarizing the information in a hexagon. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2019;118:538-47.

57. Nowak PM, Koscielniak P, Tobiszewski M, Ballester-Caudet A, Campíns-Falco P. Overview of the three multicriteria approaches applied to a global assessment of analytical methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2020;133:116065.

58. Nowak PM, Koscielniak P. What color is your method? Adaptation of the RGB additive color model to analytical method evaluation. *Anal Chem*. 2019;91(16):10343-52.

59. Ballester-Caudet A, Campíns-Falcó P, Pérez B, Sancho R, Lorente M, Sastre G, González C. A new tool for evaluating and/or selecting analytical methods: summarizing the information in a hexagon. *TrAC Trends Anal Chem*. 2019;118:538-47.

60. Sajid M, Płotka-Wasyłka J. Green analytical chemistry metrics: A review. *Talanta*. 2022;238(Pt 2):123046.

61. Paul A, Eghbali N. Green chemistry: principles and practice. *Chem Soc Rev*. 2010;39:301-12.

62. Paul BD. A history OF the concept of sustainable development: literature review. *Ann Univ Oradea, Econ Sci Ser*. 2008;17(2):581-5.

63. Płotka-Wasyłka J, Mohamed HM, Kurowska-Susdorf A, Dewani R, Fares MY, Andruch V. Green analytical chemistry as an integral part of sustainable education development. *Curr Opin Green Sustain Chem*. 2021;31:100508.

64. Tobiszewski M, Marć M, Gałuszka A, Namieśnik J. Green chemistry metrics with special reference to green analytical chemistry. *Molecules*. 2015;20:10928-46.

65. Tobiszewski M. Metrics for green analytical chemistry. *Anal Methods*. 2016;8:2993-9.

66. da Silva Burato JS, Medina DAV, Toffoli AL, Maciel EVS, Lanças FM. Recent advances and trends in miniaturized sample preparation techniques. *J Separ Sci*. 2020;43(1):202-25.

67. Hartman R, Helmy R, Al-Sayah M, Welch CJ. Analytical Method Volume Intensity (AMVI): a green chemistry metric for HPLC methodology in the pharmaceutical industry. *Green Chem*. 2011;13:934-9.

68. Kelani K., Gad A., Fayez Y., Mahmoud A., Abdel-Raouf A. Three developed spectrophotometric methods for determination of a mixture of ofloxacin and ornidazole; application of greenness assessment tools. *BMC Chemistry*. 2023; 17: 1-12.

69. Gałuszka A, Migaszewski ZM, Konieczka P, Namieśnik J. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2012;37:61-72.

70. Pena-Pereira F, Wojnowski W, Tobiszewski M. AGREE–Analytical GREENness metric approach and software. *Analytical chemistry*. 2020;92(14):10076-82.

71. Płotka-Wasyłka J. A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. *Talanta*. 2018;181:204-9.

72. Płotka-Wasyłka J, Wojnowski W. Complementary green analytical procedure index (ComplexGAPI) and software. *Green Chemistry*. 2021;23(21):8657-65.

73. Nowak PM, Wietecha-Posłuszny R, Pawliszyn J. White Analytical Chemistry: An approach to reconcile the principles of Green Analytical Chemistry and functionality. *TrAC Tren Anal Chem*. 2021;138:116223.

74. Державна фармакопея України. 2-е вид. Доповнення 4. Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»; 2020. с. 123-236.

75. ICH [International Council of Harmonisation], Expert Working Group. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). 2005. Available from: [https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/Q2\(R1\).pdf](https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/Q2(R1).pdf)

76. Горин ММ, Логойда ЛС. Розробка спектрофотометричної методики визначення метопрололу в лікарських засобах. Медична та клінічна хімія. 2022;2:105-11.

77. Монайкіна ЮВ. Застосування сульфоталеїнових барвників у спектрофотометричному аналізі лікарських засобів [дисертація]. Запоріжжя: Запорізький державний медичний університет; 2011. 177 с.

78. Жук ЮМ, Васюк СО. Застосування сульфоталеїнових барвників в аналізі бета-адреноблокаторів. Український науково-медичний молодіжний журнал. 2013;4(74):322-3.

79. Жук ЮМ, Васюк СО, Кейтлін ІМ. Спектрофотометричне визначення біспрололу за реакцією з тимоловим синім. Запорізький медичний журнал. 2012;72(3):62-4.

80. Basavaiah K, Chandrashekar U, Prameela H, Nagegowda P. Quantitative determination of propranolol with bromate and methyl orange. Acta Ciencia Indica. Chemistry. 2003;29:25-30.

81. Лебідь ЮМ. Спектрофотометричне визначення сальбутамолу в аерозолі за реакцією з бромкрезоловим зеленим. Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики. 2011;XXIV(2):90-2.

82. Panainte AD, Bibire N, Tantar G, Mihaipostu M, Madalina V, Vasile D. A New Method for the Assay of Bisoprolol Using Bromocresol Green. Rev Chim (Bucharest). 2014;65(8):916-20.

83. Бурлака ЮВ, Тарханова ОО, Васюк СО. Спектрофотометричне визначення цефтриаксону. Запорізький медичний журнал. 2009;6:93-4.

84. Бурлака ЮВ, Портна КП, Тарханова ОО, Васюк СО. Спектрофотометричне визначення деяких цефалоспоринів за реакцією з крезоловим червоним. Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики. 2010;XXIII(4):17-9.

85. Бурлака ЮВ, Тарханова ОО, Васюк СО, Кейтлін ІМ. Спектрофотометричне визначення клотримазолу у лікарських формах. Запорізький медичний журнал. 2010;4:63-6.

86. Бурлака ЮВ, Тарханова ОО, Васюк СО, Кейтлін ІМ. Визначення флуконазолу в лікарських формах за реакцією з бромтимоловим синім. Фармацевтичний журнал. 2010;3:69-75.

87. Prashanth KN, Basavaiah K, Raghu MS. Rapid and Sensitive Spectrophotometric Measurement of Non-Specific Beta Blocker Propranolol Hydrochloride Using Three Sulphonphthalein Dyes In Pure Form, Pharmaceuticals and Human Urine. Chemical Sciences Journal. 2012;2012:CSJ-80.

88. Cardoso SG, Ieggli CV, Pomblum SC. Spectrophotometric determination of carvedilol in pharmaceutical formulations through charge-transfer and ion-pair complexation reactions. Pharmazie. 2007;62(1):34-7.

89. Liu S, Zhang Z, Liu Q, Luo H, Zheng W. Spectrophotometric determination of vitamin B1 in a pharmaceutical formulation using triphenylmethane acid dyes. J Pharm Biomed Anal. 2002;30(3):685-94.

90. Aydogmus Z, Barla A. Spectrophotometric determination of doxazosin mesylate in tablets by ion-pair and charge-transfer complexation reactions. J AOAC Int. 2009;92(1):1231-37.

91. Ramesh KC, Gowda BG, Melwanki MB, Seetharamappa J, Keshavayya J. Extractive spectrophotometric determination of antiallergic drugs in pharmaceutical formulations using bromopyrogallol red and bromothymol blue. Anal Sci. 2001;17(9):1101-3.

92. Erk N. Spectrophotometric determination of indinavir in bulk and pharmaceutical formulations using bromocresol purple and bromothymol blue. Pharmazie. 2004;59(3):183-6.

93. Gowda BG, Melwanki MB, Seetharamappa J. Extractive spectrophotometric determination of ceterizine in pharmaceutical preparations. *J Pharm Biomed Anal.* 2001;25(5-6):1021-6.

94. El-Didamoni AM. Extractive spectrophotometric methods for the determination of oxomemazine hydrochloride in bulk and pharmaceutical formulations using bromocresol green, bromocresol purple and bromophenol blue. *Arch Pharm.* 2005;338(4):190-7.

95. Rahman N, Hejaz Azmi SN. Extractive spectrophotometric methods for determination of diltiazem HCl in pharmaceutical formulations using bromothymol blue, bromophenol blue and bromocresol green. *J Pharm Biomed Anal.* 2000;24(1):33-41.

96. Rahman N, Ahmad Khan N, Hejaz Azmi SN. Extractive spectrophotometric methods for the determination of nifedipine in pharmaceutical formulations using bromocresol green, bromophenol blue, bromothymol blue and eriochrome black T. *II Farmaco.* 2004;59(1):47-54.

97. Ashour S, Chenna MF, Bayram R. Spectrophotometric determination of alfuzosin HCL in pharmaceutical formulations with some sulphonephthalein dyes. *Int J Biomed Sci.* 2006;2(3):273-9.

98. Suslu I, Tamer A. Spectrophotometric determination of enoxacin as ion-pairs with bromophenol blue and bromocresol purple in bulk and pharmaceutical dosage form. *J Pharm Biomed Anal.* 2002;29(3):545-54.

99. Marona HR, Schapoval EE. Spectrophotometric determination of sparfloxacin in Pharmaceutical formulations using bromothimol blue. *J Pharm Biomed Anal.* 2001;26(3):501-4.

100. Ashour S, Al-Khalil R. Simple extractive colorimetric determination of levofloxacin by acid-dye complexation methods in pharmaceutical preparations. *Farmaco.* 2005 Sep;60(9):771-5.

101. Amin AS, El-Fetouh Gouda AA, El-Sheikh R, Zahran F. Spectrophotometric determination of gatifloxacin in pure form and in pharmaceutical formulation. *Spectrochim. Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2007;67(5):1306-12.

102. Mostafa S, El-Sadek M, Alla EA. Spectrophotometric determination of enrofloxacin and pefloxacin through ion-pair complex formation. *J Pharm Biomed Anal.* 2002;28(1):173-80.

103. Nour El-Dien FA, Mohamed GG, Mohamed NA. Spectrophotometric determination of trazodone, amineptine and amitriptyline hydrochlorides through ion-pair formation using methyl orange and bromocresol green reagents. *Spectrochim. Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2006;65(1):20-6.

104. Ulu ST, Aydogmus Z. A new spectrophotometric method for the determination of tianeptine in tablets using ion-pair reagents. *Chem Pharm Bull.* 2008;56(12):1635-8.

105. Shulyak N, Protsyk S, Kucher T, Kryskiw L, Poliak O, Zarivna N, Logoyda L. Development of the spectrophotometric method for the determination of atorvastatin in tablets by using bromothymol blue. *ScienceRise: Pharmaceutical Science.* 2022;4(38):89-97.

106. Shulyak N, Protsyk S, Kucher T, Kryskiw L, Poliak O, Mosula L, Logoyda L. Development of the Spectrophotometric Method for the Determination of Atorvastatin Calcium in Tablets by using Bromophenol Blue. *Methods and objects of chemical analysis.* 2022;17(3):111-7.

107. Peleshok K, Bondar B, Kryskiw L, Kucher T, Poliak O, Logoyda L. Non-extractive spectrophotometric determination of valsartan in pure form and in pharmaceutical products by ion-pair complex formation with bromophenol blue and methyl red. *Pharmacia.* 2021;68(4):851-8.

108. Горин М, Мельник О, Логойда Л. Застосування сульфопталеїнових барвників у фармацевтичному аналізі метопрололу. В: Матеріали ХІХ наукової конференції Львівські хімічні читання- 2023; 2023 Трав. 29-31; Львів. Львів; 2023. с. 117.

109. Horyn M, Kucher T, Kryskiw L, Poliak O, Zarivna N, Peleshok K, Logoyda L. Development of the spectrophotometric method for the determination of metoprolol tartrate in tablets by using bromocresol green. *ScienceRise: Pharmaceutical Science.* 2022;5(39):55-63.

110. Horyn M, Kucher T, Kryskiw L, Poliak O, Logoyda L. Development of the spectrophotometric method for the determination of metoprolol tartrate in tablets by using bromocresol green. В: Матеріали ІХ науково-практичної конференції з міжнародною участю Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів; 2022 Верес. 22-23; Тернопіль. Тернопіль; 2022. с. 94.

111. Horyn M, Kryskiw L, Kucher T, Poliak O, Zarivna N, Zahrychuk H, Korobko D, Peleshok K, Logoyda L. Development of the spectrophotometric method for the determination of metoprolol in tablets by using bromophenol blue. ScienceRise: Pharmaceutical Science. 2022;6(40):36-42.

112. Horyn M, Logoyda L. Development of spectrophotometric method for the determination of metoprolol in tablets by using bromphenol blue. MOL2NET'22, Conference on Molecular, Biomedical & Computational Sciences and Engineering, 8th ed. congress CHEMBIOMOL-08: Chem. Biol., Org. Chem., Med. Chem., Pharm. Ind., & Mol. Biol. Congress; 2022 December 24; Paris. Paris, France-Galveston, USA, 2022. с. 1-2.

113. Horyn M., Piponski M., Melnyk O., Ivanchuk I., Susla O., Grytsyshyn L., Korobko D., Logoyda L. Development of the Spectrophotometric Method for the Determination of Metoprolol in Tablets by using Bromothymol Blue. Methods and objects of chemical analysis. 2023;18(2):63-69.

114. Horyn M, Melnyk O. Development of the spectrophotometric method for the determination of metoprolol in tablets by using bromothymol blue. В: Матеріали XXVII конгресу студентів та молодих учених Майбутнє за наукою»; 2023 Квіт. 10-12; Тернопіль. Тернопіль; 2023. с. 176.

115. Горин ММ, Тифонюк ЮВ, Логойда ЛС. Експериментальні підходи до вибору реагенту для спектрофотометричної методики визначення мельдонію в лікарських засобах. В: Матеріали XV Всеукраїнської наукової конференції студентів та аспірантів Хімічні Каразінські читання – 2023; 2023 Квіт. 24-26; Харків. Харків; 2023. с. 68.

116. Горин ММ, Тивонюк ЮВ, Логойда ЛС. Розробка спектрофотометричної методики визначення мельдонію в капсулах за реакцією з алізарином. В: Матеріали Міжнародної Internet-конференції Modern chemistry of medicines; 2023 Трав. 18; Харків. Харків; 2023. с. 140.
117. Alizarin. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Alizarin> (accessed on 10 May 2023)
118. Swartz M. HPLC detectors: A brief review. *J Liq Chromatogr Relat. Technol.* 2010;33(9-12):1130-50.
119. Sahu PK, Ramiseti NR, Cecchi T, Swain S, Patro CS, Panda J. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2018;147:590-611.
120. Hibbert DB. Experimental design in chromatography: a tutorial review. *J Chromatogr B.* 2012;910:2-13.
121. Napolitano-Tabares PI, Negrín-Santamaría I, Gutiérrez-Serpa A, Pino V. Recent efforts to increase greenness in chromatography. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry.* 2021;32:100536.
122. Płotka J, Tobiszewski M, Sulej AM, Kupaska M, Górecki T, Namieśnik J. Green chromatography. *Journal of Chromatography A.* 2013;1307:1-20.
123. Cecchi T. *Ion-Pair Chromatography and Related Techniques.* CRC Press Taylor & Francis Group LLC, Boca Raton FL; 2009. 215 p.
124. Kazakevich YV, Lobrutto R. *HPLC for pharmaceutical scientists.* John Wiley & Sons; 2007. p. 206-228.
125. Khan I, Mulpuri K, Das B, Mohiuddin MD, Rahman MHUr. Analytical Techniques (Chromatography, Spectroscopy, Electrophoresis) In *Pharmaceutical Analysis: A Review.* *International Journal of Research in Pharmaceutical and Nano Sciences.* 2015;4(1):19-27.
126. Kupiec T. Quality control Analytical Methods: high-performance liquid chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Compounding.* 2004;8(3):233-7.

127. Ahuja S. High Pressure Liquid Chromatography. In: Ahuja S, Jespersen N. (eds.). *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier; 2006. Chapter 15. p. 486-559.
128. Atole D., Deokate U. Insight into baseline troubles and problem resolutions in high-performance liquid chromatography. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2020;13:35-38.
129. Lindholm J. Development and Validation of HPLC Methods for Analytical and Preparative Purposes. *Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology* 995. Uppsala; 2004. 87 p.
130. 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.
131. Patil VP, Tathe RD, Devdhe SJ, Angadi SS, Kale SH. Ultra-performance liquid chromatography: A review. *International Research Journal of Pharmacy*. 2011;2(6):39-44.
132. Anagha SP. A Review On Ultra Performance Liquid Chromatography. *Asian Journal of Pharmaceutical Technology and Innovation*. 2015;3(10):86-96.
133. Srivastava B. Ultra-performance liquid chromatography (UPLC): A chromatography technique. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*. 2010;2(1):19-25.
134. 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.
135. Kumar A, Saini G, Nair A, Sharma R. UPLC: A preeminent technique in pharmaceutical analysis. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*. 2012;69(3):1-381.

136. Deore S, Saudagar R. A review on ultra-performance liquid chromatography (UPLC): a chromatography technique. *International Journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences*. 2016;5(3):223.
137. Novakova L, Matysova L, Solich P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*. 2006;8(3):908-18.
138. Chawla G, Ranjan C. Principle, Instrumentation, and Applications of UPLC: A Novel Technique of Liquid Chromatography. *Open Chemistry Journal*. 2016;3:1-16.
139. 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.
140. 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.
141. Gaikwad PV, Sawant SD, Ghante MR, Munot NM. Ultra-Performance Liquid Chromatography: A recent novel development in HPLC. *International Journal of Comprehensive Pharmacy*. 2010;2(08):1-3.
142. Gumułka P, Zandarek J, Dąbrowska M, Starek M. UPLC Technique in Pharmacy – An Important Tool of the Modern Analyst. *Processes*. 2022;10(12):2498.
143. 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.
144. 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.
145. Ahuja S, Dong MW. *Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC*. Amsterdam: Elsevier science; 2005. 679 p.
146. Sadek PC. *The HPLC Solvent Guide*. Second ed. New York: Wiley & Sons; 2002. 664 p.

147. Espinoza S, Bosch E, Roses M. Retention of ionizable compounds in HPLC. 14. Acid-base pK values in acetonitrile-water mobile phases. *J Chromatogr A*. 2002;964(1-2):55-66.

148. Kazakevich YV, LoBrutto R, Vivilecchia R. Reversed-phase high-performance liquid chromatography behavior of chaotropic counteranions. *J Chromatogr A*. 2005;1064(1):9-18.

149. Flieger J. The effect of chaotropic mobile phase additives on the separation of selected alkaloids in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2006;1113(1-2):37-44.

150. Pilorz K, Choma I. Isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of tetracyclines and flumequine controlled by a chaotropic effect. *Journal of Chromatography A*. 2004;1031(1-2):303-5.

151. Shulyak N, Piponski M, Kovalenko S, Bakovska Stoimenova T, Drapak I, et al. Chaotropic salts impact in HPLC approaches for simultaneous analysis of hydrophilic and lipophilic drugs. *Journal of Separation Science*. 2021;44(15):2908-16.

152. Zhang Y, Cremer PS. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2006;10(6):658-63.

153. Gurau MC, Lim SM, Castellana ET, Albertorio F, Kataoka S, Cremer PS. On the mechanism of the Hofmeister effect. *J Am Chem Soc*. 2004;126(34):10522-3.

154. Horyn M, Piponski M, Zaremba 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.

155. Horyn M, Piponski M, Zaremba T, Logoyda L. Approaches to the selection of the optimal mobile phases in the development of HPLC method for the determination of meldonium in dosage forms. In: Abstracts of 19th Hellenic

Symposium on Medicinal Chemistry (HSMC-19); 2023 March 9-11; Patras. Patras; 2023. p. 1.

156. Piponski M, Horyn M, Grncaroska K, Oleshchuk O, Petrovska E, Angelevski S, Uglyar T, Kucher T, Logoyda L. Concepts for a new rapid and simple HPLC method for simultaneous determination of Metoprolol and Meldonium in pharmaceutical dosage forms. *Sci Pharm.* 2022;90(4):65.

157. Horyn M. Possibilities of simultaneous chromatographic determination of metoprolol and meldonium in medicines. В: Матеріали XXVI міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених; 2022 Квіт. 13-15; Тернопіль. Тернопіль; 2022. с. 139.

158. Rathod RH, Chaudhari SR, Patil AS, Shirkhedkar AA. Ultra-high performance liquid chromatography-MS/MS (UHPLCMS/MS) in practice: Analysis of drugs and pharmaceutical formulations. *Future J Pharm Sci.* 2019;5(1):6.

159. Pradip P., Krunal K. Bioanalytical Method Development and Validation: A Review. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research.* 2023;27:377-390.

160. Tiwari G., Tiwari R. Bioanalytical method validation: An updated review. *Pharm Methods.* 2010;1:25-38.

161. Murugan S, Pravallika N, Sirisha P, Chandrakala K. Bioanalytical Method Development And Validation By Using LC-MS/MS. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences.* 2013;6(1):41-5.

162. Logoyda L, Kovalenko S, Gaafar M, Abdel-Megied AM, Elbarbry FA. A validated LC-MS/MS method for the quantification of amlodipine, bisoprolol, enalapril and enalaprilat – Application to pharmacokinetic study in healthy volunteers. *Microchemical Journal.* 2020;155:104700.

163. Horyn M, Logoyda L. Bioanalytical method development and validation for the determination of metoprolol and meldonium in human plasma. *Pharmacia.* 2020;67(2):39-48.

164. Horyn M, Logoyda L. LC-MS/MS method development the determination of metoprolol and meldonium in human plasma. In: *Current trends in pharmaceutical*

chemistry and standardization of medicines; 2021 May 25-26; Ternopil. Ternopil; 2021. с. 44.

165. Горин М. Розробка біоаналітичної методики визначення мельдонію та метопрололу в плазмі крові. В: Матеріали XXIV Міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених; 2020 Квіт. 13-15; Тернопіль. Тернопіль; 2020. с. 144.

166. Logoyda L, Horyn M, Kovalenko S, Berest G. Method Development and Validation for the Determination of Meldonium and Metoprolol in Human Plasma by using LC-MS/ MS. In: Abstracts of the Dubai international pharmaceuticals & technologies conference & exhibition; 2020 February 25-27; Dubai. Dubai; 2020. p. 36.

167. Logoyda L, Horyn M, Kovalenko S. Development of the method for determination of metoprolol in human plasma. In: Abstracts of the 10th International Pharmaceutical Conference Science and Practice 2019; 2019 November 15; Kaunas. Kaunas; 2019. p. 86.

168. Логойда ЛС, Горин ММ, винахідники; Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, патентовласник. Спосіб хроматографічного визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові. Патент України № 143684. 2020 серп. 10.

169. Guideline on bioanalytical method validation / European Medicines Agency (EMA/CHMP/EWP/192217/2009). 2011. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf.

170. Валидация биоаналитического метода: метод. рекомендации. Киев: ГП «Государственный экспертный центр»; 2013. 35 с.

171. International Council for Harmonization. ICH Guideline M10 on Bioanalytical Method Validation – Scientific guideline. 2019. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline>

172. Kollipara S, Bende G, Agarwal N, Varshney B, Paliwal J. International guidelines for bioanalytical method validation: a comparison and discussion on current scenario. *Chromatographia*. 2011;73(3):201-17.

173. Клименко ЛЮ. Комплексний підхід до розробки та валідації методик кількісного визначення аналітів у біологічних ріднах в хіміко-токсикологічному аналізі [дисертація]. Харків: Національний фармацевтичний університет; 2016. 434 с.

174. Добрава ВЄ, Коваленко СМ, Малоштан ЛМ, Степанова КО. Валідація біоаналітичних методів для фармакологічних досліджень лікарських засобів згідно вимог стандарту ДСТУ ISO/IEC 17025:2005. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*. 2009;4(6):9-14.

ДОДАТОК А

Список публікацій здобувача:

1. Горин ММ, Логойда ЛС. Розробка спектрофотометричної методики визначення метопрололу в лікарських засобах. Медична та клінічна хімія. 2022;2:105-11.
2. Horyn M, Kucher T, Kryskiw L, Poliak O, Zarivna N, Peleshok K, Logoyda L. Development of the spectrophotometric method for the determination of metoprolol tartrate in tablets by using bromocresol green. ScienceRise: Pharmaceutical Science. 2022;5(39):55-63. **(SCOPUS)**
3. Horyn M, Kryskiw L, Kucher T, Poliak O, Zarivna N, Zahrychuk H, Korobko D, Peleshok K, Logoyda L. Development of the spectrophotometric method for the determination of metoprolol in tablets by using bromophenol blue. ScienceRise: Pharmaceutical Science. 2022;6(40):36-42. **(SCOPUS)**
4. Horyn M., Piponski M., Melnyk O., Ivanchuk I., Susla O., Grytsyshyn L., Korobko D., Logoyda L. Development of the Spectrophotometric Method for the Determination of Metoprolol in Tablets by using Bromothymol Blue. Methods and objects of chemical analysis. 2023;18(2):63-69. **(SCOPUS)**
5. Horyn M, Piponski M, Zaremba 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):14-222. **(SCOPUS)**
6. Piponski M, Horyn M, Grncaroska K, Oleshchuk O, Petrovska E, Angelevski S, Uglyar T, Kucher T, Logoyda L. Concepts for a new rapid and simple HPLC method for simultaneous determination of Metoprolol and Meldonium in pharmaceutical dosage forms. Sci Pharm. 2022;90(4):65. **(SCOPUS)**
7. Horyn M, Logoyda L. Bioanalytical method development and validation for the determination of metoprolol and meldonium in human plasma. Pharmacia. 2020;67(2):39-48. **(SCOPUS)**

8. Логойда ЛС, Горин ММ, винахідники; Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, патентовласник. Спосіб хроматографічного визначення метопрололу та мельдонію в плазмі крові. Патент України № 143684. 2020 серп. 10.

9. Horyn M, Kucher T, Kryskiw L, Poliak O, Logoyda L. Development of the spectrophotometric method for the determination of metoprolol tartrate in tablets by using bromocresol green. В: Матеріали ІХ науково-практичної конференції з міжнародною участю Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів; 2022 Верес. 22-23; Тернопіль. Тернопіль; 2022. с. 94.

10. Horyn M, Logoyda L. Development of spectrophotometric method for the determination of metoprolol in tablets by using bromphenol blue. MOL2NET'22, Conference on Molecular, Biomedical & Computational Sciences and Engineering, 8th ed. congress CHEMBIOMOL-08: Chem. Biol., Org. Chem., Med. Chem., Pharm. Ind., & Mol. Biol. Congress; 2022 December 24; Paris. Paris, France-Galveston, USA, 2022. с.1-2.

11. Horyn M, Melnyk O. Development of the spectrophotometric method for the determination of metoprolol in tablets by using bromothymol blue. В: Матеріали XXVII конгресу студентів та молодих учених «Майбутнє за наукою»; 2023 Квіт. 10-12; Тернопіль. Тернопіль; 2023. с. 176.

12. Горин ММ, Тифонюк ЮВ, Логойда ЛС. Експериментальні підходи до вибору реагенту для спектрофотометричної методики визначення мельдонію в лікарських засобах. В: Матеріали XV Всеукраїнської наукової конференції студентів та аспірантів Хімічні Каразінські читання – 2023; 2023 Квіт. 24-26; Харків. Харків; 2023. с. 68.

13. Horyn M, Piponski M, Zarembo T, Logoyda L. Approaches to the selection of the optimal mobile phases in the development of HPLC method for the determination of meldonium in dosage forms. In: Abstracts of 19th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry (HSMC-19); 2023 March 9-11; Patras, Patras; 2023. p. 1.

14. Horyn M. Possibilities of simultaneous chromatographic determination of metoprolol and meldonium in medicines. В: Матеріали XXVI міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених; 2022 Квіт. 13-15; Тернопіль. Тернопіль; 2022. с. 139.

15. Horyn M, Logoyda L. LC-MS/MS method development the determination of metoprolol and meldonium in human plasma. In: Current trends in pharmaceutical chemistry and standardization of medicines; 2021 May 25-26; Ternopil. Ternopil; 2021. с. 44.

16. Горин М. Розробка біоаналітичної методики визначення мельдонію та метопрололу в плазмі крові. В: Матеріали XXIV Міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених; 2020 Квіт. 13-15; Тернопіль. Тернопіль; 2020. с. 144.

17. Logoyda L, Horyn M, Kovalenko S, Berest G. Method Development and Validation for the Determination of Meldonium and Metoprolol in Human Plasma by using LC-MS/ MS. In: Abstracts of the Dubai international pharmaceuticals & technologies conference & exhibition; 2020 February 25-27; Dubai. Dubai; 2020. p. 36.

18. Logoyda L, Horyn M, Kovalenko S. Development of the method for determination of metoprolol in human plasma. In: Abstracts of the 10th International Pharmaceutical Conference Science and Practice 2019; 2019 November 15; Kaunas. Kaunas; 2019. p. 86.

19. Горин ММ, Тивонюк ЮВ, Логойда ЛС. Розробка спектрофотометричної методики визначення мельдонію в капсулах за реакцією з алізарином. В: Матеріали Міжнародної Internet-конференції Modern chemistry of medicines; 2023 Трав. 18; Харків. Харків; 2023. с. 140.

20. Горин М, Мельник О, Логойда Л. Застосування сульфоталеїнових барвників у фармацевтичному аналізі метопрололу. В: Матеріали XIX наукової конференції Львівські хімічні читання- 2023; 2023 Трав. 29-31; Львів. Львів; 2023. с. 117.

ДОДАТОК Б

Відомості про апробацію результатів дисертації:

- VIII науково-практична конференція з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (м. Тернопіль, 22-23 вересня 2022 р.) – *публікація*;
- Міжнародна конференція MOL2NET'22, Conference on Molecular, Biomedical & Computational Sciences and Engineering, 8th ed. congress CHEMBIOMOL-08: Chem. Biol., Organic Chemistry, Medicinal Chemistry, Pharmaceutical Industry, & Molecular Biology Congress (Paris, France-Galveston, USA, December 24, 2022) – *постерна доповідь та публікація*;
- 19th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry (Patras, 9-11 March 2023) – *доповідь та публікація*;
- XXVII конгрес студентів та молодих учених «Майбутнє за наукою» (м. Тернопіль, 10-12 квітня 2023 р.) – *публікація*;
- XV Всеукраїнська наукова конференція студентів та аспірантів «Хімічні Каразінські читання – 2023» (м. Харків, 24–26 квітня 2023 р.) – *публікація*;
- XXVI міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених (м. Тернопіль, 13–15 квітня 2022 р.) – *публікація*;
- науково-практична конференція «Current trends in pharmaceutical chemistry and standardization of medicines» (м. Тернопіль, 25–26 травня 2021 р.) – *доповідь та публікація*;
- XXIV Міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених (м. Тернопіль, 13–15 квітня 2020 р.) – *публікація*;
- Dubai international pharmaceuticals & technologies conference & exhibition (Dubai, February 25-27, 2020) – *постерна доповідь та публікація*;
- 10th International Pharmaceutical Conference «Science and Practice 2019» (Kaunas, November 15, 2019) – *публікація*;

- XIX наукова конференція «Львівські хімічні читання – 2023» (м. Львів, 29–31 травня 2023 р.) – *публікація*;
- Міжнародна Internet-конференція «Modern chemistry of medicines» (м. Харків, 18 травня 2023 р.) – *публікація*.

ДОДАТОК В



ДОДАТОК Г.1



ЗАТВЕРДЖУЮ
 Начальник Державної служби з
 лікарських засобів та контролю за
 наркотиками Тернопільської області
 Тарас ПРОНІВ
 2023

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Спектрофотометричні та хроматографічні методики визначення метопрололу та мелдонію в лікарських засобах.
2. **Установа, автори:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, 46001, м. Тернопіль, Майдан Воли, 1, кафедра фармацевтичної хімії, Горин М. М., д.фарм.н., професор Логойда Л. С.
3. **Джерела інформації:**
 1. Horyn M, Piponski M, Melnyk O, Ivanchuk I, Susla O, Grytsyshyn L, Korobko D, Logoyda L. Development of the Spectrophotometric Method for the Determination of Metoprolol in Tablets by using Bromothymol Blue. Methods and objects of chemical analysis. 2023;18(2):63-69.
 2. Горин М. М., Логойда Л.С. Розробка спектрофотометричної методики визначення метопрололу в лікарських засобах // Медична та клінічна хімія. - 2022.-№ 2.- С.105-111.
 3. Horyn M., Kucher T., Kryskiw L., Poliak O., Zarivna N., Peleshok K., Logoyda L. Development of the spectrophotometric method for the determination of metoprolol tartrate in tablets by using bromocresol green. - ScienceRise: Pharmaceutical Science. - 2022. - Vol. 5 (39). – P. 55–63.
 4. Horyn M., Kryskiw L., Kucher T., Poliak O., Zarivna N., Zahrychuk H., Korobko D., Peleshok K., Logoyda L. Development of the spectrophotometric method for the determination of metoprolol in tablets by using bromophenol blue // ScienceRise: Pharmaceutical Science.- 2022. - Vol. 6 (40). – P. 36–42.
 5. Horyn, M., Piponski, M., Zaremba, 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. – Vol. 1 (41). - P. 14-22.
 6. Piponski M., Horyn M., Grncaroska K., Oleshchuk O., Petrovska E., Angelevski S., Uglyar T., Kucher T., Logoyda L. Concepts for a new rapid and simple HPLC method for simultaneous determination of Metoprolol and Meldonium in pharmaceutical dosage forms. - Sci. Pharm. - 2022. - Vol. 90. - P. 65.
4. **Ефективність впровадження:** запропоновані спектрофотометричні та хроматографічні методики визначення метопрололу та мелдонію характеризуються простотою у виконанні та експресністю.
5. **Пропозиції:** розроблені методики може бути використані при здійсненні контролю якості лікарських засобів на основі метопрололу та мелдонію.

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

«11» вересня 2023

М. Грнц

Марія СТЕЦЮК

ДОДАТОК Г.2



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Розробка хроматографічних методик визначення мельдонію та метопрололу 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, Горин М. М., д.фарм.н., професор Логойда Л. С.
3. **Джерела інформації:**
 1. Horyn, M., Piponski, M., Zaremba, 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). - P. 14–22.
 2. Piponski M., Horyn M., Grncaroska K., Oleshchuk O., Petrovska E., Angelevski S., Uglyar T., Kucher T., Logoyda L. Concepts for a new rapid and simple HPLC method for simultaneous determination of Metoprolol and Meldonium in pharmaceutical dosage forms // Sci. Pharm. - 2022. - Vol. 90. - P. 65.
4. **Ефективність впровадження:** розроблені експресніші та «зелені» хроматографічні методики визначення мельдонію та метопрололу в лікарських засобах
5. **Термін впровадження:** 01.03.2023-10.03.2023 р.
6. **Новизна результатів науково-технічної розробки:** розроблені оригінальні методики хроматографічного визначення мельдонію та метопрололу в лікарських засобах для впровадження у фармацевтичне виробництво при рутинному контролі якості лікарських засобів.

« 08 » березня 2023 р.

Відповідальний за впровадження:

начальник ВАР
 Кендрамова Л. А.

ДОДАТОК Г.3



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор закладу вищої освіти з науково-педагогічної роботи Національного фармацевтичного університету,
д.фарм.н., проф. Інна ВЛАДИМИРОВА

2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Розробка спектрофотометричних та хроматографічних методик визначення мельдонію та метопрололу в лікарських засобах
2. **Установа, автор:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, 46001, м. Тернопіль, Майдан Волі, 1, кафедра фармацевтичної хімії, Горин М. М., д.фарм.н., професор Логойда Л. С.
3. **Джерела інформації:**
 1. Горин М. М., Логойда Л.С. Розробка спектрофотометричної методики визначення метопрололу в лікарських засобах // Медична та клінічна хімія. - 2022.-№ 2. - С.105-111.
 2. Horyn M., Kucher T., Kryskiw L., Poliak O., Zariwna N., Peleshok K., Logoyda L. Development of the spectrophotometric method for the determination of metoprolol tartrate in tablets by using bromocresol green. - ScienceRise: Pharmaceutical Science. - 2022. - Vol. 5 (39). – P. 55–63.
 3. Horyn M., Kryskiw L., Kucher T., Poliak O., Zariwna N., Zahrychuk H., Korobko D., Peleshok K., Logoyda L. Development of the spectrophotometric method for the determination of metoprolol in tablets by using bromophenol blue // ScienceRise: Pharmaceutical Science. - 2022. - Vol. 6 (40). – P. 36–42.
 4. 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. – Vol. 1 (41). - P. 14–22.
 5. Piponski M., Horyn M., Grncaroska K., Oleshchuk O., Petrovska E., Angelevski S., Uglyar T., Kucher T., Logoyda L. Concepts for a new rapid and simple HPLC method for simultaneous determination of Metoprolol and Meldonium in pharmaceutical dosage forms. - Sci. Pharm. - 2022. - Vol. 90. - P. 65.
4. **Де впроваджено:** Кафедра фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету
5. **Форма впровадження:** науково-дослідна робота та навчальний процес.
6. **Ефективність впровадження:** результати проведених досліджень впроваджено у науково-дослідну роботу кафедри, а також у навчальний процес з метою поглиблення знань здобувачів вищої освіти з питань фармацевтичного аналізу та стандартизації лікарських засобів метопрололу та мельдонію.
7. **Термін впровадження:** 2023-2024 навчальний рік

« 30 » 06 2023 р. (протокол № 1)

Відповідальний за впровадження:

зав.каф. фармацевтичної хімії, проф.

Вікторія ГЕОРГІЯНЦ

ДОДАТОК Г.4



«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Проректор з наукової роботи
Львівського національного медичного
університету імені Данила Галицького

проф. Вікторія СЕРГІЄНКО

«*serhienko*» «*serhienko*» 2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Розробка спектрофотометричних та хроматографічних методик визначення мельдонію та метопрололу в лікарських засобах
2. **Установа, автор:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, 46001, м. Тернопіль, Майдан Волі, 1, кафедра фармацевтичної хімії, Горин М. М., д.фарм.н., професор Логойда Л. С.
3. **Джерела інформації:**
 1. Горин М. М., Логойда Л.С. Розробка спектрофотометричної методики визначення метопрололу в лікарських засобах // Медична та клінічна хімія. - 2022.-№ 2.- С.105-111.
 2. Horyn M., Kucher T., Kryskiw L., Poliak O., Zarivna N., Peleshok K., Logoyda L. Development of the spectrophotometric method for the determination of metoprolol tartrate in tablets by using bromocresol green. - ScienceRise: Pharmaceutical Science. - 2022. - Vol. 5 (39). - P. 55-63.
 3. Horyn M., Kryskiw L., Kucher T., Poliak O., Zarivna N., Zalyrychuk H., Korobko D., Peleshok K., Logoyda L. Development of the spectrophotometric method for the determination of metoprolol in tablets by using bromophenol blue // ScienceRise: Pharmaceutical Science. - 2022 - Vol. 6 (40). - P. 36-42.
 4. Horyn, M., Piponski, M., Zaremba, 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. - Vol. 1 (41). - P. 14-22.
 5. Piponski M., Horyn M., Grncaroska K., Oleshchuk O., Petrovska E., Angelevski S., Uglyar T., Kucher T., Logoyda L. Concepts for a new rapid and simple HPLC method for simultaneous determination of Metoprolol and Meldonium in pharmaceutical dosage forms. - Sci. Pharm. - 2022. - Vol. 90. - P. 65.
4. **Де впроваджено:** кафедра фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького
5. **Форма впровадження:** науково-дослідна робота та навчальний процес.
6. **Ефективність впровадження:** результати проведених досліджень впроваджено у науково-дослідну роботу кафедри, а також у навчальний процес з метою поглиблення знань здобувачів вищої освіти з питань фармацевтичного аналізу та стандартизації лікарських засобів метопрололу та мельдонію.
7. **Термін впровадження:** 2023-2024 навчальний рік

Зав. каф. фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії, д.фарм.н., проф.

Roman Lesyk Роман ЛЕСИК

Відповідальний за впровадження:

Andriy Lozynskiy Андрій ЛОЗИНСЬКИЙ

ДОДАТОК Г.5

ЗАТВЕРДЖУЮ
 Проректор закладу вищої освіти
 з науково-педагогічної роботи
 та міжнародних зв'язків
 Буковинського державного
 медичного університету
 проф. Мар'яна ГРИЦЮК

« 28 » серпня 2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Розробка спектрофотометричних та хроматографічних методик визначення мельдонію та метопрололу в лікарських засобах.
2. **Установа, автор:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, 46001, м. Тернопіль, Майдан Волі, 1, кафедра фармацевтичної хімії, Горин М. М., д.фарм.н., професор Логойда Л. С.
3. **Джерела інформації:**
 1. Горин М. М., Логойда Л.С. Розробка спектрофотометричної методики визначення метопрололу в лікарських засобах // Медична та клінічна хімія. - 2022.-№ 2.- С.105-111.
 2. Horyn M., Kucher T., Kryskiw L., Poliak O., Zarivna N., Peleshok K., Logoyda L. Development of the spectrophotometric method for the determination of metoprolol tartrate in tablets by using bromocresol green. - ScienceRise: Pharmaceutical Science. - 2022. - Vol. 5 (39). - P. 55-63.
 3. Horyn M., Kryskiw L., Kucher T., Poliak O., Zarivna N., Zahrychuk H., Korobko D., Peleshok K., Logoyda L. Development of the spectrophotometric method for the determination of metoprolol in tablets by using bromophenol blue // ScienceRise: Pharmaceutical Science.- 2022. - Vol. 6 (40). - P. 36-42.
 4. Horyn, M., Piponski, M., Zaremba, 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. - Vol. 1 (41). - P. 14-22.
 5. Piponski M., Horyn M., Grncaroska K., Oleshchuk O., Petrovska E., Angelevski S., Uglyar T., Kucher T., Logoyda L. Concepts for a new rapid and simple HPLC method for simultaneous determination of Metoprolol and Meldonium in pharmaceutical dosage forms. - Sci. Pharm. - 2022. - Vol. 90. - P. 65.
4. **Де впроваджено:** кафедра медичної та фармацевтичної хімії Буковинського державного медичного університету.
5. **Форма впровадження:** науково-дослідна робота та навчальний процес.
6. **Ефективність впровадження:** результати проведених досліджень впроваджено у науково-дослідну роботу кафедри, а також у навчальний процес з метою поглиблення знань здобувачів вищої освіти з питань фармацевтичного аналізу та стандартизації лікарських засобів метопрололу та мельдонію.
7. **Термін впровадження:** 2023-2024 навчальний рік.

« 28 » 08 2023 р.

Відповідальний за впровадження:
 Завідувач кафедри медичної та фармацевтичної хімії
 д.х.н., професор


 Михайло БРАТЕНКО

ДОДАТОК Г.6



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Розробка спектрофотометричних та хроматографічних методик визначення мeldonію та метопрололу в лікарських засобах.
2. **Установа, автор:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, 46001, м. Тернопіль, Майдан Волі, 1, кафедра фармацевтичної хімії, Горин М. М., д.фарм.н., професор Логойда Л. С.
3. **Джерела інформації:**
 1. Горин М. М., Логойда Л.С. Розробка спектрофотометричної методики визначення метопрололу в лікарських засобах // Медичина та клінічна хімія. - 2022.-№ 2.- С.105-111.
 2. Horyn M., Kucher T., Kryskiw L., Poliak O., Zariwna N., Peleshok K., Logoyda L. Development of the spectrophotometric method for the determination of metoprolol tartrate in tablets by using bromocresol green. - ScienceRise: Pharmaceutical Science. - 2022. - Vol. 5 (39). – P. 55–63.
 3. Horyn M., Kryskiw L., Kucher T., Poliak O., Zariwna N., Zahrychuk H., Korobko D., Peleshok K., Logoyda L. Development of the spectrophotometric method for the determination of metoprolol in tablets by using bromophenol blue // ScienceRise: Pharmaceutical Science.- 2022. - Vol. 6 (40). – P. 36–42.
 4. Horyn, M., Piponski, M., Zaremba, 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. – Vol. 1 (41). - P. 14-22.
 5. Piponski M., Horyn M., Grncaroska K., Oleshchuk O., Petrovska E., Angelevski S., Uglyar T., Kucher T., Logoyda L. Concepts for a new rapid and simple HPLC method for simultaneous determination of Metoprolol and Meldonium in pharmaceutical dosage forms. - Sci. Pharm. - 2022. - Vol. 90. - P. 65.
4. **Де впроваджено:** кафедра хімії, фармацевтичного аналізу та післядипломної освіти Івано-Франківського національного медичного університету.
5. **Форма впровадження:** науково-дослідна робота та навчальний процес.
6. **Ефективність впровадження:** результати проведених досліджень впроваджено у науково-дослідну роботу кафедри, а також у навчальний процес з метою поглиблення знань здобувачів вищої освіти з питань фармацевтичного аналізу та стандартизації лікарських засобів метопрололу та мeldonію.
7. **Термін впровадження:** 2023-2024 навчальний рік

« 31 » 08 2023 р.

Відповідальний за впровадження:
завідувач кафедри хімії,
фармацевтичного аналізу
та післядипломної освіти

д.х.н., проф. Андрій СТЕЦЬКІВ