

РОЗРОБКА І ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ РАМІПРИЛУ ТА ГІДРОХЛОРТІАЗИДУ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ПРОФІЛІВ РОЗЧИНЕННЯ

Вступ. При розробці генеричних лікарських препаратів важливим є порівняння їх профілів розчинення з профілями розчинення оригінального препарату. Тому необхідно розробити швидкі й чутливі методики дослідження профілів розчинення.

Мета дослідження – розробити і валідувати аналітичну методику одночасного визначення раміприлу та гідрохлортіазиду методом рідинної хроматографії, яку можна застосовувати для дослідження профілів розчинення комбінованих препаратів.

Методи дослідження. При проведенні дослідження використовували стандартні зразки раміприлу та гідрохлортіазиду (USP RS), реактиви класу А, таблетки Раміприлу з Гідрохлортіазидом 2,5 мг/12,5 мг та 10 мг/25 мг. Зразки аналізували на рідинному хроматографі з діодноматричним детектором Agilent 1260. Використовували колонку Inertsil ODS-3 (4,6×150×3 мкм); рухома фаза А – 0,2 г/л розчину натрію гексансульфонату (рН 2,7); рухома фаза Б – ацетонітрил; швидкість рухомої фази – 1,5 мл/хв; довжина хвилі детектування – 210 нм; температура колонки – 45 °С, градієнтний режим елювання.

Результати й обговорення. Розроблено методику одночасного визначення раміприлу та гідрохлортіазиду методом рідинної хроматографії в чотирьох середовищах розчинення (0,1 М розчин кислоти хлористоводневої і буферні розчини рН 1,2, рН 4,5 та рН 6,8). Розроблена методика має достатню лінійність, правильність і прецизійність та є стійкою до незначних змін умов хроматографування. Чутливість методики становить 0,2 мкг/мл для раміприлу та 0,4 мкг/мл для гідрохлортіазиду. Досліджений діапазон дозволяє використовувати методику для дозувань від 2,5 до 10 мг раміприлу та від 12,5 до 25 мг гідрохлортіазиду.

Висновки. Розроблена методика може забезпечити одночасне визначення раміприлу та гідрохлортіазиду при дослідженні профілів розчинення комбінованого препарату.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: раміприл; гідрохлортіазид; таблетки; рідинна хроматографія; профілі розчинення.

ВСТУП. Відповідно до даних Всесвітньої організації охорони здоров'я, гіпертензія є одним з головних факторів смертності та інвалідності у світі [1]. Цей фактор призводить приблизно до 10,8 мільйона передчасних смертей щороку [1]. В Україні кардіоваскулярні захворювання є причиною смерті в 64 % випадків, більше половини з них викликала саме гіпертензія [1]. До рекомендованих для коригування тиску препаратів [2] належить комбінація діуретиків та інгібіторів ангіотензинперетворювального ензиму. Тому наявність на ринку ефективних та доступних комбінованих препаратів (у тому числі генеричних) є важливою.

При розробці генеричних препаратів одним з тестів, що опосередковано показують взаємозамінність оригінального і генеричного препара-

тів *in vitro*, є дослідження профілів розчинення (Biowaiver) [3]. Оскільки такі дослідження досить об'ємні та потребують вивчення великої кількості зразків, то важливо розробити не лише прості у виконанні, а й швидкі методи.

Ми проводили дослідження для комбінації раміприлу (інгібітор ангіотензинперетворювального ензиму) та гідрохлортіазиду (діуретик). Цю комбінацію добре вивчено, її широко застосовують для корекції тиску, і вона не втрачає своєї актуальності вже протягом понад 30 років [4, 5]. У Фармакопеї США (USP) [6] описано методики визначення розчинення для монопрепаратів раміприлу та гідрохлортіазиду, для комбінованого препарату монографія відсутня. Для визначення гідрохлортіазиду запропоновано використовувати спектрофотометричну методику, якої не було застосовано в даному випадку,

оскільки наявність гідрохлортіазиду в комбінованому препараті заважатиме визначенню раміприлу. Для визначення раміприлу запропоновано використовувати метод високоефективної рідинної хроматографії. Однак тривалість хроматографування випробовуваних розчинів за цією методикою перевищує 10 хв. До того ж для обох діючих речовин працездатність методики перевіряли лише для 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої.

Одночасне визначення раміприлу та гідрохлортіазиду описано в ряді публікацій [7–10], однак про можливість використання методики для різних середовищ розчинення ідеться лише в [10]. До того ж методики валідували у вузькому діапазоні, що дозволяло аналізувати лише одне дозування препарату, тоді як, відповідно до [11], на ринку України зареєстровано п'ять різних дозувань препарату.

У всіх проаналізованих публікаціях ідеться про використання колонки, заповненої октадецилсилільним сорбентом. Згідно з [8–10], як буферний компонент застосовували розчин перхлорату натрію концентрацією від 12 до 14 г/л, як органічний компонент – ацетонітрил. Тривалість інжекції, відповідно до [8], становила близько 20 хв, згідно з [9, 10] – приблизно 10 хв, що є досить тривалим. За даними [7], як буферний компонент використовували 0,01 М розчин калію дигідрофосфату, як органічний компонент – суміш метанолу з ацетонітрилом. Тривалість інжекції становила близько 5 хв. Однак цю методику розробили для кількісного визначення і специфічності для середовищ розчинення не було перевірено. Також рухома фаза містила 80 % органічного компонента.

Мета дослідження – розробити і валідувати аналітичну методику одночасного визначення раміприлу та гідрохлортіазиду методом рідинної хроматографії, яку можна застосовувати для

дослідження профілів розчинення комбінованих препаратів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.

Стандартні зразки: раміприлу (0,996 мг/г), гідрохлортіазиду (0,997 мг/г).

Реактиви: кислота хлористоводнева 37 % (“Carlo Erba”), натрію хлорид, кислота оцтова, калію дигідрофосфат, натрію гідроксид, ацетонітрил, кислота фосфорна (“Sigma-Aldrich”), натрію ацетат безводний (“Fluka”), натрію гексансульфонат (“Supelco”).

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

Обладнання: рідинний хроматограф з діодноматричним детектором Agilent 1260, аналітичні ваги Mettler Toledo XPE-205, рН-метр Mettler Toledo Seven Easy.

Умови хроматографування.

Використовували колонку Inertsil ODS-3 (4,6×150×3 мкм); рухома фаза А – 0,2 г/л розчину натрію гексансульфонату (рН 2,7); рухома фаза Б – ацетонітрил; швидкість рухомої фази – 1,4 мл/хв; довжина хвилі детектування – 210 нм; температура колонки – 45 °С, градієнтний режим елюювання – відповідно до таблиці 1.

Приготування розчинів.

Як розчинник для вихідних розчинів порівняння використовували суміш рухомої фази А: рухомої фази Б (1:1 об./об.), як середовища розчинення – 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої і буферні розчини рН 1,2, рН 4,5 та рН 6,8.

Готували вихідні розчини раміприлу (концентрація 499 мкг/мл) та гідрохлортіазиду (концентрація 1247 мкг/мл). Використовуючи вихідні розчини, готували розчини порівняння для п'яти дозувань комбінованого препарату (табл. 2). Розчини порівняння готували для кожного з чотирьох досліджуваних середовищ розчинення.

Таблиця 1 – Градієнт елюювання

| Час хроматографування, хв | Рухома фаза А, % | Рухома фаза Б, % |
|---------------------------|------------------|------------------|
| 0 | 70,0 | 30,0 |
| 1,5 | 70,0 | 30,0 |
| 2,5 | 30,0 | 70,0 |
| 3 | 30,0 | 70,0 |
| 3,1 | 70,0 | 30,0 |
| 4,5 | 70,0 | 30,0 |

Таблиця 2 – Приготування розчинів порівняння

| Дозування (раміприл/гідрохлортіазид), мг | Концентрація раміприлу, мкг/мл | Концентрація гідрохлортіазиду, мкг/мл |
|--|--------------------------------|---------------------------------------|
| 2,5/12,5 | 5 | 25 |
| 5/25 | 10 | 50 |
| 5/12,5 | 10 | 25 |
| 10/25 | 20 | 50 |
| 5/12,5 | 20 | 25 |

Для дослідження лінійності готували 11 розчинів у діапазоні концентрацій: для раміприлу – 0,100–29,928 мкг/мл, для гідрохлортіазиду – 0,249–74,823 мкг/мл. Розчини готували для чотирьох середовищ розчинення.

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

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. За основу методу хроматографування використано мето-

дику визначення супровідних домішок раміприлу, яку попередньо ми розробили [12], з коригуванням режиму елюювання. Спочатку апробували ізократичні умови хроматографування при співвідношенні рухомих фаз 50:50 (рис. 1, А), 60:40 (рис. 1, Б) та 70:30 (рис. 1, В). При співвідношенні рухомих фаз 50:50 пік раміприлу інтерферував з піками розчинника. У разі зміни вмісту ацетонітрилу в рухомій фазі час утримування піка гідрохлортіазиду майже не змінювався, тоді як час утримування раміприлу змінювався суттєво. При зменшенні вмісту ацетонітрилу на 10 % раміприл повністю розділявся з піками

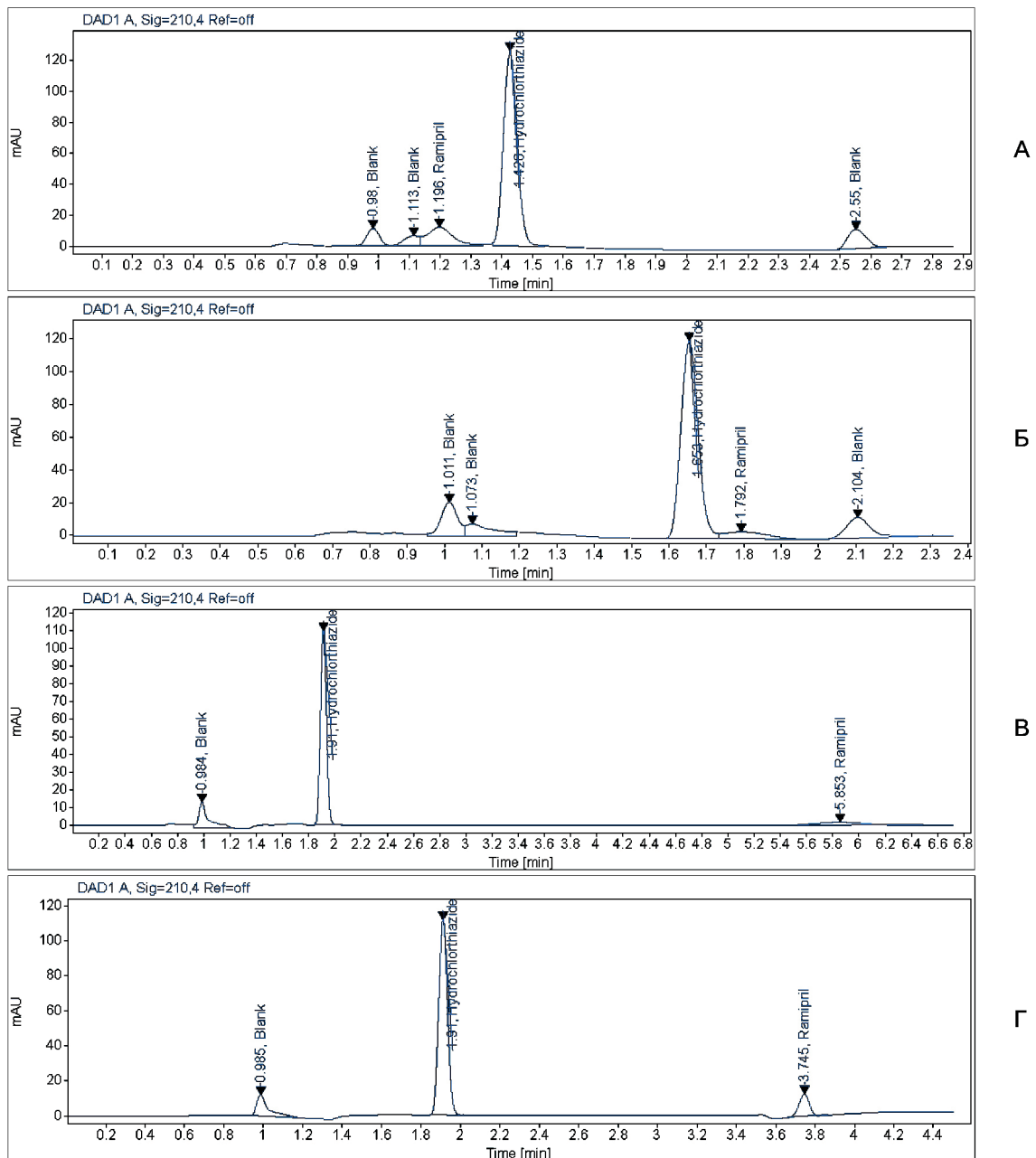


Рис. 1. Хроматограми, отримані при підборі умов хроматографування: А – співвідношення рухома фаза А:рухома фаза Б 50:50; Б – співвідношення рухома фаза А:рухома фаза Б 60:40; В – співвідношення рухома фаза А:рухома фаза Б 70:30; Г – градієнтне елюювання.

розчинника, однак не повністю розділявся з піком гідрохлортіазиду. В разі зниження вмісту ацетонітрилу всі піки розділялись повністю, однак значно збільшувалась ширина піка раміприлу. Тому було вирішено підібрати умови градієнтного елювання з початковим співвідношенням рухомих фаз 70:30. Фінальний варіант градієнтного елювання (див. табл. 1) забезпечував надійне розділення раміприлу та гідрохлортіазиду між собою, а також з піками розчинника. Ефективність хроматографічної системи за піком раміприлу збільшилась у 20 разів порівняно з ізократичним елюванням (з 1000 до 22 000 теоретичних тарілок).

Перевіряли вплив незначних змін при хроматографуванні на можливість відтворення методики. При цьому готували розчини порівняння та випробовували розчини для дозувань 2,5 мг/12,5 мг та 10 мг/25 мг (найбільше і найменше дозування) та аналізували їх за номінальних і змінених умов (температура колонки – ± 5 °С, швидкість потоку – $\pm 0,05$ мл/хв, вміст ацетонітрилу в початковому співвідношенні фаз – ± 1 %, концентрація натрію гексансульфо-

нату в рухомій фазі А – $\pm 0,01$ г/л, рН рухомої фази А – $\pm 0,2$). Результати порівняння розрахованого вмісту раміприлу та гідрохлортіазиду за номінальних і модифікованих умов наведено в таблиці 3.

Різниця між розрахованим вмістом за номінальних і модифікованих умов не перевищувала 1,5 % для раміприлу та 1,7 % для гідрохлортіазиду. Симетрія піка під час дослідження робастності становила 0,888–1,795 для раміприлу і 0,974–1,148 для гідрохлортіазиду, що задовольняє вимоги Ph. Eur. 2.2.46. Тобто методика достатньо стійка до незначних змін умов хроматографування.

Дослідження лінійності проводили в діапазоні концентрацій 0,249–29,928 мкг/мл для раміприлу і 0,249–74,823 мкг/мл для гідрохлортіазиду. В розчині з концентрацією раміприлу 0,100 мкг/мл співвідношення сигнал/шум для піка було меншим 10, тому в розрахунок цієї концентрації не включали. Дослідження проводили для чотирьох середовищ розчинення. Графіки залежності площі піка від концентрації аналіту наведено на рисунках 2–9.

Таблиця 3 – Результати дослідження робастності

| Умова хроматографування | Різниця з номінальними умовами, % | | | |
|-------------------------|-----------------------------------|-----------------|-------------|-----------------|
| | 2,5 мг/12,5 мг | | 10 мг/25 мг | |
| | раміприл | гідрохлортіазид | раміприл | гідрохлортіазид |
| +5 °С | 0,232 | 0,291 | 0,290 | 0,343 |
| -5 °С | 0,815 | 1,393 | 0,475 | 0,403 |
| +0,05 мл/хв | 0,976 | 1,673 | 0,416 | 0,442 |
| -0,05 мл/хв | 1,342 | 1,098 | 0,294 | 0,222 |
| +1 % | 0,646 | 1,289 | 0,273 | 0,074 |
| -1 % | 0,273 | 0,562 | 1,026 | 0,659 |
| +0,01 г/л | 0,636 | 0,033 | 1,324 | 0,807 |
| -0,01 г/л | 0,994 | 0,616 | 1,510 | 1,115 |
| +0,2 рН | 0,980 | 1,201 | 0,326 | 0,170 |
| -0,2 рН | 1,322 | 0,415 | 0,397 | 0,362 |

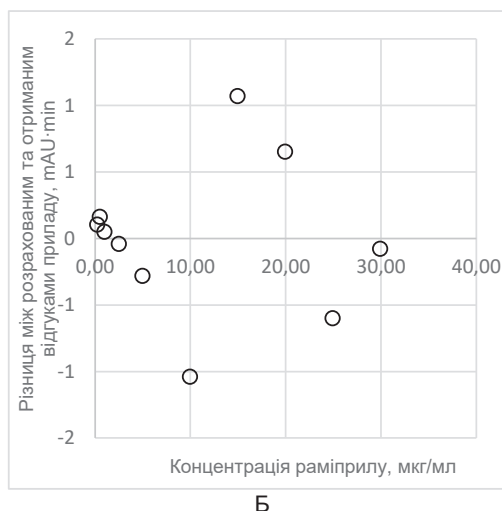
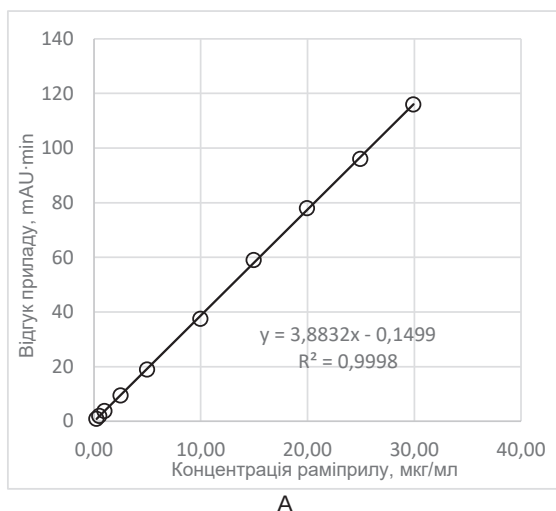
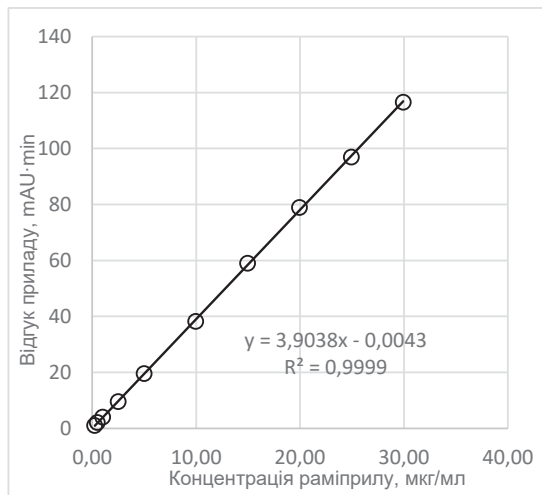
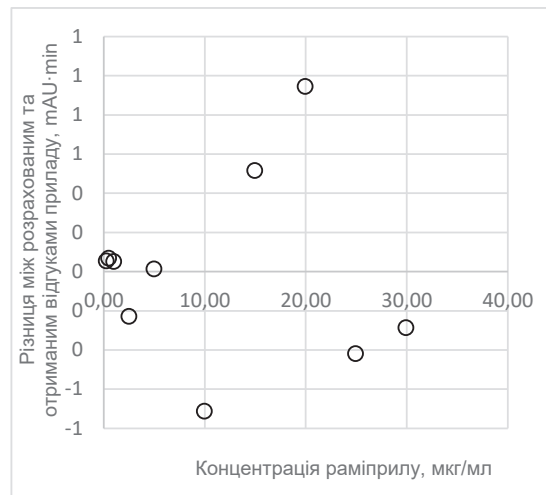


Рис. 2. Графік залежності відгуку приладу від концентрації раміприлу в 0,1 М кислоті хлористоводневій: А – графік регресії; Б – графік залишків.

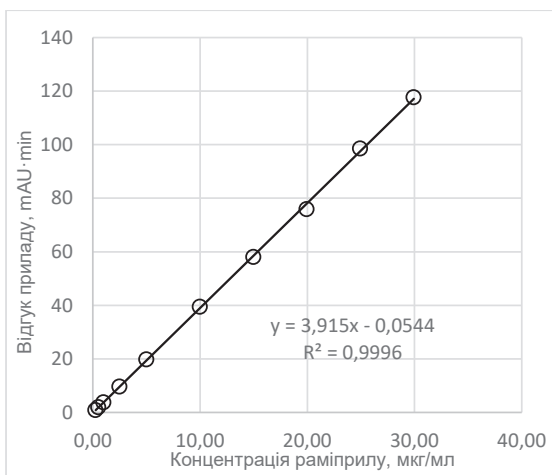


А

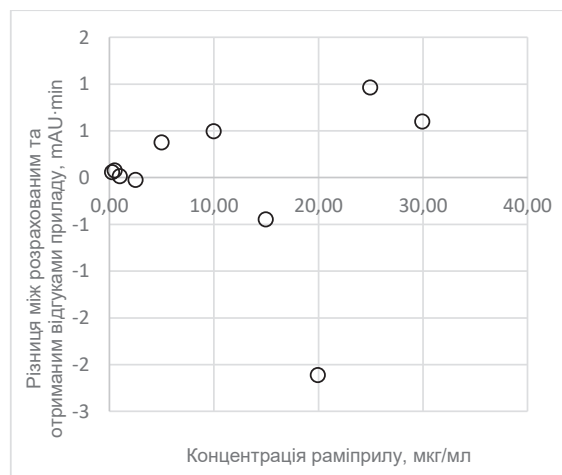


Б

Рис. 3. Графік залежності відгуку приладу від концентрації раміприлу в буферному розчині рН 1,2: А – графік регресії; Б – графік залишків.

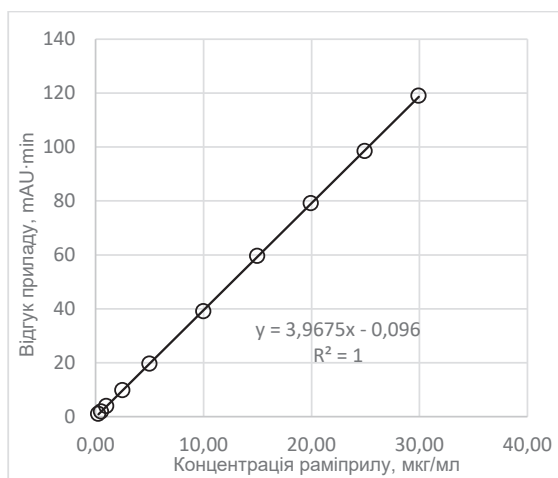


А

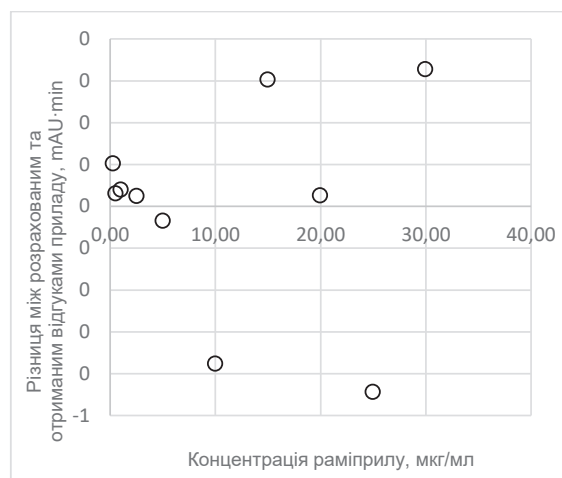


Б

Рис. 4. Графік залежності відгуку приладу від концентрації раміприлу в буферному розчині рН 4,5: А – графік регресії; Б – графік залишків.

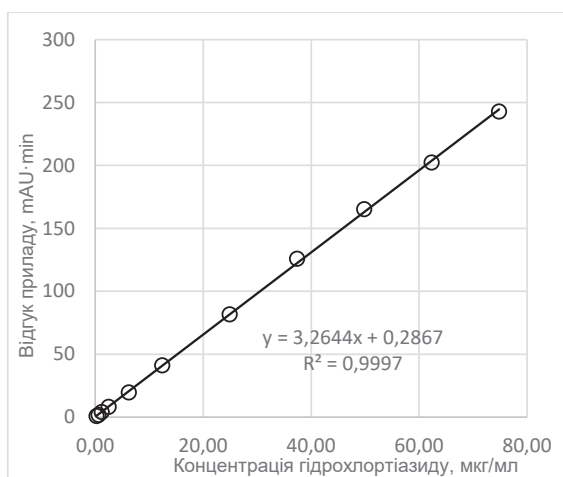


А

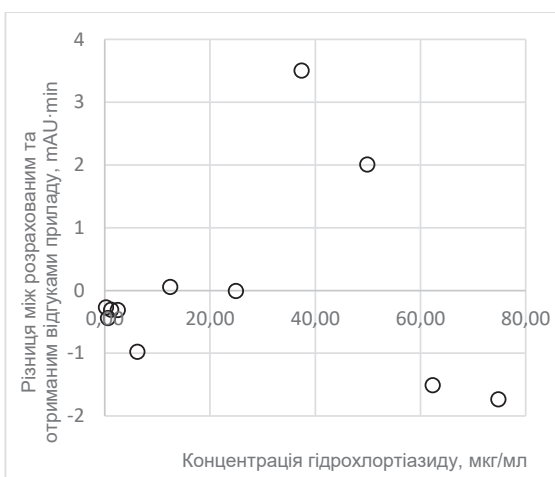


Б

Рис. 5. Графік залежності відгуку приладу від концентрації раміприлу в буферному розчині рН 6,8: А – графік регресії; Б – графік залишків.

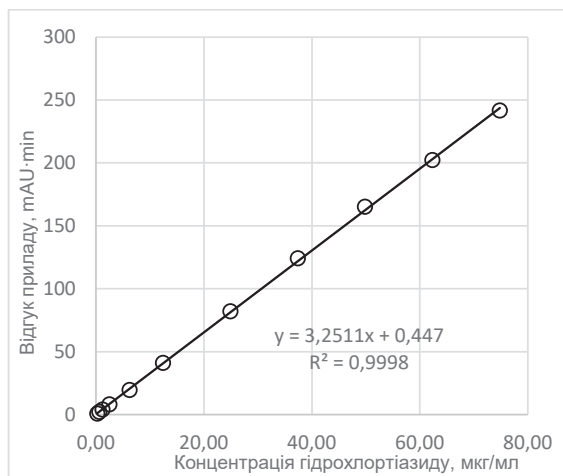


А

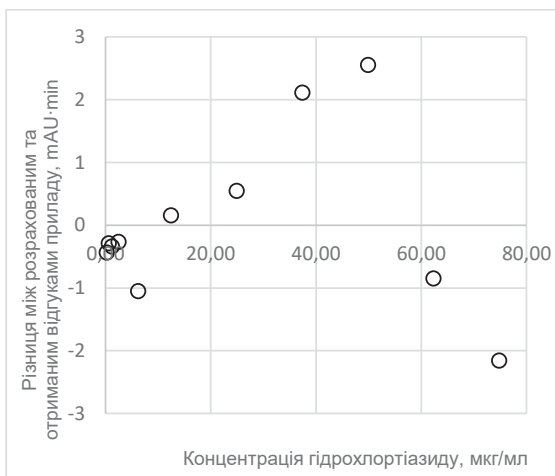


Б

Рис. 6. Графік залежності відгуку приладу від концентрації гідрохлортіазиду в 0,1 М кислоті хлористоводневій: А – графік регресії; Б – графік залишків.

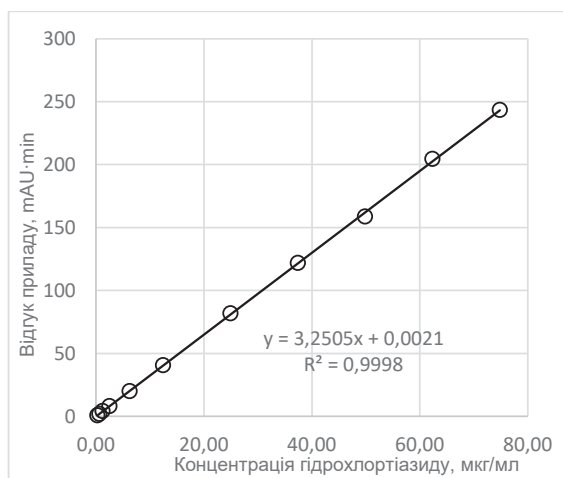


А

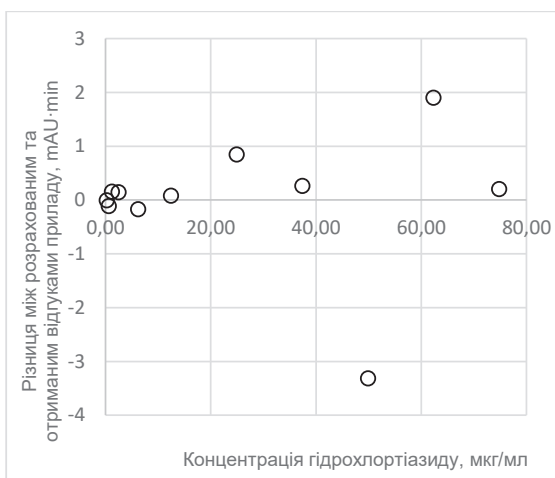


Б

Рис. 7. Графік залежності відгуку приладу від концентрації гідрохлортіазиду в буферному розчині рН 1,2: А – графік регресії; Б – графік залишків.



А



Б

Рис. 8. Графік залежності відгуку приладу від концентрації гідрохлортіазиду в буферному розчині рН 4,5: А – графік регресії; Б – графік залишків.

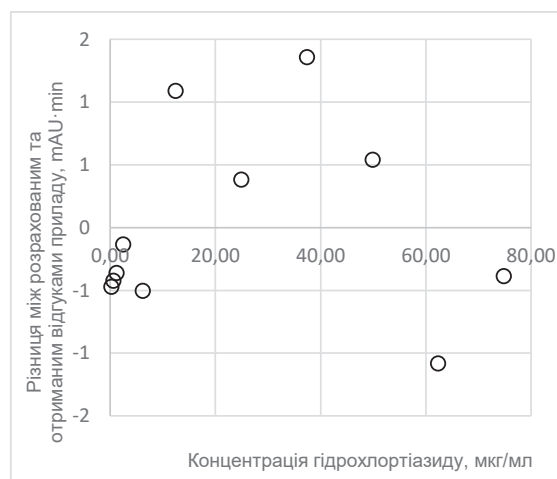
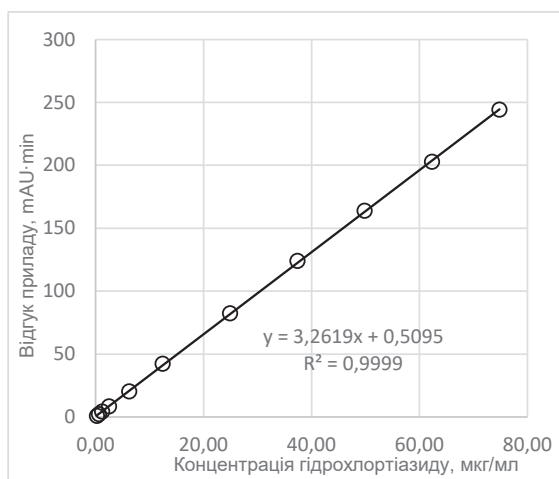


Рис. 9. Графік залежності відгуку приладу від концентрації гідрохлортіазиду в буферному розчині рН 6,8: А – графік регресії; Б – графік залишків.

Коефіцієнт кореляції калібрувальної прямої був не меншим 0,99981 для раміприлу та 0,99985 для гідрохлортіазиду, що задовольняє критерій прийнятності (не менше 0,995). Відношення вільного члена рівняння регресії до номінальної концентрації раміприлу (дозування 2,5 мг) становило не більше 0,785 %, для гідрохлортіазиду (дозування 12,5 мг) – не більше 0,629 %, що задовольняє критерій прийнятності (не більше 3,0 %). Залишки довільним чином розкидані довкола нуля. Тобто методика є лінійною у досліджуваному діапазоні.

Межу кількісного визначення розраховували з параметрів калібрувальної прямої для п'яти розчинів у діапазоні концентрацій 0,249–4,988 мкг/мл для раміприлу та 0,249–6,235 мкг/мл для гідрохлортіазиду. Результати розрахунку наведено в таблицях 4 і 5.

Межа кількісного визначення для раміприлу не перевищувала 0,227 мкг/мл, що еквівалентно 4,5 % від номінальної концентрації для дозування 2,5 мг. Межа кількісного визначення для гідрохлортіазиду не перевищувала 0,378 мкг/мл, що еквівалентно 1,5 % від номінальної концен-

трації для дозування 12,5 мг. Тобто методика достатньо чутлива для дослідження профілів розчинення.

Для перевірки правильності та прецизійності методики розраховували ступені вилучення аналіту з матриці й відносне стандартне відхилення ступенів вилучення. Результати розрахунку наведено в таблицях 6 і 7.

Середнє значення ступенів вилучення раміприлу для різних дозувань і різних середовищ перебувало в межах 99,26–101,32 %, для гідрохлортіазиду – в межах 99,40–101,24 %, що задовольняє критерій прийнятності (97,0–103,0 %). Відносне стандартне відхилення ступенів вилучення раміприлу для різних дозувань та різних середовищ перебувало в межах 1,14–2,22 %, гідрохлортіазиду – в межах 1,95–2,88 %, що задовольняє критерій прийнятності (не більше 3,0 %). Тобто правильність та прецизійність методики достатні.

ВИСНОВКИ. Розроблена методика придатна для одночасного визначення раміприлу та гідрохлортіазиду в комбінованому препараті при

Таблиця 4 – Результати розрахунку межі кількісного визначення для раміприлу

| Середовище розчинення | b | S _a | МКВ, мкг/мл | МВ, мкг/мл |
|-------------------------------|------|----------------|-------------|------------|
| 0,1 М кислота хлористоводнева | 3,57 | 0,05 | 0,146 | 0,074 |
| Буферний розчин рН 1,2 | 3,88 | 0,09 | 0,227 | 0,115 |
| Буферний розчин рН 4,5 | 3,98 | 0,08 | 0,192 | 0,098 |
| Буферний розчин рН 6,8 | 3,95 | 0,02 | 0,046 | 0,023 |

Таблиця 5 – Результати розрахунку межі кількісного визначення для гідрохлортіазиду

| Середовище розчинення | b | S _a | МКВ, мкг/мл | МВ, мкг/мл |
|-------------------------------|------|----------------|-------------|------------|
| 0,1 М кислота хлористоводнева | 3,15 | 0,09 | 0,296 | 0,154 |
| Буферний розчин рН 1,2 | 3,13 | 0,12 | 0,378 | 0,197 |
| Буферний розчин рН 4,5 | 3,22 | 0,10 | 0,305 | 0,159 |
| Буферний розчин рН 6,8 | 3,25 | 0,11 | 0,328 | 0,171 |

Таблиця 6 – Результати розрахунку правильності для раміприлу

| Дозування (раміприл/гідрохлортіазид), мг | Досліджений діапазон | | Ступінь вилучення | 0,1 М НСІ | Буферний розчин | | |
|---|----------------------|-------|----------------------|-----------|-----------------|--------|--------|
| | мкг/мл | % | | | pH 1,2 | pH 4,5 | pH 6,8 |
| 2,5/12,5 | 0,249– 29,928 | 5–599 | Мінімум | 96,87 | 97,77 | 97,34 | 97,59 |
| | | | Максимум | 103,23 | 105,26 | 101,77 | 101,57 |
| | | | Середнє | 100,34 | 100,84 | 100,13 | 100,23 |
| 5/25 | 0,249– 29,928 | 2–299 | Мінімум | 97,68 | 97,53 | 96,90 | 97,45 |
| | | | Максимум | 104,09 | 105,01 | 101,31 | 101,43 |
| | | | Середнє | 101,18 | 100,60 | 99,68 | 100,08 |
| 5/12,5 | 0,249– 29,928 | 2–299 | Мінімум | 97,68 | 97,29 | 97,10 | 97,47 |
| | | | Максимум | 104,10 | 104,74 | 101,51 | 101,45 |
| | | | Середнє | 101,19 | 100,35 | 99,87 | 100,10 |
| 10/25 | 0,249– 29,928 | 1–150 | Мінімум | 96,98 | 97,87 | 97,40 | 97,28 |
| | | | Максимум | 103,35 | 105,36 | 101,83 | 101,24 |
| | | | Середнє | 100,46 | 100,94 | 100,19 | 99,90 |
| 10/12,5 | 0,249– 29,928 | 1–150 | Мінімум | 96,35 | 98,24 | 97,46 | 96,65 |
| | | | Максимум | 102,67 | 105,76 | 101,89 | 100,59 |
| | | | Середнє | 99,80 | 101,32 | 100,24 | 99,26 |

Таблиця 7 – Результати розрахунку правильності для гідрохлортіазиду

| Дозування (раміприл/гідрохлортіазид), мг | Досліджений діапазон | | Ступінь вилучення | 0,1 М НСІ | Буферний розчин | | |
|---|----------------------|---------|----------------------|-----------|-----------------|--------|--------|
| | мкг/мл | % | | | pH 1,2 | pH 4,5 | pH 6,8 |
| 2,5/12,5 | 0,249– 74,823 | 1–299 | Мінімум | 93,00 | 96,33 | 94,38 | 97,75 |
| | | | Максимум | 103,68 | 107,13 | 103,83 | 102,55 |
| | | | Середнє | 100,06 | 100,84 | 99,91 | 100,16 |
| 5/25 | 0,249– 74,823 | 0,5–150 | Мінімум | 92,40 | 96,14 | 95,31 | 97,62 |
| | | | Максимум | 103,02 | 106,91 | 104,86 | 102,42 |
| | | | Середнє | 99,42 | 100,64 | 100,89 | 100,03 |
| 5/12,5 | 0,249– 74,823 | 1–299 | Мінімум | 92,82 | 96,71 | 94,64 | 97,67 |
| | | | Максимум | 103,48 | 107,55 | 104,12 | 102,47 |
| | | | Середнє | 99,86 | 101,24 | 100,19 | 100,07 |
| 10/25 | 0,249– 74,823 | 0,5–150 | Мінімум | 92,41 | 96,11 | 95,04 | 97,91 |
| | | | Максимум | 103,02 | 106,89 | 104,56 | 102,72 |
| | | | Середнє | 99,42 | 100,62 | 100,61 | 100,32 |
| 10/12,5 | 0,249– 74,823 | 1–299 | Мінімум | 92,39 | 96,31 | 94,48 | 98,01 |
| | | | Максимум | 103,00 | 107,11 | 103,94 | 102,83 |
| | | | Середнє | 99,40 | 100,82 | 100,01 | 100,43 |

дослідженні профілів розчинення в чотирьох середовищах розчинення. Застосування мето-

дики можливе для дозувань від 2,5 до 10 мг раміприлу та від 12,5 до 25 мг гідрохлортіазиду.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Global report on hypertension: the race against a silent killer. World Health Organization 2023. – Access mode: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240081062> (accessed on 25 March 2024).
2. Guideline for the pharmacological treatment of hypertension in adults: summary. World Health Organization 2022. – Access mode: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/356108/9789240050969-eng.pdf?sequence=1> (accessed on 25 March 2024).
3. Biopharmaceutics classification system-based biowaivers (M9). ICH harmonised guideline. – Access mode: https://database.ich.org/sites/default/files/M9_Guideline_Step4_2019_1116.pdf (accessed on 25 March 2024).
4. Bhushan B.. Comparative Efficacy and Safety of Triple Therapy (Ramipril, Telmisartan, Hydrochlorothiazide) Vs Dual Anti Hypertensive Therapy (Ramipril or Telmi-

sartan, Hydrochlorothiazide) in Stage 2 Hypertensive Patients / B. Bhushan, S. Gupta, V. Khajuria [et al.] // Journal of Clinical and Diagnostic Research. – 2014. – No. 8 (8). – P. 25–28.

5. Efficacy and Safety of Ramipril in Combination with Hydrochlorothiazide Results of a Long-Term Study / D. Heidbreder, K. L. Froer, B. Bauer [et al.] // Journal of Cardiovascular Pharmacology. – 1991. – No. 18 (2). – P. 169–173.

6. Pharmacopeia, U. S., & Pharmacopeia, U. S. (2023 Issue 3) National Formulary, The United States Pharmacopeial Convention. Inc., Rockville, MD. – Access mode: <https://online.uspnf.com/uspnf/section/monographs-usp> (accessed on 25 March 2024).

7. Development and Validation of Novel RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Ramipril, Hydrochlorothiazide and Bisoprolol in Ternary Combi-

nations / S. Alahmad, H. M. Elfatry, M. M. Mabrouk [et al.] // *Der Pharma Chemica*. – 2017. – No. 9 (20). – P. 70–75.

8. Nagavi J. B. Analytical RP-HPLC method development and validation for the simultaneous estimation of ramipril and hydrochlorothiazide in tablet dosage form / J. B. Nagavi, P. G. Anantharaju // *American Journal of Pharm. Tech. Research*. – 2014. – No. 4 (4). – P. 349–365.

9. Development and validation of RP-HPLC chromatographic dissolution method for the simultaneous estimation of ramipril and hydrochlorothiazide from solid dosage formulation / P. V. Raut, S. L. Padwal, M. T. Bachute, S. A. Polshettiwar // *Journal of Pharmaceutical Research International*. – 2021. – No. 33 (42B). – P. 203–217.

10. Biowaiver eligibility of a lower strength Ramipril/Hydrochlorothiazide immediate release tablets using a new validated HPLC analytical method / A. N. Zaid, M. Ghanem, L. Maqboul [et al.] // *Drug Research*. – 2016. – No. 66 (10). – P. 539–546.

11. Державний реєстр лікарських засобів України [Електронний ресурс]. – Режим доступу : <http://www.drz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&atscode=C09BA0> (accessed on 25 March 2024).

12. Typlynska K. Development of methods of quality control of the tablets “Ramipril” / K. Typlynska, Y. Kondratova, L. Logoyda // *Scientia Pharmaceutica*. – 2023. – No. 91 (2). – P. 21.

REFERENCES

1. Global report on hypertension: the race against a silent killer. World Health Organization 2023 Access mode: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240081062> (accessed on 25 March 2024).

2. Guideline for the pharmacological treatment of hypertension in adults: summary. World Health Organization 2022 Access mode: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/356108/9789240050969-eng.pdf?sequence=1> (accessed on 25 March 2024).

3. Biopharmaceutics classification system-based biowaivers (M9). ICH harmonised guideline Access mode: https://database.ich.org/sites/default/files/M9_Guideline_Step4_2019_1116.pdf (accessed on 25 March 2024).

4. Bhushan, B., Gupta, S., Khajuria, V., Kumar, D., La M., Kumar, D., Bhat, S., & Sharma, A. (2014). Comparative Efficacy and Safety of Triple Therapy (Ramipril, Telmisartan, Hydrochlorothiazide) Vs Dual Anti Hypertensive Therapy (Ramipril or Telmisartan, Hydrochlorothiazide) in Stage 2 Hypertensive Patients. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(8), 25-28.

5. Heidbreder, D., Froer, K.L., Bauer, B., Cairns V. & Breitstadt, A. (1991). Efficacy and Safety of Ramipril in Combination with Hydrochlorothiazide Results of a Long-Term Study. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 18(2), 169-173.

6. Pharmacopeia, U. S., & Pharmacopeia, U. S. (2023 Issue 3) National Formulary, The United States Pharmacopeial Convention. *Inc., Rockville, MD*. Access mode: <https://online.uspnf.com/uspnf/section/monographs-usp> (accessed on 25 March 2024).

7. Alahmad, S., Elfatry, H.M., Mabrouk, M.M., Hammad, S.F., & Mansour, F.R. (2017). Development and Validation of Novel RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Ramipril, Hydrochlorothiazide and Bisoprolol in Ternary Combinations. *Der Pharma Chemica*, 9(20), 70-75.

8. Nagavi, J.B. & Anantharaju, P.G. (2014) Analytical RP-HPLC method development and validation for the simultaneous estimation of ramipril and hydrochlorothiazide in tablet dosage form. *American Journal of PharmTech Research*, 4(4), 349-365.

9. Raut, P.V., Padwal, S.L., Bachute, M.T. & Polshettiwar, S.A. (2021) Development and validation of RP-HPLC chromatographic dissolution method for the simultaneous estimation of ramipril and hydrochlorothiazide from solid dosage formulation. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 33(42B), 203-217.

10. Zaid, A. N., Ghanem, M., Maqboul, L., Zaid, H. & Mahasne A. (2016) Biowaiver eligibility of a lower strength Ramipril/Hydrochlorothiazide immediate release tablets using a new validated HPLC analytical method. *Drug Research*, 66(10), 539-546.

11. *State Register of Medicinal Products of Ukraine* <http://www.drz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&atscode=C09BA0> (accessed on 25 March 2024).

12. Typlynska, K., Kondratova, Y., & Logoyda, L. (2023). Development of Methods of Quality Control of the Tablets “Ramipril”. *Scientia Pharmaceutica*, 91(2), 21.

Отримано 30.01.2024

Адреса для листування: К. В. Туплинська, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, вул. Руська, 36, Тернопіль, 46002, Україна, e-mail: typlynska_kv@tdmu.edu.ua.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD FOR DETERMINATION OF RAMIPRIL AND HYDROCHLOROTHIAZIDE FOR THE STUDY OF DISSOLUTION PROFILES

Summary

Introduction. When developing generic drugs, it is important to compare their dissolution profiles with the dissolution profiles of the original drug. Therefore, it is important to develop fast and sensitive methods for studying dissolution profiles.

The aim of the study – to develop and validate an analytical procedure for the simultaneous determination of ramipril and hydrochlorothiazide by liquid chromatography, which can be used to study the dissolution profiles of combined drugs.

Research Methods. The research used standard samples of ramipril and hydrochlorothiazide (USP RS), class A reagents, tablets of Ramipril with Hydrochlorothiazide 2.5 mg/12.5 mg and 10 mg/25 mg. The samples were analyzed on a liquid chromatograph with an Agilent 1260 diode array detector. An Inertsil ODS-3 column (4.6 × 150 × 3 μm) was used; mobile phase A – 0.2 g/l sodium hexanesulfonate solution (pH 2.7); mobile phase B: acetonitrile; mobile phase speed 1.5 ml/min; detection wavelength - 210 nm; column temperature – 45 °C, gradient elution mode.

Results and Discussion. A technique for the simultaneous determination of ramipril and hydrochlorothiazide by liquid chromatography in 4 dissolution media (0.1 M hydrochloric acid solution and buffer solutions of pH 1.2, pH 4.5, and pH 6.8) was developed. The developed method has sufficient linearity, accuracy and precision and is robust to minor changes in chromatography conditions. The sensitivity of the method is 0.2 μg/ml for ramipril and 0.4 μg/ml for hydrochlorothiazide. The studied range allows using the method for dosages from 2.5 to 10 mg of ramipril and from 12.5 to 25 mg of hydrochlorothiazide.

Conclusions. The developed technique can be used for simultaneous determination of ramipril and hydrochlorothiazide to study dissolution profiles of the combined dosage form.

KEY WORDS: ramipril; hydrochlorothiazide; tablets; liquid chromatography; dissolution profiles.