

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

РОЗРОБКА ВЕРХ-МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ НІФЕДИПІНУ В ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ З ВИКОРИСТАННЯМ ПІДХОДУ «ЯКІСТЬ ШЛЯХОМ РОЗРОБКИ» (QUALITY BY DESIGN)

Вступ. Лікарські засоби з групи блокаторів кальцієвих каналів (БКК) належать до базисних препаратів, що використовуються в терапії гіпертонічної хвороби (ГХ). Для забезпечення контролю якості лікарських засобів на будь-яких етапах життєвого циклу потрібні надійні, швидкі, чутливі та безпечні методики кількісного визначення їх активних фармацевтичних інгредієнтів. Ніфедипін за хімічною структурою належить до похідних 1,4-дигідропіридину. В існуючих методиках визначення ніфедипіну відсутнє планування експерименту, що, зі свого боку, призводить до надмірного використання розчинників та збільшення часу розробки методики через проведення серії негативних експериментів.

Метою роботи була розробка доступної, простої та безпечної ВЕРХ-методики визначення ніфедипіну в лікарських засобах із застосуванням підходів Quality by Design (QbD).

Методи дослідження. У дослідженні використовували рідинний хроматограф Shimadzu LC-2050 C з діодноматричним детектуванням (ДМД) і програмним забезпеченням LabSolutions. Різного типу колонки використовували як стаціонарні фази для вивчення універсальності й доступності розробленої методики: Luna C8, Luna C18, Zorbax C8 Stable Bond (SB), InertClone ODS та Zorbax SB Phenyl. ФСЗ ніфедипіну (чистота $\geq 98\%$) виробництва Sigma-Aldrich Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA), таблетки «Ніфедипін» 20 мг ПрАТ «ЛекХім».

Результати й обговорення. Для планування експерименту щодо розробки ВЕРХ методики визначення ніфедипіну в ЛЗ використано сучасний підхід QbD. Базові умови елюювання ґрунтувалися на ізохронічному елюванні ніфедипіну рухомою фазою у складі: ацетонітрил – метанол – 0,7 % триетилламін з рН 3,05 у співвідношеннях 30–35–35. Хроматографічні умови: температура – 30 °С, швидкість потоку рухомої фази – 1 мл/хв, детектування за довжини хвилі 237 нм, загальний час визначення – до 4 хв. Запропонована методика апробована на різних колонках: Luna C8 (150 × 4,6 мм, 3 мкм), Luna C18 (100 × 4,6 мм, 3 мкм), InertClone ODS (150 × 4,6 мм, 3,5 мкм), Zorbax SB C8 (150 × 4,6 мм, 3,5 мкм). За отриманими результатами можна зробити висновок, що запропонований підхід визначення ніфедипіну є універсальним і розширює горизонт використання розробленої методики для лабораторій з обмеженою кількістю хроматографічних колонок. Валідацію ВЕРХ-методики проводили відповідно до вимог настанови ІСН за такими параметрами: лінійність, правильність, прецизійність та робастність. Методики МВ та МКВ становили 2,33 мкг/мл та 7,08 мкг/мл відповідно. Діапазон застосування перебував у межах від 10 до 50 мкг/мл. Згідно з проведеними розрахунками інструментами MOGAPI, CaFRI, AGSA та CASI загальний бал екологічності розробленої методики становив 79, 69,44, 77 та 78 відповідно. Отримані значення підтверджують те, що запропонована методика ВЕРХ розроблена відповідно до основних постулатів «зеленої» хімії з використанням сучасних хроматографічних підходів.

Висновки. Розроблено доступну, швидку та безпечну ВЕРХ-методику визначення ніфедипіну в таблетках із використанням принципів QbD. ВЕРХ-методика кількісного визначення ніфедипіну може використовуватись у лабораторіях з обмеженим бюджетом, оскільки задовольняє параметри придатності хроматографічної системи на різного типу колонках.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ніфедипін; лікарські засоби; кількісне визначення; ВЕРХ; Quality by Design.

ВСТУП. Лікарські засоби з групи блокаторів кальцієвих каналів (БКК) належать до базисних препаратів, що використовуються в моно- та комбінованій терапії гіпертонічної хвороби (ГХ). За хімічною класифікацією БКК поділяються на дигідропіридинові та недигідропіридинові. До дигідропіридинових похідних належать: амлодипін, ніфедипін, лерканідипін, німодипін та інші. Механізм дії

описаних препаратів проявляється впливом на судини, тому актуальним є призначення з іншими антигіпертензивними засобами (що впливають на серцевий м'яз) в комбінованій терапії ГХ. Для забезпечення контролю якості лікарських засобів на будь-яких етапах життєвого циклу потрібні надійні, швидкі, чутливі й безпечні методики кількісного визначення їх активних фармацевтичних інгредієнтів. Ніфедипін за хімічною структурою належить до похідних 1,4-дигідропіридину,

pKa та Log P дорівнюють 5,41 та 3,41 відповідно [1–2]. У ДФУ немає монографії про субстанцію та лікарські форми ніфедипіну, тоді як в Американській фармакопеї наявні монографії щодо субстанції та капсул ніфедипіну. В описаних ВЕРХ-методиках використовували рухоми фазу в складі: ацетонітрил – метанол – вода у співвідношеннях 25 : 25 : 50 зі швидкістю потоку 1 мл/хв та довжиною хвилі детектування 265 та 235 нм. Нерухома фаза – хроматографічна колонка L1 (4,6 мм × 25 см, 5 мкг) [3–4].

Фармакопейні методики визначення ніфедипіну мають дещо застарілі способи розробки методик, зважаючи на новітні підходи до компонентів рухомих фаз, умов хроматографування, дизайну дослідження та використання нових хроматографічних колонок. Нами було проведено критичний огляд існуючих джерел щодо аналітичного забезпечення лікарських форм ніфедипіну. У науковій літературі представлена низка хроматографічних методик визначення ніфедипіну в ЛЗ та біологічних рідинах [5–14]. У наведених методиках відсутнє планування експерименту, що, зі свого боку, призводить до надмірного використання розчинників та збільшення часу розробки методики через проведення серії негативних експериментів.

Метою роботи була розробка експресної, простої та «зеленої» ВЕРХ-методики визначення ніфедипіну в лікарських засобах із використанням підходів Quality by Design (QbD).

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У дослідженні використовували рідинний хроматограф Shimadzu LC-2050 C з діодноматричним детектуванням (ДМД) та програмним забезпеченням LabSolutions. Різного типу колонки використовували як стаціонарні фази для вивчення універсальності та доступності розробленої методики: Luna C8 (100 × 4,6 мм, 3 мкм), Luna C18 (100 × 4,6 мм, 3 мкм), InertClone ODS (150 × 4,6 мм, 3,5 мкм), Zorbax SB C8 (150 × 4,6 мм, 3,5 мкм) та Zorbax SB Phenyl (150 × 4,6 мм, 3,5 мкм). Для зважування, дегазації рухомих фаз та корегування pH використовували ваги аналітичні RAD WAG AS 200/C, ультразвукову баню (Elmasonic Easy 40 H, Germany) та pH-метр (Mettler-Toledo, model LE438, Switzerland) відповідно. Для планування експерименту використовували безплатну пробну версію застосунку MiniTab.

ФСЗ ніфедипіну придбано в Sigma-Aldrich Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA), таблетки «Ніфедипін» 20 мг – у ПрАТ «ЛекХім».

Розчинники: метанол (MeOH), ацетонітрил (ACN) та вода високоочищена виробництва Honeywell, Riedel-de Haen (Німеччина). Також у роботі використовували хроматографічної якості: фосфорну кислоту 88 % (для корегування pH), триетиламін (TEA), калію дигідроген фосфат та трифтороцтову кислоту (TFA). Для фільтрування робочих розчинів використовували фільтри RC Membrane (розміром 0,45 мкм, Phenex, Німеччина).

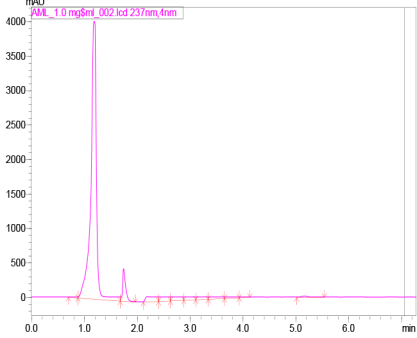
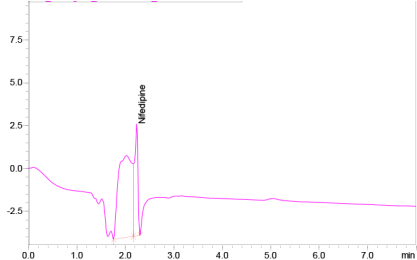
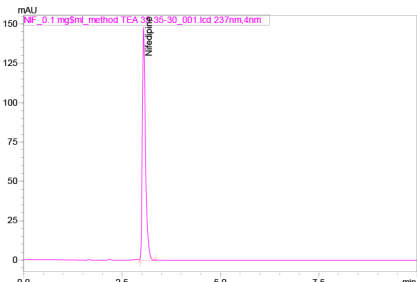
Приготування випробовуваного розчину таблеток ніфедипіну: масу наважки попередньо подрібнених таблеток ніфедипіну, що вміщує 25 мг ніфедипіну, розчиняють метанолом у мірній колбі на 25,00 мл та фільтрують. Відбирають 2,50 мл одержаного фільтрату в колбу на 25,00 мл і доводять об'єм до мітки метанолом.

Приготування розчину порівняння ніфедипіну: 25 мг ФСЗ ніфедипіну поміщають у мірну колбу на 25,00 мл, розчиняють у метанолі та перемішують. Аліквоту 2,50 мл одержаного розчину переносять до мірної колби на 25,00 мл і доводять метанолом до мітки.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Термін, що закладений для розробки ВЕРХ-методики кількісного визначення АФІ, залежить від позитивних і негативних результатів експериментальних досліджень. За великої частки негативних результатів зростає і відповідна кількість затрачених розчинників і реактивів. Крім того, це призводить до зменшення терміну «життя» колонки й експлуатації приладу. Сучасним підходом до планування та розробки методики є використання принципів «Якість шляхом розробки» (Quality by Design) [15]. Принципи QbD використовуються для планування та розробки аналітичних методик з урахуванням різних параметрів (факторів) методу, що впливають на хроматографічний відгук.

Для створення матриці експерименту потрібно провести попередні експериментальні дослідження вибору оптимальних хроматографічних умов. Базисною колонкою в експерименті вибрано Luna C8 розміром 150 × 4,6 мм та діаметром пор 3 мкм. На першому етапі вивчали різні підходи до компонентів рухомих фаз. У таблиці 1 показано способи з використанням у складі рухомих фаз трифтороцтової кислоти, буфера калію дигідрогенфосфату та TEA в різних співвідношеннях з органічними компонентами. Згідно з одержаними результатами ми зупинилися на підході з використанням у складі рухомої фази TEA.

Таблиця 1 – Різні підходи до компонентів рухомих фаз визначення ніфедипіну на хроматографічній колонці Luna C8 (150 × 4,6 мм, 3 мкм)

Підхід	Хроматограма	Висновок
Трифтороцтова кислота 0,1 %		Малий час утримування ніфедипіну (близький до «мертвого» об'єму) та незадовільне розділення
25 mM калію дигідроген фосфат		Великі шуми
TEA 0,5 %		Вузький, несиметричний пік

Як видно з таблиці 1, застосовуючи підхід з 0,5 % TEA у складі рухомої фази одержано розділення ніфедипіну, але з негативним коефіцієнтом симетрії. Тому для подальшого дослідження ми збільшили концентрацію

TEA до 0,7 %, що забезпечило відмінне утримування із задовільним значенням коефіцієнта симетрії (k').

Наступний етап попередніх експериментальних досліджень передбачав

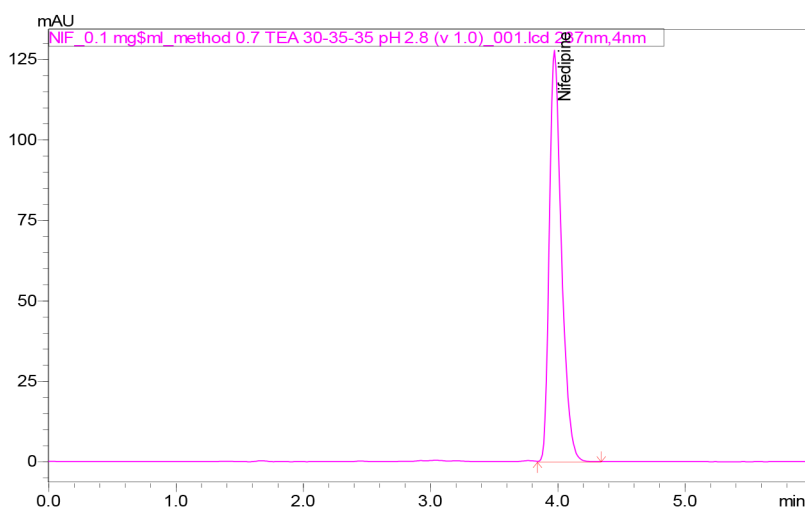


Рис. 1. Хроматограма ніфедипіну (0,1 мг/мл) з рухомою фазою ACN-MeOH – 0,7 % TEA з рН 2,8 (30–35–35) на колонці Luna C8

Таблиця 2 – Вивчення оптимальних хроматографічних умов

Результат \ Параметри	30 °C	28 °C	32 °C	0,8 мл/хв	1,0 мл/хв	1,2 мл/хв	pH 2,71	pH 2,91	pH 3,06	Критерії прийнятності
Коефіцієнт асиметрії (Tf)	1,41	1,35	1,45	1,41	1,41	1,25	1,45	1,25	1,4	0,8–1,5
Коефіцієнт симетрії (K') («мертвий» об'єм 1,278)	2,11	2,16	2,08	2,86	2,11	1,55	1,56	1,54	1,54	1–10
Час утримування (Rt)	3,98	4,04	3,93	4,93	3,98	3,26	3,27	3,25	3,25	–
Число теоретичних тарілок (NTP)	8394	8410	8586	9646	8394	7580	7625	7541	7602	> 2000

підбір оптимальних співвідношень 0,7 % TEA й органічних компонентів у складі рухомої фази, а саме MeOH та ACN. Враховуючи параметри придатності хроматографічної системи впродовж всього експерименту, вибрали оптимальну рухому фазу в складі ACN-MeOH – 0,7 % TEA з pH 2,8 у співвідношеннях 30–35–35 (рис. 1.).

Для оптимізації хроматографічних умов проводили вивчення швидкості потоку, температури та pH, що показано в таблиці 2.

Як видно з таблиці 2, робочими параметрами вибрано: температуру колонки – 30 ± 2 °C, швидкість потоку – 1 мл/хв, рухома фаза у складі ACN-MeOH – 0,7 % TEA з pH 2,81 у співвідношенні 30–35–35.

Враховуючи те, що нашою метою була розробка доступної методики, ми провели апробацію розробленої методики на різних за ціною політикою хроматографічних колонках: Luna C18, Zorbax C8, InertClone ODS та Zorbax Phenyl.

З одержаних даних таблиці 3 випливає, що розроблена ВЕРХ-методика є універсальною і дає змогу забезпечити ефективне розділення ніфедипіну на різних алкільних колонках як стаціонарної фази. Використання Zorbax SB Phenyl (фенільної колонки) також допустиме, проте для забезпечення задовільних параметрів придатності хроматографічної системи потрібно скорегувати хроматографічні умови. Запропонована методика кількісного визначення ніфедипіну є доступною, адже із застосуванням різного типу хроматографічних колонок залишається швидкою та задовольняє параметри придатності хроматографічної системи. Отримані результати розширюють горизонт використання розробленої методики для лабораторій з обмеженою кількістю хроматографічних колонок, тому що в дослідженні показані й різні за ціною категорією колонки (Phenomenex – дешевші, Agilent – дорожчі).

Оптимізація методики. Для оптимізаційного експерименту використовували аналіз Vox Benken, що передбачав три фактори та

в загальному 26 експериментів (таблиця 4). Пріоритетними факторами вибрано співвідношення об'ємів MeOH, 0,7 % TEA в рухомій фазі та pH. Для аналізу й оптимізації основних параметрів проаналізовано такі відгуки: число теоретичних тарілок (NTP), площа піка (A), коефіцієнт асиметрії (Tf) та час утримування (Rt).

Для здійснення статистичного аналізу застосовано програмне забезпечення Minitab. Для вивчення значущості моделей, термінів та їх взаємодій – дисперсійний аналіз (ANOVA). Отримані значення регресійного аналізу подано в рівняннях регресії:

$$\begin{aligned}
 Rt &= 9,50 + 0,0045 \text{ MeOH} - 0,394 \text{ pH} - \\
 &- 0,5143 \text{ TEA} - 0,001049 \text{ MeOH} \cdot \text{MeOH} + \\
 &+ 0,008491 \text{ TEA} \cdot \text{TEA} + \\
 &+ 0,002580 \text{ MeOH} \cdot \text{TEA} + 0,01150 \text{ pH} \cdot \text{TEA} \\
 Res &= -11,63 + 0,531 \text{ TEA} \\
 TF &= -164,9 + 28,83 \text{ pH} + 7,43 \text{ TEA} - \\
 &- 0,0739 \text{ TEA} \cdot \text{TEA} - 0,854 \text{ pH} \cdot \text{TEA} \\
 NTP &= -14402 + 679 \text{ TEA} \\
 A &= -2798651 + 50253 \text{ MeOH} + 128448 \text{ TEA} - \\
 &- 1195 \text{ TEA} \cdot \text{TEA} - 1485 \text{ MeOH} \cdot \text{TEA}
 \end{aligned}$$

Вплив факторів методу на відгук кількості теоретичних тарілок (NTP). Як впливають фактори методики (MeOH, TEA та pH) на відгук NTP, показано на рис. 2. На хроматографічний відгук NTP найбільший вплив має TEA, а саме із зростанням TEA зростає NTP.

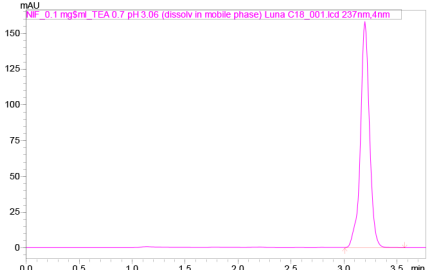
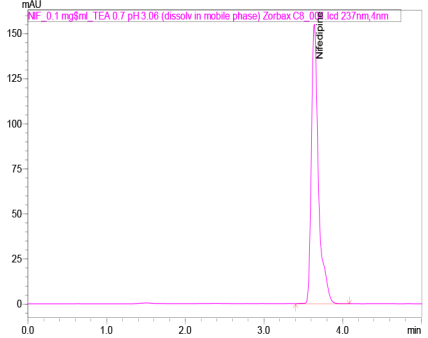
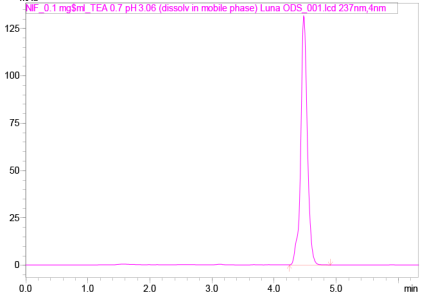
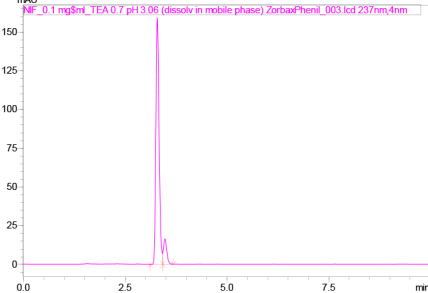
Вплив факторів методу на відгук коефіцієнта асиметрії (Tf). Як впливають фактори методики (MeOH, TEA та pH) на відгук Tf, показано на рис. 3. На хроматографічний відгук Tf значно впливає pH, а саме із зростанням значення pH збільшується Tf.

Вплив факторів методу на відгук – площу піка (A).

Як впливають фактори методики (MeOH, TEA та pH) на відгук A, показано на рис. 4. На хроматографічний відгук значно впливає MeOH, а саме зі збільшенням MeOH зростає A.

Вплив факторів методу на відгук час утримування (Rt). Як впливають фактори

Таблиця 3 – Апробація різних хроматографічних колонок

Хроматографічна колонка	Хроматограма	Примітки
Luna C18 Phenomenex		Симетричний пік із задовільними параметрами хроматографічної системи (час утримування до 3,5 хв)
Zorbax SB C8 Agilent Technologies		Несиметричний пік із задовільними параметрами хроматографічної системи (час утримування до 4,0 хв)
InertClone ODS Phenomenex		Симетричний пік із задовільними параметрами хроматографічної системи (час утримування до 5,0 хв)
Zorbax SB Phenyl Agilent Technologies		Несиметричний і вузький пік із незадовільними параметрами хроматографічної системи (час утримування до 4,0 хв)

Примітки: * – хроматографічна колонка Luna C8 була базовою та описаною вище;
 ** – SB – Stable Bond (захищена та стійка колонка).

методики (MeOH, TEA та pH) на відгук Rt, показано на рис. 5. На хроматографічний відгук Rt, як і на NTP, впливає TEA, а саме із зростанням TEA зростає Rt.

Оптимізація методики. Для оптимізації методики визначено такі критерії: NTP, A, Rt – максимальне значення, Tf – значення від 1,0 до 1,5. Результати оптимізації дослідження представлено на рис. 6. Найкраще елювання ніфедипіну спостерігалось з pH 3,05, а оптимальне відсоткове співвідношення

в рухомій фазі MeOH та TEA становило 35 і 30 % відповідно.

Валідація хроматографічної методики визначення ніфедипіну. Для забезпечення контролю якості ЛЗ потрібно використовувати валідовані методики кількісного визначення АФІ. Валідацію розробленої ВЕРХ-методики проводили за такими параметрами: лінійність, робастність, правильність та прецизійність відповідно до вимог настанови ІСН [16].

Таблиця 4 – Матриця експерименту

StdOrder	RunOrder	PtType	Blocks	MeOH	pH	TEA	NTP	A	Tf	Rt
1	1	2	1	30	2,7	32,5	8838	177783	1,786	3,412
2	2	2	1	35	2,7	32,5	7690	178026	1,557	3,51
3	3	2	1	30	3,1	32,5	8634	178084	1,781	3,386
4	4	2	1	35	3,1	32,5	7558	182009	1,568	3,486
5	5	2	1	30	2,9	30	0	142101	0	3,086
6	6	2	1	35	2,9	30	7101	176601	1,598	3,155
7	7	2	1	30	2,9	35	9792	176387	1,716	3,821
8	8	2	1	35	2,9	35	8055	177334	1,458	3,955
9	9	2	1	32,5	2,7	30	7748	161647	0	3,123
10	10	2	1	32,5	3,1	30	7689	181167	1,726	3,116
11	11	2	1	32,5	2,7	35	9085	176830	1,567	3,894
12	12	2	1	32,5	3,1	35	9064	177306	1,563	3,912
13	13	0	1	32,5	2,9	32,5	8562	176717	1,65	3,459
14	14	2	1	30	2,7	32,5	8767	178376	1,777	3,41
15	15	2	1	35	2,7	32,5	7685	177978	1,546	3,508
16	16	2	1	30	3,1	32,5	8733	178466	1,793	3,39
17	17	2	1	35	3,1	32,5	7553	178428	1,554	3,491
18	18	2	1	30	2,9	30	0	136312	0	3,083
19	19	2	1	35	2,9	30	7113	177047	1,598	3,155
20	20	2	1	30	2,9	35	9806	177335	1,712	3,817
21	21	2	1	35	2,9	35	8012	177386	1,461	3,953
22	22	2	1	32,5	2,7	30	7660	164291	0	3,119
23	23	2	1	32,5	3,1	30	7703	177323	1,694	3,114
24	24	2	1	32,5	2,7	35	8975	176765	1,585	3,888
25	25	2	1	32,5	3,1	35	9405	176957	1,594	3,904
26	26	0	1	32,5	2,9	32,5	8498	176836	1,654	3,457

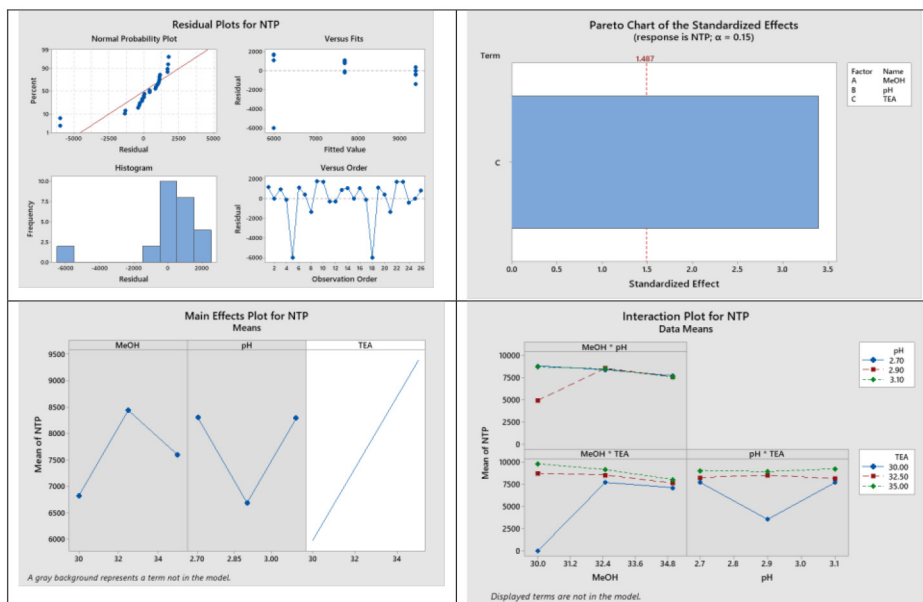


Рис. 2. Результати вивчення хроматографічного відгіку NTP

Лінійність, діапазон застосування. Лінійність ВЕРХ-методики проводили за допомогою регресійного аналізу. Результати вивчення основних параметрів лінійної залежності продемонстровано в таблиці 5.

Калібрувальний графік та рівняння регресії наведено на рисунку 7.

МВ та МКВ методики становлять 2,33 та 7,08 мкг/мл відповідно. Діапазон застосування перебував у межах від 10 до 50 мкг/

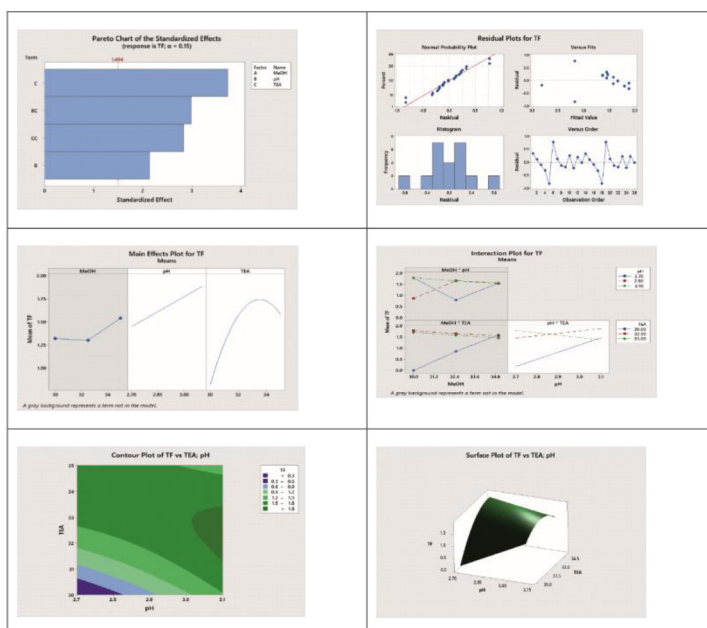


Рис. 3. Результати вивчення хроматографічного відгуку Tf

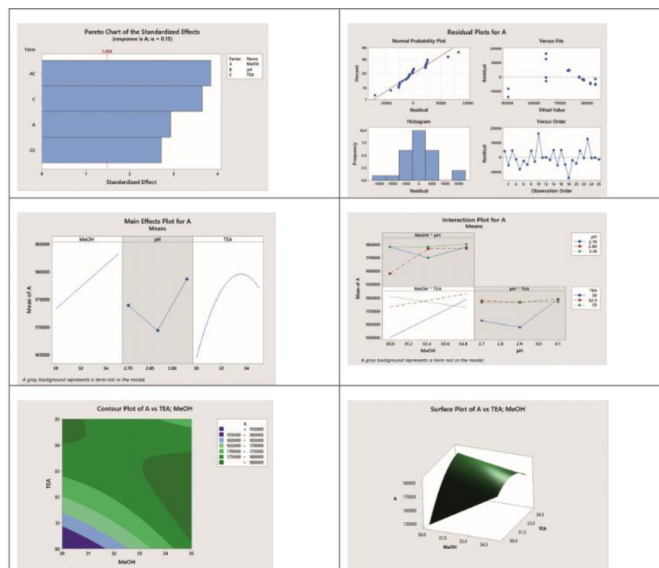


Рис. 4. Результати вивчення хроматографічного відгуку A

мл. Отримані значення лінійної залежності відповідають критеріям прийнятності.

Правильність та прецизійність. Для вивчення валідаційного параметра «правильність», згідно з табл. 6, готували модельні зразки з точними концентраціями АФІ в межах від 80 до 120 %, оцінюючи коректність критеріїв прийнятності. Для вивчення прецизійності виконували по 6 експериментів у 3 серіях дослідів (табл. 7). Одержані результати правильності та прецизійності відповідають критеріям прийнятності.

Апробація розробленої ВЕРХ-методики для кількісного визначення ніфедипіну в таблетках. Розроблену хроматографічну методику було протестовано на таблетках «Ніфедипін» 20 мг ПрАТ «ЛекХім». Отримані результати підтверджують можливість використання розробленої хроматографічної методики для аналізу ЛЗ на основі ніфедипіну (табл. 8).

Робасність. Для аналізу валідаційного параметра «робасність» вивчали зміни Tf та Rt залежно від змін температури та швидкості потоку.

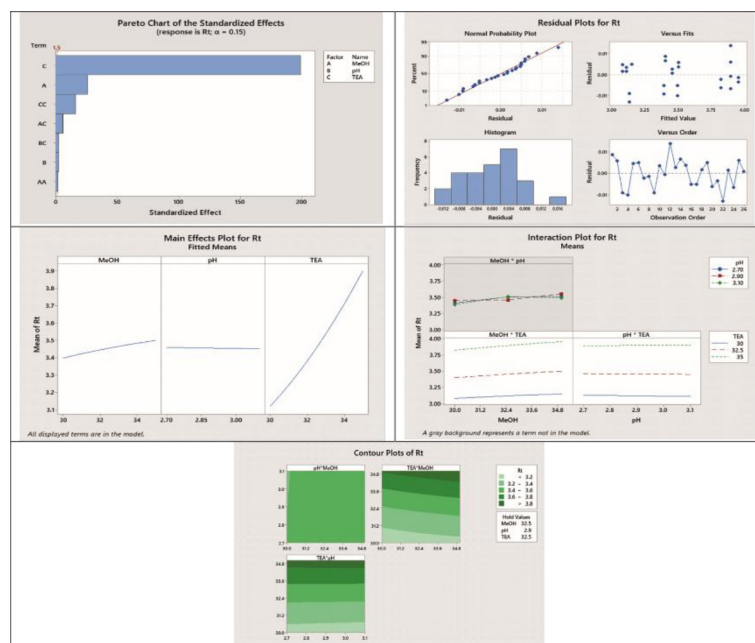
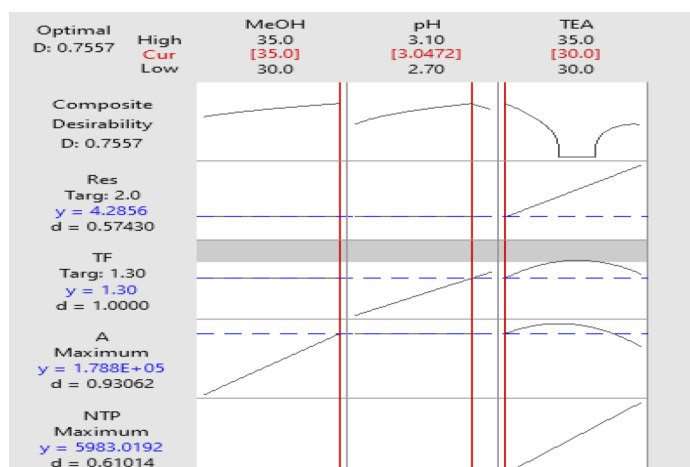
Рис. 5. Результати вивчення хроматографічного відгуку R_t 

Рис. 6. Результати оптимізації хроматографічної методики кількісного визначення ніфедипіну з рухомою фазою у складі ACN-МеОН – 0,7 % TEA з рН 3,05 (30–35–35)

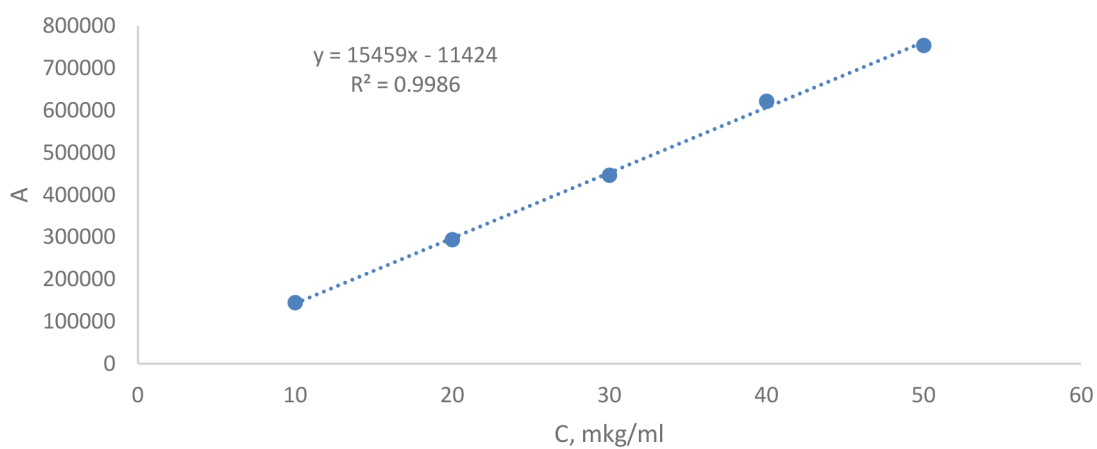


Рис. 7. Залежність концентрації ніфедипіну від площі піка

Таблиця 5 – Основні параметри лінійної залежності

Параметр	Значення	Критерій	Висновок про методику
$b \pm (S_b)$	15 459 $\pm$ (330,11)	–	Коректна
$a \pm (S_a)$	–11 423,8 $\pm$ (10 948,79)	$ a \leq \Delta a$	Коректна
Δa	30 398,72	–	Коректна
Δb	916,56	–	Коректна
R^2	0,9986	$> 0,9980$	Коректна
MB	2,337	–	Коректна
MKB	7,083	–	Коректна
Діапазон застосування, мкг/мл	10,00–50,00	–	Коректна

Таблиця 6 – Результати вивчення правильності

Модельні зразки	Вміст ніфедипіну, %		Результат $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100 \%$
	Введено, $X_i = (C_i/C_{rs}) \cdot 100 \%$	Знайдено, $Y_i = (A_i/A_{rs}) \cdot 100 \%$	
M_1	79,91	80,04	100,17
M_2	80,11	80,05	99,93
M_3	80,29	79,99	99,63
M_4	100,16	100,15	99,99
M_5	99,99	100,01	100,02
M_6	100,10	100,22	100,12
M_7	120,05	119,97	99,93
M_8	120,01	120,05	100,03
M_9	120,12	119,97	99,86
Середнє значення, Z , %			99,96
Стандартне відхилення, S_z , %			0,16
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95 \%, 8) \cdot S_z = 2,3060 S_z$, %			0,37
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta_{As} = 2,4 \%$			Виконується ($0,37 < 2,4$)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 $, %			0,04
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta \%$			Виконується ($0,04 < 0,51$)
Відповідає вимогам			Загальний висновок про методику

Таблиця 7 – Результати вивчення прецизійності

№ зразка	Значення Z , %		
	1-й експеримент	2-й експеримент	3-й експеримент
1	100,07	99,89	100,12
2	99,95	100,05	99,97
3	99,98	101,01	100,10
4	100,09	100,10	100,04
5	100,15	99,89	100,16
6	99,99	99,95	99,92
Середнє Z (%)	100,04	99,98	100,05
RSD_x , %	0,09	0,08	0,10
Відносне стандартне відхилення, RSD_z (%)	0,09		
Відносний довірчий інтервал, Δ_z	$0,09 \leq 2,4$		
Критичне значення збіжності результатів Δ_{As} , %	2,4		

Результати, наведені в табл. 9, свідчать, що невеликі зміни температури та швидкості потоку не мають суттєвого впливу на робастність методики.

Застосування принципів «зеленої» хімії для розробки ВЕРХ-методики визначення ніфедипіну в лікарських засобах

Підтвердженням актуальності екологічно безпечних методик є суттєве збільшення інструментів і метрик для вивчення «зеленості» за останніх декілька років. Це пов'язано із забезпеченням мінімізації негативних впливів перед, під час та після аналізу ЛЗ на навколишнє середовище та працівників лабораторії. Для

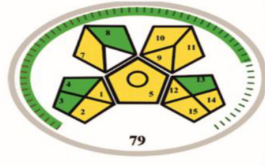
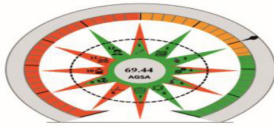
Таблиця 8 – Кількісне визначення ніфедипіну в таблетках

Лікарський препарат	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
Таблетки «Ніфедипін» 20 мг ПрАТ «ЛекХім»	0,0202 0,0201 0,0198 0,0199 0,0200 0,0203	$\bar{m} = 0,020$ г $S = 1,87 \cdot 10^{-4}$ $t = 2,57$ $\Delta x = 1,96 \cdot 10^{-4}$ $RDS = 0,93$ $\varepsilon = 0,98 \%$

Таблиця 9 – Результати вивчення робасності

Хроматографічні параметри		Tf	Rt
Швидкість потоку, мл/хв	0,8	1,45	4,93
	1,0	1,41	3,98
	1,2	1,25	3,26
Температура, °C	28	1,35	4,04
	30	1,41	3,98
	32	1,45	3,93

Таблиця 10 – Результати вивчення екологічності ВЕРХ-методики визначення ніфедипіну

Інструмент	Результат
Modified GAPI (MOGAPI)	
AGSA	
CaFRI	
CACI	

вивчення екологічності розробленої ВЕРХ-методики застосовували інструменти Modified GAPI (MOGAPI), CaFRI, AGSA, CACI [17–20].

Згідно з проведеними розрахунками інструментами MOGAPI, CaFRI, AGSA та CACI загальний бал екологічності

розробленої методики становив 79, 69,44, 77 та 78 відповідно. Отримані значення підтверджують, що запропонована ВЕРХ-методика розроблена відповідно до основних постулатів «зеленої» хімії з використанням сучасних хроматографічних підходів.

ВИСНОВКИ. Нами розроблено доступну, швидко й безпечно ВЕРХ-методику визначення ніфедипіну в таблетках із використанням принципів QbD. У роботі показано імплементацію розробленої методики на різних типах хроматографічних колонок та за різною ціновою категорією. ВЕРХ-методика кількісного визначення ніфедипіну може використовуватись у лабораторіях з обмеженим бюджетом, оскільки задовольняє параметри

придатності хроматографічної системи на різного типу колонках. Для забезпечення надійності результатів проводили валідацію розробленої ВЕРХ-методики відповідно до принципів ІСН. Методика була лінійною в діапазоні від 10 до 50 мкг/мл, МВ та МКВ становило 2,34 та 7,08 мкг/мл відповідно. Отримані значення вивчення екологічності методами MOGAPI, AGSA, CACI та CaFri вказують на відмінний «зелений» результат.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Gonchar A., Sholoiko N. Consumption analysis of two-component fixed combinations of medicines for arterial hypertension treatment in Ukraine as one of the stages for evaluation of their reimbursement prospects. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. Vol. 4, No. 38. P. 19–27. DOI: <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.263733>
2. PubChem – National Library of Medicine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/> (accessed on 31 May 2024).
3. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.). 11th Edition. 2022. URL: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-11th-edition> (accessed on 22 March 2023).
4. The United States Pharmacopeia. The National Formulary. Rockville, Md.: United States Pharmacopeial Convention, Inc. URL: <https://www.uspnf.com> (accessed on 22 March 2023).
5. Garg S., Bhosale A. P., Saritha K., Pendlikatla S., Haritha G., Yadav P., Yanmandru V. K. Determination of Nifedipine by Validated RP-HPLC Method in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form. *Journal of Advanced Zoology*. 2023. Vol. 44.
6. Girase Sanjana P., Chetna R. Mahajan, Pratibha S. Mali. Development and validation of stability indicating HPLC method for estimation of nifedipine in extended-release tablet dosage form. *World journal of pharmaceutical research*. 2024. Vol. 13, No. 23. P. 1306–1316.
7. Hashem H., Ehab I. A., Magda E. A novel stability indicating HPLC-method for simultaneous determination of atenolol and nifedipine in presence of atenolol pharmacopoeial impurities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2025. Vol. 5, No. 8. P. 017–025.
8. Zhang M. J., Jiang S. X., Huang X. M., Wei W. Z., Duan G. P., Zhang H. Q. Rp-hplc determination of nifedipine tablets. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2011. Vol. 31, No. 2. P. 368–370.
9. Logoyda L., Korobko D., Ivanusa I., Kovalenko S. Development of the methodology of the chromatographic determination of nifedipine in medicines. 2017.
10. Bhardwaj S., Gupta M. K., Bhalla V. Method development and validation of stability indicating UPLC assay method for Nifedipine. *International Journal of Drug Regulatory Affairs*. 2018. Vol. 3, No. 4. P. 24–42.
11. Galan-Rodriguez C., González-Álvarez J., Valls-Remolí M. Method development and validation study for quantitative determination of nifedipine and related substances by ultra-high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*. 2015. Vol. 29, No. 2. P. 233–239.
12. Arafat M., Ahmed Z., Mikov M. Determination of nifedipine in rat plasma using HPLC-UV detector: A simple method for pharmacokinetics and oral bioavailability studies. *Int. J. Pharma. Pharm. Sci*. 2016. Vol. 8. P. 98–102.
13. Logoyda L. A HPLC-MS/MS method development and validation for the simultaneous determination of nifedipine and enalapril in human plasma. *Int J Appl Pharm*. 2018. Vol. 10. P. 35–42.
14. Logoyda L. HPLC-MS/MS method development for the quantitative determination of nifedipine for Caco-2 permeability assay. *Pharmacia*. 2020. Vol. 67. P. 83–88.
15. ICH I. Q9 (R1). Quality Risk Management. In International conference on harmonization of technical requirements for registration of Pharmaceuticals for Human use considerations. 2023.
16. ICH Q2 (R2). Validation of Analytical Procedures – Scientific guideline. Geneva. 2023. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline> (accessed on 24 June 2024).
17. Mansour F. R., Bedair A., Belal F., Magdy G., Locatelli M. Analytical Green Star Area (AGSA) as a new tool to assess greenness of analytical methods. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2025. Vol. 46. P. 102051.
18. Mansour F. R., Nowak P. M. Introducing the carbon footprint reduction index (CaFRI) as a software-supported tool for greener laboratories in chemical analysis. *BMC chemistry*. 2025. Vol. 19, No. 1. P. 121.
19. Mansour F. R., Plotka-Wasyłka J., Locatelli, M. Modified GAPI (MoGAPI) tool and software for the assessment of method greenness: case studies and applications. *Analytica*. 2024. Vol. 5, No. 3. P. 451–457.
20. Mansour F. R., Bedair A., Locatelli M. Click analytical chemistry index as a novel concept and framework, supported with open source software to assess analytical methods. *Advances in Sample Preparation*. 2025. Vol. 14. P. 100164.

REFERENCES

1. Gonchar, A., & Sholoiko, N. (2022). Consumption analysis of two-component fixed combinations of medicines for arterial hypertension treatment in Ukraine as one of the stages for evaluation of their reimbursement prospects. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, 4 (38), 19–27. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.263733>
2. PubChem – National Library of Medicine. Retrieved from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/> (accessed on 31 May 2024).
3. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.). 11th Edition (2022). Retrieved from: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph.-eur.-11th-edition> (accessed on 22 March 2023).
4. The United States Pharmacopeia (2021). The National Formulary. Rockville, Md.: United States Pharmacopeial Convention, Inc. Retrieved from: <https://www.uspnf.com> (accessed on 22 March 2023).
5. Garg, S., Bhosale, A. P., Saritha, K., Pendlikatla, S., Haritha, G., Yadav, P., Yanmandru, V. K. (2023). Determination of Nifedipine by Validated RP-HPLC Method in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form. *Journal of Advanced Zoology*, 44.
6. Girase, Sanjana P., Chetna R. Mahajan, & Pratibha S. Mali (2024). Development and validation of stability indicating HPLC method for estimation of nifedipine in extended-release tablet dosage form. *World journal of pharmaceutical research*, 13 (23), 1306–1316.
7. Hashem, H., Ehab, I.A., & Magda, E. (2015). A novel stability indicating HPLC-method for simultaneous determination of atenolol and nifedipine in presence of atenolol pharmacopoeial impurities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(8), 017–025.
8. Zhang, M. J., Jiang, S. X., Huang, X. M., Wei, W. Z., Duan, G. P., & Zhang, H. Q. (2011). Rp-Hplc determination of nifedipine tablets. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 31(2), 368–370.
9. Logoyda, L., Korobko, D., Ivanusa, I., & Kovalenko, S. (2017). Development of the methodology of the chromatographic determination of nifedipine in medicines.
10. Bhardwaj, S., Gupta, M. K., & Bhalla, V. (2018). Method development and validation of stability indicating UPLC assay method for Nifedipine. *International Journal of Drug Regulatory Affairs*, 3(4), 24–42.
11. Galan-Rodriguez, C., González-Álvarez, J., & Valls-Remolí, M. (2015). Method development and validation study for quantitative determination of nifedipine and related substances by ultra-high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*, 29(2), 233–239.
12. Arafat, M., Ahmed, Z., & Mikov, M. (2016). Determination of nifedipine in rat plasma using HPLC-UV detector: A simple method for pharmacokinetics and oral bioavailability studies. *Int. J. Pharma. Pharm. Sci*, 8, 98–102.
13. Logoyda, L. (2018). A HPLC-MS/MS method development and validation for the simultaneous determination of nifedipine and enalapril in human plasma. *Int J Appl Pharm*, 10, 35–42.
14. Logoyda, L. (2020). HPLC-MS/MS method development for the quantitative determination of nifedipine for Caco-2 permeability assay. *Pharmacia*, 67, 83–88.
15. ICH, I. (2023). Q9 (R1) Quality Risk Management. In *International conference on harmonization of technical requirements for registration of Pharmaceuticals for Human use considerations*.
16. ICH Q2 (R2) Validation of Analytical Procedures–Scientific guideline. Geneva (2023). Retrieved from: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline> (accessed on 24 June 2024).
17. Mansour, F. R., Bedair, A., Belal, F., Magdy, G., Locatelli, M. (2025). Analytical Green Star Area (AGSA) as a new tool to assess greenness of analytical methods. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 46, 102051.
18. Mansour, F. R., Nowak, P. M. (2025). Introducing the carbon footprint reduction index (CaFRI) as a software-supported tool for greener laboratories in chemical analysis. *BMC Chemistry*, 19 (1), 121.
19. Mansour F. R., Plotka-Wasyłka J., Locatelli, M. (2024). Modified GAPI (MoGAPI) tool and software for the assessment of method greenness: case studies and applications. *Analytica*, 5 (3), 451–457.
20. Mansour, F. R., Bedair, A., Locatelli, M. (2025). Click analytical chemistry index as a novel concept and framework, supported with open source software to assess analytical methods. *Advances in Sample Preparation*, 14, 100164.

Адреса для листування: tverdun_mamy@tdmu.edu.ua

M. M. Horyn

I. HORBACHEVSKY TERNOPIL NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY
OF THE MINISTRY OF HEALTH OF UKRAINE

DEVELOPMENT OF THE HPLC METHOD FOR THE DETERMINATION OF NIFEDIPINE IN DRUGS USING THE APPROACH “QUALITY BY DESIGN”

Summary

Introduction. Calcium channel blockers (CCBs) are among the basic drugs used in the treatment of hypertension (HT). To ensure the quality control of drugs at any stage of the life cycle, reliable, fast, sensitive and safe methods for the quantitative determination of their active pharmaceutical ingredients are required. Nifedipine is a 1,4-dihydropyridine derivative by chemical structure. Existing methods for the determination of nifedipine lack experimental planning, which in turn leads to excessive use of solvents and an increase in the time required to develop the method due to a series of negative experiments.

The aim of the work was to develop an accessible, simple and safe HPLC method for the determination of nifedipine in drugs using Quality by Design (QbD) approaches.

Research Methods. In this study used a Shimadzu LC-2050 C liquid chromatograph with a diode array detection (DMD) and LabSolutions software. Different types of columns were used as stationary phases when studying the versatility and accessibility of the developed method: Luna C8, Luna C18, Zorbax C8 Stable Bond (SB), InertClone ODS and Zorbax SB Phenyl. Nifedipine CRS (purity $\geq 98\%$) manufactured by Sigma-Aldrich Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA), Nifedipine tablets 20 mg manufactured by LekKhim PrJSC.

Results and Discussion. To plan the experiment on the development of HPLC method for the determination of nifedipine in drugs was used a modern QbD approach. The basic elution conditions were based on isocratic elution of nifedipine with a mobile phase consisting of: acetonitrile-methanol – 0.7 % triethylamine with pH 3.05 in the ratios 30–35–35. Chromatographic conditions: temperature – 30 °C, mobile phase flow rate – 1 ml/min, detection at wavelength – 237 nm, total detection time up to 4 min. The proposed method was tested on different columns: Luna C8 (150 × 4.6 mm, 3 μ m), Luna C18 (100 × 4.6 mm, 3 μ m), InertClone ODS (150 × 4.6 mm, 3.5 μ m), Zorbax SB C8 (150 × 4.6 mm, 3.5 μ m). According to the results, it can be concluded that the proposed approach for the determination of nifedipine is universal and expands the horizon of the use of the developed method for laboratories with a limited number of chromatographic columns. Validation of the HPLC method was carried out in accordance with the requirements of the ICH for the following parameters: linearity, accuracy, precision and robustness. The LOD and LOQ of the method were 2.33 μ g/ml and 7.08 μ g/ml, respectively. The range of application was from 10 to 50 μ g/ml. According to the calculations performed using the MOGAPI, CaFRI, AGSA and CACI tools, the overall environmental score of the developed method was 79, 69.44, 77 and 78, respectively. The obtained values confirm that the proposed HPLC method was developed in accordance with the basic postulates of “green” chemistry using modern chromatographic approaches.

Conclusions. An accessible, rapid and safe HPLC method for the determination of nifedipine in tablets using QbD principles has been developed. The HPLC method for the quantitative determination of nifedipine can be used in laboratories with a limited budget, as it satisfies the suitability parameters of the chromatographic system on various types of columns.

KEY WORDS: amlodipine besylate; quantification; medicines; HPLC; Quality by Design.

Стаття надійшла до редакції 14.09.2025

Стаття прийнята 30.09.2025

Статтю опубліковано 24.10.2025

