التقدير الطيفي لـ (أتورفاستاتين الكالسيوم) بشكله النقي وفي مستحضراته الصيدلانية

قيس ناجي رشيد

كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة تكريت

الخلاصة

استُخدمت طريقتين بسيطة وحساسة وسريعة لتقدير المركب الدوائي اتورفاستاتين الكالسيوم (Atv) بشكله النقي وفي مستحضراته الصيدلانية. اعتمدت الطريقة [I] على أكسدة (Atv) في الوسط الحامضي باستخدام عامل مؤكسد (بروميد البوتاسيوم:برومات البوتاسيوم) ($KBr:KBrO_3$) يليها اضافة صبغة البنفسج البلوري Crystal Violet (CV) [4-[bis[4-(dimethylamino)phenyl]methylidene]cyclohexa-2,5-dien-1-ylidene]-dimethylazanium;chloride والتي تتفاعل مع المتبقي من العامل المؤكسد ليتكون ناتج أزرق والذي أعطى أعلى قيمة امتصاص عند طول موجي 594 نانومتر، أما الطريقة [II] فتضمنت تقدير (Atv) باستخدام الكاشف الكروموجيني صوديوم 1،2- نفثوكينون-4-سلفونيت في الوسط القاعدي وعند أس هيدروجيني (pH 11.5) لتكوين ناتج برتقالي والذي أعطى أعلى امتصاص عند طول موجي 456 نانومتر، ومدى الخطية كان عند (10-100) مكغم/مل و(20-80) مكغم/مل للطريقتين على التوالي، وعند امتصاصية مولارية 70.708×10^4 لتر/مول.سم و41.2347×10^4 لتر/مول.سم، ومعامل ارتباط 0.9992 و0.9977، وكان حد الكشف وحد الكمية (0.0178 مكغم/مل، 0.054 مكغم/مل) و(0.059 مكغم/مل، 0.179 مكغم/مل) للطريقتين على التوالي، طبقت الطريقتان بنجاح في تقدير (Atv) في المستحضرات الصيدلانية على شكل أقراص.

الكلمات المفتاحية: أتورفاستاتين الكالسيوم، (بروميد البوتاسيوم:برومات البوتاسيوم)، صبغة البنفسج البلوري، كاشف كروموجيني، طرائق طيفية.

Spectrophotometric Determination of (Atorvastatin Ca) in Pure form and in the Pharmaceutical Formulations

Qabas N. Rashid

College of Education for pure science-Tikrit University

umadwaan@gmail.com

Received: 27 March 2017 **Accepted: 14 May 2017**

Abstract

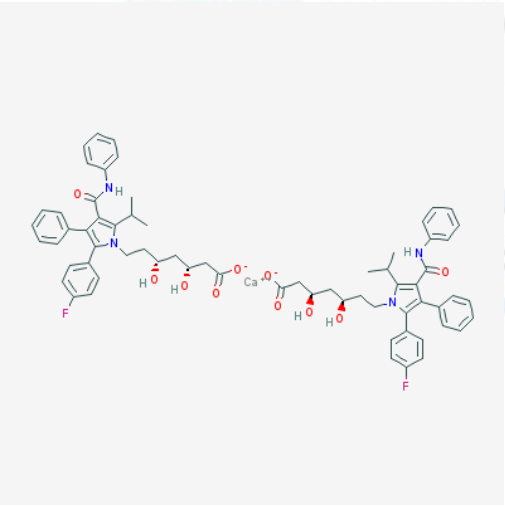
Simple, sensitive and rapid two methods for determination of Atorvastatin Calcium (Atv) in both pure form and pharmaceutical formulations. The first method was based on the oxidation of the studied drug in presence of acidic medium by a known excess of (Potassium bromide: Potassium bromate) ($KBr:KBrO_3$) as an oxidizing agent and subsequent determination of unreacted oxidant by reacting it with Crystal Violet (CV) dye [4 [bis [4 (dimethylamino) phenyl] methylidene] cyclohexa-2,5-dien-1-ylidene]-dimethylazanium;chloride to produce blue at $\lambda_{max.}$ 594 nm. The second method involved determination of (Atv) using Chromogenic reagent Sodium 1,2-naphthoquine- 4-sulfonate (NQS) as reagent in an alkaline medium (pH 11.5) to form an orange product at $\lambda_{max.}$ 456nm, and the linearity range was found to be (10-100)µg/mL and (20-80)µg/mL respectively. With molar absorptivity 70.708×10^4 L/mol.cm and 20.565×10^3 L/mol.cm, correlation coefficient 0.9992 and 0.9977 and the limit of detection and limit of quantification (0.0178 µg/mL, 0.054 µg/mL) and (0.059 µg/mL, 0.179 µg/mL) respectively. The two methods were successfully applied for the determination of (Atv) in tablet formulation.

Key Words: Atorvastatin Calcium, ($KBr:KBrO_3$), Crystal Violet dye, Chromogenic reagent, spectrophotometric methods.

المقدمة

أتورفاستاتين الكالسيوم (الموضح في شكل رقم 1) [1] ينتمي إلى مجموعة الستاتين (أو مثبطات إنزيم HMG-CoA) وهي ادوية مخفضة للكوليسترول، بالإضافة إلى دوره في التنظيم الغذائي لعلاج إرتفاع الكوليسترول والدهون الثلاثية في الدم، كما يستخدم للوقاية من الجلطات لدى مرضى إرتفاع الكوليسرول في الدم وللتقليل من إحتمال الوفاة نتيجة اسباب متعلقة بأمراض القلب [2]. الاسم العلمي له Calcium (3R,5R) – 7 - [2 - (4 -fluorophenyl)-3-phenyl- 4-(phenylcarbamoyl)-5-propan-2-ylpyrrol-1-yl]-3,5-dihydroxyheptanoate وصيغته الكيميائية $C_{66}H_{68}CaF_2N_4O_{10}$ ووزنه الجزيئي155.34 غم/مول [3].

استخدمت تقنيات كثيرة ومتنوعة لتقدير عقار Atorvastatin Calcium ومنها تقديره في مصل الدم بتقنية liquid chromatography–mass spectrometry [4]، وكذلك قُدر بتقنية HPLC [5]، كما قُدر بتقنية TLC-Densitometric [6]، وتقنية TLC [7]، بالاضافة الى تقديره في المستحضرات الصيدلانية والعينات البيولوجية بتقنية differential pulse adsorptive stripping voltammetry (DPAdSV) [8]، بالاضافة الى تقديره بتقنية UV. spectrophotometry في المستحضرات الصيدلانية بنوعيها الأقراص والكبسول [9-15]، كما استُخدمت تقنية UV- visible spectrophotometry بشكل كبير في تقدير هذا العقار في التراكيب الصيدلانية بنوعيها الأقراص والكبسول [16-21].



شكل (1): الصيغة التركيبية لـ Atorvastatin Ca

الهدف من البحث

يهدف البحث الى ايجاد طريقة طيفية بسيطة وسريعة واقتصادية لتقدير عقار اتورفاستاتين الكالسيوم باستخدام كواشف تعطي نواتج ملونة عند ارتباطها مع هذا العقار سواء باستخدام صبغة مع العامل المؤكسد في الوسط الحامضي، أو باستخدام كاشف كروموجيني في الوسط القاعدي، وكذلك معرفة تكافؤية العقار مع كل من هذين الكاشفين من خلال اعتماد طريقتي

النسبة المولية وطريقة التغيرات المستمرة (طريقة جوب)، ومدى نجاح الطريقتين المقترحتين في تقدير العقار في المستحضرات الصيدلانية (على هيئة أقراص).

المواد وطرائق العمل

الأجهزة

- مطياف الأشعة المرئية-فوق البنفسجية نوع:

Single beam from A&E Lab (UK) –S60- Series with 1 cm quartz cells

- مقياس الدالة الحامضية نوع: (Senz pH tester, China)
- ميزان حساس (بأربع مراتب عشرية) نوع: Mettler AB 104-S (Switzerland)

المـواد

- اتورفاستاتين الكالسيوم (M. wt. 1155.363 g/mole, %98.8) من معمل أدوية سامراء (SDI Samarra-Iraq).
- بروميد البوتاسيوم KBr (M. wt. 119.002 g/mole, %99) من شركة Merck، وبرومات البوتاسيوم ($KBrO_3$ M. wt. 167 g/mole, %98) من شركة Fluka.
- صبغة البنفسج البلوري Crystal Violet (M. wt. 407.979 g/mole, %90) من شركة Fluka.
- كاشف NQS (M. wt. 260.20 g/mole, %97) من شركة BDH.
- حامض الكبريتيك H_2SO_4 (M. wt. 98.079 g/mole, %98) من شركة GCC.
- حامض الهيدروكلوريك HCl (M. wt. 36.46094 g/mole, %36) من شركة Thomas baker.
- حامض النتريك HNO_3 (M. wt. 63.01 g/mole, %70) من شركة GCC.
- حامض الخليك CH_3COOH (M. wt. 60.05 g/mole, %99) من شركة Merck.
- هيدروكسيد الصوديوم NaOH (M. wt. 39.997 g/mole, %98) من شركة GCC.
- ايثانول CH_3CH_2OH (M. wt. 46.06844 g/mole, %99.9) من شركة Scharlau.

تحضير المحاليل

- حُضر محلول أتورفاستاتين الكالسيوم القياسي بتركيز 1000 مكغم/مل وذلك بإذابة 0,1000 غم منه في 100 مل من الايثانول ومنه تم تحضير المحاليل المخففة.
- تم تحضير العامل المؤكسد ($KBr:KBrO_3$) بأخذ وزن 1,0 غم من بروميد البوتاسيوم، وأخذ وزن 0,1000 غم من برومات البوتاسيوم، وتذوب في 100 مل ماء مقطر [22]، (يؤخذ من المزيج المذاب 2,5 مل وتخفف الى 100 مل ماء مقطر في قنينة حجمية).
- حُضر محلول حامض الكبريتيك بتركيز تقريبي 1,0 مولاري وذلك بتخفيف 5,4 مل من الحامض المركز (18,4 مولاري) الى 100 مل ماء مقطر.

- حُضرت الصبغة بتركيز 1×10^{-4} مولاري وذلك بإذابة 0,0041 غم منها في 100 مل ماء مقطر.
- حُضر محلول حامض الهيدروكلوريك بتركيز تقريبي 1,0 مولاري وذلك بتخفيف 8,6 مل من الحامض المركز (11,64 مولاري) الى 100 مل ماء مقطر.
- حُضر محلول حامض النتريك بتركيز تقريبي 1,0 مولاري وذلك بتخفيف 6,3 مل من الحامض المركز (15,78 مولاري) الى 100 مل ماء مقطر.
- حُضر محلول حامض الخليك بتركيز تقريبي 1,0 مولاري وذلك بتخفيف 5,8 مل من الحامض المركز (17,33 مولاري) الى 100 مل ماء مقطر.
- حُضر محلول كاشف NQS بتركيز 0,01 مولاري وذلك بإذابة 0,2602 غم منه في 100 مل ماء مقطر، ويكون تحضير المحلول يومياً خلال الاستخدام وكذلك يُحفظ بعيداً عن الضوء أثناء التخزين.
- حُضر محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 1,0 مولاري وذلك بإذابة 4,000 غم منه في 100 مل ماء مقطر.

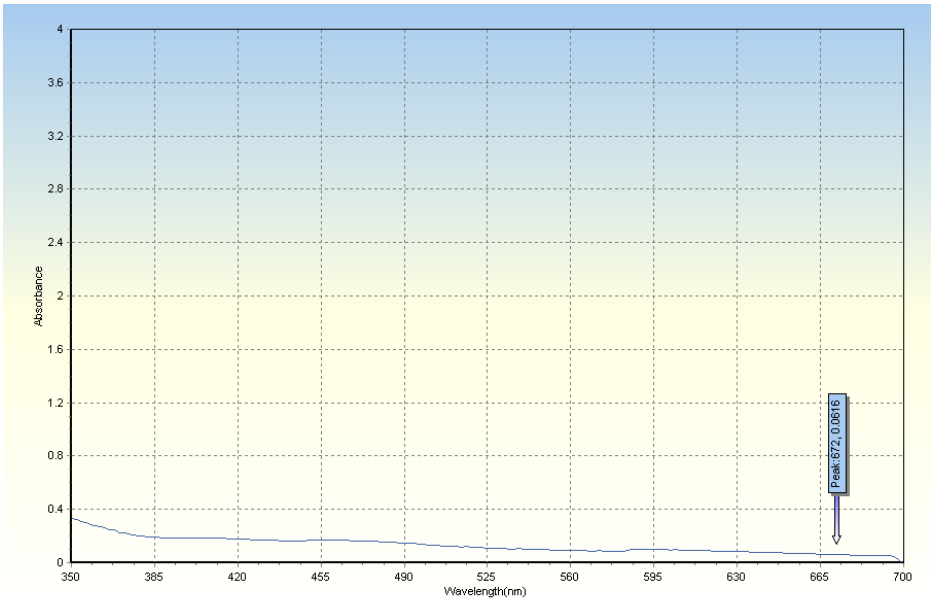
الطريقة الأولى

خطوات العمل

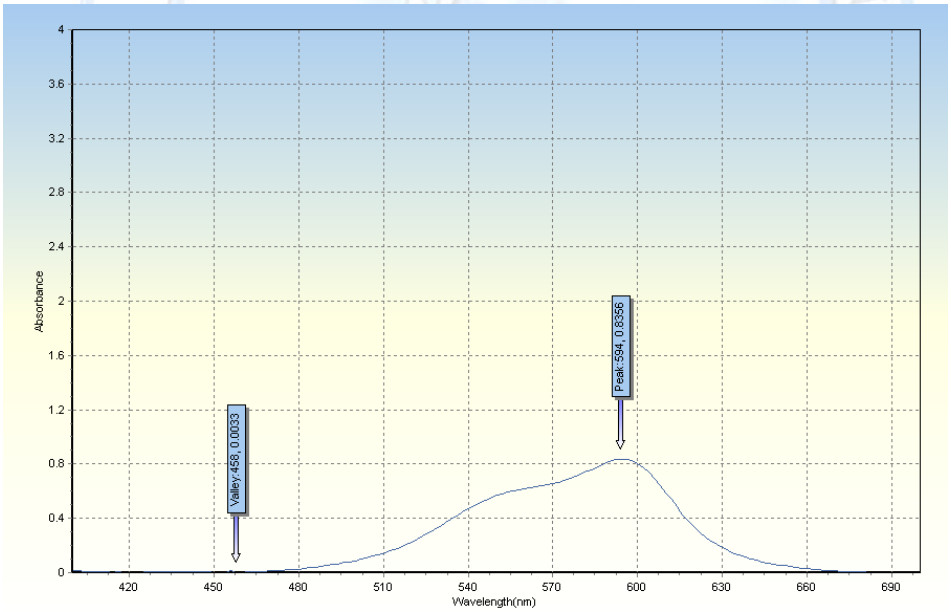
بعد اجراء الاختبارات الأولية، تم التوصل الى الظروف المثلى حيث يُنقل 1,0 مل من 500 مكغم/مل (Atv) الى قنينة حجمية سعة 10 مل، ثم يُضاف 1,5 مل من العامل المؤكسد ($KBr:KBrO_3$) بتخفيف (2,5 الى 100 مل)، تليها اضافة 0,5 مل من 1,0 مولاري حامض H_2SO_4، وبعد 15 دقيقة يُضاف 1,0 مل من صبغة Crystal Violet، وبعد 5 دقائق يُكمل الحجم بالايثانول الى 10 مل، وكان اعلى امتصاص للمركب الناتج (أزرق اللون) 594 نانومتر.

النتائج والمناقشة

أطياف الامتصاص مبينة في شكل (2) والذي يمثل طيف امتصاص محلول البلانك المكوّن من (العامل المؤكسد والوسط الحامضي والصبغة) مقابل الماء المقطر، وشكل (3) الذي يمثل طيف امتصاص معقد Atv-CV مقابل البلانك لتكوين ناتج أزرق اللون له أعلى امتصاص عند 594 نانومتر.



شكل (2): طيف امتصاص محلول البلانك مقابل المذيب (الماء المقطر)

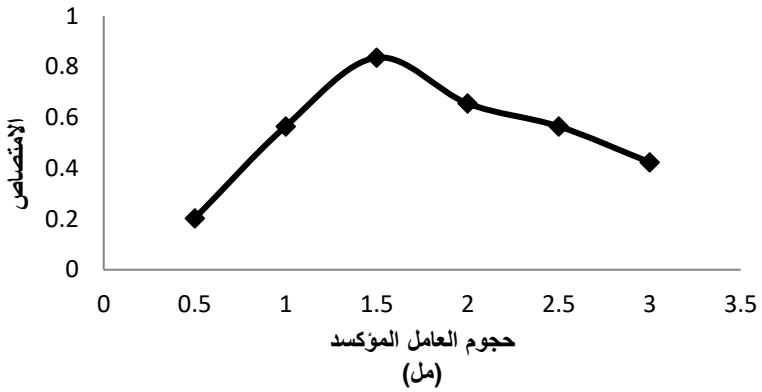


شكل (3): طيف امتصاص معقد Atv-CV مقابل البلانك

الظروف المثلى لتكوين المعقد:

1. تأثير حجم العامل المؤكسد

بعد اجراء اختبارات لأفضل نسبة مزيج للعامل المؤكسد على تكوين المعقد والتي كانت بتخفيف (2,5 الى 100 مل)، تم اضافة حجوم مختلفة ومتزايدة من مزيج العامل المؤكسد ($KBr:KBrO_3$) لمعرفة مدى تأثيرها على امتصاص المعقد الناتج، حيث يتبين من شكل (4) أن أفضل حجم مضاف من العامل المؤكسد هو 1,5 مل والذي تم استخدامه في الدراسات اللاحقة، مع ملاحظة نقصان الامتصاص عند اضافة حجوم اكثر بسبب ان شدة لون الناتج تقل تدريجياً الى ان يختفي اللون تماماً.



شكل (4): تأثير حجم العامل المؤكسد ($KBr:KBrO_3$) على امتصاص معقد Atv-CV

2. تأثير استخدام حوامض مختلفة

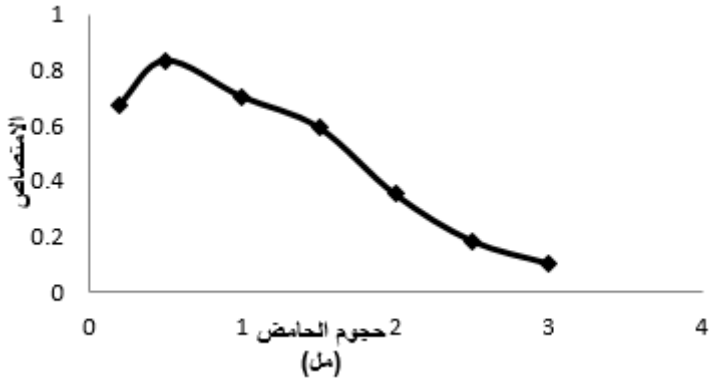
استُخدمت حوامض (H_2SO_4, HCl, HNO_3, CH_3COOH)، وبتركيز 1,0 مولاري لكل منهم، وكذلك نفس الحجم المضاف 0,5 مل، لمعرفة الحامض الذي يعطي أفضل امتصاص عند تكوين المعقد، حيث يتبين من جدول (1) أن أفضل حامض مستخدم لتكوين الناتج هو حامض الكبريتيك.

جدول (1): تأثير انواع مختلفة من الحوامض على قيم امتصاص معقد Atv -CV

الحامض المستخدم	قيم امتصاص معقد Atv -CV
H_2SO_4	0,8356
HCl	0,5773
HNO_3	0,3496
CH_3COOH	0,2051

3. تأثير حجم الحامض

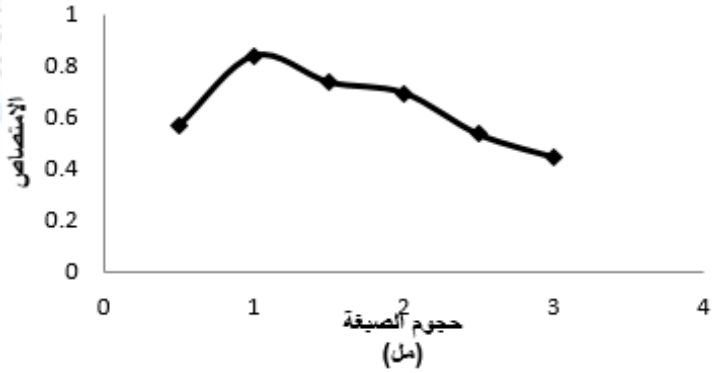
استُخدمت حجوم مختلفة ومتزايدة من حامض H_2SO_4 بتركيز 1,0 مولاري، لمعرفة الحجم الذي يعطي اعلى امتصاص، وكما مبين في شكل (5) فإن الحجم الأمثل المضاف من الحامض هو 0,5 مل، وعند زيادة الحجم المضاف فإن لون الناتج المتكون يختفي تدريجياً.



شكل (5): تأثير حجم حامض H_2SO_4 على قيم امتصاص معقد Atv -CV

4. تأثير حجم الصبغة

الشكل (6) يبين تأثير اضافة حجوم مختلفة من صبغة CV على امتصاص المعقد، وكان افضل حجم مضاف هو 1,0 مل، وتم استخدام هذا الحجم في التجارب اللاحقة.



شكل (6): تأثير حجوم صبغة CV على قيم امتصاص معقد Atv -CV

5. تأثير الزمن على استقرارية المعقد

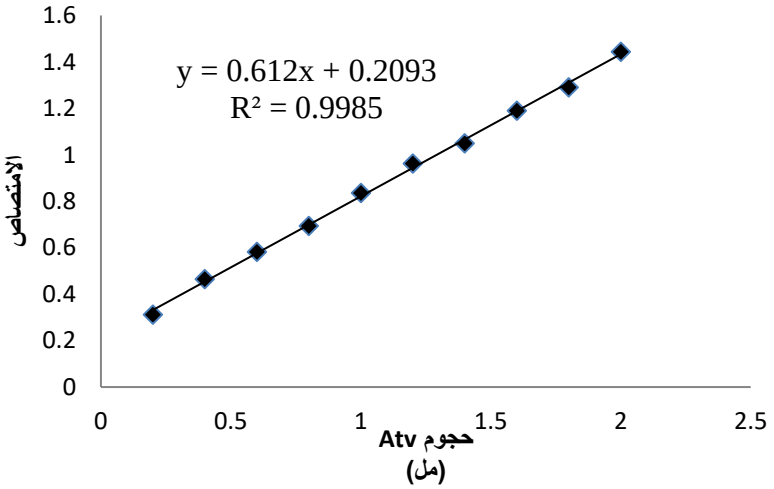
دُرس تأثير استقرار المعقد لأهميته في معرفة الفترة الزمنية التي يبقى فيها ثابتاً، حيث تم متابعة التفاعل مع الزمن باستخدام الظروف المثلى كل عشرة دقائق لمدة ثلاث ساعات، وبعدها أُخذ امتصاص المعقد في اليوم التالي ولوحظ من جدول (2) ثبات قيم الامتصاص عند $\lambda_{max.}$ مع الزمن، حيث ان قيمة الامتصاص للمعقد ثابتة لمدة 24 ساعة.

جدول (2): تأثير الزمن على استقرارية معقد Atv -CV

الزمن (دقيقة)	امتصاص معقد Atv -CV
0.0	0,8356
10	590,83
20	600,83
30	50,835
40	40,835
50	0,8356
60	0,8356
120	70,835
180	0,8356
(24 ساعة)	0,8356

منحنى المعايرة

يبين شكل (7) الصفة الخطية لمنحنى المعايرة الذي تم الحصول عليه عند الظروف المثلى، حيث ان الخطية كانت ضمن التراكيز (10-100) مكغم/مل والتي تساوي الحجوم ضمن (0,2-2,0) مل.



شكل (7): منحنى المعايرة لمعقد Atv -CV عند $\lambda_{max.}$ 594 نانومتر

التطبيقات

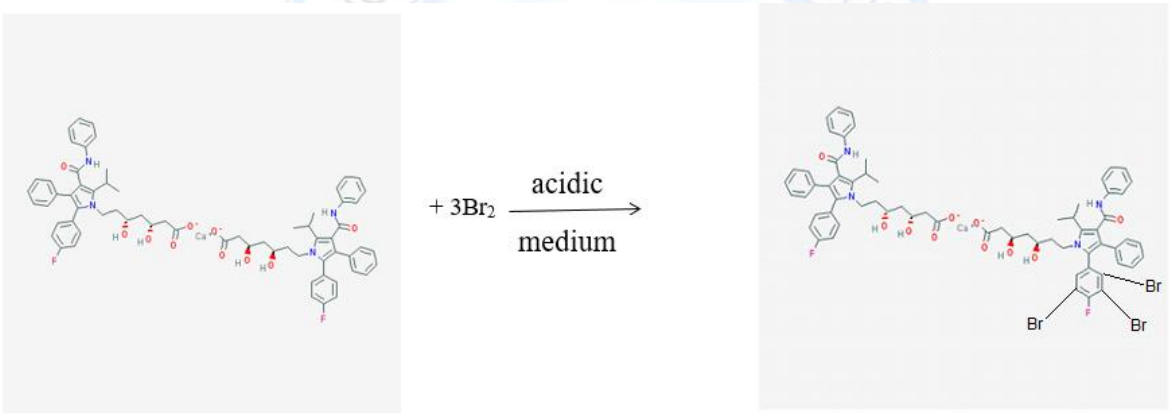
تم تطبيق هذه الطريقة في تقدير Atv في مستحضراته الصيدلانية على هيئة أقراص، وذلك بأخذ وزن 20 قرص وحساب متوسط الوزن (المعدل) الذي يعادل وزن قرص واحد، تم طحن الأقراص جيداً الى مسحوق ناعم، واخذ وزن منها يعادل 0,1000 غم من Atv ويُذوّب في 100 مل من الايثانول، وبعدها رُشح المحلول واستُعمل الراشح للتقدير، يُؤخذ من الراشح 5 تراكيز لتقدير Atv في المستحضر، وكما في جدول (3).

جدول (3): تطبيق الطريقة المقترحة في تقدير Atv على المستحضرات الصيدلانية (الطريقة الأولى)

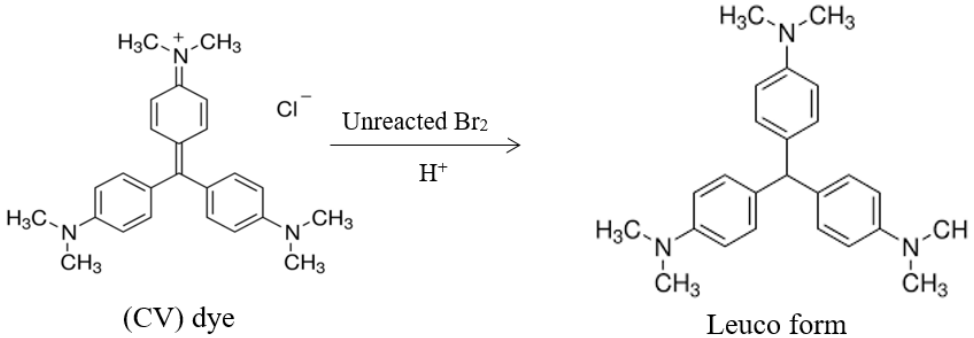
المستحضرات الصيدلانية	المحتوى من Atv (ملغم)	المستحصل بالطريقة المقترحة (ملغم)	نسبة الخطأ %E	الاسترداد المئوي %Rec.
Atorvastatin TAD	20	20,19	0,95	100,95
Atorvastatin AVas-20	20	20,08	0,40	100,40
Atorvast 20	20	20,27	1,35	101,35

يمكن أن يكون التفاعل المقترح حسب كيفية أكسدة العقار Atv من خلال ارتباط ثلاث مجاميع من البروم بالحلقة التي يرتبط بها مجموعة هالوجين [23] وكيفية تحويل صبغة CV الى Leuco form [24] وكما يلي:

$$BrO_3^- + 5Br^- + 6H^+ \longrightarrow 3Br_2 + 3H_2O$$



Atv



(CV) dye

Leuco form

الطريقة الثانية

خطوات العمل

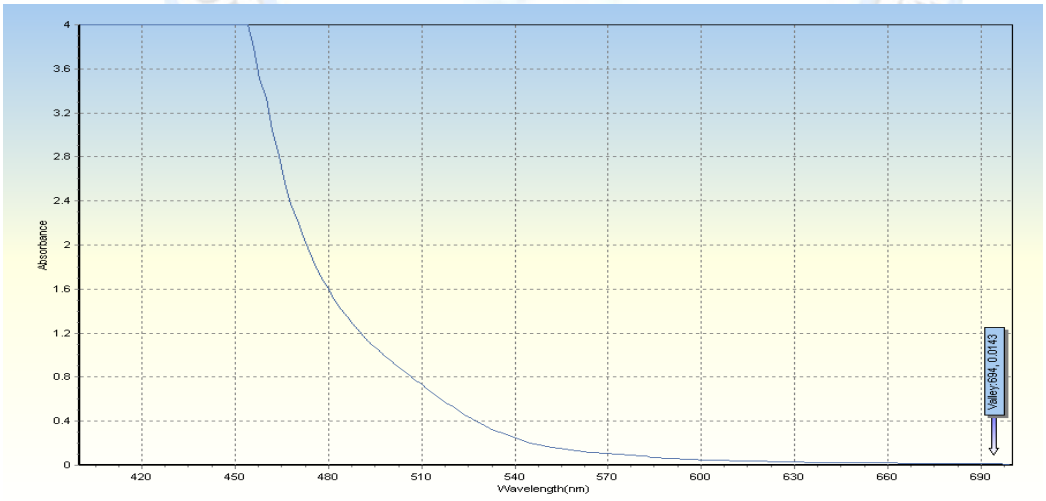
بعد اجراء الاختبارات الأولية، تم التوصل الى الظروف المثلى حيث نُقل 2,0 مل من محلول Atv بتركيز 500 مكغم/مل الى قنينة حجمية سعة 25 مل، يليها اضافة 4,0 مل من0,01 مولاري من محلول كاشف NQS، وبعدها يُضاف 0,5 مل من 1,0 مولاري NaOH، وبعد 15 دقيقة يُكمل الحجم بالماء المقطر.

تعيين تكافؤية المعقد

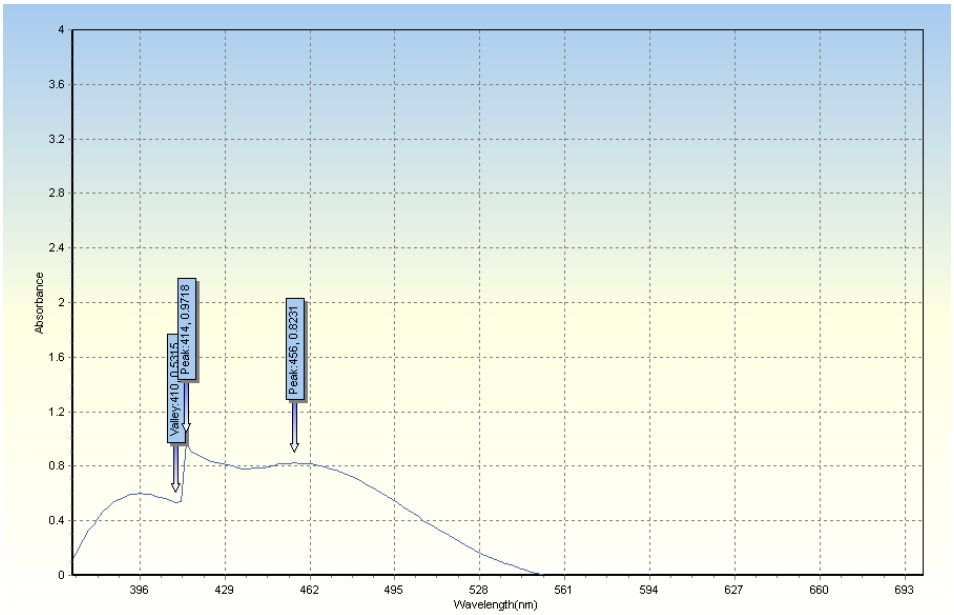
من أجل التعرف على نسبة تكافؤ العقار الى الكاشف في المعقد المتكون طيفياً، تم تطبيق طريقتي النسبة المولية (Mole ratio) والتغيرات المستمرة (Continuous variation, Job method)، حيث أُجريت طريقة النسبة المولية باضافة حجوم متزايدة 1,0 – 15 مل من الكاشف بتركيز أولي 4×10^{-3} مولاري في حجم نهائي 25 مل، أما طريقة جوب فتضمنت اضافة حجوم متناقصة 4,5 – 0,5 مل من الكاشف بتركيز أولي 4×10^{-3} مولاري الى حجوم متزايدة 0,5 – 4,5 مل من العقار بنفس التركيز، حيث يكون الحجم الكلي لكل من العقار والكاشف 5 مل، وباتباع نفس الخطوات عند الظروف المثلى.

النتائج والمناقشة

أطياف الامتصاص مبينة في شكل (8) والذي يمثل طيف امتصاص محلول البلانك المكوّن من (محلول الكاشف NQS والوسط القاعـدي) مقابل الماء المقطـــر، وشكل (9) الذي يمثـــل طيف امتصاص معقد Atv-NQS مقابل البلانك عند درجة حرارة الغرفة 25 ^{0}م لتكوين ناتج برتقالي اللون له أعلى امتصاص عند 456 نانومتر.



شكل (8): طيف امتصاص محلول الكاشف NQS مقابل المذيب (الماء المقطر)

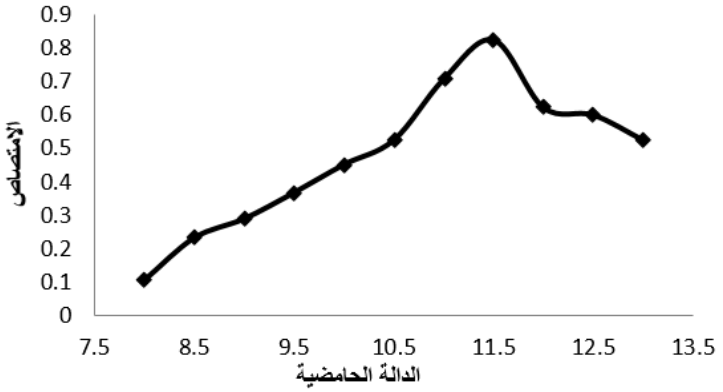


شكل (9): طيف امتصاص معقد Atv -NQS مقابل البلانك

الظروف المثلى لتكوين المعقد:

1. **تأثير الدالة الحامضية**

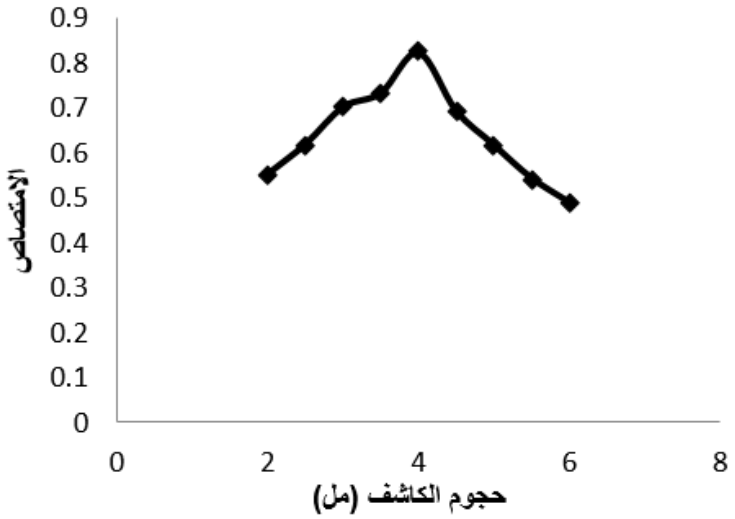
يُعتبر الوسط القاعدي ضروري لتكوين الناتج، لأن Atv لا يتفاعل مع الكاشف في الوسط الحامضي، حيث اظهرت النتائج عند دالة حامضية اقل من 8,0 يكون الامتصاص مقارب للصفر، حيث تكون الدالة الحامضية المثلى لتكوين المعقد عند 11,5 والمبينة في شكل (10) والذي يتضمن اضافة حجوم من تراكيز مختلفة من هيدروكسيد الصوديوم لدراسة تأثير الـpH.



شكل (10): تأثير الدالة الحامضية على قيم امتصاص معقد Atv –NQS

2. تأثير تركيز الكاشف

تم دراسة تأثير تركيز الكاشف NQS في درجة حرارة الغرفة، وذلك من خلال اضافة حجوم متزايدة من الكاشف بتركيزه الأولي 0,01 مولاري مع ثبات تركيز Atv وهو 40 مكغم/مل، وشكل (11) يبين أن الحجم الأمثل المضاف من الكاشف هو 4,0 مل.



شكل (11): تأثير تركيز الكاشف NQS على قيم امتصاص معقد Atv –NQS

3. تأثير الزمن على استقرارية المعقد

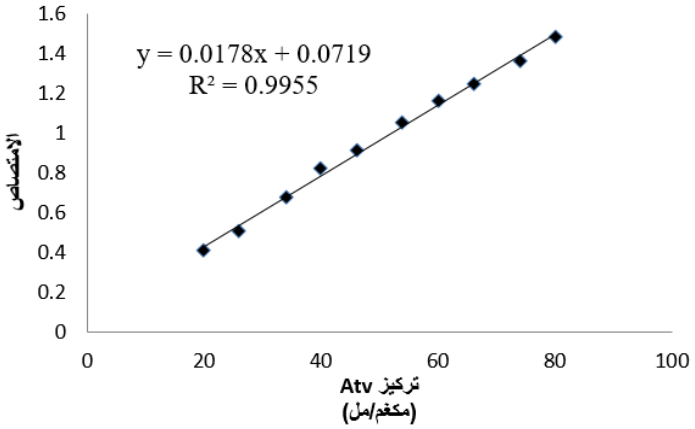
لمعرفة استقرارية المعقد الناتج وذلك من دراسة الفترة الزمنية التي يبقى فيها ثابتاً، فقد تم متابعة تفاعل الكاشف NQS مع العقار Atv مع الزمن عند الظروف المثلى، حيث يلاحظ من النتائج المبينة في جدول (4) ثبات قيم الامتصاص عند $\lambda_{max.}$ مع الزمن ولمدة 120 دقيقة (ساعتان) على الأقل وهذه المدة كافية لإجراء القياسات.

جدول (4): تأثير الزمن على استقرارية معقد Atv - NQS

الزمن (دقيقة)	امتصاص معقد Atv - NQS
0.0	0,8231
10	0,8235
20	0,8229
30	0,8230
40	0,8231
50	0,8231
60	0,8232
120	0,8231

منحنى المعايرة

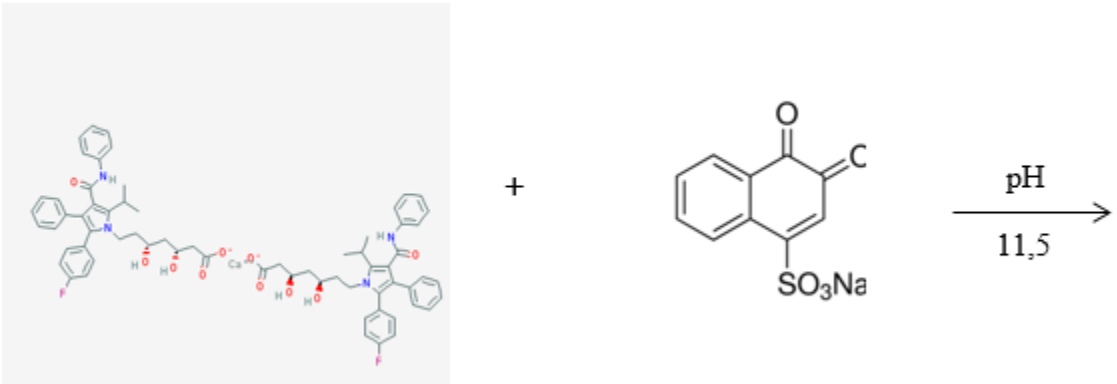
تم الحصول على الصفة الخطية لمنحنى المعايرة تحت الظروف المثلى والمبينة في شكل (12)، حيث أن الخطية كانت ضمن التراكيز (20-80) مكغم/مل.

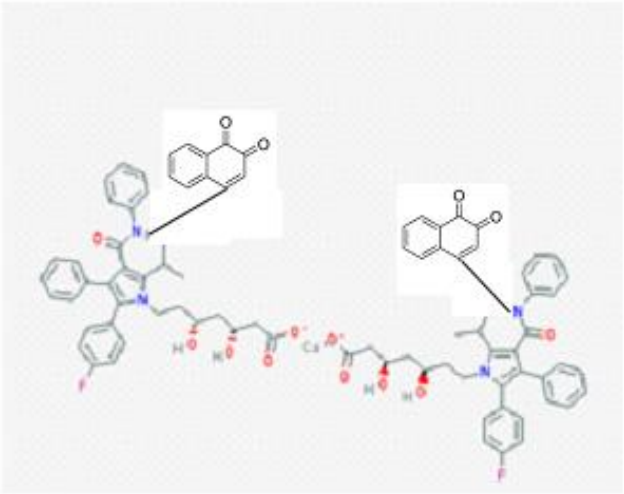


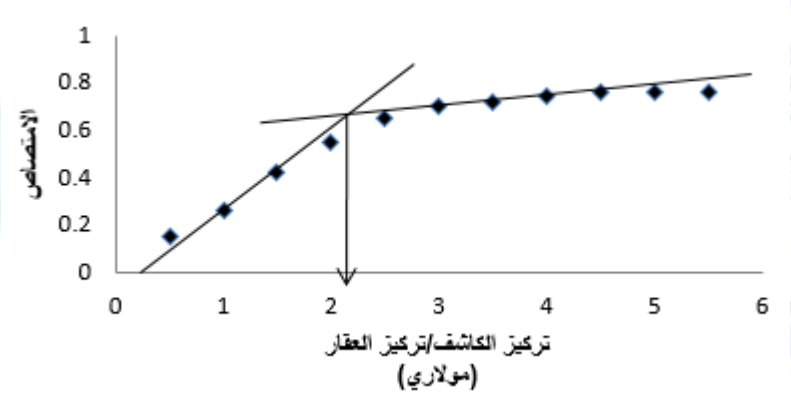
شكل (12): منحنى المعايرة لمعقد Atv -NQS عند $\lambda_{max.}$ 456 نانومتر

تكافؤية المعقد

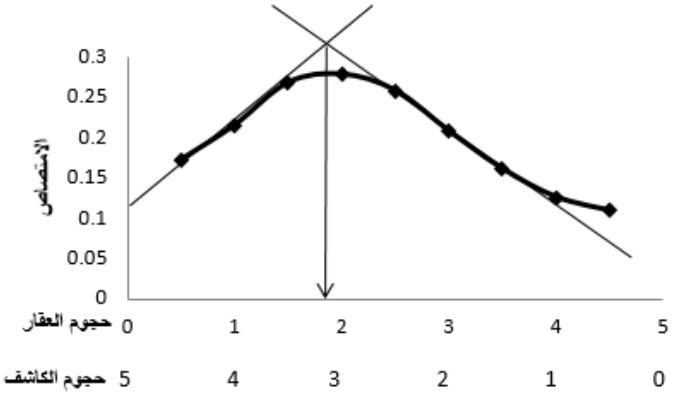
من خلال تطبيق طريقتي النسبة المولية وطريقة جوب في تعيين تكافؤية المعقد وعند الظروف المثالية، فقد أكدت الطريقتان أن نسبة ارتباط العقار الى الكاشف هي 2:1، لذا فالتفاعل المقترح هو ارتباط العقار مع الكاشف من خلال مجموعتي الأمين الثانوية في كلا الطرفين [25-27].







شكل (13): طريقة النسبة المولية لمعقد Atv –NQS



شكل (14): منحنى طريقة التغيرات المستمرة لمعقد Atv -NQS

التطبيقات

تم تطبيق هذه الطريقة في تقدير Atv في مستحضراته الصيدلانية على هيئة أقراص، والنتائج مبينة في جدول (3).

جدول (3): تطبيق الطريقة المقترحة في تقدير Atv على المستحضرات الصيدلانية (الطريقة الثانية)

المستحضرات الصيدلانية	المحتوى من Atv (ملغم)	المستحصل بالطريقة المقترحة (ملغم)	نسبة الخطأ %E	الاسترداد المئوي %Rec.
Atorvastatin TAD	20	20,26	1,3	101,30
Atorvastatin AVas-20	20	20,15	0,75	100,75
Atorvast 20	20	20,28	1,4	101,40

المصادر

1. PubChem, Atorvastatin calcium, National Centre for Biotechnology Information, U. S. National Library of Medicine.
2. J. N. Suresh Kumar - Ch. Narendra Babu - T. Dhanalakshmi - K. Florence - M. Sita Ramanjaneyulu - N. Sambasivanaik - "Development and validation of spectrophotometric method for estimation of Atorvastatin Calcium bulk and pharmaceutical formulations" – World Journal of Pharmacy and pharmaceutical Sciences, 2014, Vol. 3(7), pages 1305-1313.
3. M. Sobhy Al-Adl1 - M. Lobna Abdel-Aziz - AM. Maha Mohamed - "Spectrophotometric determination of Atorvastatin Calcium and Rosuvastatin Calcium in bulk and dosage form using P-Dimethylaminobenzaldehyde" - J App Pharm. ,2017, Vol.9(1), pages 1-7.

4. Hossein Danafar and Mehrdad Hamidi – "Method validation of Amlodipine and Atorvastatin by liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) method in human plasma" - Cogent Medicine, 2016, Vol. 3, pages 1-11.
5. H. Elsadig Rudwan - B. W. E. Amna Mohammed Hussien and E. M. Ahmed Saeed – "Development and validation of stability indicating high performance liquid chromatography method for determination of Atorvastatin Calcium in the presence of its degradation products" - Pelagia Research Library, Der Pharmacia Sinica, 2015, Vol.6(11), pages 19-27.
6. S. Nada Abdelwahab – A. Badr EL-Zeiny and I. Salwa Tohamy – "TLC- Densitometric method for determination of some Cholesterol lowering drugs in different combinations" - Journal of Chromatography & Separation Techniques, 2012, Vol. 3(3), pages 1-6.
7. Abdul Aziz Ramadan - Hussen AL-Akraa - Mohammad Maktabi – "TLC simultaneous determination of Amlodipine, Atorvastatin, Rosuvastatin and Valsartan in pure form and in tablets using Phenyl-modified Aleppo Bentonite" – Int. J. Pharm. Pharm. Sci., 2014, Vol. 6(3), pages 180-188.
8. G. Tiago Almeida Silva Hudson Zanin - Fernando Campanha Vicentini - Orlando Fatibello-Filho – "Differential pulse adsorptive stripping Voltammetric determination of nanomolar levels of Atorvastatin Calcium in pharmaceutical and biological samples using a vertically aligned carbon nanotube/graphene oxide electrode" - The Analyst, 2014, Vol. 139(11), pages 1-39.
9. N. Pandurang Dhabale - Vijay jadhav and Chandrakant Raut – "UV-spectrophotometric estimation of Atorvastatin Calcium in tablet Dosage Form" - Asian J. Research Chem., 2010, Vol. 3(2), pages 1-3.
10. P. Kailash Prajapati – A. Bhandari – "Spectroscopic method for estimation of Atorvastatin Calcium in tablet dosage form" – Indo. Global Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, Vol. 1(4), pages 294-299.
11. S. Ghanty – N. Sadhukhan – A. Mondal – "Development and validation of a UV-spectrophotometric method for quantification of Atorvastatin in tablets" - Journal of Pharma. Sci.Tech., 2012, Vol. 2(1), pages 34-40.

12. Shyni Bernard - Molly Mathew - K.L.Senthilkumar - K. N. Girija – "Simultaneous estimation of Atorvastatin Calcium and Amlodipine besylate by UV spectrophotometric method using hydrotropic solubilization" - Hygeia. J. D. Med., 2013, Vol. 5(1), pages 105-112.

13. Safila Naveed – "Simple UV spectrophotometric assay of Atorvastatin API formulation and their comparative study" - Global Journal of Medical Research: B, 2014, Vol. 14(2), pages 34-38.

14. N. Usha Rani – K. Keerthana – M. Mitha – S. Santhosh Kumar, K. Kotamma - T. M. N. U. Kiran – "New spectroscopic method for estimation of Atorvastatin tablets using hydrotropic solubilization technique" - Asian J. Pharm. Ana., 2015, Vol. 5(2), pages 100-104.

15. B. Sagar Wankhede - R. Nitin Dixit - S. Sohan Chitlange – "Validated spectrophotometric methods for quantitative determination of Atorvastatin Calcium and Metoprolol Succinate in capsules" - Der Pharma Chemica, 2010, Vol. 2(1), pages 134-140.

16. S. Sharma - M. C. Sharma – "Method development and validation of Atorvastatin Calcium using FeCl3 by UV-Visible spectrophotometric methods" - Am-Euras. J. Toxicol. Sci., 2011, Vol. 3(2), pages 105-110.

17. Shyni Bernard and Molly Mathew – "Spectrophotometric method of estimation of Atorvastatin Calcium using Sulfo-phospho-vanillin reaction" - Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2012, Vol. 2(6), pages 150-154.

18. S. Tarek Belala - G. Hoda Daabeesb - M. Magdi Abdel-Khalekb - S. Mohamed Mahrousb - M. Mona Khamisb – "New simple spectrophotometric method for determination of the binary mixtures (Atorvastatin Calcium and Ezetimibe Candesartan Cilexetil and Hydrochlorothiazide) in tablets" - Journal of Pharmaceutical Analysis, 2013, Vol. 3(2), pages 118-126.

19. M. Sasikala - B. Vijaya Kumar and G. Venkateshwarlu – "Spectrophotometric determination of drugs by using Cerium (IV) and Indigocaramine couple as analytical reagent" - IOSR Journal of Applied Chemistry, 2015, Vol. 8(8), pages 6-15.

20. A. Rehab Abdalgader - S. Reem Mohamed - A. Hadeel Mohamed - M. Malik Gaily - A. Mazin Suliman - M. Musab Ibrahim – "Development & validation of complexometric titration

method for analysis of Atorvastatin Calcium In raw material and tablet dosage form" - American Journal of Research Communication, 2016, Vol. 4(11), pages 19-31.

21. Keerthisikha Palur - Bharathi Koganti - Sreenivasa Charan Archakam - Sridhar henchugari - Bhavana Nagireddy - Mahesh Babu Devabhaktuni - Meenakshi Sankranthi – "Simultaneous estimation of Atorvastatin and Aspirin in bulk and capsule dosage form by chemometric assisted spectrophotometric methods" – J. Young Pharm., 2016, Vol. 8(4), pages 424-429.

22. Raval Kashyap and Kevin Makavana- "Development of new colorimetric method and validation for determination of Loperamide in bulk and marketed formulation"- IJPCBS, 2013, Vol. 3(2), pages 215-226.

23. B. Karakapora - Ch. Umakanthappa and N. Paregowda - "Titrimetric and modified spectrophotometric methods for the determination of Amlodipine Besylate using Bromate-Bromide mixture and two dyes" - Science Asia, 2006, Vol. 32, pages 271-278.

24. U. Kanchan - A. Anupama and K. T. Raunak - "Leuco Crystal Violet method for the determination of Nicorandil in bulk dosage" - Karbala International Journal of Modern Science, 2016, Vol. 2(1), pages 1-9.

25. A. Ibrahim - M. Mona and A. Manal - "Novel spectrophotometric method for determination of Cinacalcet hydrochloride in its tablets via derivatization with 1,2-Naphthoquinone-4-sulphonate" - Chemistry Central Journal, 2012, Vol. 6(1), pages 1-8.

26. A. Abir and A. Abdalla - "A new spectrophotometric method for the determination of Cardiovascular drugs in dosage forms" - American Academic and Scholarly Research Journal, 2013, Vol. 5(1), pages 105-121.

27. M. Aida and A. Abdalla - "Spectrophotometric method for determination of Primaquine in pharmaceutical formulations via derivatization with 1,2-Naphthoquinone-4-sulfonate" - Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry, 2014, Vol. 1(4), pages 10-19.