

Міністерство охорони здоров'я України  
Запорізький державний медичний університет

ЖУК ЮЛІЯ МИКОЛАЇВНА



УДК 615.074:543.42:543.632.562

**РОЗРОБКА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИХ МЕТОДИК КІЛЬКІСНОГО  
ВИЗНАЧЕННЯ ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН, ЩО МІСТЯТЬ ВТОРИННУ  
АЛІФАТИЧНУ АМІНОГРУПУ**

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

**Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата фармацевтичних наук**

Запоріжжя – 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Запорізькому державному медичному університеті Міністерства охорони здоров'я України.

**Науковий керівник** доктор фармацевтичних наук, професор **Васюк Світлана Олександрівна**, Запорізький державний медичний університет, завідувач кафедри аналітичної хімії.

**Офіційні опоненти:**

доктор фармацевтичних наук професор **Безуглий Петро Овксентійович**, Національний фармацевтичний університет, професор кафедри фармацевтичної хімії;

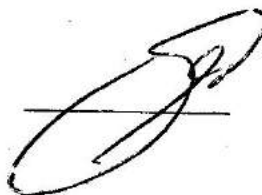
доктор фармацевтичних наук, професор, заслужений працівник освіти України **Трохимчук Віктор Васильович**, Національна медична академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика, декан медико-профілактичного і фармацевтичного факультету, професор кафедри організації і економіки фармації.

Захист відбудеться «07» червня 2016 р. о 10<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 17.600.03 при Запорізькому державному медичному університеті (69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Запорізького державного медичного університету (69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26).

Автореферат розісланий «07» червня 2016 р.

Учений секретар  
спеціалізованої вченої ради



Рижов О. А.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Лікарські засоби, що впливають на адренергічну систему, відносяться до однієї з найбільш важливих груп фармакологічних препаратів, оскільки ці засоби приймають активну участь у регуляції життєво-важливих функцій організму: артеріального тиску, серцевого викиду, просвіту судин, регуляції вуглеводного обміну та ін. Препарати цієї групи знаходять широке використання для усунення термінальних станів (шоки, в тому числі, анафілактичний), колапс, бронхоспазм, загроза передчасних пологів, гіпоглікемічна кома, тощо). Також ці препарати знайшли використання в очній практиці та при реанімаційних заходах. У той же час у сучасному фармацевтичному світі спостерігається чітка тенденція до збільшення асортименту лікарських засобів – впроваджуються нові лікарські засоби, розробляються нові лікарські форми, зростає асортимент препаратів-генериків.

Важлива задача фармацевтичного аналізу – забезпечення якості ліків на усіх етапах їх життєвого циклу. Важливим елементом у цій системі є контроль якості ліків, який здійснюється сучасними фізико-хімічними методами аналізу, у тому числі спектрофотометрією у видимій області спектра. Безперечні переваги цього абсорбційного методу – це висока точність аналізу, експресність, зручність у виконанні, а також доступність відповідного обладнання.

Головною проблемою даного методу є пошук нових специфічних аналітичних реагентів. Сульфогфталейнові барвники, більш відомі як кислотно-основні індикатори, знайшли місце в спектрофотометричному аналізі в якості чутливих та доступних кольорореагентів. Однак, недостатньо досліджена можливість їх використання для кількісного визначення лікарських речовин, що впливають на адренергічну систему. Отже, розробка чутливих, експресних, простих у виконанні спектрофотометричних методик кількісного визначення лікарських речовин у лікарських препаратах із застосуванням сульфогфталейнових барвників є актуальною проблемою сучасного фармацевтичного аналізу.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана у відповідності з планом наукових досліджень Запорізького державного медичного університету і є фрагментом комплексної теми «Застосування фізико-хімічних методів в аналізі лікарських речовин, похідних амінів, азолів та інших» (№ державної реєстрації 0111U005857). Дисертантом особисто розроблені методики кількісного визначення лікарських речовин, що містять вторинну аліфатичну аміногрупу.

**Мета і задачі дослідження.** Метою роботи була розробка високочутливих, простих у виконанні, валідованих та економічних спектрофотометричних методик кількісного визначення лікарських речовин, що містять вторинну аліфатичну аміногрупу на основі їх реакцій з сульфогфталейновими барвниками. Для реалізації поставленої мети вирішувались такі задачі:

✓ провести аналіз літературних джерел щодо кількісного визначення лікарських речовин, що містять вторинну аліфатичну аміногрупу, а також використання сульфогфталейнових барвників у спектрофотометричному аналізі;

- ✓ встановити оптимальні умови перебігу реакцій аналізованих лікарських речовин, що містять вторинну аліфатичну аміногрупу з сульфофталеїновими барвниками та розрахувати аналітичні показники чутливості реакцій;
- ✓ розробити спектрофотометричні методики кількісного визначення лікарських речовин, що містять вторинну аліфатичну аміногрупу, у складі готових лікарських форм;
- ✓ запропонувати хімізм взаємодії, встановити коефіцієнти стехіометричних співвідношень «реагент – лікарська речовина», виділити та встановити будову сполук, які утворюються в результаті реакцій;
- ✓ визначити валідаційні характеристики розроблених спектрофотометричних методик досліджуваних лікарських речовин.

*Об'єкт дослідження.* Розробка та валідація спектрофотометричних методик кількісного визначення лікарських речовин, що містять вторинну аліфатичну аміногрупу, у складі лікарських препаратів.

*Предмет дослідження.* 9 субстанцій, що містять вторинну аліфатичну аміногрупу, 30 лікарських форм, до складу яких входять досліджувані субстанції.

**Методи дослідження.** Для розробки нових методик кількісного аналізу досліджуваних лікарських речовин застосовано спектрофотометрію у видимій області спектра. Спектри реєстрували за допомогою спектрофотометра SPECORD 200, обробку проводили з використанням програмного пакету WinASPECT 2.2.1.0. Для ідентифікації продуктів реакцій використовували хромато-мас-спектрометрію. Стехіометричні співвідношення реагуючих речовин встановлювали спектрофотометричними методами: неперервних змін та насичення. Побудову графіків та розрахунок параметрів лінійної залежності проводили з використанням програми «Sigma Plot v.11.0». ІЧ-спектри реєстрували на спектрофотометрі Bruker Alpha в області  $7500-400\text{ см}^{-1}$  з використанням приставки ATR (пряме введення речовини). Хромато-мас-спектри – на високоефективному рідинному хроматографі Agilent 1260 Series, оснащеному діодно-матричним та мас-селективним детектором Agilent LC/MSD SL.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектри – на спектрофотометрі ядерного магнітного резонансу Bruker 500. Встановлення температури плавлення проводили на приладі Stuart SMP30 Melting Point Apparatus.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше експериментально доведено та науково обґрунтовано можливість застосування сульфофталеїнових барвників у практиці фармацевтичного аналізу для кількісного спектрофотометричного визначення мезатону, сальбутамолу та деяких  $\beta$ -адреноблокаторів, а саме атенололу, бетаксолу гідрохлориду, бісопрололу тартрату, карведілолу, метопрололу тартрату, небіволу гідрохлориду та соталоу гідрохлориду.

Вперше встановлено оптимальні умови перебігу реакцій сульфофталеїнових барвників з 9 лікарськими речовинами, що містять вторинну аліфатичну аміногрупу, а саме БКЗ з бетаксолу гідрохлоридом, сальбутамолу сульфатом та фенілефрину гідрохлоридом, БКП з метопрололу тартратом, карведіолом та соталоу гідрохлоридом, БТС з атенололом та небіволу гідрохлоридом, а також ТС з бісопрололу фумаратом, розраховано аналітичні показники чутливості реакцій.

Розроблено методики кількісного визначення в 30 лікарських формах промислового виготовлення, визначено валідаційні характеристики, які доводять коректність запропонованих методик.

Визначено коефіцієнти стехіометричних співвідношень «реагент – лікарська речовина» для реакцій сульфоталеїнових барвників з лікарськими речовинами, що містять вторинну аліфатичну аміногрупу, виділено та ідентифіковано продукти реакції, запропоновано ймовірний хімізм реакцій.

Наукова новизна одержаних результатів підтверджена 3 патентами України на корисну модель (№ 76557, 96464, 106404).

**Практичне значення одержаних результатів.** Розширено асортимент аналітичних реагентів для кількісного спектрофотометричного аналізу лікарських речовин, що містять вторинну аліфатичну аміногрупу. Розроблено та валідовано нові, чутливі та прості у виконанні методики кількісного визначення 9 досліджуваних сполук, що містять вторинну аліфатичну аміногрупу, у складі 30 лікарських форм промислового виробництва.

Результати досліджень знайшли застосування в науково-педагогічному процесі Запорізького державного медичного університету, Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського, Національного фармацевтичного університету, Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика.

Розроблений спосіб спектрофотометричного визначення карведілолу в таблетках впроваджено в роботу лабораторії з контролю якості лікарських засобів та медичної продукції Державної служби з лікарських засобів у Запорізькій області.

«Спосіб кількісного визначення мезатону в розчині для ін'єкцій» включено до галузевого реєстру нововведень МОЗ України за 2014 р. (реєстр № 173/1/14).

**Особистий внесок здобувача.** Здобувачем самостійно вивчені, проаналізовані та узагальнені дані літератури з питань, що стосуються теми дисертації, виконана експериментальна частина дисертаційної роботи, проведена графічна та статистична обробка одержаних результатів, написані всі розділи дисертаційної роботи, сформульовані висновки та запропоновані практичні рекомендації. Постановка мети та задач, обговорення результатів проведені з науковим керівником.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати досліджень доповідалися та обговорювалися на 80-й ювілейній науково-практичній конференції студентів і молодих вчених за участю міжнародних спеціалістів «Працюємо, творимо, презентуємо» (Івано-Франківськ, 2011), Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених і студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації 2011» (Запоріжжя, 2011), 72 Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю, присвячена дню науки «Медицина та фармація ХХІ століття – крок у майбутнє» (Запоріжжя, 2012), I Міжнародній інтернет-конференції молодих вчених і студентів «Современные достижения медицинской и фармацевтической науки» (Запоріжжя, 2012), I Регіональній науково-практичній конференції студентів, аспірантів та

молодих вчених «Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих наук» (Запоріжжя, 2012), X Міжнародній студентській науковій конференції «Перший крок в науку – 2013» (Вінниця, 2013), XVII Міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених (Тернопіль, 2013), Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених і студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації 2013» (Запоріжжя, 2013), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 2013), V (67) Міжнародному науково-практичному конгресі студентів та молодих вчених «Актуальні проблеми сучасної медицини» (Київ, 2013), науково-практичній конференції «Сучасні аспекти медицини і фармації півдня України», присвячена 110-річчю з дня становлення фармацевтичної освіти на півдні України (Одеса, 2013), II Регіональній науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Актуальні проблеми та перспективи розвитку медичних, фармацевтичних та природничих наук» (Запоріжжя, 2013), Українській науково-практичній конференції, присвяченій 100-річчю з дня народження доктора хімічних наук, професора Петюніна П. О. «Проблеми синтезу біологічно-активних речовин та створення на їх основі лікарських субстанцій» (Харків, 2014), 74 Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених і студентів з міжнародною участю, присвячена Дню науки «Сучасні аспекти медицини і фармації 2014» (Запоріжжя, 2014), Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених і студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації 2015» (Запоріжжя, 2015), II Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Аналітична хімія у фармації» (Харків, 2016), Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених і студентів з міжнародною участю, присвячена Дню науки «Сучасні аспекти медицини і фармації 2016» (Запоріжжя, 2016).

Апробацію роботи проведено 23 червня 2016 року на спільному засіданні професорсько-викладацького складу кафедр аналітичної хімії; біологічної хімії; органічної та біоорганічної хімії; фармацевтичної хімії; фармакогнозії, фармакології та ботаніки; токсикологічної і неорганічної хімії; управління і економіки фармації, медичного та фармацевтичного товарознавства; фізикоїдної хімії Запорізького державного медичного університету.

**Публікації.** За результатами дисертаційних досліджень опубліковано 26 наукових робіт, у тому числі 6 статей у виданнях, що входять до міжнародних наукометричних баз (4 статті у фахових виданнях України, 2 статті у виданнях іноземних держав), 3 патенти України на корисну модель, 16 тез доповідей, 1 нововведення.

**Обсяг та структура дисертації.** Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури (розділ 1), методологічних підходів і методів дослідження (розділ 2), експериментальної частини (розділи 3-5), загальних висновків, списку використаних джерел та 6 додатків. Дисертація викладена на 167 сторінках друкованого тексту (обсяг основного тексту 108 сторінок), ілюстрована 41 рисунком та 17 таблицями. Список використаних джерел включає 195 найменувань, з яких 147 іноземні.

## **ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

### **Методи аналізу лікарських речовин, що містять вторинну аліфатичну аміногрупу (огляд літератури)**

Проаналізовано дані літератури щодо використання сульфогфталейнових барвників у якості перспективних специфічних аналітичних кольорореагентів в галузі фармацевтичного аналізу. Описано існуючі методики аналізу лікарських речовин, що містять вторинну аліфатичну аміногрупу, різними фізико-хімічними методами, а також розглянуто офіційні методики кількісного визначення зазначених лікарських речовин. Обґрунтовано актуальність розробки нових методик кількісного визначення лікарських речовин, що містять вторинну аліфатичну аміногрупу на основі їх реакцій з сульфогфталейновими барвниками.

### **Об'єкти дослідження, реагенти, розчинники та загальні методи аналізу**

Для розробки методик кількісного визначення в якості об'єктів дослідження було використано стандартні робочі зразки субстанцій 9 лікарських речовин, що містять вторинну аліфатичну аміногрупу (атенолол, бетаксолулу гідрохлорид, бісопрололу фумарат, карведілол, метопрололу тартрат, небіволулу гідрохлорид, сальбутамолу сульфат, соталолу гідрохлорид, фенілефрину гідрохлорид), а також 30 лікарських форм на їх основі.

В якості кольорореагентів було застосовано сульфогфталейнові барвники (БКЗ, БКП, БТС, ТС), розчинники та реагенти, що відповідали вимогам «х.ч.», «ч.д.а.» та «фарм.».

Дослідження проводились методами спектрофотометрії у видимій та інфрачервоній областях, хромато-мас-спектрометрії та спектрометрії ядерного магнітного резонансу на атестованих державними органами приладах.

### **Спектрофотометричне визначення лікарських речовин, що містять вторинну аліфатичну аміногрупу**

В ході роботи було вивчено фактори, що можуть впливати на швидкість та повноту перебігу реакцій, а саме природа та склад розчинника, природа та кількість реагентів, швидкість перебігу реакцій та стабільність досліджуваних розчинів у часі.

Аналізуючи дані літератури щодо розчинності досліджуваних речовин і сульфогфталейнових барвників та їх реакційної здатності було обрано такі розчинники, як хлороформ, ацетон, метанол та етанол.

Критеріями оцінки придатності розчинника для розробки методик кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин були максимальна величина оптичної густини, стабільність оптичної густини отриманих розчинів у часі, а також можливість встановити межі концентрацій, в яких спостерігається підпорядкування основному закону світлопоглинання.

Експериментально було встановлено, що ацетон є оптимальним розчинником для проведення реакцій аналізованих лікарських речовин, а саме атенололу, бетаксолу гідрохлориду, карведілолу, метопрололу тартрату, небіволу гідрохлориду, сальбутамолу сульфату, соталоу гідрохлориду та фенілефрину гідрохлориду з сульфоталеїновими барвниками, а у випадку бісопрололу фумарату оптимальним розчинником виявився хлороформ.

З метою підбору оптимального реагенту для розробки методик кількісного визначення було порівняно спектри поглинання продуктів реакції досліджуваних лікарських речовин з найпоширенішими сульфоталеїновими барвниками. Основним критерієм вибору реагенту була максимальна величина оптичної густини продукту реакції.

Виходячи з результатів проведених досліджень для подальшої розробки спектрофотометричних методик кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин було обрано наступні сульфоталеїнові барвники: БТС для аналізу атенололу та небіволу гідрохлориду, БКП для аналізу соталоу гідрохлориду, метопрололу тартрату та карведілолу, БКЗ для аналізу бетаксолу гідрохлориду, сальбутамолу сульфату та фенілефрину гідрохлориду, ТС для аналізу бісопрололу фумарату.

Наступним етапом дослідження було встановлення кількості реагенту, необхідного для повноти перебігу реакції. Її встановлювали експериментально, виходячи з максимального виходу продукту реакції. Було встановлено, що при додаванні до розчинів небіволу гідрохлориду та бетаксолу гідрохлориду 0,20% розчину БТС та 0,14% розчину БКЗ, відповідно, у кількостях від 0,50 до 2,50 мл, оптична густина досліджуваних розчинів стрімко зростала. Тому концентрацію реагентів було збільшено до 0,50%. В результаті для небіволу гідрохлориду максимум оптичної густини було досягнуто при додаванні 2,00 мл розчину БТС, а для бетаксолу гідрохлориду при додаванні 1,00 мл розчину БКЗ. Для розчинів карведілолу та атенололу при збільшенні об'ємів доданих реагентів від 0,50 до 2,50 мл 0,11% розчину БКП та 0,10% розчину БТС, відповідно, не відбувається суттєвого збільшення величини оптичної густини отриманих розчинів. Отже для подальшої розробки методик кількісного визначення цих лікарських речовин обрано об'єм реагенту 1,00 мл. Аналогічно було встановлено оптимальну кількість та концентрацію реагенту і для інших лікарських речовин: бісопрололу фумарату – 1,00 мл 0,10% розчину ТС; метопрололу тартрату – 1,00 мл 0,04% розчину БКП; сальбутамолу сульфату – 1,00 мл 0,30% розчину БКЗ; соталоу гідрохлориду – 2,00 мл 0,02% розчину БКП; фенілефрину гідрохлориду – 5,00 мл 1,00% розчину БКЗ.

Стабільність аналізованих розчинів у часі встановлювали шляхом вимірювання оптичної густини отриманих розчинів в оптимальних умовах протягом 30 хв з інтервалом у 5 хв. Було встановлено, що досліджувані розчини стабільні протягом щонайменше 30 хв.

Спираючись на отримані дані було встановлено оптимальні умови перебігу реакцій, а також розроблено загальні методики кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин, що містять вторинну аліфатичну аміногрупу у



складі сучасних лікарських форм на основі їх реакції з сульффталеїновими барвниками.

Для встановлення аналітичних показників чутливості досліджуваних реакцій були виміряні спектри поглинання продуктів взаємодії аналізованих лікарських речовин з сульффталеїновими барвниками в оптимальних умовах, а також були встановлені максимуми світлопоглинання. Виходячи з отриманих величин було розраховано аналітичні показники чутливості даних реакцій, які наведені у табл. 1.

Таблиця 1

**Аналітичні показники чутливості реакцій  
лікарська речовина – реагент**

Лікарська речовина	$\lambda_{\max}$ , нм	$\epsilon$	a	$W_s$	$C_{\min}$ , мкг/мл
Атенолол	402	$1,77 \cdot 10^4$	$7,41 \cdot 10^{-2}$	$1,35 \cdot 10^{-2}$	0,67
Бетаксололу гідрохлорид	408	$1,05 \cdot 10^4$	$3,14 \cdot 10^{-2}$	$2,85 \cdot 10^{-2}$	1,42
Бісопрололу фумарат	420	$1,81 \cdot 10^4$	$2,29 \cdot 10^{-2}$	$4,37 \cdot 10^{-2}$	2,19
Карведілол	398	$1,72 \cdot 10^4$	$4,48 \cdot 10^{-2}$	$2,23 \cdot 10^{-2}$	1,12
Небівололу гідрохлорид	401	$5,51 \cdot 10^3$	$1,57 \cdot 10^{-2}$	$6,37 \cdot 10^{-2}$	3,18
Метопрололу тартрат	400	$4,21 \cdot 10^4$	$6,97 \cdot 10^{-2}$	$1,44 \cdot 10^{-2}$	0,72
Сальбутамолу сульфат	413	$4,54 \cdot 10^4$	$6,58 \cdot 10^{-2}$	$1,52 \cdot 10^{-2}$	0,76
Соталолу гідрохлорид	399	$2,16 \cdot 10^3$	$8,49 \cdot 10^{-3}$	$1,17 \cdot 10^{-1}$	5,88
Фенілефрину гідрохлорид	410	$1,31 \cdot 10^4$	$4,28 \cdot 10^{-2}$	$2,33 \cdot 10^{-2}$	1,17

Як видно з табл. 1, високі значення молярних коефіцієнтів світлопоглинання та низькі відкривальні мінімуми свідчать про високу чутливість реакцій між досліджуваними лікарськими речовинами та відповідними сульффталеїновими барвниками.

Стехіометричні коефіцієнти реагуючих компонентів: лікарська речовина – реагент були встановлені на прикладі взаємодії метопрололу тартрату, карведілолу та соталолу гідрохлориду з БКП, небівололу гідрохлориду та атенололу з БТС, бісопрололу фумарату з ТС, а також бетаксололу гідрохлориду з БКЗ. Для цього були використанні найбільш поширені методи: метод неперервних змін (метод ізомолярних серій) та метод насичення (метод молярних співвідношень). Отримані результати повністю погоджуються між собою (табл. 2).

У відповідності зі встановленими стехіометричними співвідношеннями компонентів реакцій та оптимальними умовами проведення реакцій, було виділено та ідентифіковано забарвлені продукти взаємодії досліджуваних лікарських речовин, а саме, атенололу, бетаксололу гідрохлориду, бісопрололу фумарату, карведілолу та соталолу гідрохлориду з відповідними сульффталеїновими барвниками.

Для встановлення структур виділених продуктів реакцій було застосовано методи ІЧ-спектрофотометрії, хромато-мас-спектрометрії та спектрометрії ядерного магнітного резонансу.

**Співвідношення компонентів реакції  
лікарська речовина – сульфоталеїновий барвник**

Лікарська речовина – сульфоталеїновий барвник	Метод визначення	
	метод неперервних змін	метод насичення
1	2	3
Метопрололу тартрат – БКП	1:1	1:1
Карведілол – БКП	1:1	1:1
Соталолу гідрохлорид – БКП	1:1	1:1
Небівололу гідрохлорид – БТС	1:1	1:1
Бетаксололу гідрохлорид – БКЗ	1:1	1:1
Атенолол – БТС	1:1	1:1
Бісопрололу фумарат – ТС	1:1	1:1

Для ідентифікації та доведення індивідуальності вихідних сполук та вивчення продуктів реакцій було хромато-мас-спектрометрично досліджено декілька β-блокаторів у вигляді солей (бісопрололу фумарат, бетаксололу гідрохлорид та соталолу гідрохлорид) й основ (карведілол і атенолол) та відповідних реагентів (БКЗ, БКП, БТС і ТС), а також утворені ними продукти реакцій, за умов розчинення досліджуваних речовин та реагентів у співвідношенні 1:1. Одержані хроматограми доводять, що чистота сполук становить 98–100%.

Для усіх досліджуваних лікарських речовин та продуктів їх взаємодії з сульфоталеїновими барвниками, а саме атенололу з БТС, бісопрололу фумарату з ТС, бетаксололу гідрохлориду з БКЗ, карведілолу та соталолу гідрохлориду з БКП було знято <sup>1</sup>H ЯМР-спектри, які однозначно довели будову утворених сполук, згідно хімічних зсувів сигналів протонів та їх відповідної мультиплетності. Було встановлено, що продуктами реакцій є іонні асоціати.

Для підтвердження утворення іонного асоціату було проведено ІЧ-спектрометричне дослідження бісопрололу фумарату, тимолового синього та продукту їх реакції. Схему взаємодії сполук представлено на рис. 1.

Вихідні сполуки та іонний асоціат характеризуються наявністю усіх відповідних валентних та деформаційних коливань згідно запропонованих структур.

Так, у ІЧ-спектрі продукту реакції спостерігається гіпсохромний зсув сигналу карбонільної, сульфо-, етерної груп та метильних замісників. Протонування вторинної амінної групи бісопрололу підтверджується валентними коливаннями, що фіксуються при 2746 та 1574 см<sup>-1</sup>. Набуває малої інтенсивності та уширюється сигнал валентного коливання ОН-групи, а валентні коливання ароматичних кілець набувають незначного батохромного зсуву. Що стосується деформаційних коливань СН-, СО-, CN- та CS-зв'язків, то вони присутні з відповідною інтенсивністю в області 1300–600 см<sup>-1</sup>.

Також було знято  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр для продукту реакції карведілолу з БКП. Отримані результати однозначно вказують на проходження в досліджуваних розчинах процесів, пов'язаних з формуванням іонних асоціатів.

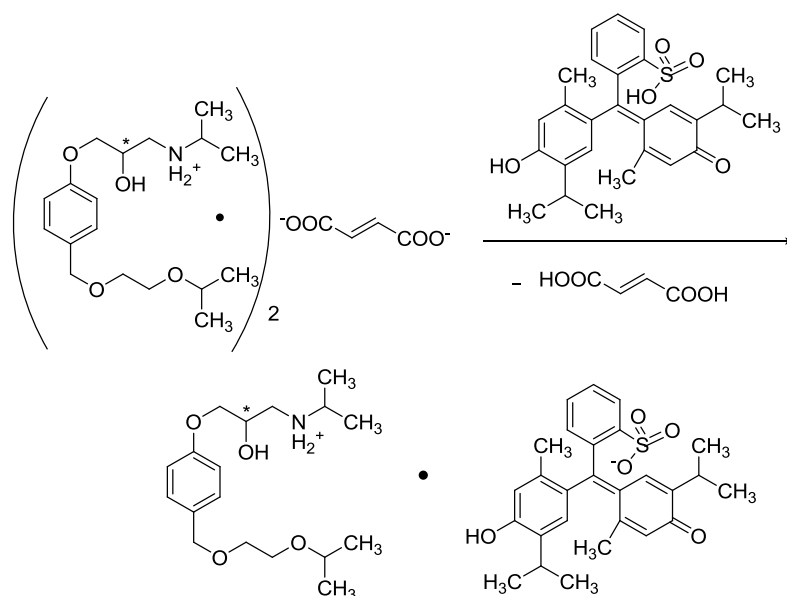


Рис. 1. Схема взаємодії бісопрололу фумарату з тимоловим синім

### Розробка методик кількісного визначення лікарських засобів за їх реакціями з сульфогфталейновими барвниками

В основу розробки спектрофотометричних методик кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин у складі лікарських форм були покладені експериментально встановлені оптимальні умови реакцій лікарських речовин з сульфогфталейновими барвниками.

Кількісне визначення проводили в межах концентрацій лікарських речовин, у яких спостерігається підпорядкування основному закону світлопоглинання. Для цього попередньо було проведено визначення величин абсорбції серії розчинів досліджуваних речовин з різною концентрацією та розраховано величини питомих показників поглинання ( $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ ) для кожної концентрації. Для кількісного визначення було обрано інтервали концентрацій, в яких значення  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$  були постійними або у межах допустимих відхилень (табл. 3).

Таблиця 3

#### Значення питомих показників поглинання лікарських речовин та межі концентрацій, в яких спостерігається підпорядкованість світлопоглинання закону Бера

Лікарська речовина	$\lambda_{\text{max}}$ , нм	Обраний інтервал концентрацій, мг/100 мл	$A_{1\text{cm}}^{1\%}(\bar{x} \pm \Delta\bar{x})$
1	2	3	4
Атенолол	402	1,80–2,80	666±1

1	2	3	4
Бетаксололу гідрохлорид	408	1,65–2,75	300±1
Бісопрололу фумарат	420	2,50–3,75	236±1
Карведілол	398	1,00–2,40	423±1
Небівололу гідрохлорид	401	4,00–6,80	136±1
Метопрололу тартрат	400	1,00–2,00	614±2
Сальбутамолу сульфат	413	0,40–2,00	663±4
Соталолу гідрохлорид	399	4,80–7,80	70±1
Фенілефрину гідрохлорид	410	1,20–2,00	644±2

З метою виключення систематичної похибки, що може бути спричинена умовами виконання експерименту, та для отримання більш точних результатів аналізу, було використано метод стандарту. Для кількісного визначення застосовували стандартні розчини досліджуваних лікарських речовин, які готували з субстанцій лікарських речовин, що відповідали вимогам нормативної документації.

За результатами дослідження запропоновано спектрофотометричні методики кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин, що містять вторинну аліфатичну аміногрупу у складі лікарських форм: точну наважку лікарської форми вміщують у мірну колбу, розчиняють, доводять розчинником до позначки, перемішують, фільтрують крізь паперовий фільтр (за необхідності). Аліквотну частину одержаного розчину переносять у мірну колбу, додають розчин відповідного сульфофталеїнового барвника, доводять розчинником до позначки. Паралельно проводять дослід з розчином порівняння. Абсорбцію досліджуваного розчину та розчину порівняння вимірюють на фоні компенсаційного розчину.

За наведеними методиками проведено статистичну обробку результатів кількісного визначення лікарських речовин. Показники відносної невизначеності середнього результату не перевищують 1,2%, що свідчить про високу відтворюваність запропонованих методик.

### **Валідація методик кількісного визначення лікарських речовин, що містять вторинну аліфатичну аміногрупу**

Для того, щоб аналітична методика зайняла гідне місце в системі забезпечення якості, відповідала своєму призначенню, тим самим гарантувала достовірні та точні результати аналізу, передбачена процедура валідації аналітичних методик. Згідно ДФУ запропоновані методики кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин, що містять вторинну аліфатичну аміногрупу були перевірені за такими валідаційними характеристиками як специфічність, лінійність, діапазон застосування, точність, правильність та робасність.

*Прогноз повної невизначеності методики.* Для підтвердження коректності методики при виконанні її в іншій лабораторії необхідно проводити прогноз повної невизначеності методики. Було встановлено, що прогнозована повна невизначеність

результатів аналізу у кожному випадку не перевищує критичного значення ( $max\Delta_{As}$ ), тобто методики будуть давати коректні результати й в інших лабораторіях (табл. 4).

Таблиця 4

### Повна невизначеність результатів аналізу

Лікарський препарат	$\Delta_{SP}$	$\Delta_{As}$	$max\Delta_{As}$
Таблетки «Атенолол-Астрафарм» 0,1 г, «Атенобене» 0,1 г, «Атенолол-Здоров'я» 0,05 г	1,52	1,67	2,4
Таблетки «Бетак» 0,02 г, «Бетакор» 0,02 г, «Локрен» 0,02 г	1,50	1,66	2,4
Таблетки «Бісопролол-Ратіофарм» 10 мг, «Бісопролол-Ратіофарм» 5 мг, «Бісопролол-Лугал» 10 мг, «Бісопролол-Лугал» 5 мг	1,26	1,44	3,2
Таблетки «Корвазан 25», «Корвазан 12,5», «Коріол 25», «Коріол 12,5»	1,62	1,76	2,4
Таблетки «Метопрололу тартрат» 0,1 та 0,05 г	1,95	2,07	2,4
Таблетки «Корвітол 100» та «Корвітол 50»	2,30	2,40	2,4
Таблетки «Егілок Ретард 50 мг» та «Егілок Ретард 100 мг»	1,89	2,02	2,4
Таблетки «Метопролол 50» та «Метопролол 100»	1,97	2,09	2,4
Таблетки «Беталок ЗОК 25»	1,92	2,04	2,4
Таблетки «Вазокардін 100» та «Вазокардін 50»	2,03	2,14	2,4
Таблетки «Небівал», 0,005 г	1,18	1,37	3,2
Аерозоль «Сальбутамол» 200 доз	1,11	1,31	3,2
Таблетки «Соритмік 80» та «Соритмік 160»	1,17	1,36	2,4
Розчин для ін'єкцій «Мезатон» 1% – 1 мл	1,07	1,27	3,2

*Специфічність.* Специфічність можна визначати використовуючи прямий та непрямий підходи. Прямий підхід повинен демонструвати відсутність/припустимість впливу інших речовин. Використовуючи непрямий підхід, висновок про специфічність роблять після визначення правильності методики, а також шляхом порівняння результатів аналізу з арбітражною методикою.

Для встановлення специфічності запропонованих методик кількісного визначення атенололу в таблетках «Атенолол-Астрафарм» 0,1 г та «Атенобене» 0,1 г; бісопрололу фумарату в таблетках «Бісопролол-Ратіофарм» 10 мг, «Бісопролол-Ратіофарм» 5 мг, «Бісопролол-Лугал» 10 мг та «Бісопролол-Лугал» 5 мг; карведілолу в таблетках «Корвазан 25», «Корвазан 12,5», «Коріол 25» та «Коріол 12,5»; метопрололу тартрату в таблетках «Метопрололу тартрат», 0,1 г, «Метопрололу тартрат», 0,05 г, «Егілок Ретард 50 мг», «Егілок Ретард 100 мг», «Метопролол 50» та «Метопролол 100»; фенілефрину гідрохлориду в розчині для ін'єкцій «Мезатон» 1% – 1 мл проводили випробування розчинів «плацебо». Для цього готували модельні суміші допоміжних речовин. До кожної модельної суміші додавали відповідну лікарську речовину у концентрації, що міститься у досліджуваному препараті. Потім відтворювали усі етапи пробопідготовки та

вимірювали абсорбцію розчину «плацебо» ( $A_{blank}$ ) та розчину порівняння, що містить досліджувану лікарську речовину ( $A_{st}$ ). У кожному випадку допоміжні речовини майже не поглинають випромінювання в області спектра, в якій спостерігаються максимуми поглинання діючої речовини, тобто їх вклад у сумарну величину фонового поглинання є незначимим і методики характеризуються припустимою специфічністю.

Лікарські форми атенололу (таблетки «Атенолол-Здоров'я» 0,05 г), бетаксололу гідрохлориду (таблетки «Бетакс» 0,02 г, «Бетакор» 0,02 г, «Локрен» 0,02 г), небіволулу гідрохлориду (таблетки «Небівал», 0,005 г), метопрололу тартрату (таблетки «Корвітол 100», «Корвітол 50», «Беталок ЗОК 25», «Вазокардін 100», «Вазокардін 50»), соталолу гідрохлориду (таблетки «Соритмік 80», «Соритмік 160») та сальбутамолу сульфату (аерозоль «Сальбутамол» 200 доз) мали відносно складний набір допоміжних речовин, тому створити модельні суміші препаратів в умовах лабораторії виявилось неможливим. У цих випадках було використано непрямий підхід визначення специфічності. Висновок щодо специфічності запропонованих методик робили після визначення правильності методик, порівнюючи результати з арбітражною методикою (у випадку сальбутамолу сульфату) або використовуючи метод добавок (в інших випадках).

*Лінійну залежність* досліджували у межах діапазону застосування розроблених методик. Вона була підтверджена безпосередньо на субстанціях, шляхом розведення стандартних розчинів (використано не менше 5 концентрацій для кожної лікарської речовини). За отриманими даними будували графіки залежності оптичної густини отриманих розчинів від їх концентрації. Одержані результати обробляли методом найменших квадратів та розраховували рівняння лінійної регресії, що мали загальний вигляд:  $y = a + b \cdot x$ , де  $y$  – вимірювана величина (оптична густина),  $x$  – концентрація визначуваної лікарської речовини,  $a$  – вільний член лінійної залежності для розрахованої регресійної прямої,  $b$  – кутовий коефіцієнт для розрахованої регресійної прямої.

Для кількісної оцінки відтворюваності результатів визначень та адекватності лінійної залежності розраховували числові показники лінійної залежності, а саме, коефіцієнт кореляції  $r$  (повинен бути більше загального індексу кореляції  $R_c$ ), залишкове стандартне відхилення  $S_0$  (не повинно перевищувати максимальну невизначеність аналізу  $\Delta_{As}$ ), вільний член лінійної регресії  $a$  ( $|a| \leq \Delta a$ ) та коефіцієнт регресії  $b$  (табл. 5).

Таблиця 5

### Числові показники лінійної залежності

Лікарська речовина	$b$	$a$	$S_0$ (%)	$r$
1	2	3	4	5
Атенолол	1,0057±(0,0023)	-0,3990±(0,2305)	0,0824	1,000
Бетаксололу гідрохлорид	0,9971±(0,0015)	0,2260±(0,1556)	0,0488	1,000
Бісопрололу фумарат	0,9721±(0,0117)	1,6943±(1,1787)	0,4020	0,9997
Карведілол	0,9959±(0,0043)	0,0638±(0,4273)	0,3569	0,9999
Метопрололу тартрат	1,0153±(0,0026)	-1,7164±(0,2690)	0,1467	1,000

1	2	3	4	5
Небівололу гідрохлорид	1,0029±(0,0079)	-0,1880±(0,0079)	0,2487	0,9999
Сальбутамолу сульфат	1,0141±(0,0076)	-0,5189±(0,8434)	0,7929	0,9999
Соталолу гідрохлорид	0,9909±(0,0094)	0,4500±(0,9513)	0,3010	0,9999
Фенілефрину гідрохлорид	1,0052±(0,0071)	-0,3500±(0,7180)	0,2781	0,9999

Розраховані числові показники лінійної залежності свідчать про те, що лінійність відповідає вимогам ДФУ в обраних діапазонах концентрацій.

*Діапазон застосування.* Згідно ДФУ діапазон застосування методики залежить від її призначення і визначається при вивченні лінійності. Мінімально допустимий діапазон застосування методики для кількісного визначення лікарських субстанцій та лікарських форм складає 80–120% від номінального вмісту. Як видно з табл. 6 у всіх випадках діапазон застосування методик є не меншим за мінімально допустимий.

Таблиця 6

**Діапазони застосування методик кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин**

Лікарська речовина	Діапазон робочих концентрацій
Атенолол	79–121%
Бетаксолулу гідрохлорид	75–125%
Бісопрололу фумарат	80–120%
Карведілол	60–140%
Метопрололу тартрат	67–133%
Небівололу гідрохлорид	75–125%
Сальбутамолу сульфат	35–165%
Соталолу гідрохлорид	77–123%
Фенілефрину гідрохлорид	75–125%

*Прецизійність* розроблених методик було вивчено на рівні збіжності. Згідно рекомендацій ДФУ було розраховано наступні метрологічні характеристики збіжності розроблених методик: стандартне відхилення ( $S$ ) та відносне стандартне відхилення (RSD), відносний довірчий інтервал одиничного ( $\Delta_{x,r}$ ) та середнього ( $\Delta_{\bar{x},r}$ ) значення. Однобічний довірчий інтервал одиничного значення ( $\Delta_{x,r}$ ) не має перевищувати максимально припустиму невизначеність аналізу ( $\Delta_{As}$  %).

Розраховані метрологічні характеристики розроблених методик свідчать про те, що методики є точними на рівні збіжності.

Згідно ДФУ *правильність* для готових лікарських форм встановлювали методом «модельних сумішей», методом добавок, а також шляхом порівняння результатів аналізу, одержаних з використанням методики, що валідується, та арбітражного методу, правильність, якого відома.

Метод «модельних сумішей» використовували для встановлення правильності фенілефрину гідрохлориду в розчині для ін'єкцій (розчин для ін'єкцій «Мезатон» 1% – 1 мл).

Згідно рекомендацій ДФУ, систематичну складову невизначеності характеризують відмінністю середнього значення для відношення (знайдено/введено)  $\bar{Z}$  від 100 %. Систематична похибка статистично не відрізняється від нуля, якщо відхилення  $\bar{Z}$  від 100% не перевищує свій довірчий інтервал:  

$$\delta\% = |\bar{Z} - 100| \leq \frac{\Delta z}{\sqrt{n}}$$

Якщо зазначене співвідношення не виконується, то застосовують критерій незначущості цієї систематичної похибки у порівнянні з максимально припустимою невизначеністю аналізу:  $\delta\% = |\bar{Z} - 100| \leq 0,32 \cdot \Delta A_s$ .

Розрахований критерій практичної незначущості не перевищує максимально припустиму невизначеність аналізу, що свідчить про правильність методики.

У разі неможливості одержання усіх компонентів лікарського засобу застосовували метод добавок.

Основна мета при визначенні правильності методик методом добавок полягає у виявленні можливих систематичних похибок, що виникають в результаті впливу допоміжних речовин (матриці), що входять до складу лікарської форми.

Оскільки при внесенні добавок стандартів до розчинів досліджуваних препаратів під впливом матриці може змінюватися коефіцієнт чутливості  $b$  у порівнянні з чистими розчинами речовин, що не містять матриці, для одержаних залежностей було розраховано відповідні коефіцієнти, які порівнювали з коефіцієнтами чутливості, одержаними при визначенні лінійності (табл. 7). Чим ближче одержаний коефіцієнт чутливості до номінального, тим менше вплив матриці на результати визначення.

Таблиця 7

**Порівняння значень коефіцієнтів чутливості, встановлених для РСЗ та лікарських форм**

Лікарський препарат	$b_1 \pm (s_b)$ (для стандартних розчинів)	$b_1 \pm (s_b)$ (для лікарських форм за методом добавок)
1	2	3
Таблетки «Атенолол-Астрафарм» 0,1 г	1,0057±(0,0023)	1,0064±(0,0022)
Таблетки «Атенобене» 0,1 г	1,0057±(0,0023)	1,0052±(0,0019)
Таблетки «Атенолол-Здоров'я» 0,05 г	1,0057±(0,0023)	1,0059±(0,0022)
Таблетки «Бетак» 0,02 г	0,9971±(0,0015)	0,9975±(0,0008)
Таблетки «Бетакор» 0,02 г	0,9971±(0,0015)	0,9968±(0,0017)
Таблетки «Локрен» 0,02 г	0,9971±(0,0015)	0,9965±(0,0009)
Таблетки «Бісопролол-Ратіофарм» 10 мг	0,9721±(0,0117)	0,9718±(0,0113)
Таблетки «Бісопролол-Ратіофарм» 5 мг	0,9721±(0,0117)	0,9726±(0,0116)
Таблетки «Бісопролол-Лугал» 10 мг	0,9721±(0,0117)	0,9728±(0,0122)



1	2	3
Таблетки «Біспролол-Лугал» 5 мг	0,9721±(0,0117)	0,9715±(0,0114)
Таблетки «Корвазан 25»	0,9959±(0,0043)	0,9965±(0,0036)
Таблетки «Корвазан 12,5»	0,9959±(0,0043)	0,9954±(0,0049)
Таблетки «Коріол 25»	0,9959±(0,0043)	0,9963±(0,0035)
Таблетки «Коріол 12,5»	0,9959±(0,0043)	0,9961±(0,0038)
Таблетки «Небівал», 0,005 г	1,0029±(0,0079)	1,0013±(0,0069)
Таблетки «Метопрололу тартрат», 0,1 г	1,0153±(0,0026)	1,0148±(0,0042)
Таблетки «Метопрололу тартрат», 0,05 г	1,0153±(0,0026)	1,0146 ±(0,0022)
Таблетки «Корвітол 100»	1,0153±(0,0026)	1,0154±(0,0039)
Таблетки «Корвітол 50»	1,0153±(0,0026)	1,0158±(0,0015)
Таблетки «Егілок Ретард 50 мг»	1,0153±(0,0026)	1,0161±(0,0046)
Таблетки «Егілок Ретард 100 мг»	1,0153±(0,0026)	1,0142±(0,0028)
Таблетки «Метопролол 50»	1,0153±(0,0026)	1,0151±(0,0034)
Таблетки «Метопролол 100»	1,0153±(0,0026)	1,0157±(0,0037)
Таблетки «Беталок ЗОК 25»	1,0153±(0,0026)	1,0160±(0,0025)
Таблетки «Вазокардін 100»	1,0153±(0,0026)	1,0145±(0,0023)
Таблетки «Вазокардін 50»	1,0153±(0,0026)	1,0150±(0,0024)
Таблетки «Соритмік 80»	0,9909±(0,0094)	0,9901±(0,0099)
Таблетки «Соритмік 160»	0,9909±(0,0094)	0,9912±(0,0098)

Для встановлення правильності методики кількісного визначення сальбутамолу сульфату в аерозолі порівнювали результати кількісного визначення за розробленою методикою ( $\bar{X} = 9,74 \cdot 10^{-5}$  г) з результатами визначення за методикою МКЯ ( $\bar{X} = 9,20 \cdot 10^{-5}$  г). Результати визначення за обома методиками майже однакові, що свідчить про правильність розробленої методики.

В результаті проведених досліджень були отримані задовільні показники лінійності, точності та правильності запропонованих методик у діапазонах концентрацій, що перевищують мінімально допустимий діапазон застосування методик згідно вимог ДФУ (80–120%).

Оцінку *робастності* було проведено на стадії розробки методик під час встановлення оптимальних умов проведення перебігу реакцій та визначення факторів, які здатні впливати на величину оптичної густини: кількість доданих реагентів, стабільність досліджуваних розчинів у часі, а також наявність води у розчиннику.

Було встановлено, що отримані розчини стабільні протягом щонайменше 30 хв, а коливання доданих реагентів у межах  $\pm 10\%$  суттєво не впливають на результати дослідження.

У тих випадках, коли для розчинення лікарської речовини використовували воду (метопрололу тартрат, небівололу гідрохлорид, сальбутамолу сульфат, соталолу гідрохлорид та фенілефрину гідрохлорид) було визначено, як саме впливає її кількість на величину оптичної густини та характер спектра. При додаванні

відносно великих кількостей води до аналізованих розчинів було виявлено негативний вплив на утворення продуктів реакції. На спектрах це було видно зі зниження величини оптичної густини, а також власне характеру спектрів. Експериментально встановлено, що максимальна кількість води в аналізованих розчинах, яка не має негативного впливу на перебіг реакцій становить до 4%

Таким чином, проведені дослідження та розрахунки доводять, що розроблені методики відповідають вимогам ДФУ і можуть бути використані в роботі ВТК хіміко-фармацевтичних підприємств та Державних інспекцій з контролю якості лікарських засобів.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі викладене теоретичне узагальнення та нове експериментальне вирішення наукової задачі з розробки та валідації чутливих, експресних та простих у виконанні спектрофотометричних методик визначення лікарських речовин, що містять вторинну аліфатичну аміногрупу з використанням сульфоталеїнових барвників в якості аналітичних кольорореагентів.

1. На основі аналізу даних літератури обґрунтовано доцільність розробки нових методів аналізу лікарських речовин, що містять вторинну аліфатичну аміногрупу з використанням сульфоталеїнових барвників в якості аналітичних кольорореагентів та абсорбційної спектрофотометрії у видимій області спектра.

2. Досліджено оптимальні умови проведення реакцій між досліджуваними лікарськими речовинами та сульфоталеїновими барвниками (карведілолу, метопрололу тартрату та соталолу гідрохлориду з БКП, атенололу та небівололу гідрохлориду з БТС, бетаксолулу гідрохлориду, сальбутамолу сульфату та фенілефрину гідрохлориду з БКЗ, а також бісопрололу фумарату з ТС). Обрано оптимальні розчинники (хлороформ для бісопрололу фумарату та ацетон у випадку атенололу, бетаксолулу гідрохлориду, карведілолу, метопрололу тартрату, небівололу гідрохлориду, сальбутамолу сульфату, соталолу гідрохлориду та фенілефрину гідрохлориду), а також реагенти та їх кількість, необхідна для повноти перебігу реакції. Низькі значення відкриваних мінімумів ( $0,67-5,88$  мкг/мл) та високі значення молярних показників світлопоглинання ( $2,16 \cdot 10^3-4,54 \cdot 10^4$ ) свідчать про високу чутливість реакцій.

3. Методами насичення та ізомолярних серій встановлено стехіометричні співвідношення «лікарська речовина – сульфоталеїновий барвник», які складають 1:1 для продуктів реакцій сульфоталеїнових барвників з атенололом, бісопрололу фумаратом, бетаксолулу гідрохлоридом, карведілолом, метопрололу тартратом, небівололу гідрохлоридом та соталолу гідрохлоридом.

4. Виділено та ідентифіковано продукти реакцій атенололу з БТС, бетаксолулу гідрохлориду з БКЗ, бісопрололу фумарату з ТС, карведілолу та соталолу гідрохлориду з БКП. За допомогою ІЧ-,  $^1\text{H}$  ЯМР та  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектроскопії підтверджено, що продуктами реакцій є іонні асоціати.

5. Розроблено та валідовано спектрофотометричні методики кількісного визначення 9 лікарських речовин, що містять вторинну аліфатичну аміногрупу у

складі 30 лікарських форм. Розроблені методики є простими у виконанні та не потребують особливих умов.

6. Прогнозована повна невизначеність результатів аналізу у кожному випадку не перевищує критичного значення, і свідчить про те, що методики будуть давати коректні результати й в інших лабораторіях.

7. Доведено, що за такими валідаційними характеристиками як специфічність, лінійність, правильність, діапазон застосування, прецизійність та робастність розроблені методики кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин відповідають вимогам ДФУ і можуть бути застосовані у лабораторіях відділів технічного контролю виробників лікарських засобів і інспекцій з контролю якості лікарських засобів.

8. Розроблені методики впроваджено у практичну діяльність лабораторії з контролю якості лікарських засобів та медичної продукції Державної служби з лікарських засобів у Запорізькій області. Також розроблені методики знайшли використання в науково-педагогічному процесі Запорізького державного медичного університету, Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського, Національного фармацевтичного університету, Національної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика.

## **СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Лебідь Ю. М. Спектрофотометричне визначення салбутамолу в аерозолі за реакцією з бромкрезоловим зеленим / Лебідь Ю. М. // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики. – 2011. – Вип. XXIV. – № 2. – С. 90–92.

2. Жук Ю. М. Спектрофотометричне визначення бісопрололу за реакцією з тимоловим синім / Жук Ю. М., Васюк С. О., Кейтлін І. М. // Запорізький медичний журнал. – 2012. – Вип. 72. – № 3. – С. 62–64. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину дослідження, написав статтю).

3. Жук Ю. Н. Спектрофотометрическое определение метопролола тартрата в таблетках / Жук Ю. Н., Васюк С. А. // Вестник фармации. – 2014. – Вип. 64. – № 2. – С. 64–70. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину дослідження, написав статтю).

4. Жук Ю. М. Спектрофотометричне визначення карведілолу в таблетках / Жук Ю. М., Васюк С. О., Верьовкіна І. С. // Фармацевтичний часопис. – 2015. – № 3. – С. 24–27. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину дослідження, написав статтю).

5. Zhuk Y. N. Spectrophotometric determination of betaxolol in pure form and pharmaceuticals / Zhuk Y. N., Vasyuk S. O. // The Pharma Innovation. – 2016. – № 5 (6). – P. 31–33. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину дослідження, написав статтю).

6. Жук Ю. М. Спектрофотометричне визначення соталолу в таблетках / Жук Ю. М., Васюк С. О. // Фармацевтичний журнал. – 2016. – № 1. – С. 49–55.

(Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину дослідження, написав статтю).

7. Патент на корисну модель 76557 Україна, МПК G01N 21/78. Спосіб кількісного визначення мезатону в розчині для ін'єкцій / Ю. М. Жук, С. О. Васюк – № u2012 07090 ; заявл. 12.06.12 ; опубл. 10.01.13, Бюл. № 1. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину, аналіз отриманих даних, оформив патент).

8. Патент на корисну модель 96464 Україна, МПК G01N 21/78. Спосіб спектрофотометричного визначення метопрололу тартрату в таблетках / Ю. М. Жук, С. О. Васюк – № u2014 08570 ; заявл. 28.07.14 ; опубл. 10.02.15, Бюл. № 3. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину, аналіз отриманих даних, оформив патент).

9. Патент на корисну модель 106404 Україна, МПК G01N 21/78. Спосіб кількісного визначення карведілолу в таблетках / Ю. М. Жук, С. О. Васюк – № u2015 10440 ; заявл. 26.10.15 ; опубл. 25.04.16, Бюл. № 8. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину, аналіз отриманих даних, оформив патент).

10. Жук Ю. М. Спектрофотометричне визначення сальбутамолу за реакцією з бромкрезоловим зеленим / Жук Ю. М. // Тези доповідей 80-ої ювілейної науково-практичної конференції студентів і молодих вчених за участю міжнародних спеціалістів «Працюємо, творимо, презентуємо», 7-8 квіт. 2011 року. – Івано-Франківськ, 2011. – С. 215.

11. Жук Ю. М. Спектрофотометричне визначення мезатону за реакцією з бромкрезоловим зеленим / Жук Ю. М. // Матеріали 72 Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю, присвячена Дню науки «Медицина та фармація ХХІ століття – крок у майбутнє», 19-20 квіт. 2012 року. – Запоріжжя, 2012. – С. 188.

12. Жук Ю. М. Спектрофотометричне визначення метопрололу тартрату / Жук Ю. М., Васюк С. О. // Матеріали I міжнар. інтерн.-конф. «Современные достижения медицинской и фармацевтической науки», 23–25 жовт. 2012 року. – Запоріжжя, 2012. – С. 103. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину дослідження, написав тези).

13. Жук Ю. М. Спектрофотометричне визначення метопрололу в таблетках / Жук Ю. М. // Матеріали I Регіон. наук.-практ. конф. студентів, аспірантів та молодих учених «Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих наук», 15 груд. 2012 року. – Запоріжжя, 2012. – С. 136–137.

14. Портна К. П. Розробка та валідація спектрофотометричних методик кількісного визначення речовин з первинною та вторинною аміногрупами / Портна К. П., Жук Ю.М. // Матеріали X Міжнародної студентської наукової конференції «Перший крок в науку – 2013», 11-12 квіт. 2013 року. – Вінниця, 2013. – С. 292. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, експериментальні дослідження з розробки методик кількісного визначення мезатону, сальбутамолу, метопрололу, бісопрололу).

15. Жук Ю. М. Спектрофотометричне визначення деяких  $\beta$ -адреноблокаторів в лікарських формах / Жук Ю. М. // Матер. XVII міжнар. мед. конгресу студ. та мол. вчених, 22-24 квіт. 2013 року. – Т., 2013. – С. 306.

16. Жук Ю. М. Кількісне визначення метопрололу тартрату в таблетках «Корвітол® 50» / Жук Ю. М. // Матер. Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю «Сучасні аспекти медицини та фармації – 2013», присвячена Дню науки, 16-17 трав. 2013 року. – Запоріжжя, 2013. – С. 209.

17. Жук Ю. М. Кількісне визначення метопрололу тартрату в таблетках «Корвітол® 100» / Жук Ю. М., Васюк С. О. // Матер. 5-ї науково-практичної конф. з міжнар. участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів», 27-28 верес. 2013 року. – Т., 2013. – С. 184–186. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину дослідження, написав тези).

18. Жук Ю. М. Застосування сульфоталейнових барвників в аналізі бета-адреноблокаторів / Жук Ю. М., Васюк С. О. // Матер. 67 Міжнар. наук.-практ. конгресу студентів та молодих вчених «Актуальні проблеми сучасної медицини», 23-25 жовт. 2013 року. – К., 2013. – С. 322–323. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину дослідження, написав тези).

19. Жук Ю. М. Кількісне визначення карведілолу / Жук Ю. М., Васюк С. О. // Матер. наук.-практ. конф. «Сучасні аспекти медицини і фармації Півдня України», 6-7 квіт. 2013 року. – О., 2013. – С. 123-124. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину дослідження, написав тези).

20. Жук Ю. М. Спектрофотометричне визначення метопрололу в таблетках «Вазокардін 50 мг» / Жук Ю. М. // Матер. II Регіон. наук.-практ. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених «Актуальні проблеми та перспективи розвитку медичних, фармацевтичних та природничих наук – 2013», 21 груд. 2013 року. – Запоріжжя, 2013. – С. 10.

21. Розробка та валідація спектрофотометричних методик кількісного визначення речовин в лікарських формах на основі взаємодії з сульфоталейновими барвниками та похідними хінону. / Васюк С. О., Загородній С. Л., Портна К. П., Жук Ю. М. // Матер. Укр. наук.-практ. конф., присвяченої 100-річчю з дня народження доктора хімічних наук, професора П. О. Петюніна «Проблеми синтезу біологічно активних речовин та створення на їх основі лікарських субстанцій», 24-25 квіт. 2014 року. – Х., 2014. – С. 88. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, експериментальні дослідження з розробки методик кількісного визначення мезатону, сальбутамолу, бісопрололу та метопрололу).

22. Жук Ю. М. Спектрофотометричне визначення метопрололу в таблетках «Егілок ретард 50 мг» та «Егілок ретард 100 мг» / Жук Ю. М. // Матер. 74 Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2014», 15-16 трав., 2014 року. – Запоріжжя, 2014. – С. 171.

23. Жук Ю. М. Кількісне визначення метопрололу тартрату в таблетках «Беталок ЗОК 25 мг» та «Метопролол 100 мг» / Жук Ю. М., Верьовкіна І. С. //

Матер. 75 Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2015», 14-15 квіт. 2015 року. – Запоріжжя, 2015. – С. 150–151. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав основну експериментальну частину дослідження, написав тези).

24. Жук Ю. М. кількісне визначення бетаксололу в таблетках / Жук Ю. М., Васюк С. О. // Матеріали II Міжн. наук-практ. інт.-конф. «Аналітична хімія в фармації», 17 берез. 2016 року. – Х., 2016. – С. 53–54. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав основну експериментальну частину дослідження, написав тези).

25. Жук Ю. М. Спектрофотометричне визначення небівололу / Жук Ю. М. // Матер. 76 Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2016», 12-13 трав. 2015 року. – Запоріжжя, 2015. – С. 232.

26. Жук Ю. М. Спосіб кількісного визначення мезатону в розчині для ін'єкцій / Жук Ю. М., Васюк С. О. // Реєстр галузевих нововведень МОЗ України (Реєстр № 173/1/14). – К., 2014. – С. 170. (Дисертант провів експериментальну частину дослідження, підготував та оформив галузеве нововведення).

## АНОТАЦІЯ

**Жук Ю. М. Розробка спектрофотометричних методик кількісного визначення лікарських речовин, що містять вторинну аліфатичну аміногрупу. – На правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія. Запорізький державний медичний університет МОЗ України, Запоріжжя, 2016.

Дисертація присвячена розробці високочутливих, простих у виконанні, валідованих та економічних спектрофотометричних методик кількісного визначення лікарських речовин, що містять вторинну аліфатичну аміногрупу на основі їх реакцій з сульфофталеїновими барвниками.

Вивчено оптимальні умови перебігу реакцій досліджуваних лікарських речовин, що містять вторинну аліфатичну аміногрупу з сульфофталеїновими барвниками та розраховано аналітичні показники чутливості.

Встановлено стехіометричні коефіцієнти між реагуючими компонентами «лікарська речовина – реагент». Виділено та ідентифіковано продукти реакцій атенололу, бетаксололу гідрохлориду, біспрололу фумарату, карведілолу та соталолу гідрохлориду з сульфофталеїновими барвниками, запропоновано хімізм перебігу реакцій.

Розроблено прості, чутливі, експресні методики кількісного визначення 9 лікарських речовин, у складі 30 сучасних лікарських форм.

Розроблені методики валідовані згідно вимог ДФУ і є прийнятними для виконання поставлених завдань.

**Ключові слова:** кількісний аналіз, спектрофотометрія, лікарські речовини, вторинна аліфатична аміногрупа, сульфофталеїнові барвники, валідація.

## АННОТАЦИЯ

**Жук Ю. Н. Разработка спектрофотометрических методик количественного определения лекарственных веществ, содержащих вторичную алифатическую аминогруппу. – На правах рукописи.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия. Запорожский государственный медицинский университет МЗ Украины, Запорожье, 2016.

Диссертация посвящена разработке высокочувствительных, простых в выполнении, валидных и экономичных спектрофотометрических методик количественного определения лекарственных веществ, содержащих вторичную алифатическую аминогруппу на основе их реакций с сульфопфталеиновыми красителями.

Изучены оптимальные условия проведения реакций исследуемых лекарственных веществ с сульфопфталеиновыми красителями и рассчитаны аналитические показатели чувствительности.

Установлены стехиометрические коэффициенты «лекарственное вещество – реагент». Выделены и идентифицированы продукты реакций атенолола, бетаксолола гидрохлорида, бисопролола фумарата, карведилола и соталола гидрохлорида с сульфопфталеиновыми красителями, предложен химизм протекания реакции.

Разработаны простые, чувствительные, экспрессные методики количественного определения 9 лекарственных средств в составе 30 современных лекарственных форм.

Разработанные методики валидированы согласно требований ГФУ.

**Ключевые слова:** количественный анализ, спектрофотометрия, лекарственные вещества, вторичная алифатическая аминогруппа, сульфопфталеиновые красители, валидация.

## ANNOTATION

**Zhuk Y. M. Spectrophotometric method development for the quantitative determination of drugs containing the secondary aliphatic amino group. – A manuscript.**

Thesis for a candidate's degree in pharmaceutical chemistry on the speciality 15.00.02 – pharmaceutical chemistry and pharmacognosy. – Zaporizhzhia State Medical University, Ministry of Public Health of Ukraine, Zaporizhzhia, 2015.

Based on the literature data the practicability of development of new spectrophotometric methods for the analysis of drugs containing the secondary aliphatic amino group using sulphophthalein dyes as reagent was proved

There were studied optimal conditions of the photometric reactions of investigational medicinal substances containing the secondary aliphatic amino group and sulphophthalein dyes (carvedilol, metoprolol tartrate and sotalol hydrochloride with bromocresol purple, atenolol and nebivolol hydrochloride with bromthymol blue,

betaxolol hydrochloride, salbutamol sulphate and phenylephrine hydrochloride with bromocresol green, bisoprolol fumarate with thymol blue). Optimal solvents (chloroform in the bisoprolol case and acetone in other circumstances), reagents and its quantity were selected. The reactions proceeded rapidly at room temperature, so temperature and time mode didn't need correction in all cases. Lows of identification limit (0,67 – 5,88 mcg/ml) and ups of molar absorption coefficient ( $2,16 \cdot 10^3$ – $4,54 \cdot 10^4$ ) testified the reactions high sensitivity.

Defined stoichiometric ratio «reagent – drug substance» by molar ratio and isomolar series method. Molar ratio method results were consistent with isomolar series method results. Stoichiometric coefficients between reagents and drug substances were 1:1 in each case (atenolol, bisoprolol fumarate, betaxolol hydrochloride, carvedilol, metoprolol tartrate, nebivolol hydrochloride, sotalol hydrochloride and sulphophthalein dies).

Reaction products of atenolol, betaxolol, bisoprolol, carvedilol, sotalol with sulphophthalein dies were isolated and identified. Products of reactions were ion-associates. It was proved by IR spectrophotometry,  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectrometry.

Spectrophotometric methods for the quantitative determination of 9 drugs containing the secondary aliphatic amino group consisting of 30 commercial agents were developed and validated.

Estimated total uncertainty of the analysis in each case did not exceed the critical value and suggests that methods will give correct results in other laboratories.

Following validation characteristics as specificity, precision, linearity, accuracy and robustness were determined according to requirements of Ukrainian Pharmacopoeia

Methods characterized by sufficient specificity to identify studied substances in presence of excipients.

The linear dependence fundamentals were calculated. It was confirmed that developed methods are linear in selected ranges of concentrations. All requirements according to linear dependence parameters are met.

Precision was determined in investigational medicinal substances in three different concentrations in the calibration range in three replicates. In all cases confidence interval does not more than the maximum indeterminateness of analysis.

Accuracy was set for drug dosage forms using standard addition, model mixtures methods and by comparing results of the quantitative determination obtained by the developed method with the results of the arbitration procedure. The results showed the high accuracy of the proposed methods.

The validation of robustness was carried out at methods development. Factors affect the absorbency such as the amount of reagent, stability test solutions over the time and the presence of water in the solvent were studied.

It was established that sample solutions are stable for at least 30 minutes, and addition  $\pm 10\%$  of reagents solution from the optimal to the sample solution has no effect on the absorbance value. The maximum amount of water which does not adversely affect the absorption spectra is 4%.

Proved that for such validation characteristics as specificity, linearity, accuracy, range, precision and robustness developed methods of quantitative determination of



studied drugs are corresponded to The Ukrainian Pharmacopoeia specification. Developed methods can be used in the laboratory of technical control department of drugs manufacturers and inspections of drugs quality control.

The developed methods were implemented in the practice of drugs quality control laboratory. The developed methods are using in scientific and pedagogical process of Ukrainian higher education.

**Keywords:** analysis, spectrophotometry, drugs, secondary aliphatic amino group, sulphophthalein dies, validation.

### ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

БКП	– бромкрезоловий пурпурний;
БКЗ	– бромкрезоловий зелений;
БТС	– бромтимоловий синій;
ВТК	– відділ технічного контролю;
ДФУ	– Державна Фармакопея України;
ІЧ	– інфрачервоний;
ТС	– тимоловий синій;
ЯМР	– ядерний магнітн