

Рекомендована д. біол. наук, проф. Л. С. Фірою

УДК 543.42:[615.22:615.4]

DOI 10.11603/2312-0967.2017.4.8397

## СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АТЕНОЛОЛУ В ЛІКАРСЬКИХ ФОРМАХ ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ 2,3-ДИХЛОР-1,4-НАФТОХІНОНУ

© А. О. Донченко, С. О. Васюк

Запорізький державний медичний університет

donchenko130791@gmail.com

**Мета роботи.** Розробка та валідація методики кількісного визначення атенололу в лікарських формах із використанням методу абсорбційної спектрофотометрії.

**Матеріали і методи.** В дослідженні використано робочий стандартний зразок атенололу, 2,3-дихлор-1,4-нафтохінон, зразки готових лікарських форм вітчизняного виробництва.

**Результати й обговорення.** Експериментально встановлено, що 2,3-дихлор-1,4-нафтохінон взаємодіє з атенололом у середовищі ДМФА з утворенням забарвленої сполуки з максимумом абсорбції при 493 нм. Проведена валідація розробленої методики. Визначені основні валідаційні характеристики, а саме лінійність, прецизійність, правильність, робастність та діапазон застосування. Підпорядкування закону Бера спостерігається в межах концентрацій 11,20–19,60 мг/100 мл, коефіцієнт кореляції становить 0,9990. Параметри лінійної залежності розраховані за допомогою регресійного аналізу методом найменших квадратів. Запропонована методика відповідає вимогам ДФУ, які висувають до методик кількісного аналізу лікарських речовин.

**Висновки.** Розроблено та валідовано спектрофотометричну методику кількісного визначення атенололу, яка успішно застосована для аналізу лікарських форм. Результати дослідження свідчать, що методика є точною, простою у виконанні та придатною для використання в лабораторіях контролю якості лікарських речовин.

**Ключові слова:** атенолол; 2,3-дихлор-1,4-нафтохінон; спектрофотометрія; кількісне визначення; валідація.

**Вступ.** Серцево-судинні захворювання є одними із найбільш поширених неінфекційних захворювань у багатьох європейських країнах. Впродовж останніх років смертність від хвороб системи кровообігу значно знизилася, однак вони залишаються основною причиною раптової смерті в Україні [1]. З метою покращення якості лікування фахівцями проводиться розробка нових лікарських засобів. Також значна увага приділяється вдосконаленню вже існуючих схем лікування препаратами, що довели свою ефективність не тільки у великих рандомізованих дослідженнях, але і в рутинній практиці лікарів. До них можна віднести блокатори  $\beta$ -адренорецепторів. Їх призначають при артеріальній гіпертензії, ішемічній хворобі серця, хронічній серцевій недостатності та різних порушеннях ритму. При цьому перевага надається таким блокаторам  $\beta$ -адренорецепторів, які мають тривалий період напіввиведення, сприятливий баланс ліпофільно-гідрофільних властивостей і відрізняються високим рівнем кардіоселективності. Одним із таких препаратів є атенолол [2].

Атенолол – блокатор  $\beta$ -адренорецепторів, що має антиангінальний, антигіпертензивний та антиаритмічний ефекти. Зменшує автоматизм синусового вузла, уповільнює атріовентрикулярну провідність, знижує скоротливість міокарда і його потребу в кисні. Атенолол застосовують для лікування артеріальної

гіпертензії, профілактики нападів стенокардії, порушеннях серцевого ритму [3].

Згідно з Державною Фармакопеею України і Британською Фармакопеею, кількісний вміст атенололу в субстанції визначають методом ацидиметрії з потенціометричним фіксуванням кінцевої точки титрування [4, 5]. Фармакопея США описує метод високо-ефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з УФ-детектором [6].

За даними літератури, для кількісного визначення атенололу найчастіше використовують спектрофотометрію та ВЕРХ [7, 8]. Окрім того, зустрічаються методи аналізу комбінованих лікарських форм. Наприклад, Sanjay Dey зі співавторами запропонували одночасно визначати атенолол та аторвастатин у таблетках методом абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій області спектра [9], а науковці із Shree Dhanvantary Pharmacy College працювали над аналізом суміші атенололу та івабрадину гідрохлориду [10].

Описані методики є досить чутливими, точними та селективними. Однак деякі з них довготривалі, складні у виконанні або потребують використання малопоширених реагентів.

Тому метою роботи стала розробка точної, доступної та валідної спектрофотометричної методики кількісного визначення атенололу у лікарських формах на основі реакції з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном.

**Матеріали і методи.** Для проведення дослідження було використано такі лікарські форми:

– таблетки «Атенолол» 50 мг (ПАТ «Монфарм», Україна, серія 10317);

– таблетки «Атенолол-Здоров'я» 50 мг (ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я», Україна, серія 20317);

– таблетки «Атенолол-Астрафарм» 50 мг (ТОВ «Астрафарм», Україна, серія 020216).

Як реактив та розчинник використовували 2,3-дихлор-1,4-нафтохінон та ДМФА. Як стандарт використовували робочий стандартний зразок (РСЗ) атенололу.

Аналітичне обладнання: спектрофотометр Sperecord 200, ваги електронні АВТ-120-5DM, водяна баня Memmert WNB 7-45, мірний посуд класу А.

#### **Загальна методика кількісного визначення атенололу**

Точну наважку атенололу (0,0375 г) поміщали в мірну колбу ємністю 25,00 мл, розчиняли та доводили до позначки розчином ДМФА, ретельно перемішували. До 1,00 мл отриманого розчину додавали 1,00 мл 4 % розчину 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону, перемішували. Отриману реакційну суміш нагрівали 10 хв на водяній бані за температури 95 °С. Після охолодження розчин кількісно переносили в мірну колбу ємністю 25,00 мл та доводили розчином ДМФА до позначки. Абсорбцію вимірювали на фоні компенсаційного розчину, що не містив досліджуваної речовини, при довжині хвилі 493 нм.

#### **Методика кількісного визначення атенололу в таблетках**

Точну наважку порошку розтертих таблеток (0,2300 г – «Атенолол-Астрафарм», 0,1400 г – «Атенолол-Здоров'я», 0,1500 г – «Атенолол») поміщали в мірну колбу на 25,00 мл, додавали ДМФА, інтенсивно перемішували і доводили тим же розчинником до позначки. Отриману суміш фільтрували, відкидаючи перші порції фільтрату. Далі аліквоти фільтрату аналізували за запропонованою методикою.

**Результати й обговорення.** На основі проведених досліджень розроблено просту та відтворювану методику кількісного визначення атенололу на основі реакції з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном. Підібрані оптимальні умови проведення спектрофотометричного аналізу, показана можливість використання методики для визначення готових лікарських форм.

Експериментально встановлено, що реагент взаємодіє з атенололом у середовищі ДМФА з утворенням забарвленої сполуки з максимумом абсорбції при 493 нм (рис. 1). Межа виявлення за оптимальних умов становить 13,88 мкг/мл.

Також визначено, що необхідною умовою успішного перебігу реакції є нагрівання на водяній бані. Максимальне значення абсорбції спостерігалось при нагріванні реакційної суміші протягом 10 хв за температури 95 °С (рис. 2).

#### *Визначення валідаційних характеристик*

Усі аналітичні методики і випробування, включені в нормативні документи, мають бути валідованими. Валідацію розробленої методики проведено відповідно до вимог ДФУ, згідно зі стандартизованою процедурою валідації методом стандарту [4, 11]. Встановлено основні валідаційні характеристики, а саме лінійність, прецизійність, правильність, робастність та діапазон застосування.

#### **Лінійність**

Лінійність визначали у межах концентрацій, у яких спостерігається підпорядкування закону Бера, а саме 11,20–19,60 мг/100 мл. На рисунку 3 представлено графік залежності абсорбції від концентрації атенололу (рис. 3).

Параметри лінійної залежності розраховували за допомогою регресійного аналізу методом найменших квадратів. Отримані величини наведено в таблиці 1.

За даними таблиці 1 виконуються вимоги до параметрів лінійної залежності, тобто лінійність методики кількісного визначення атенололу підтверджується в усьому діапазоні концентрацій (80–120 %).

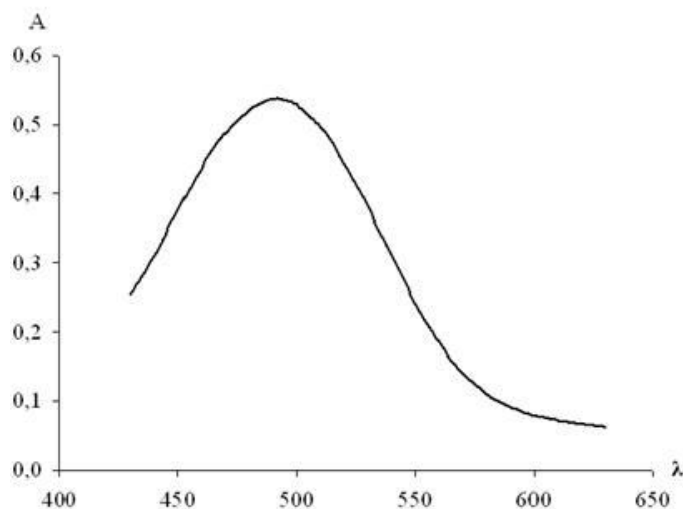


Рис. 1. Спектр поглинання продукту реакції атенололу з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном у середовищі ДМФА.

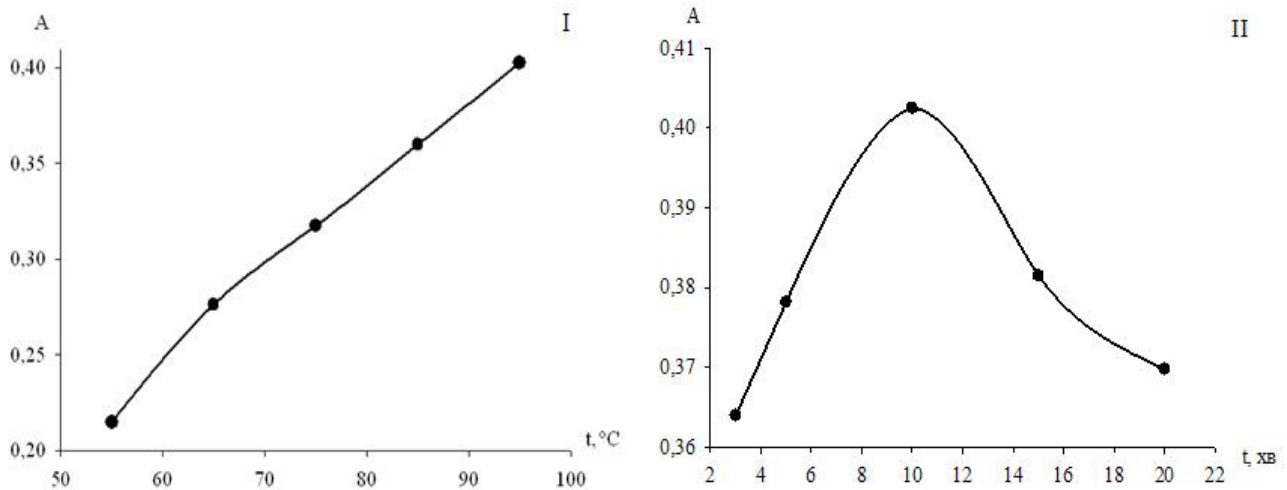


Рис. 2. Залежність абсорбції випробовуваного розчину від температури нагрівання (I), від часу нагрівання на водяній бані (II).

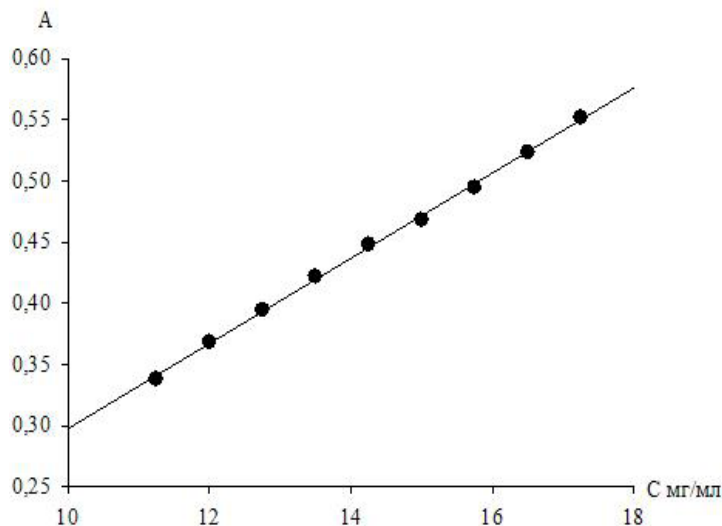


Рис. 3. Графік залежності абсорбції випробовуваного розчину від концентрації атенололу в умовах кількісного визначення.

Таблиця 1. Числові показники лінійної залежності

Величина	Значення	Критерії	Висновок
$b \pm (s_b)$	0,0349 ± (0,0006)	–	–
$a \pm (s_a)$	-0,0528 ± (0,0083)	$ a  \leq \frac{0,32 \cdot \Delta A_s(\%)}{1 - (X_{\min}/100)} = 0,7272$	відповідає
$s_{x,0}(\%)$	0,0945	$\leq \Delta_{A_s}(\%)/t(95\%;7) = 1,055$	відповідає
$r$	0,9990	$\geq 0,9970$	відповідає

### Прецизійність

Прецизійність визначена на рівні збіжності. Було проаналізовано 9 проб, концентрації яких рівномірно розподілені в досліджуваному діапазоні методики (плюс розчин порівняння, концентрація якого близька до номінальної). Згідно з вимогами ДФУ до прецизійності, методика є точною на рівні збіжності,

якщо одnobічний довірчий інтервал ( $\Delta x$ ) не перевищує максимальну допустиму невизначеність аналізу ( $\Delta A_s\%$ ). Дані таблиці 2 свідчать про точність розробленої методики.

### Правильність

Для встановлення правильності розробленої методики використовували метод добавок, у ході якого до

Таблиця 2. Визначення збіжності результатів кількісного визначення атенололу в лікарських формах (n=9, p=0,95)

Таблетована лікарська форма	Вміст	Метрологічні характеристики				
		$\bar{X}$	S	RSD	$\Delta_{x,r}$	$\Delta_{As}\%$
«Атенолол»	0,050 г	0,0505	$6,24 \cdot 10^{-4}$	1,23	2,29	3,20
«Атенолол-Здоров'я»	0,050 г	0,0501	$4,71 \cdot 10^{-4}$	0,940	1,74	3,20
«Атенолол-Астрафарм»	0,050 г	0,0500	$4,53 \cdot 10^{-4}$	0,906	1,68	3,20

трьох рівних проб лікарської форми додавали різні кількості стандартного розчину атенололу та тричі аналізували. Результати визначень є правильними, оскільки відсутня значуща систематична похибка, тобто справжнє значення величини, що визначається, потрапляє у встановлений довірчий інтервал (табл. 3).

#### Робасність

Оцінку робасності проводили на стадії розробки методики. Для оцінки *робасності* методики проводили дослідження стабільності аналітичних розчинів у часі. Випробовуваний розчин і розчин порівняння є стійкими протягом щонайменше 30 хв.

Таблиця 3. Результати визначення правильності методом добавок

Таблетована лікарська форма	$\Delta Z$	RSD	$\Delta \bar{Z}$	$ \bar{Z}-100 $
«Атенолол»	100,61	0,41	2,26	0,61
«Атенолол-Здоров'я»	100,18	0,96	5,39	0,18
«Атенолол-Астрафарм»	100,22	1,14	6,34	0,22

**Висновки.** 1. Розроблено просту та відтворювану методику кількісного визначення атенололу на основі реакції з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном, яка успішно застосована для аналізу лікарських форм.

2. Проведено валідацію методики кількісного визначення атенололу відповідно до вимог ДФУ.

3. Встановлено, що методика відповідає вимогам ДФУ за специфічністю, лінійністю, точністю, робасністю та діапазоном застосування.

## СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АТЕНОЛОЛА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ 2,3-ДИХЛОР-1,4-НАФТОХИНОНА

А. А. Донченко, С. А. Васюк

Запорожский государственный медицинский университет

donchenko130791@gmail.com

**Цель работы.** Разработка и валидация методики количественного определения атенолола в лекарственных формах с использованием метода абсорбционной спектрофотометрии.

**Материалы и методы.** В исследовании использованы рабочий стандартный образец атенолола, 2,3-дихлор-1,4-нафтохинон, образцы готовых лекарственных форм отечественного производства.

**Результаты и обсуждение.** Экспериментально установлено, что 2,3-дихлор-1,4-нафтохинон взаимодействует с атенололом в среде ДМФА с образованием окрашенного соединения с максимумом абсорбции при 493 нм. Проведена валидация разработанной методики. Определены основные валидационные характеристики, а именно линейность, прецизионность, правильность, робастность и диапазон применения. Подчинение закону Бера наблюдается в пределах концентраций 11,20–19,60 мг/100 мл, коэффициент корреляции составляет 0,9990. Параметры линейной зависимости рассчитаны с помощью регрессионного анализа методом наименьших квадратов. Предложенная методика соответствует требованиям ГФУ, которые предъявляют к методикам количественного анализа лекарственных веществ.

**Выводы.** Разработана и валидирована спектрофотометрическая методика количественного определения атенолола, которая успешно применена для анализа лекарственных форм. Результаты исследования свидетельствуют, что методика является точной, простой в выполнении и пригодной для использования в лабораториях контроля качества лекарственных веществ.

**Ключевые слова:** атенолол; 2,3-дихлор-1,4-нафтохинон; спектрофотометрия; количественное определение; валидация.

**SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF ATENOLOL IN DOSAGE FORMS USING 2,3-DICHLORO-1,4-NAPHTHOQUINONE****A. O. Donchenko, S. O. Vasyuk***Zaporizhzhia State Medical University**donchenko130791@gmail.com*

**The aim of the work.** Developing and validating the spectrophotometric method for atenolol assay using absorption spectrophotometry.

**Materials and Methods.** Atenolol working standard, 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone and the sample of finished dosage forms were used.

**Results and Discussion.** It was experimentally established that atenolol reacts with 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone in DMF medium to formation the colored reaction product with absorption maximum at 493 nm. The proposed method was subjected to validation tests. The method was validated for the parameters like linearity, precision, accuracy, robustness and scope of application. Beer's law was obeyed over the concentration range of 11.20–19.60 mg/100 ml with correlation coefficient 0.9990. The linearity ranges were calculated with the help of regression analysis by means of least squares.

**Conclusion.** The spectrophotometric method of atenolol assay was developed and validated. This procedure is successfully applied for dosage forms analysis. Investigation results show that the procedure is precise, simple and relevant to be applied at the quality control laboratories for dosage forms.

**Key words:** atenolol; 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone; spectrophotometry; assay; validation studies.

**Список літератури**

1. Коваленко В. М. Серцево-судинні хвороби: медично-соціальне значення та стратегія розвитку кардіології в Україні / В. М. Коваленко, А. П. Дорогой // Український кардіологічний журнал. – 2016. – С. 5–14.
2. Kuyper L.M. Atenolol vs Nonatenolol  $\beta$ -Blockers for the Treatment of Hypertension: A Meta-analysis / L. M. Kuyper, N. A. Khan // *Can J Cardiol.* – 2014. – № 30. – P. 47-53.
3. Машковский М. Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский. – 16-е изд., перераб., испр. и доп. – М. : Новая Волна, 2012. – 1216 с.
4. Державна Фармакопея України. – 2-е вид. – Харків : Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2015. – Т 1. – 2015. – 1128 с.
5. British Pharmacopoeia. – Vol. 1–4. – London: The Stationary Office, 2009. – 10952.
6. United States Pharmacopoeia 36. – USP Convention Inc. – Rockville, 2013. – 5640.
7. Zhuk Y. N. Quantitative determination of Atenolol in tablets / Y. N. Zhuk, S. O. Vasyuk // *IJAPBC.* – 2015. – Vol. 5, № 3. – P. 350–354.
8. Development and validation of an isocratic HPLC method for simultaneous determination of quaternary mixtures of antihypertensive drugs in pharmaceutical formulations / J. F. F. Anderson, M. C. G. Gerlin, R. A. Sversut [et al.] // *Acta Chromatogr.* – 2017. – № 1. – P. 95–110.
9. Dey S. Spectrophotometric method for simultaneous determination of atenolol and atorvastatin in tablet dosage forms / S. Dey, S. Sarkar, J. Malakar [et al.] // *Int. J. Pharm. Biomed. Res.* – 2012. – Vol. 3, № 1. – P. 40–43.
10. Patil P. A. Q-absorbance ratio spectrophotometric method for simultaneous determination of atenolol and ivabradine hydrochloride in synthetic mixture / P. A. Patil, H. A. Raj, G. B. Sonara // *Pharm. and Biol. Eval.* – 2016. – Vol. 3, № 2. – P. 224–230.
11. Гризодуб А. И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств / А. И. Гризодуб. – Х. : Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств», 2016. – 396 с.

**References**

1. Kovalenko VM, Dorohoy AP. [Cardiovascular disease: medical and social significance and the strategy of cardiology development in Ukraine]. *Ukrainskyi kardiologichnyi zhurnal.* 2016;5-14. Ukrainian.
2. Kuyper L, Khan N. Atenolol vs Nonatenolol  $\beta$ -Blockers for the Treatment of Hypertension: A Meta-analysis. *Can J Cardiol* [Internet]. 2014;30(5): 47-53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cjca.2014.01.006>.
3. Mashkovskiy MD. *Medicine remedies.* [Лекарственные средства]. Moscow: Novaya Volna, 2012. Russian.
4. State Pharmacopoeia of Ukraine. 2nd ed. Kharkiv: Naukovo-ekspertnyi farmakopeyniy tsentr; 2015.
5. British Pharmacopoeia. London: The Stationary Office; 2009.
6. United States Pharmacopoeia. 36th ed. Rockville: USP Convention Inc, 2013.
7. Zhuk Y, Vasyuk S. Quantitative determination of Atenolol in tablets. *IJAPBC.* 2015;5(3): 350-4.
8. Anderson J, Gerlin M, Sversut R, Oliveira L, Singh A, Amaral M et al. Development and validation of an isocratic HPLC method for simultaneous determination of quaternary mixtures of antihypertensive drugs in pharmaceutical for-

mulations. Acta Chromatogr [Internet]. 2017;29(1): 95-110. Available from: <https://doi.org/10.1556/1326.2017.29.1.9>

9. Dey S, Sarkar S, Malakar J, Mazumder B. Spectrophotometric method for simultaneous determination of atenolol and atorvastatin in tablet dosage forms. Int J Pharm Biomed Res. 2012;3(1): 40-3.

10. Patil P, Raj H, Sonara G. Q-Absorbance Ratio Spectro-

photometric method for simultaneous determination of Atenolol and Ivabradine HCl in synthetic mixture. Pharm and Biol Eval. 2016;3(2): 224-30.

11. Grisodub AI. Standardized procedures for the validation of drug quality control methods. Kharkov: Gosudarstvennoye predpriyatiye «Ukrainskiy nauchnyy farmakopeynyy tsentr kachestva lekarstvennykh sredstv; 2016. Russian.

Отримано 01.09.2017