МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ВІСЛОУС ОЛЬГА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 615.222:54.062:543.422.3

РОЗРОБКА І ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ *β*-АДРЕНОБЛОКАТОРІВ МЕТОДОМ АБСОРБЦІЙНОЇ СПЕКТРОФОТОМЕТРІЇ

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук

Харків – 2017

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету Міністерства охорони здоров'я України

Науковий керівник: кандидат фармацевтичних наук, доцент
БЕВЗ НАТАЛІЯ ЮРІЇВНА
Національний фармацевтичний університет,
доцент кафедри фармацевтичної хімії

Офіційні опоненти: доктор хімічних наук, професор
СВЄЧНІКОВА ОЛЕНА МИКОЛАЇВНА
Харківський національний педагогічний університет
імені Г. С. Сковороди, завідувач кафедри хімії

доктор фармацевтичних наук, професор
ВАСЮК СВІТЛАНА ОЛЕКСАНДРІВНА
Запорізький державний медичний університет,
завідувач кафедри аналітичної хімії

Захист відбудеться " 28 " вересня 2017 року о 10^{00} годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.01 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4).

Автореферат розісланий " 28 " серпня 2017 року.

В.о. ученого секретаря
спеціалізованої вченої ради,
професор О.А. Рубан

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. З метою зниження рівня серцево-судинних захворювань, інвалідності та смертності від їх ускладнень, покращення спеціалізованої комплексної профілактики та лікування, а також підвищення якості життя населення у медичній практиці широко застосовують *β*-адреноблокатори, як препарати першої лінії для лікування хворих з артеріальною гіпертензією.

β-адреноблокатори містять в своїй структурі арилоксипропаноламіногрупу і є похідними амідів (атенолол), аміноспиртів (бісопрололу фумарат, бетаксололу гідрохлорид, метопрололу тартрат, тимололу малеат, пропранололу гідрохлорид, соталолу гідрохлорид, карведілол).

Група СО7 – *β*-адреноблокаторів представлена на українському фармацевтичному ринку закордонними та вітчизняними дженериками, у вигляді однокомпонентних та комбінованих лікарських засобів у формі таблеток або очних крапель, які повинні відповідати вимогам ДФУ. У зв'язку з цим, дуже важливо приділяти увагу методам аналізу цих лікарських засобів.

Для кількісного визначення *β*-адреноблокаторів в лікарських засобах застосовуються різноманітні фізико-хімічні методи, а саме: електрохімічні, флуориметричні, хемілюмінесцентні, а також селективний метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Британська та Європейська фармакопеї рекомендують вміст активного фармацевтичного інгредієнту у субстанціях *β*-адреноблокаторів визначати методом кислотно-основного титрування у неводному середовищі, у розчинах для ін'єкцій – методом ВЕРХ. Фармакопея США пропонує використовувати методику оберненофазової ВЕРХ з УФ-детектуванням. Деякі з цих методів є доволі складними у виконанні або вимагають дорогого устаткування та застосування низки токсичних органічних розчинників як у методі ВЕРХ. Інші відомі методи характеризуються недостатньою селективністю та чутливістю. Актуальним залишається питання розроблення нових високочутливих методик кількісного визначення *β*-адреноблокаторів з подальшим застосуванням при розробці монографії ДФУ. Саме абсорбційна спектрофотометрія є і залишається найширше використовуваним, відносно простим, економічним та водночас доступним методом фармацевтичного аналізу для більшості лабораторій з контролю якості.

Роботи науковців Львівського національного університету ім. І. Франка (Яцків О. С., Пацай І. О.), Запорізького державного медичного університету (проф. Васюк С. О. та учнів), Ужгородського національного університету (Кіш П., Балог Й., Чундак С., Базель Я.) по розробці спектрофотометричних методик, які ґрунтуються на утворенні забарвлених продуктів низькі відомих лікарських засобів з різноманітними реагентами, є передумовою для опрацювання уніфікованої аналітичної методики для кількісного визначення *β*-адреноблокаторів.

З огляду на це, одним з перспективних напрямків є розроблення і валідація методик кількісного визначення різних за фармакологічною дією *β*-адреноблокаторів методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ- та видимій ділянках спектра та з використанням методу екстракційної спектрофотометрії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Робота є фрагментом наукових досліджень, що проводяться співробітниками хімічних кафедр Національного фармацевтичного університету в напрямку розробки та валідації методів контролю якості лікарських препаратів. Робота виконана згідно з планом науково-дослідних робіт НФаУ за проблемою «Фармація» – «Розробка та валідація методів контролю якості лікарських засобів аптечного та промислового виробництва» (№№ державної реєстрації 0108U000376, 0114U000949). Дисертантом особисто проведено розробку та валідацію методик контролю якості *β*-адреноблокаторів (селективних, неселективних та комбінованих).

Мета і завдання дослідження. Мета дисертаційного дослідження – розроблення високочутливих, простих у виконанні та відтворюваних спектрофотометричних методик кількісного визначення *β*-адреноблокаторів.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі задачі:

– проаналізувати літературні джерела щодо офіцинальних і неофіцинальних методів аналізу неселективних, селективних та комбінованих *β*-адреноблокаторів;

– розробити та валідувати спектрофотометричну методику кількісного визначення та провести процедуру верифікації тесту «*Розчинення*» пропранололу гідрохлориду в таблетках для подальшого введення до монографії на ГЛЗ «Пропранололу таблетки» Державної Фармакопеї України;

– розробити методики кількісного визначення атенололу і тимололу малеату методом абсорбційної спектрофотометрії придатних для фармацевтичного аналізу;

– розробити спектрофотометричну методику кількісного визначення бісопрололу фумарату для проведення фармако-технологічного випробування тесту «*Розчинення*» таблеток вітчизняних виробників (вибір середовища, об'єму розчинника, швидкості обертання приладу, часу розчинення);

– розробити екстракційно-фотометричні методики кількісного визначення вмісту основної речовини у субстанції та кількісного визначення вмісту активних фармацевтичних інгредієнтів у складі готових лікарських засобів (таблетки, очні краплі), що містять *β*-абдреноблокатори різної фармакологічної дії;

– експериментально обґрунтувати оптимальні умови утворення продуктів взаємодії *β*-адреноблокаторів з барвниками – вибір реагенту, його концентрації, органічного розчинника, pH середовища; встановити коефіцієнти стехіометричних співвідношень «лікарська речовина – реагент»;

– визначити валідаційні характеристики екстракційно-фотометричної методики: специфічність, робасність, лінійність, правильність, прецизійність.

Об'єкт дослідження – контроль якості лікарських речовин групи *β*-адреноблокаторів.

Предмет дослідження – розроблення спектрофотометричних методик кількісного визначення пропранололу гідрохлориду, атенололу, тимололу малеату, бісопрололу фумарату і їх застосування для визначення кількісного вмісту основної речовини в АФІ, в моно- та багатокомпонентних лікарських формах, при проведенні тесту «*Розчинення*»; розроблення уніфікованої екстракційно-фотометричної методики для кількісного визначення вмісту *β*-адреноблокаторів різної фармакологічної дії у 8 субстанціях та 7 готових лікарських формах.

Методи дослідження. Для вирішення поставлених задач застосовували фармакопейні фізико-хімічні методи аналізу: абсорбційну спектрофотометрію в ультрафіолетовій і видимій ділянках спектра, абсорбційну спектрофотометрію в інфрачервоній ділянці, потенціометричне визначення pH, визначення фармакотехнологічних параметрів ГЛЗ та кількісного вмісту АФІ. Структуру нових утворених речовин встановлювали методами абсорбційної УФ- та ІЧ-спектроскопії. При визначенні стехіометричних співвідношень використовували розрахунковий напівемпіричний метод РМ3 з використанням алгоритму Полака-Рібєра за допомогою програми Hyperchem 8.0 та ПМР-спектроскопію. Процедуру валідації аналітичних методик та обробку результатів експериментальних досліджень проводили відповідно до вимог ДФУ з використанням методів математичної статистики.

Наукова новизна отриманих результатів. У дисертаційній роботі науково обґрунтоване застосування принципу утворення йонного асоціату в системі «реагент – лікарська речовина – органічний розчинник» для екстракційно-фотометричного визначення *β*-адреноблокаторів.

Установлені оптимальні умови утворення йонних асоціатів (pH середовища, кількість барвника, молярне співвідношення компонентів, стабільність хлороформних витягів) з 8 досліджуваними речовинами, встановлені аналітичні показники чутливості реакцій та запропонована будова комплексів «*β*-адреноблокатор – метиловий оранжевий».

Запропонована екстракційно-спектрофотометрична методика для здійснення кількісного визначення тимололу малеату у лікарських формах промислового виробництва (патент України на корисну модель № 94643). Розроблена методика спектрофотометричного визначення тимололу малеату за власним світлопоглинанням в очних краплях у присутності допоміжних речовин (патент України на корисну модель № 95980).

У результаті виконання експериментальної частини дисертаційної роботи розроблені екстракційно-фотометричні методики кількісного визначення *β*-адреноблокаторів, а саме атенололу, бетаксололу гідрохлориду, бісопрололу фумарату, метопрололу тартрату, пропранололу гідрохлориду, соталолу гідрохлориду, тимололу малеату, карведілолу. Отримані результати досліджень мають пріоритетний характер і захищені 2 патентами України на корисну модель та виданий інформаційний лист № 426-2014 «Кількісне спектрофотометричне визначення тимололу малеату в очних краплях у присутності бензалконію хлориду». Патент на корисну модель № 95908 «Спосіб кількісного спектрофотометричного визначення фенілефрину гідрохлориду або тимололу малеату у присутності бензалконію хлориду» включено до галузевого реєстру нововведень МОЗ України за 2015 р. (реєстр № 673/2/15).

Практичне значення отриманих результатів. За результатами роботи розроблена монографія «Пропранололу таблетки», яка включена до 2 видання Державної Фармакопеї України. Валідована методика кількісного визначення пропранололу гідрохлориду в таблетках у середовищі водного метанолу методом стандарту. Верифікована методика абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій ділянці спектра тесту «*Розчинення*» пропранололу гідрохлориду у препараті таблетки «Анаприлін-Здоров'я».

Розроблено та валідовано екстракційно-фотометричну методику кількісного визначення 8 досліджуваних речовин та 7 лікарських форм промислового виробництва, що містять β-адреноблокатори, з метою використання в рутинному аналізі та визначення їх залишкових кількостей на поверхні обладнання.

Розроблений спосіб кількісного визначення метопрололу тартрату в таблетках впроваджено в роботу лабораторії з аналізу якості лікарських засобів та виробів медичного призначення територіальної Державної служби з лікарських засобів у Житомирській області (акт впровадження 16 жовтня 2015 р.); методику кількісного визначення тимололу малеату в очних краплях в присутності бензалконію хлориду впроваджено в роботу лабораторії з аналізу якості лікарських засобів та виробів медичного призначення територіальної Державної служби з лікарських засобів у Сумської області (акт впровадження 22 грудня 2015 р.); екстракційно-фотометричну методику кількісного визначення тимололу малеату впроваджено в роботу лабораторії з аналізу якості лікарських засобів та виробів медичного призначення у Волинській обл. (акт впровадження 07 квітня 2016 р.) та в лабораторії розробки активних субстанцій ПАТ «Фармак» (акт впровадження 11 травня 2016 р.).

Результати досліджень знайшли застосування в навчальному процесі при викладанні курсу фармацевтичної хімії на кафедрі фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького (акт впровадження 21 квітня 2015 р.), на кафедрі фармацевтичних дисциплін медичного факультету Ужгородського національного університету (акт впровадження 08 вересня 2015 р.), на кафедрі фармацевтичної хімії ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України» (акт впровадження 04 червня 2016 р.).

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 обговорення результатів проведені з науковим керівником. Наукові роботи опубліковані у співавторстві з Георгіянц В. А., Безуглим П. О., Бевз Н. Ю., Живорою Н. В.

Співавторами наукових праць є науковий керівник та науковці, спільно з якими проведені дослідження. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок.

Апробація результатів дисертації. За основними результатами дисертаційної роботи зроблені доповіді на IX Міжнародній медико-фармацевтичній конференції студентів і молодих вчених «Хист» (Чернівці, вип. 14, 2012), Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання створення нових лікарських засобів» (Харків, 19-20 квітня 2012); III науково-практичній конференції з міжнародною участю (Харків, 21-23 листопада 2012); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні питання експериментальної, клінічної медицини та фармації» (Луганськ, 2012); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Косметологія: сьогодення та майбутнє»: (Харків, 15 листопада 2013); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Актуальні питання створення нових лі-

карських засобів» (Харків, 22-23 квітня 2014); міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Актуальні питання створення нових лікарських засобів» (Харків, 23 квітня 2015); Другій міжнародній студентській конференції «Be in Progress2» (Люблін, 23 квітня 2016); VIII Національний з'їзд фармацевтів України (Харків, 13-16 вересня 2016).

Публікації. Матеріали дисертації опубліковано у 19 роботах, у тому числі 7 статтях у наукових і фахових виданнях, 9 тезах доповідей, 2 патентах України на корисну модель, 1 інформаційному листі, 1 нововведенні.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 187 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, 5 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 137 сторінок друкованого тексту. Робота ілюстрована 41 таблицями, 54 рисунками та 1 схемою. Список використаних джерел містить 163 найменувань, з них 38 кирилицею та 125 латиною.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обговорюється актуальність теми, формуються мета і завдання досліджень, відзначається наукова новизна і практичне значення одержаних результатів.

Розділ 1. Фізико-хімічні методи кількісного визначення *β*-адреноблокаторів (огляд літератури). Аналітичний огляд літературних джерел наукової інформації присвячений порівняльному аналізу підходів до проведення кількісного визначення *β*-адреноблокаторів у субстанціях та ГЛЗ провідними фармакопеями світу; особливостям застосування цих речовин у медичній практиці.

Узагальнені літературні дані щодо нефармакопейних методик контролю якості досліджуваних сполук. Особливу увагу приділено екстракційно-фотометричним методикам, які уже знайшли застосування для кількісного визначення *β*-адреноблокаторів. З огляду витікає, що незважаючи на різноманітність методик кількісного визначення речовин цієї групи методом фотометрії, до теперішнього часу відсутня загальна уніфікована методика визначення кількісного вмісту цих сполук із застосуванням специфічних реагентів.

Розділ 2. Об'єкти дослідження, реагенти та розчинники. Описані об'єкти дослідження, методи і використане в процесі дослідження аналітичне обладнання.

Для дослідження використовувались стандартні зразки – селективних *β*-адреноблокаторів (атенолол, бісопрололу фумарат, бетаксололу гідрохлорид, метопрололу тартрат), неселективних (тимололу малеат, пропранололу гідрохлорид, соталолу гідрохлорид), комбінованих (карведілол), хімічні назви та серії яких наведені. Наводиться склад досліджуваних одно- та багатокомпонентних готових лікарських засобів і перелік допоміжних речовин. Відповідний склад ГЛЗ використовували для виготовлення модельних сумішей лікарських препаратів. У роботі використані барвники, розчинники та реагенти, що відповідали кваліфікації «х.ч.», «ч.д.а.» та «фарм.», розчини яких були виготовлені згідно з вимогами ДФУ.

Розділ 3. Розробка методик контролю якості пропранололу гідрохлориду в таблетках. Згідно монографії Британської фармакопеї «Propranolol Tablets» кіль-

кісне визначення пропранололу гідрохлориду рекомендовано проводити методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ-ділянці спектра за власним поглинанням у середовищі водного метанолу у співвідношенні 1:5 за довжини хвилі 290 нм. Розрахунок кількісного вмісту проводять методом питомого показника поглинання.

Враховуючи підхід ДФУ, розроблена методика кількісного визначення пропранололу гідрохлориду в таблетках «Анаприлін-Здоров'я» (серії 40310, 140611, 141210) методом УФ-спектрофотометрії з використанням розрахунку вмісту АФІ методом стандарту.

Згідно стандартизованій процедурі вивчені основні валідаційні характеристики методики – *специфічність*, *лінійність, правильність, прецизійність*. Встановлено, що допоміжні речовини препарату не впливають на достовірність отриманих результатів, оскільки фонове поглинання є незначущим δ_{noise}=0,24%≤ max δ=0,77%. Умови пробопідготовки суттєво не впливають на методику аналізу $\Delta_{SP} = 1{,}4 \le 0{,}77\%$, повна прогнозована невизначеність не перевищує критичного значення $\Delta_{As} 1{,}65 \le \max \Delta_{As} = 2{,}4\%$.

Лінійність, *правильність* та *прецизійність* методики кількісного визначення пропранололу гідрохлориду вивчали в діапазоні застосування від 80% до 120%. Параметри *лінійності* (рис. 1, табл. 1) відповідають вимогам ДФУ на всьому діапазоні концентрацій (a = 1,3 ≤ 1,18; r = 0,99985 ≥ 0,99571). Методика прецизійна, оскільки значення відносного довірчого інтервалу менше критичного значення для збіжності результатів: Δ% = 0,56 ≤ 2,4 і виконується критерій незначущості систематичної похибки δ = 0,186 (табл. 2).

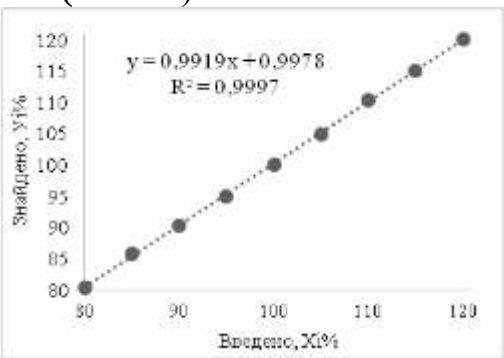

Рис. 1. Залежність відношення оптичної густини від відношення концентрації розчину пропранололу гідрохлориду

Таблиця 1

Метрологічні характеристики лінійної залежності

Величина	Значення	Вимоги	Оцінка результатів (витримуються або не витримуються)
b	0,9897		
s_b	0,0062		
a	| 1,30 |	≤ | 1,18 |	витримуються
s_a	0,623		
s_0	0,239		
s_0/b	| 0,24 |	≤ | 1,27 |	витримуються
s_Y	13,69		
r	| 0,9999 |	≥ | 0,9957 |	витримуються

Таблиця 2

Результати аналізу модельних сумішей та їх статистична обробка

Відносне стандартне відхилення, s_z%	0,30
Відносний довірчий інтервал $\Delta\% = t(95\%.8)*s_z = 1,860*s_z =$	0,56
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta_{As,}\% \leq$	2,40
Систематична похибка $\delta = \lvert X - 100 \rvert$	0,29
Критерій незначущості систематичної похибки 1) $\delta \leq \Delta\%/3 = 0,56/3 = 0,186$; 2) Якщо не виконується, тоді $\delta \leq \max \delta = 0,77$	не виконується виконується
Загальний висновок про методику:	коректна

Розроблена методика кількісного визначення включена до монографії ДФУ 2.0 «Пропранололу таблетки».

Розділ 4. Розробка методик спектрофотометричного кількісного визначення пропранололу гідрохлориду, бісопрололу фумарату, тимололу малеату та атенололу. Згідно з вимогами ДФУ та USP випробування «*Розчинення»* дозволяє досліджувати технологію виготовлення та стабільність твердих лікарських форм. Метод абсорбційної спектрофотометрії використовували для вивчення фармако-технологічного параметру, а саме тесту «*Розчинення*» ГЛЗ у вигляді таблеток, які містять β-адреноблокатори.

Продовжуючи роботу над опрацюванням методик для монографії «Пропранололу таблетки», вивчали розчинення таблеток «Анаприлін-Здоров'я» (серії 40310, 140611, 141210). Кількість пропранололу, яка перейшла у 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої визначали УФ-спектрофотометричним методом за довжини хвилі 289 нм, розрахунок діючої речовини проводили методом стандарту.

Тест *«Розчинення»* пропранололу гідрохлориду в таблетках гармонізований з USP, тому необхідною умовою стала верифікація наступної методики: середовище – 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої, об'єм – 1000 мл, прилад із лопаттю, швидкість обертання 100 об/хв, температура розчинення 37°С, час розчинення 30 хв. Оптичну густину одержаних розчинів та розчину порівняння вимірювали за довжини хвилі 289 нм. Методику верифікували в діапазоні застосування від 50% до 130%. Визначені валідаційні характеристики методики: лінійність (табл. 3, рис. 2), збіжність та правильність (табл. 4) відповідають вимогам ДФУ.

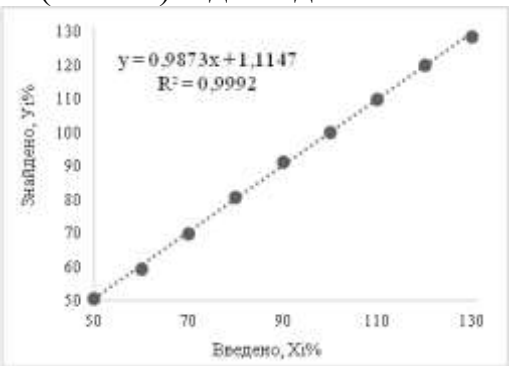

Рис. 2. Залежність відношення оптичної густини від концентрації розчину пропранололу гідрохлориду при проведені тесту «*Розчинення*»

Таблиця 3

Метрологічні характеристики лінійної залежності

Величина	Значення	Вимоги	Оцінка результатів (витримуються або не витримуються)
b	1,0063		
s_b	0,0119		
a	| -0,23 |	≤ | 2,10 |	витримується
s_a	1,1208		
s_0	0,9266		
s_0 /b	| 0,92 |	≤ | 1,58 |	витримується
s_Y	27,36		
r	| 0,9994 |	≥ | 0,9986 |	витримується

Таблиця 4

Результати перевірки прецизійність і правильності

	Параметри	Значення	Вимоги	Оцінка результатів
Прецизійність	Δ_Z	1,49	≤ 3,0	витримується
Правильність	$\|Z_{ср} – 100\|$	| 0,08 |	≤ 0,5	витримується

Верифікована методика тесту «*Розчинення*» увійшла до монографії ДФУ 2.0 «Пропранололу таблетки».

Бісопрололу фумарат широко застосовується в медичній практиці та випускається багатьма вітчизняними виробниками. Розроблена пряма спектрофотометрична методика для вивчення швидкості та кількості вивільнення бісопрололу фумарату з таблеток «Біпролол – Борщагівський ХФЗ», «Бісопролол – «Луганський хімікофармацевтичний завод» і «Бісопрол – «Фармак». Спектральні характеристики розчинів речовини досліджували в різних розчинниках: етанолі, воді, 0,1 М розчинах кислоти хлористоводневої або натрію гідроксиду. Найбільш придатним розчинником для кількісного визначення обраний 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої, в УФ-спектрі якого спостерігається два максимуми поглинання за довжин хвиль 272 нм та 277 нм. Підпорядкування розчинів бісопрололу фумарату основному закону світлопоглинання в максимумі при 272 нм спостерігається в концентраціях від $4{,}0\cdot10^{-5}$ до $2{,}8\cdot10^{-4}$ г/мл.

На підставі визначених експериментальних даних запропоновано проводити тест «*Розчинення*» за наступних умов: використовувати 5 таблеток з вмістом діючої речовини 10 мг, об’єм середовища – 500 мл, температура середовища – 37°С, розчинник – 0,1 М розчин хлористоводневої кислоти; швидкість обертання – 75 об/хв. Встановлено, що через 20 хв вивільняється не менше 75% від номінального вмісту бісопрололу фумарату. При досліджені валідаційних характеристик отримані результати: a=0,9762, b=0,9931, r = 0,9999, що не перевищують критеріїв прийнятності.

Оскільки склад діючих речовин, їх походження та технологія виробництва на кожному заводі відрізняється, було проведено порівняльні дослідження профілів розчинення препаратів-дженериків, які містять основну діючу речовину бісопрололу фумарат з однаковим вмістом АФІ, і розраховані значення факторів розходжен-

ня і подібності дозволяють підтвердити подібність профілів розчинення та запропонувати використовувати тест «*Розчинення*» для даної лікарської форми (табл. 5).

Таблиця 5

Таблиця значень факторів розходження і подібності для кривих вивільнення бісопрололу фумарату з таблеток

f_1			f_2		
Бісопрол / Конкор	Біпролол / Конкор	Бісопролол-Лугал / Конкор	Бісопрол / Конкор	Біпролол / Конкор	Бісопролол-Лугал / Конкор
3,66	3,54	5,07	67,65	71,06	63,41

Використання методу прямої спектрофотометрії для визначення АФІ у ГЛЗ не завжди є можливим через заважаючий вплив наявних допоміжних речовин. З метою уникнення впливу допоміжних речовин на характер УФ-спектру тимололу малеату в очних краплях «Офтан-Тимолол» розроблена пряма спектрофотометрична методика кількісного визначення, яка базується на проведенні кількісного визначення АФІ за довжини хвилі 298 нм після попереднього маскування допоміжної речовини (бензалконій хлориду) розчином калію дихромату.

У комбінованих ЛФ за наявності декількох АФІ ароматичної будови у фармацевтичному аналізі не завжди можливе застосування методу прямої спектрофотометрії. У таких випадках частіше використовують абсорбційну спектрофотометрію у видимій ділянці спектру, яка ґрунтується на специфічних фізико-хімічних властивостях новоутворених сполук аналіту з використаним реагентом. Саме цей підхід був використаний для розроблення методики кількісного визначення атенололу в присутності ніфедипіну і хлорталідону у комбінованих таблетках «Тонорма». Атенолол містить естерне угрупування, за рахунок чого утворює похідне гідроксамової кислоти, яке з солями Fe(III) в кислому середовищі забарвлюється у червоно-фіолетовий колір. При розробці спектрофотометричної у видимій ділянці спектру методики встановлений час проведення реакції (90 хв) утворення похідного гідроксамової кислоти, підібраний температурний режим (60°С) і аналітична довжина хвилі – 500 нм. Встановлено підпорядкованість стандартних розчинів гідроксамового похідного атенололу за цих умов закону Бугера-Ламберта-Бера (від 0,01% до 0,005%), МВ = 1,04; МКВ = 7,32. Відповідно до розробленої методики проведено кількісне визначення атенололу в таблетках «Тонорма». Доведено, що інші компоненти ЛЗ за цих умов не вступають в реакцію.

Розділ 5. Розробка екстракційно-фотометричної методики кількісного визначення *β*-адреноблокаторів. При розробленні уніфікованої екстракційно-фотометричної методики враховували фактори, що впливають на екстракцію досліджуваних лікарських речовин: вибір органічного розчинника, барвника та його концентрації, об’єм реагентів, час перебігу реакції та стійкість утворених продуктів з часом.

Визначені оптимальні умови перебігу реакції: триразове екстрагування; органічний розчинник – хлороформ з використанням кожного разу по 10 мл; барвник – 5% розчин метиловий оранжевого; фосфатний буферний розчин з pH 3,5 або 7,5. Для визначення кількості речовини, яка екстрагується хлороформом, розраховували коефіцієнт розподілу і ступінь вилучення, при цьому вилучається не менше 99,6% сполуки.

При виборі барвника для утворення йонного асоціату використовували реагенти: бромтимоловий синій, бромфеноловий синій і метиловий оранжевий.

На реакцію утворення йонного асоціату впливає pH середовища. При виборі барвника встановлено, що проведення реакції у середовищі фосфатного буферного розчину з pH 7,5 у випадку використання бромфенолового синього в хлороформний шар частково переходить реагент. Використання бромтимолового синього не дало позитивного результату. З метиловим оранжевим за даних умов нові сполуки утворюють атенолол та соталолу гідрохлорид. При використані фосфатного буферного розчину з pH 3,5 стійкі сполуки з метиловим оранжевим утворюють: пропранололу гідрохлорид, бісопрололу фумарат, бетаксололу гідрохлорид, тимололу малеат, метопрололу тартрат та карведилол, в абсорбційних спектрах поглинання яких на ділянці від 220 до 550 нм, спостерігаються дві доволі пологі смуги з максимумами за довжин хвиль, які наведені в табл. 6.

Таблиця 6

Максимуми за довжини хвиль, які спостерігаються в абсорбційному спектрі

Субстанції	λ, нм	
	1 максимум	2 максимум
	pH 3,5	
Бісопрололу фумарат	272	424
Тимололу малеат	297	426
Пропранололу гідрохлорид	281	425
Метопрололу тартрат	277	431
Бетаксололу гідрохлорид	274	424
Карведилол	286	424
	pH 7,5	
Атенолол	270	425
Соталолу гідрохлорид	268	425

Необхідну для повноти перебігу реакції кількість барвника та фосфатного буферного розчину визначали експериментально за максимальною величиною абсорбції продукту реакції.

Майже всі досліджувані *β*-адреноблокатори дуже добре розчинні у воді, тому реакцію проводили у водному середовищі. Для карведилолу, який практично не розчиняється у воді, як розчинник використовували 96% етиловий спирт. Аналітичні смуги були обрані за максимумами при довжинах хвиль 424 – 431 нм, відповідно (рис. 3-4).

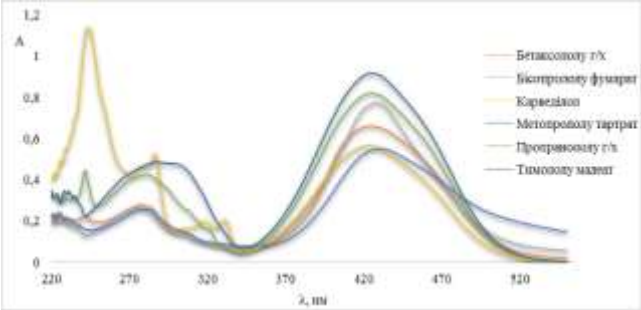

Рис. 3. Абсорбційні спектри поглинання хлороформних розчинів йонних асоціатів β-адреноблокаторів з метиловим оранжевим при pH 3,5

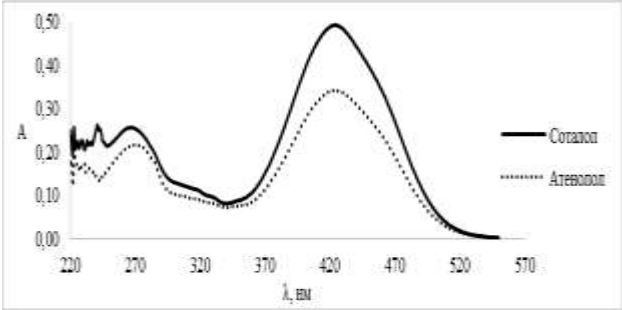

Рис. 4. Абсорбційні спектри поглинання хлороформних розчинів йонних асоціатів атенололу та соталолу гідрохлориду з метиловим оранжевим при pH 7,5

Для опрацювання методики було досліджено підпорядкування хлороформних розчинів продукту реакції β-адреноблокаторів з метиловим оранжевим закону Бугера-Ламберта-Бера. Доведено, що підпорядкування аналізованих розчинів основному закону світлопоглинання спостерігається в інтервалі концентрацій від $2{,}0\cdot10^{-4}$ до $2{,}2\cdot10^{-3}$ %.

Експериментальним шляхом визначені показники чутливості реакції між β-адреноблокаторами та метиловим оранжевим: питомий показник поглинання продуктів реакції ($A_{1см}^{1\%}$), молярний показник світлопоглинання (ε), коефіцієнт Сендела (W_S), межі виявлення (C_{min}, мкг/мл). З цією метою проводили реакції метилового оранжевого з досліджуваними лікарськими речовинами за оптимальних умов (табл. 7).

Таблиця 7

Аналітичні показники чутливості реакцій «лікарська речовина – метиловий оранжевий»

Досліджувана речовина	λ_{max}, нм	W_S	C_{min}, мкг/мл	$A_{1см}^{1\%}$	ε
Атенолол	425	0,0035	0,180	296±7	756,93
Бісопрололу фумарат	424	0,0014	0,070	603±24	49879,20
Бетаксололу гідрохлорид	424	0,0014	0,075	506±36	26197,54
Карведилол	424	0,0016	0,080	588±16	23902,20
Метопрололу тартрат	431	0,0018	0,090	545±33	49986,67
Пропранололу гідрохлорид	425	0,0012	0,060	506±18	1354,01
Соталолу гідрохлорид	425	0,0020	0,100	234±14	591,29
Тимололу малеат	426	0,0018	0,090	515±4	223123,75

Високі значення молярних коефіцієнтів світлопоглинання та низькі значення величин C_{min}, свідчать про високу чутливість реакції метилового оранжевого з досліджуваною групою лікарських сполук.

Стехіометричні співвідношення «лікарська речовина – реагент» розраховували напівемпіричним методом PM3 з використанням алгоритму Полака-Рібєра за допомогою програми Hyperchem 8.0. Змодельована та відображена геометрична структура досліджуваних молекул, розраховані енергетичні параметри комплексів. Результати розрахунків повної енергії свідчать, що стехіометричні співвідношення

досліджуваних комплексів метилового оранжевого з атенололом, бісопрололу фумаратом, тимололу малеатом, пропранололу гідрохлоридом, метопрололу тартратом, бетаксололу гідрохлоридом, соталолу гідрохлоридом, карведилолом може бути як 1:1, так і 1:2, але найбільш енергетично вигідна, тобто стабільна конформація спостерігається у співвідношенні «лікарська речовина-реагент» 1:1.

Стехіометричні співвідношення і структуру комплексів *β*-адреноблокаторів та метилового оранжевого встановлювали методом ПМР-спектроскопії.

При аналізі спектрів ЯМР ^{1}H, яка відповідає протонам аліфатичних груп карведилолу і метилового оранжевого визначали інтегральну інтенсивність синглетів метоксигрупи (3.69 м.д.) і диметиламіногрупи (3.13 м.д.). Розрахунки з використанням наведених на рис. 5 даних показують, що метиловий оранжевий і карведилол утворюють продукт у співвідношенні 1:2 відповідно.

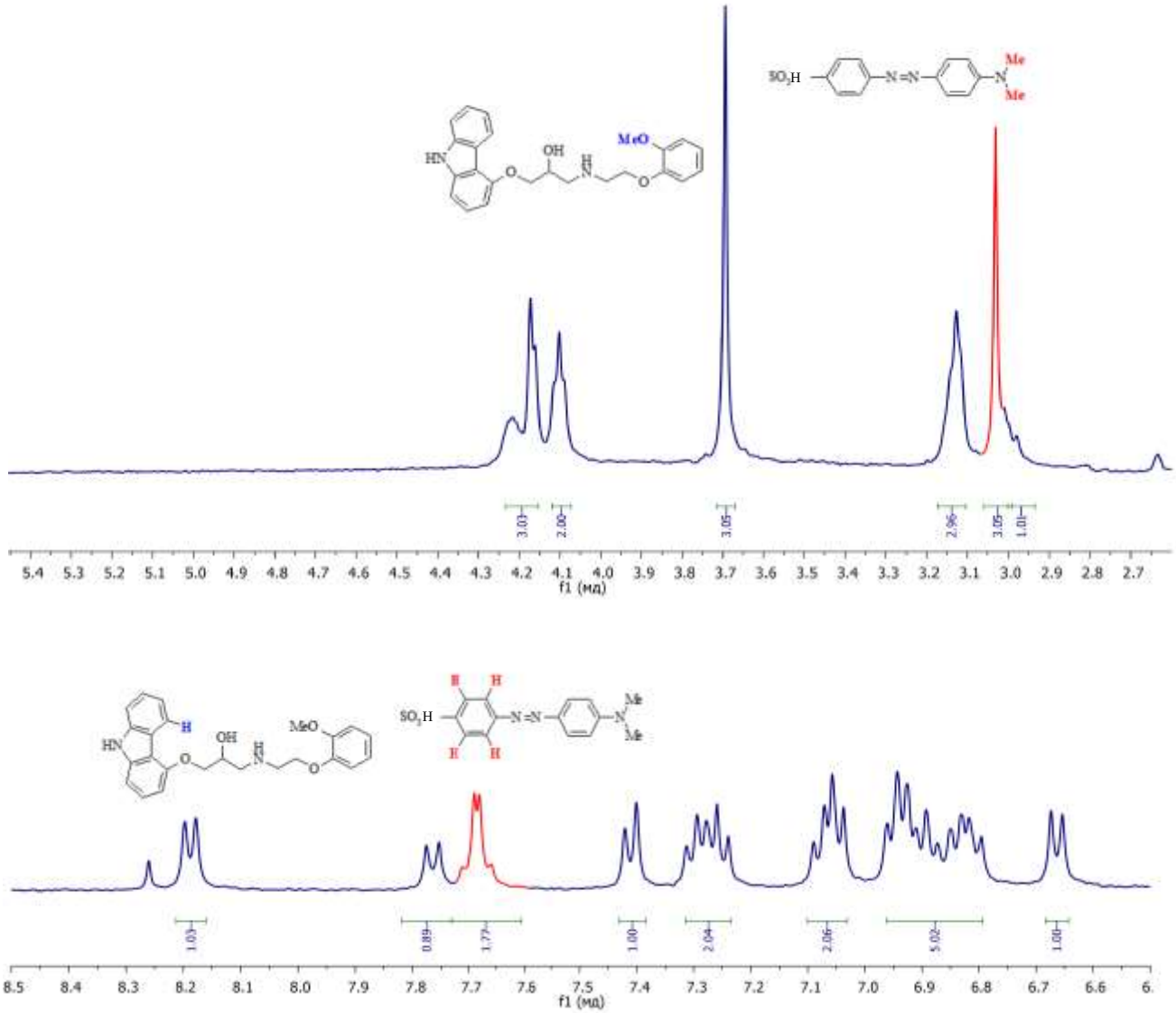

Рис. 5. ПМР-спектр комплексу карведилолу з метиловим оранжевим в ДМСО-D_6

До такого ж висновку можна дійти, аналізуючи ароматичні ділянки спектрів ЯМР ^{1}H карведилолу, метилового оранжевого і продукту їх реакції.

Дані ^{1}H спектрів доводять, що досліджувані сполуки утворюють новий продукт з метиловим оранжевим у співвідношенні 1:2 у випадку карведилолу і соталолу і 1:1 у всіх інших випадках, що підтверджує прогноз напівемпіричного методу PM3 з використанням алгоритму Полака-Рібєра.

Для доведення утворення нових сполук використовували методи УФ- та ІЧ-спектроскопії. Вивчали УФ-спектри поглинання водного розчину тимололу малеату та продукту його взаємодії з метиловим оранжевим в середовищі фосфатного буферного розчину з pH 3,5, використовуючи як компенсаційний розчин суміш усіх реагентів. Встановили, що в УФ-спектрі водного розчину тимололу малеату максимум спостерігається за довжини хвилі 294 нм. УФ-спектр продукту взаємодії тимололу з метиловим оранжевим характеризується двома максимумами при 294 нм і доволі широкою смугою в області 459 – 463 нм, що характеризується гіперхромним ефектом, і може свідчити про перерозподіл електронної густини ароматичної системи молекули за рахунок утворення йонного асоціату.

Підтвердження структури комплексу «лікарська речовина – реагент» встановлювали, аналізуючи ІЧ-спектри досліджуваних речовин, метилового оранжевого та утворених продуктів реакції.

В ІЧ-спектрах досліджуваних продуктів реакцій *β*-адреноблокаторів з метиловим оранжевим спостерігається зміщення характеристичних смуг ароматичної –C=C групи і аміногрупи –NH на 20-40 см$^{-1}$ та поява додаткових смуг притаманних протонованій аміногрупі в порівнянні з індивідуальними речовинами.

Деформаційні коливання амідної групи δ(NH), наприклад, атенололу при 1584 см$^{-1}$ зміщуються в комплексі до 1515 см$^{-1}$; соталолу гідрохлориду при 1800 – 2000 см$^{-1}$ переміщені в комплексі до 1646 см$^{-1}$. Валентна смуга коливання NH-групи бісопрололу фумарату при 3042 см$^{-1}$ в комплексі зміщуються до 2925 см$^{-1}$; тимололу малеату при 3044 см$^{-1}$ в комплексі переміщена до 2973 см$^{-1}$ – 2922 см$^{-1}$; метопрололу тартрату при 2981 см$^{-1}$ – 2874 см$^{-1}$ в комплексі зміщується до 2922 см$^{-1}$ – 2852 см$^{-1}$. У комплексах бетаксололу гідрохлориду та карведилолу з'являються додаткові смуги при 1563 см$^{-1}$ і 1505 см$^{-1}$ відповідно.

На підставі результатів комплексних досліджень запропоновано екстракційно-фотометричну методику кількісного визначення *β*-адреноблокаторів, для перевірки коректності якої були вивчені основні валідаційні характеристики: *специфічність, лінійність, прецизійність, правильність і робасність*.

Робасність. За умов перевірки робасності вивчено стабільність розчинів у часі та вплив pH. У табл. 8, на прикладі хлороформних розчинів йоних асоціатів тимололу з метиловим оранжевим надані результати дослідження впливу pH на оптичну густину розчинів, якщо значення pH різниться на ±10 %.

Таблиця 8

Вплив pH на оптичну густину хлороформних розчинів йонних асоціатів тимололу малеату з метиловим оранжевим

Розчин	Оптичні густини Аі (середнє трьох вимірів) Випробування			середнє	SrpH, %	RSDpH,%	ΔpH,%	δmax,%
	0,1 М HCl (pH 3,15)	pH 3,5	0,1M NaOH (pH 3,85)					
1	0,522	0,521	0,519	0,521	0,0024	0,23	0,50	1,54
2	0,538	0,539	0,536	0,537	0,0025	0,24	0,53	
3	0,555	0,556	0,552	0,554	0,0034	0,33	0,71	

При взаємодії атенололу та соталолу гідрохлориду з метиловим оранжевим, утворення йонних асоціатів відбувається у середовищі фосфатного буферного розчину з pH 7,5. Встановлено, що оптична густина хлороформних розчинів характеризується незначним коливаннями при зміні pH (±10%), а відтак не призводить до помітного впливу на результати аналізу (табл. 9).

Таблиця 9

Вплив pH на оптичну густину хлороформних розчинів йонних асоціатів атенололу з метиловим оранжевим

Розчин	Оптичні густини Аі середнє трьох вимірів			середнє	SrpH, %	RSDpH,%	ΔpH,%	δmax,%
	0,1 М HCl (pH 6,75)	pH 7,5	0,1M NaOH (pH 8,25)					
1	0,281	0,284	0,282	0,282	0,0039	0,3881	0,8275	1,54
2	0,282	0,285	0,283	0,284	0,0050	0,4979	1,0615	
3	0,279	0,283	0,281	0,281	0,0063	0,6347	1,3532	

Доведено, що досліджувані розчини і розчин порівняння стабільні протягом 1 години, оскільки довірчий інтервал вимірювань оптичної густини у часі не перевищує критерію незначущості $\Delta t \leq \max \delta = 1{,}54\%$ (табл. 10, 11).

Таблиця 10

Дослідження стабільності розчину йонного асоціату тимололу малеату з метиловим оранжевим залежно від часу

Розчин	Термін дослідження стабільності t, хв					середнє	RSD_t,%	Δ_t,%	δ_{max},%
	0	15	30	45	60				
A_0	0,522	0,522	0,521	0,521	0,519	0,521	0,23	0,50	1,54
A	0,526	0,526	0,524	0,522	0,520	0,523	0,49	1,06	

Таблиця 11

Дослідження стабільності розчину йонного асоціату атенололу з метиловим оранжевим у часі

Розчин	Термін дослідження стабільності t, хв					середнє	RSD_t,%	Δ_t,%	δ_{max},%
	0	15	30	45	60				
A_0	0,284	0,282	0,283	0,283	0,281	0,283	0,40	0,86	1,54
A	0,280	0,282	0,283	0,282	0,283	0,282	0,43	0,92	

Лінійність вивчали для 9 концентрацій досліджуваних речовин, яка рівномірно змінюється в межах діапазону застосування методики та охоплює діапазон 80% – 120% від номінальної (табл. 12).

Таблиця 12

Метрологічні характеристики лінійної залежності запропонованої методики

Досліджувана речовина	b	a	Sa	r	МВ ≤ 32%	МКВ ≤ 32%
Атенолол	0,9870	1,5258	1,1994	0,9995	4,01%	12,1%
Бісопрололу фумарат	0,9892	1,1767	1,2051	0,9995	4,02%	12,1%
Бетаксололу гідрохлорид	1,0390	-3,4037	2,4200	0,9981	7,60%	23,2%
Карведилол	1,0030	0,0588	1,6978	0,9990	5,60%	16,9%
Метопрололу тартрат	0,9740	3,0797	1,5390	0,9991	5,20%	15,8%
Пропранололу гідрохлорид	0,9738	2,3452	1,7432	0,9989	5,90%	17,9%
Соталолу гідрохлорид	0,9884	1,5583	0,4892	0,9999	1,00%	3,1%
Тимололу малеат	1,0375	-3,1478	1,3339	0,9994	4,20%	12,8%

Одержані значення коефіцієнтів кореляції свідчать про те, що лінійність методики підтверджується в обраних діапазонах концентрацій і виконуються усі вимоги ДФУ щодо параметрів лінійної залежності.

Прецизійність і правильність оцінювали за даними, отриманими при вивченні лінійності (табл. 13).

Таблиця 13

Правильність та прецизійність результатів кількісного визначення

Досліджувана речовина	$\overline{z}$	Sz%	Δas%	δ
Атенолол	100,26	0,48	0,90	0,26
Бісопрололу фумарат	100,13	0,43	0,80	0,13
Бетаксололу гідрохлорид	100,45	0,92	1,72	0,45
Карведилол	100,37	0,68	1,27	0,37
Метопрололу тартрат	100,54	0,79	1,48	0,54
Пропранололу гідрохлорид	100,13	0,43	0,80	0,13
Соталолу гідрохлорид	100,43	0,31	0,58	0,43
Тимололу малеат	100,55	0,63	1,17	0,55

Як видно з таблиць 12-13, методика аналізу характеризується достатньою *лінійністю*, *правильністю* і *прецизійністю* на всьому досліджуваному діапазоні концентрацій 80% – 120%.

Для подальшого використання екстракційно-фотометричної методики у фармацевтичному аналізі її апробовано на лікарських формах промислового виробництва і підтверджено валідаційними характеристиками: *робасність, лінійність, специфічність, прецизійність (збіжність), правильність*.

Оцінку *робасності* проводили шляхом визначення факторів, що впливають на величину оптичної густини, а саме вплив інших АФІ і допоміжних речовин ГЛЗ.

Встановлено, що вплив плацебо у всіх досліджуваних лікарських формах складає менше 1%.

Лінійність, правильність, прецизійність визначали у межах діапазону застосування аналітичної методики (80% – 120%) від номінального вмісту на модельних розчинах, які відповідали складу ГЛЗ. Встановлено, що лінійність методики для всіх досліджуваних ГЛФ спостерігається на всьому діапазоні досліджуваних концентрацій (табл. 14-15).

Таблиця 14

Числові показники лінійної залежності

Модельні суміші	b	a	S_b	S_a	$r \geq R_c$
Пропранололу гідрохлорид «Анаприлін-Здоров'я», 40 мг	1,0021	0,2263	0,0074	0,7442	0,9998
Бетаксололу фумарат «Бетакор», 20 мг	0,9785	2,3090	0,0121	1,2229	0,9995
Бісопрололу гідрохлорид «Бісопролол-Лугал», 10 мг	0,9981	0,5783	0,0086	0,8623	0,9997
Карведилол «Карведилол-КВ», 25 мг	0,9772	2,6640	0,0059	0,5974	0,9999
Метопрололу тартрат «Метопролол», 50 мг	0,9866	1,5382	0,0140	1,4075	0,9993
Тимололу малеат «Тимолол-Дарниця», 5 мг/мл	0,9860	1,9184	0,0082	0,8284	0,9998
Атенолол «Тенорік» (атенолол 50 мг, хлорталідон 12,5 мг)	0,9696	3,3493	0,0123	1,2397	0,9994

Таблиця 15

Визначення правильності та прецизійності методики на модельних сумішах досліджуваних лікарських засобів

Модельні суміші	$\bar{z}$	s_z%	Δ%	$\delta = \lvert X - 100 \rvert$	МВ ≤ 32%	МКВ ≤ 32%
Пропранололу гідрохлорид «Анаприлін-Здоров'я», 40 мг	100,44	0,25	0,46	0,44	2,41	7,4
Бетаксололу фумарат «Бетакор», 20 мг	100,20	0,59	1,10	0,18	4,12	12,4
Бісопрололу гідрохлорид «Бісопролол-Лугал», 10 мг	100,40	0,32	0,59	0,40	2,80	8,62
Карведилол «Карведилол-КВ», 25 мг	100,43	0,41	0,77	0,43	2,00	6,1
Метопрололу тартрат «Метопролол», 50 мг	100,22	0,51	0,95	0,22	4,70	14,2
Тимололу малеат «Тимолол-Дарниця», 5 мг/мл	100,55	0,36	0,67	0,55	2,70	8,3
Атенолол «Тенорік» (атенолол 50 мг, хлорталідон 12,5 мг)	100,37	0,62	1,15	0,37	4,20	12,7

Проведене кількісне визначення АФІ у ГЛФ методом екстракційної фотометрії. Розраховані метрологічні характеристики, які свідчать, що відносна невизначеність середнього результату кількісного визначення пропранололу гідрохлориду в таблетках «Анаприлін-Здоров'я» становить 0,04%; бетаксололу гідрохлорид в таблетках «Бетакор» – 0,12%; бісопрололу фумарату в ЛФ «Бісопролол-Лугал» – 0,008%; карведилолу в таблетках «Карведилол-КВ» – 0,12%; метопрололу тартрату в таблетках «Метопролол» – 0,22%; тимололу малеату в очних краплях «Тимолол-Дарниця» – 0,18%; атенололу в таблетках «Тенорік» (комбінований препарат) – 0,41%.

ВИСНОВКИ

У роботі наведено узагальнення та експериментальне вирішення наукової задачі з розроблення та валідації методик кількісного визначення β-адреноблокаторів методом спектрофотометрії з подальшим введенням до монографій ДФУ.

1. На основі аналізу літературних джерел обґрунтована доцільність опрацювання єдиної уніфікованої спектрофотометричної методики кількісного визначення β-адреноблокаторів.

2. Розроблена та валідована спектрофотометрична методика кількісного визначення пропранололу гідрохлориду в таблетках «Анаприлін-Здоров'я» (серії 40310, 140611, 141210). Веріфікована спектрофотометрична методика кількісного визначення пропранололу гідрохлориду при проведенні тесту «*Розчинення*». За результатами проведеної роботи розроблена монографія ДФУ «Пропранололу таблетки» (ДФУ 2.0, Т. 3, стор. 643).

3. Розроблена методика кількісного визначення бісопрололу фумарату методом спектрофотометрії та доведена можливість застосування її для проведення тесту «*Розчинення*». Обґрунтовані умови проведення тесту: концентрація АФІ, середовище, об'єм розчинення, швидкість обертання та час розчинення. Розроблена методика за отриманими валідаційними характеристиками може бути рекомендована до застосування у фармацевтичному аналізі.

4. Розроблена експресна методика кількісного визначення тимололу малеату методом спектрофотометрії в очних краплях «Офтан-Тимолол» за довжини хвилі 298 нм в присутності розчину калій дихромату як маскуючого реагенту допоміжної речовини бензалконію хлориду.

5. Розроблена методика кількісного визначення атенололу методом спектрофотометрії у видимій ділянці спектру за світлопоглинанням його забарвленого похідного гідроксамату феруму (III) за довжини хвилі 500 нм та показана можливість визначення вмісту діючої речовини в таблетках «Тонорма» у присутності таких АФІ, як ніфедипін і хлорталідон.

6. Розроблено екстракційно-фотометричну методику кількісного визначення β-адреноблокаторів. У результаті експериментальних досліджень обраний реагент – метиловий оранжевий, екстрагент – хлороформ, pH середовища, аналітична довжина хвилі. Встановлено, що підпорядкування отриманих розчинів основному закону світлопоглинання спостерігається в межах концентрацій 0,0002 –

0,022 мг/мл. Високі значення молярних коефіцієнтів поглинання та низькі значення меж виявлення свідчать про високу чутливість аналітичної реакції метилового оранжевого з досліджуваною групою лікарських речовин. Розраховані коефіцієнти стехіометричних співвідношень «лікарська речовина – реагент» методами ПМР-спектроскопії і напівемпіричним методом РМ3 з використанням алгоритму Полака-Рібєра. Найбільш енергетично вигідна, стабільна конформація спостерігається у співвідношенні «лікарська речовина-реагент» 1:1. За допомогою УФ- та ІЧ-спектроскопії доведено, що в результаті взаємодії досліджуваної речовини з метиловим оранжевим утворюються нові солеподібні продукти, які мають характер йонного асоціату.

7. Вивчені валідаційні характеристики екстракційно-фотометричної методики визначення АФІ: *специфічність, робасність, лінійність, правильність, прецизійність*, як у субстанціях, так і у готових лікарських засобах підтверджують, що методики відповідають своєму призначенню – дозволяють коректно контролювати якість ЛЗ. Розроблені екстракційно-фотометричні методики та показана можливість їх застосування для кількісного визначення досліджуваних речовин у 8 субстанціях та у 7 готових лікарських засобах (таблетки, очні краплі).

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Віслоус О. О., Бевз Н. Ю., Георгіянц В. А. Кількісне визначення карведілолу в таблетках «Коріол» методом спектрофотометрії. *Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика*. Київ. 2013. Випуск 22, кн. (4). С. 229-235. *(Дисертантом самостійно проведено аналіз літературних джерел, виконано експериментальну частину дослідження, написано статтю).*

2. Віслоус О. О., Комарова Ю. А., Бевз Н. Ю., Георгіянц В. А., Гризодуб О. І., Живора Н. В. Верифікація спектрофотометричної методики кількісного визначення пропранололу гідрохлориду в таблетках. *Фармаком*. 2013. №3. С. 34-38. *(Дисертантом самостійно проведено аналіз літературних джерел, виконано експериментальну частину дослідження, написано статтю).*

3. Vislous O. O., Bevz N. Yu, Georgiyants V. A., Zhivora N. V. Development of the «Dissolution» test for bisoprolol tablets. *News of Pharmacy*. 2014. № 1 (77). P. 49-53. *(Дисертантом самостійно проведено аналіз літературних джерел, виконано експериментальну частину дослідження, написано статтю).*

4. Vislous O., Bevz N., Georgiyants V. Development of the extraction-photometric method for quantitative determination of Timolol Maleate. *Journal of Chemical and pharmaceutical research*. 2014. №6(9). P. 156-159. *(Дисертантом самостійно проведено аналіз літературних джерел, виконано експериментальну частину дослідження, написано статтю).*

5. Вислоус О. А., Бевз Н. Ю., Живора Н. В., Безуглый П. А. «Количественное определение атенолола в таблетках Тонорма методом спектрофотометрии». *«Вестник фармации»*. 2014. №4(66). С.68-73. *(Дисертантом самостійно проведено аналіз літературних джерел, виконано експериментальну частину дослідження, написано статтю).*

6. Вислоус О. А., Бевз Н. Ю., Георгиянц В. А. Количественное определение метопролола тартрата в таблетках экстракционно-фотометрическим методом. *Республиканский научный журнал «Вестник ЮКГФА»*. 2014. №3(68). С. 20-23. *(Дисертантом самостійно проведено аналіз літературних джерел, виконано експериментальну частину дослідження, написано статтю).*

7. Віслоус О. О., Бевз Н. Ю., Георгіянц В. А. Метод ідентифікації та кількісного визначення β-адреноблокаторів (огляд літератури). *Scientific Journal «ScienceRise»*. 2015. №10/4(15). С. 56-70. *(Дисертантом самостійно проведено аналіз літературних джерел, виконано експериментальну частину дослідження, написано статтю).*

8. Екстракційно-фотометричний спосіб кількісного визначення тимололу малеату : пат. 94643 Україна : МПК G01J3/42 (2006.01). № u 2014 05716; заявл. 27.05.2014; опубл. 25.11.2014, Бюл. №22. *(Дисертантом самостійно проводився аналіз літературних джерел, виконано експериментальну частину, аналіз отриманих даних, проводилася робота за патентами).*

9. Спосіб кількісного спектрофотометричного визначення фенілефрину гідрохлориду або тимололу малеату у присутності бензалконію хлориду : пат. 95908 Україна : МПК G01J3/42 (2006.01). № u 2014 08264; заявл. 21.07.2014; опубл. 12.01.2015, Бюл. № 1. *(Дисертантом самостійно проводився аналіз літературних джерел, виконано експериментальну частину, аналіз отриманих даних, проводилася робота за патентами).*

10. Георгіянц В. А., Бевз Н. Ю., Віслоус О. О. Кількісне спектрофотометричне визначення тимололу малеату в очних краплях у присутності бензалконію хлориду. Інформаційний лист №426-2014 / Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи (Укрмедпатентінформ). Київ, 2014. Вип. 45. 4 с. (Рішення ПК «Фармація» Протокол №87 від 23.10. 2014 р.).

11. Віслоус О. О. Розробка та валідація методик кількісного визначення *β*-адреноблокаторів. *Хист*. Чернівці. 2012. Вип. 14. С. 119.

12. Віслоус О. О., Бевз Н. Ю. Розробка та валідація методик кількісного визначення методик кількісного визначення β-адреноблокаторів. Актуальні питання створення нових лікарських засобів: матеріали всеукр. наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених 19-20 квіт. 2012 р. Х.: НФаУ, 2012. С. 139.

13. Віслоус О. О., Бевз Н. Ю. Верифікація спектрофотометричної методики кількісного визначення пропранолол гідрохлориду в таблетках. Український медичний альманах. 2012. Т.15, №2. дод.: Актуальні питання експериментальної, клінічної медицини та фармації: матеріали всеукр. наук.-практ. конференції з міжнар. участю, 25-26 жовт. С. 304.

14. Вислоус О. А., Бевз Н. Ю. Разработка методики количественного определения бетаксолола. Сучасні досягнення фармацевтичної технології: матеріали ІІІ наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 21-23 листоп. 2012 р. Х.: Вид-во НФаУ, 2012. С. 35-36.

15. Верифікація методик як необхідний етап введення монографій на ГЛЗ до ДФУ / В. А. Георгіянц, Н. Ю. Бевз та ін. // Косметологія: сьогодення та майбутнє: матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 15 листоп. 2013 р. м Харків / М-во охорони здоров’я України; Нац. фармац. ун-т. Х., 2013. С. 91-92.

16. Vislous O. A., Dvoynos I. A., Bevz N. Yu. Development extraction-photometric method of assay of timolol maleate. Актуальні питання створення нових лікарських засобів: тези доп. всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів, 22-23 квіт. 2014 р. Х.: Вид-во, 2014. С. 57.

17. Vislous O. A., Bevz N. Yu., Palchik S. A., Zhivora N. V. UV-spectrophotometric assay sotalol hydrochloride in bulk and tablet formulation. Актуальні питання створення нових лікарських засобів: тези доп. міжнар. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів, 23 квіт. 2015 р. Х.:Вид-во НФаУ, 2015. 712 с.

18. Vislous O., Bevz N., Georgiyants V., Kryvanych O. Development of the extraction-photometric method for quantitative determination of beta-blockers. BeProgress2 in international conference of pharmacy students. Lublin. 2016. P. 4.

19. Віслоус О. О., Бевз Н. Ю., Георгіянц В. А., Безуглий П. О. Визначення стехіометричних співвідношень взаємодії β-адреноблокаторів із метиловим оранжевим. Фармація XXI століття: тенденції та перспективи: матеріали VIII Нац. з'їзду фармацевтів України, 13-16 вересня 2016 р., м. Харків: у 2 т. Т.1 / М-во охорони здоров'я України, Нац. фармац. ун-т; ред. кол.: В.П. Черних (голова) та ін.; уклад.: С.Ю. Данильченко та ін. Харків: НФаУ, 2016. С.174 (Серія «Наука»).

АНОТАЦІЯ

Віслоус О.О. Розробка та валідація методик кількісного визначення β-адреноблокаторів методом абсорбційної спектрофотометрії. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук (доктора філософії) за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія. – Національний фармацевтичний університет, Харків, 2017.

Дисертаційна робота присвячена удосконаленню контролю якості готових лікарських засобів, що містять *β*-адреноблокатори селективної, неселективної та комбінованої дії за допомогою верифікації та / або валідації методик, які експериментально доводять їх придатність для вирішення поставлених завдань.

Розроблено та валідовано спектрофотометричну методику кількісного визначення пропранололу гідрохлориду, верифікована методика тесту «*Розчинення*», які увійшли до монографії «Пропранололу таблетки» другого видання ДФУ.

Розроблено спектрофотометричну в УФ-області методику кількісного визначення бісопрололу фумарату в таблетках методом стандарту у середовищі 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої при довжини хвилі 272 нм. Методика валідована та запропонована для проведення тесту «*Розчинення*» таблеток бісопрололу фумарату різних вітчизняних виробників.

Розроблена експресна методика вибіркового спектрофотометричного визначення тимололу малеату в очних краплях «Офтан-Тимолол» за довжини хвилі 298 нм в присутності допоміжних речовин.

Здійснено кількісне визначення атенололу методом абсорбційної спектрофотометрії у видимій ділянці спектра в таблетках «Тонорма», яка заснована на реакції утворення гідроксамового похідного атенололу з солями феруму (III). Забарвлений продукт визначали за довжини хвилі 500 нм.

Проведено розробку та валідацію уніфікованої екстракційно-фотометричної методики кількісного визначення *β*-адреноблокаторів у субстанціях та у складі ГЛЗ, яка ґрунтується на утворенні йонного асоціату діючих речовин з метиловим оранжевим. При розробці методики підібрано реагент, pH середовища, екстрагент, аналітична довжина хвилі, встановлені співвідношення *β*-абдреноблокаторів з барвником і чутливість реакції.

Ключові слова: контроль якості, *β*-адреноблокатори, абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій та видимій ділянках спектра, екстракційна фотометрія, барвник, йонні асоціати, валідація, верифікація.

АННОТАЦИЯ

Вислоус О. А. Разработка и валидация методик количественного определения β-адреноблокаторов методом абсорбционной спектрофотометрии. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия. – Национальный фармацевтический университет МЗ Украины, Харьков, 2017.

Разработана методика количественного определения пропранолола гидрохлорида в таблетках «Анаприлин-Здоровье» методом абсорбционной спектрофотометрии в УФ-области в водном метаноле в соотношении 1:5 при длине волны 290 нм методом стандарта. Валидационные характеристики: полная неопределенность пробоподготовки Δ_{AS} = 0,97% ≤ 2,40%; влияние фонового поглощения 0,24% ≤ 0,77%, параметры линейности (a = 1,3 ≤ 3,85, r = 0,9999≥0,9957), результаты изучения правильности и сходимости не превышают критериев приемлемости методики, что стало основой для формирования фармакопейной статьи, которая вошла во второе издание ГФУ (ГФУ 2.0, Т. 3, стр. 643).

Проведена верификация теста «*Растворение*» таблеток «Анаприлин-Здоровье» спектрофотометрическим методом при длине волны 289 нм в среде 0,1 М раствора кислоты соляной. Верификационные параметры теста «*Растворение*» линейность (Yi = 1,0063•Xi-0,23; r = 0,9994≥0,9986), сходимость и правильность не превышают критериев приемлемости критического значения погрешности (3,0%) и характеризуются качественными аналитическими показателями.

Разработана спектрофотометрическая в УФ-области методика количественного определения бисопролола фумарата в таблетках методом стандарта. Предложенную методику использовано для проведения теста «*Растворение*» таблеток бисопролола фумарата различных отечественных производителей. Количественное определение бисопролола фумарата в таблетках проводили при длине волны 272 нм методом стандарта, используя как растворитель 0,1 М раствор кислоты соляной. Испытания проводили на приборе Pharma Test-DT 70, объем среды растворения – 500 мл; скорость вращения – 75 об/мин. Установлено, что через 20 минут высвобождается не менее 75% от номинального содержания бисопролола фумарата. При установлении валидационных характеристик полученные результаты: a = 0,9762, b = 0,9931, r = 0,9999, не превышают критериев приемлемости. Проведенные сравнительные исследования профилей растворения препаратов-дженериков,

содержащих основное действующее вещество бисопролола фумарат с одинаковой концентрацией АФИ, позволили подтвердить сходство профилей растворения, что может свидетельствовать об отсутствия влияния вспомогательных веществ. Методика может быть рекомендована к применению в фармацевтическом анализе и использованию для разработки монографии действующей ГФУ.

Доказано, что вспомогательные вещества капель с тимолола малеатом влияют на интенсивность УФ-спектра действующего вещества. Разработана экспрессная спектрофотометрическая методика определения тимолола малеата в глазных каплях «Офтан-Тимолол» при длине волны 298 нм в присутствии 0,20 мл 5% раствора калия дихромата для связывания бензалкония хлорида. Установлено, что аналиты стабильны в течение 1 часа.

Впервые осуществлена модификация количественного определения атенолола методом абсорбционной спектрофотометрии в видимой области в таблетках «Тонорма», основанная на реакции образования гидроксамового производного атенолола с солями железа (III). Окрашенный продукт определяли при длине волны 500 нм.

При разработке спектрофотометрической в видимой области методики установлена время проведения реакции (90 мин) образования производного гидроксамовой кислоты, подобранный температурный режим (60°С) и аналитическая длина волны при 500 нм. Установлено подчиняемость стандартных растворов атенолола в этих условиях закону Бугера-Ламберта-Бера (от 0,01% до 0,005%), МВ = 1,04; МКВ = 7,32. По разработанной методике проведено количественное определение атенолола в таблетках «Тонорма». Доказано, что другие компоненты ЛС (нифедипин и хлорталидон) в этих условиях не вступают в реакцию.

Проведена разработка и валидация унифицированной экстракционно-фотометрической методики количественного определения β-адреноблокаторов в субстанциях и в составе готовых лекарственных средств. Методика основывается на образовании ионного ассоциата действующих веществ с метиловым оранжевым. При разработке методики подобраны краситель, pH среды, экстрагент, аналитическая длина волны, установлены соотношения β-абдреноблокаторов с индикатором и чувствительность реакции.

Установлены коэффициенты стехиометрических соотношений «лекарственное вещество – реагент» полуэмпирическим методом PM3 с использованием алгоритма Полака-Рибера и ПМР-спектроскопией. Ионные ассоциаты образуются в мольном соотношении атенолола, бисопролола фумарата, тимолола малеата, пропранолола гидрохлорида, бетаксолола гидрохлорида, соталола гидрохлорида, метопролола тартрата, карведилола с метиловым оранжевым 1:1. С помощью УФ- и ИК-спектроскопии установлено, что в результате взаимодействия исследуемых веществ с метиловым оранжевым образуются солеподобные продукты, которые имеют характер ионных ассоциатов.

Методика апробирована на субстанциях и готовых лекарственных средствах. Валидационные характеристики экстракционно-фотометрической методики: специфичность, робастность, линейность, правильность, прецизионность, соответствуют требованиям Государственной Фармакопеи Украины и метод может применяться для количественного определения лекарственных средств.

Ключевые слова: методы контроля качества, *β*-адреноблокаторы, абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой области, экстракционная фотометрия, реагенты, ионные ассоциаты, валидация, верификация.

SUMMARY

Vislous OO Development and validation of methods for quantification of β-blockers вy absorption spectrophotometry. – Manuscript.

The thesis for Candidate Degree in Pharmacy, Speciality 15.00.02 – Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy. – National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2017.

The dissertation is devoted to the improvement of quality control of finished medicinal products containing *β*-adrenoblockers of selective, nonselective and combined action by means of verification and / or validation of techniques that experimentally prove their suitability for solving their tasks.

The spectrophotometric method of quantitative determination of propranolol hydrochloride was developed and validated, the method of the "Dissolution" test, which was included in the monograph "Propranolol Tablets" of the second edition of the SPF, was verified.

The spectrophotometric method for the quantitative determination of bisoprolol fumarate in tablets using the standard method in a medium of a 0.1 M solution of hydrochloric acid at a wavelength of 272 nm was developed in the UV-region. The method is validated and proposed for the "Dissolution" test of bisoprolol fumarate tablets of various domestic manufacturers.

An express method for the selective spectrophotometric determination of timolol maleate in eye drops "Oftan-Timolol" for a wavelength of 298 nm in the presence of auxiliary substances was developed.

The quantitative determination of atenolol by absorption spectrophotometry in the visible spectrum region in tablets of "Tonorm" is carried out, which is based on the reaction of the formation of hydroxamic derivative atenolol with ferum (III) salts. The colored product was determined at a wavelength of 500 nm in the concentration of the active substance 0.1 – 0.05 g / ml.

The development and validation of a unified extraction-photometric method for quantitative determination of β-adrenoblockers in sub-tensions and in the composition of the HPL, which is based on the formation of the ionic associate of active substances with methyl orange, is developed and validated. During the development of the method, reagent, pH medium, extractant, analytical wavelength, correlation of β-abdrenoblockers with the dye and reaction sensitivity were selected.

Key words: quality control, *β*-adrenoblockers, absorption spectrophotometry in ultraviolet and visible spectral regions, photometric extractions, dye, ion associate, validation, verification.

Підписано до друку 23.08. 2017. Формат 60х84/16.
Папір офсетний. Гарнітура Times New Roman. Друк цифровий.
Ум. друк. арк. 0,9. Наклад 100 пр. Зам. № б/н.
Надруковано СПД ФО Степанов В. В., м. Харків, вул. Ак. Павлова, 311