

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

Доброва Анна Олегівна

УДК: 615.281:615.015.2:542.87

ДИСЕРТАЦІЯ

**Дослідження хімічної взаємодії та розробка методик контролю якості
лікарських препаратів з доксицикліном та амоксициліном**

226 «Фармація, промислова фармація»

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

А.О. Доброва

Науковий керівник: Георгіянц Вікторія Акопівна, доктор фармацевтичних
наук, професор

Харків – 2021

АНОТАЦІЯ

Доброва А. О. Дослідження хімічної взаємодії та розробка методик контролю якості лікарських препаратів з доксицикліном та амоксициліном. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація». – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2021.

У дисертаційній роботі висвітлено питання хімічної взаємодії доксицикліну та амоксициліну із солями металів, що входять до складу мінеральних, столових вод та антацидів, розробки методик контролю якості доксицикліну, а також амоксициліну у його комбінованих лікарських формах із клавулановою кислотою.

Із постійним розширенням фармацевтичного ринку зростає кількість лікарських засобів, відповідно ще більшої актуальності набуває питання поліпрагмазії. Одночасний прийом декількох лікарських засобів може викликати зниження ефективності, побічні реакції чи неочікувані ефекти. Саме тому вивчення лікарських взаємодій є важливим. Такі дослідження можна виконувати як *in vivo*, так і *in vitro*. З іншого боку, результати хімічних та/або фізико-хімічних експериментів (*in vitro*) дозволяють оцінювати доцільність *in vivo* дослідження, коли вони є вкрай необхідними, а коли ними можна знехтувати.

Катіони кальцію, магнію, алюмінію містяться в антацидних лікарських засобах, дієтичних добавках, входять до складу харчових продуктів та напоїв. Відомо, що доксициклін здатен утворювати комплекси метал-ліганд. Однак наявні дані довели, що структура комплексів, їхні властивості залежать від умов, у яких вони утворюються. Тому в нашому дослідженні було використано доксициклін, як модельну молекулу для вивчення процесів комплексоутворення із катіонами кальцію, магнію, заліза та алюмінію в заданих фіксованих умовах із подальшим перенесенням методик аналізу на молекулу амоксициліну.

У *першому* розділі здійснено аналіз наукових джерел щодо проблем взаємодії антибактеріальних лікарських засобів з іншими ЛЗ, іонами металів, їжею та напоями. У ході систематичного пошуку визначено й узагальнено дані щодо можливостей та особливостей застосування фізико-хімічних методів для дослідження питання взаємодії лікарських засобів з іонами металів.

У *другому* розділі обґрунтовано використані в дослідженні об'єкти та методи. У роботі використано сучасні хімічні та фізико-хімічні методи аналізу, з-поміж яких: спектрофотометрія у видимій та ультрафіолетовій областях (УФ), тест розчинення, електроімпедансна спектроскопія (ЕІС), тонкошарова хроматографія (ТШХ), високоефективна тонкошарова хроматографія (ВЕТШХ), високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), ультраефективна рідинна хроматографія (УЕРХ).

У *третьому* розділі висвітлено результати дослідження комплексоутворення доксицикліну та амоксициліну із солями металів методами спектрофотометрії в ультрафіолетовій та видимій областях спектра. Спектрофотометричне дослідження передбачало використання двох підходів – метод Джоба та метод стехіометричних співвідношень, що показали себе дієвими для аналізу сполук метал-ліганд. У рамках умов проведеного експерименту було визначено, що амоксицилін утворює комплексну сполуку із солями магнію у стехіометричному співвідношенні 1:1 у середовищі 0,1 М кислоти хлористоводневої.

Уперше для капсул доксицикліну й таблеток амоксициліну було проведено моделювання їх одночасного прийому із мінеральними/столовими водами та виявлено в тесті розчинення *in vitro* вплив катіонного складу досліджуваних вод на розчинення і вивільнення діючої речовини. Для експерименту було обрано мінеральні та столові води, наявні у вільному доступі на ринку України, що містять найбільшу кількість катіонів лужноземельних металів. У відібраних зразках мінеральних/столових вод за допомогою потенціометричного титрування та з використанням рідинної хроматографії попередньо було визначено їхній точний катіонний склад.

У результаті експерименту виявлено взаємодію доксицикліну із мінеральними водами «Боржомі», «Єсентуки-17», «Трускавецька», «Карпатська джерельна» та газованим безалкогольним напоєм «Спрайт» у середовищі 0,1 М кислоти хлористоводневої. Розрахунок факторів подібності досліджуваних зразків показав, що профілі розчинення капсул доксицикліну у середовищі 0,1 М HCl із додаванням усіх вищезазначених зразків мінеральних/столових вод та напою не є подібними, у порівнянні із контрольним зразком. На практиці це означає, що одночасний прийом доксицикліну та вищезазначених мінеральних вод та напоїв є неприпустимим, оскільки може вплинути на ефективність лікарського засобу.

Моделювання одночасного прийому амоксициліну та мінеральних/столових вод показало, що у середовищі кислоти хлористоводневої із додаванням порції усіх досліджуваних зразків спостерігається значне зниження концентрації вивільненого з таблеток амоксициліну, у порівнянні із контрольним зразком. Концентрація амоксициліну при додаванні мінеральної води «Трускавецька» також знижується, проте в меншій мірі.

Четвертий розділ містить результати моделювання взаємодії доксицикліну з солями кальцію, магнію, заліза(III) та алюмінію в середовищі води очищеної з подальшим аналізом зразків методом електроімпедансної спектроскопії (EIC). Дієву модель було розроблено на прикладі вже відомого комплексоутворення доксицикліну з Fe^{3+} , яка дозволила провести як якісне, так і кількісне оцінювання зазначеного процесу. Утворення комплексів спостерігається на змінах кривих Найквіста та Бода. Використання методу дозволило виявити стехіометричне співвідношення, у якому відбувається взаємодія, тобто ймовірну будову комплексних сполук доксицикліну із солями кальцію, магнію, заліза(III) та алюмінію. Результати засвідчили, що за співвідношення концентрацій 1:1 відбувається комплексоутворення ліганду та досліджуваних іонів. На основі значень молярної провідності було розраховано константи стабільності утворених комплексних сполук. Це дозволило кількісно оцінити утворення комплексів. Розраховані константи стабільності утворення комплексів розташовані в такому порядку: Al^{3+} (2,65) > Mg^{2+} (2,43) > Ca^{2+} (1,9).

Розроблену модель дослідження було застосовано і для вивчення комплексів амоксициліну. У результаті проведення експериментального дослідження взаємодії амоксициліну із зазначеними солями методом електроімпедансної спектроскопії було виявлено, що за співвідношення концентрацій 1:1 відбувається стійке утворення комплексу метал-ліганд із Mg^{2+} , Ca^{2+} та Al^{3+} , що підтверджується якісним аналізом і кількісними оцінками за допомогою констант стабільності.

Розраховані константи утворення комплексів амоксициліну засвідчують, що найбільш стійкі комплекси утворюються з солями заліза (3,57). Цей показник майже дорівнював відповідному показнику для алюмінію (3,48). Константи стабільності комплексів амоксициліну з солями магнію та кальцію дорівнювали 2,67 і 2,38 відповідно.

Згідно з даними літературних джерел, надто низькі значення констант стабільності (від негативних до 1) свідчать про те, що комплекс метал-ліганд не тільки розчиняється у воді, але й легко дисоціює на іон металу та ліганд. Отже, усі досліджувані комплексні сполуки демонструють доволі високу стабільність.

У *п'ятому* розділі проведено верифікацію методик для одночасної ідентифікації, кількісного визначення, визначення компонентів, визначення вмісту домішок та проведення тесту розчинення комбінованих таблеток амоксициліну та клавуланової кислоти, рекомендованих Британською фармакопеею. Верифіковані методики було перенесено в умови ультраефективної хроматографії для підвищення ефективності процесу аналізу. Для оптимізації методик до параметрів хроматографування було внесено деякі зміни. Модифіковані методики були валідовані. За результатами валідації вони відповідали всім відповідним критеріям: специфічність, лінійність, правильність, прецизійність, стабільність. Окрім того, було розраховано межі виявлення та кількісного визначення. УЕРХ-метод кількісного визначення дозволив зменшити тривалість аналізу з 15 хв до 7,5 хв. Для зіставлення ВЕРХ та УЕРХ-методів кількісного визначення комбінованих таблеток амоксициліну та клавуланової кислоти

було здійснено порівняльне оцінювання на відповідність принципам «зеленої» хімії та статистичне оцінювання результатів визначення. З погляду екологічності, впливу на навколишнє середовище та персонал обидва методи є екологічні та безпечні. Статистичне оцінювання обох методів за допомогою регресійного методу Пассінга-Баблока довело відповідність отриманих результатів, тому ці методи можуть бути рекомендовані для аналізу комбінованих таблеток амоксициліну та клавуланової кислоти.

Ключові слова: доксициклін, амоксицилін, клавуланова кислота, лікарські взаємодії, комплекси металів, електроімпедансна спектроскопія

Список публікацій здобувача:

1. Добрава А. О., Матерієнко А. С., Головченко О. С., Георгіянц В. А. Біофармацевтичне дослідження взаємодії доксицикліну з мінеральними водами та напоями «*in vitro*». *Клінічна фармація*. 2017. № 3. С. 55-62. (Особистий внесок – виконання експериментальних досліджень, оброблення та аналіз результатів, участь у написанні статті).
2. Dobrova A., Golovchenko O., Georgiyants V. Verification of dissolution test for doxycycline hyclate in capsules to implement into the pharmacopoeial monograph. «*ScienceRise: Pharmaceutical Science*». 2018. № 1 (11). P. 16–20. (Особистий внесок – планування та проведення експериментальної частини, оброблення результатів, участь у написанні статті).
3. Добрава А. О., Попов О. С., Зупанець І. А., Георгіянц В. А. Аналіз сучасних підходів до попередження антимікробної резистентності: роль і місце фізико-хімічних методів досліджень *in vitro* та оцінки біоеквівалентності. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*. № 3(59). 2019. С. 16-24. (Особистий внесок – аналіз літературних джерел, оформлення матеріалів)
4. Dobrova A. O., Golovchenko O. S., Georgiyants V. A. Modelling and investigation of amoxicillin chemical interaction with mineral waters containing

- a significant amount of calcium and magnesium salts. *Pharmacia*. 2021. 68(1). P. 101-107. **(Scopus)** (Особистий внесок – планування та проведення експериментальної частини, оброблення та аналіз результатів, оформлення матеріалів)
5. Dobrova A., Golovchenko O., Bezruk I., Ivanauskas L., Georgiyants V. Simultaneous determination of amoxicillin and potassium clavulanate in combined medicinal forms: procedure transfer from HPLC to UPLC. *Ces.slov.Farm*. 69 (4), 2020. P. 186-193. **(Scopus)** (Особистий внесок – планування експерименту, участь у проведенні експериментальної частини, оформлення та підготовка статті до друку)
 6. Dobrova A., Antonenko Y., Golovchenko O., Harna N., Garna S., Georgiyants V. Development of the method for estimating complex formation using the electrochemical impedance spectroscopy on the example of the doxycycline and iron (III) interaction. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2021. № 1 (29). P. 31-38. **(Scopus)** (Особистий внесок – участь у плануванні експерименту, підготовка досліджуваних зразків, оброблення результатів, участь в оформленні статті до друку)
 7. Доброва А. О. Безрук І. В., Георгіянц В. А, Іванаускас Л., Головченко О. С. Спосіб визначення калію клавуланату та амоксициліну в складі комбінованих лікарських форм: пат. на корисну модель № 142575 Україна № u202000686; заявл. 05.02.2020; опубл. 10.06.2020, Бюл. № 11. (Особистий внесок – участь у патентному пошуку, планування та проведення експериментальної частини, оформлення матеріалів)
 8. Dobrova A., Golovchenko O., Georgiyants V. Study of doxycycline interaction with some mineral waters and drinks. «*ChemCYS 2018*» *Chemistry Conference for Young Scientists: Book of Abstracts* (February 21-23). Blankenberge, Belgium, 2018. P. 87.
 9. Dobrova A., Golovchenko O., Georgiyants V. Applying the comparative kinetics “Dissolution” test for studying possible doxycycline interaction. *The 8th International Conference on Pharmaceutical Sciences and Pharmacy Practice*

- dedicated to the 80th anniversary of the Museum of History of Lithuanian Medicine and Pharmacy: Book of Abstracts.* Kaunas, Lithuania, 2017. P. 59-60.
10. Добрава А. О. Головченко О. С., Георгиянц В. А., Саидов Н. Б. Перспективы изучения взаимодействия амоксициллина и клавулановой кислоты с солями металлов для обеспечения качественной терапевтической помощи. "Наука и инновация". Душанбе: «Сино». 2017. № 3. С. 39-40.
 11. Добрава А. О., Головченко О. С., Георгиянц В. А. Риск взаимодействия антибиотиков с компонентами минеральных вод. *Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике*: сб. мат. VI науч.-практ. конф. с междунар. участием. Алматы, 2017. С. 68-69.
 12. Dobrova A. O. Golovchenko O. S., Georgiyants V. A. Amoxycillin and metal salts interaction study by UV- spectrophotometry methods. *Topical issues of new medicines development*: матеріали XXVI Міжнародної науково-практичної конференції молодих учених та студентів (10-12 квіт. 2019 р., м. Харків). Харків: НФаУ, 2019. С.66.
 13. Bondareva A. Yu., Dobrova A. O., Golovchenko O. S., Georgiyants V. A. Modeling of dissolution kinetics of antibiotics with mineral waters. *Topical issues of new drugs development*: Abstracts of XXV International Scientific And Practical Conference of Young Scientists and Student (Kharkiv, April 18-20, 2018). Kharkiv: NUPh, 2018. P. 86-87.
 14. Добрава А. О., Георгіянц В. А. Хімічне обґрунтування раціонального прийому препаратів амоксициліну. *BIMCO 2018*: Збірник матеріалів Буковинського міжнародного медико-фармацевтичного конгресу студентів і молодих учених. БДМУ, Чернівці, 2018. С. 420.
 15. Dobrova A., Golovchenko O., Georgiyants V. Experimental study of rational drug use. 34th Congress and international scientific-practical conference of the Lithuanian pharmaceutical association (19th of October). Book of abstracts. Vilnius, Lithuania. 2019. P. 12.
 16. Добрава А. О., Антоненко Є. О., Георгіянц В. А. Перспективи використання імпедансної спектроскопії для дослідження взаємодії лікарських

засобів із солями металів. *Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку* : матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України, м. Харків, 19-20 вересня 2019 р. : у 2 т. редкол. : А. А. Котвіцька та ін. Харків : НФаУ, 2019. Т. 1. С. 361-362.

17. Доброва А. О., Головченко О. С., Георгіянц В. А. Перспективи методики ультра-високоєфективної рідинної хроматографії для кількісного визначення таблеток амоксициліну клавуланату. *Збірка тез всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання сучасної медицини і фармації»* (до 50-річчя заснування ЗДМУ) (18-25 квітня, 30 травня 2018 р.). Запоріжжя, 2018. С. 150.
18. Dobrova A. O. Bezruk I. V., Georgiyants V. A., Ivanauskas L. Optimization of HPLC conditions for analysis of cations and anions in mineral waters for medicines interaction studies. *Управління якістю в фармації* : матеріали XIII наук.-практ. конф., м. Харків, 17 трав. 2019 р. X. : НФаУ, 2019. С. 47.
19. Доброва А. О., Головченко О. С., Безрук І. В., Іванаускас Л., Георгіянц В. А. Верифікація тесту розчинення таблеток амоксициліну та клавуланової кислоти. *Управління якістю в фармації* : матеріали XIV наук.-практ. конф., м. Харків, 22 трав. 2020 р. X. : НФаУ, 2020. С. 43.
20. Доброва А. О., Безрук І. В., Георгіянц В. А., Іванаускас Л. Реалізація методики тонкошарової хроматографії в умовах високоєфективної тонкошарової хроматографії для аналізу таблеток амоксициліну з клавуланатом. *Матеріали науково-практичної конференції «Сучасні проблеми фармакології, косметології та аромології»* (4 жовтня 2019 р., м. Одеса). 2019. с. 71.

ABSTRACT

Dobrova A. O. Chemical interaction study and development of methods for quality control of doxycycline and amoxicillin medicines

Thesis for a Ph. D. degree in specialty 226 “Pharmacy, industrial pharmacy”.
– National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv 2021

The dissertation work is devoted to the study of the chemical interaction of doxycycline and amoxicillin with metal salts that are part of mineral/drinking waters and antacids, the development of methods for quality control of doxycycline and amoxicillin in its combined dosage forms with clavulanic acid.

With the constant growth of the pharmaceutical market, the number of medicinal products is growing, respectively; the issue of polypharmacy becomes even more relevant. Taking several medicines at the same time may reduce the effectiveness, cause side effects or adverse reactions. That is why the study of drug-drug interactions are highly important. They can be performed by both *in vivo* and *in vitro*. On the other hand, using the results of chemical and / or physicochemical experiments (*in vitro*), it is possible to assess when *in vivo* studies are necessary to fully define the drug interaction profile and when they can be waived.

Cations of calcium, magnesium, aluminum are contained in antacid drugs, dietary supplements, are part of food and beverages. It is known that doxycycline is able to form metal-ligand complexes. However, the available data have shown that the structure of complexes, their properties depend on the conditions in which they are formed. Therefore, doxycycline was used in this study as a model molecule to study the processes of complexation with cations of calcium, magnesium, iron and aluminum under given fixed conditions with subsequent transfer of analysis methods and procedures to the amoxicillin molecule.

The first chapter analyzes scientific sources on the problems of interaction of antibacterial drugs with other drugs, metal ions, food and beverages. In the course of a systematic search, data on the possibilities and features of the application of physicochemical methods to study the interaction of drugs with metal ions were found and generalized.

The second chapter substantiates the objects and methods used in the study. Modern chemical and physicochemical methods of analysis are used in the work: spectrophotometry in the visible and ultraviolet region (UV-vis), dissolution test, electroimpedance spectroscopy (EIS), thin layer chromatography (TLC), high performance thin layer chromatography (HPTLC), high performance liquid chromatography (HPLC), ultra-performance liquid chromatography (UPLC).

The third chapter is devoted to the study of the complexation of doxycycline and amoxicillin with metal salts by UV-vis spectrophotometry. Spectrophotometric analysis included two methods that proved effective for the analysis of metal-ligand compounds – the Job method and the method of stoichiometric ratios. Under the conditions of the experiment, it was found that amoxicillin forms a complex compound with the magnesium salts in a stoichiometric ratio of 1:1 in a medium of 0.1 M hydrochloric acid.

For the first time, doxycycline capsules and amoxicillin tablets were simulated concomitantly with mineral waters and the effect of the cationic composition of mineral waters on the dissolution and release of the active substance in the in vitro dissolution test was established. For the experiment, mineral/drinking waters available in free access on the market of Ukraine, containing the largest number of alkaline earth metal cations, were selected. In the selected samples of mineral/drinking waters, the exact cationic composition was previously determined by potentiometric titration, as well as using liquid chromatography.

As a result of the experiment, the interaction of doxycycline with “Borjomi”, “Yessentuki-17”, “Truskavetska”, “Karpatska dzherelna” and “Sprite” carbonated soft drink in 0.1 M hydrochloric acid was established. The calculation of the similarity factors of the studied samples showed that the dissolution profiles of doxycycline capsules in 0.1 M HCl medium with the addition of all the above samples of mineral /drinking waters and beverage are not similar compared to the control sample. In practice, this means that the simultaneous use of doxycycline and the above mentioned drinks is unacceptable, as it may affect the effectiveness of the drug.

Modeling of simultaneous administration of amoxicillin and mineral / drinking water showed that in 0.1 M hydrochloric acid with the addition of a portion of

all test samples there is a significant decrease in the concentration of amoxicillin released from the tablets, compared with the control sample. The concentration of amoxicillin with the addition of mineral water "Truskavetska" also decreases, but to a lesser extent.

The fourth chapter contains modeling of the interaction of doxycycline with calcium, magnesium, iron(III) and aluminum ions in purified water medium with subsequent analysis of samples by electroimpedance spectroscopy (EIS). The effective model was developed on the example of the already known complexation of doxycycline with Fe^{3+} , which allowed both quantitative and qualitative assessment of this process. The formation of complexes is observed on the changes of the Nyquist and Bod curves. The use of the method allowed establishing the stoichiometric ratio in which the interaction takes place, i.e. the probable structure of complex compounds of doxycycline with salts of calcium, magnesium, iron(III) and aluminum. The results showed that at a concentration ratio of 1: 1 there is a complexation of the ligand and the studied ions. Based on the values of molar conductivity, the stability constants of the formed complex compounds were calculated. This allowed us to assess formation of complexes. The calculated stability constants of complex formation are arranged in the following order: Al^{3+} (2.65) > Mg^{2+} (2.43) > Ca^{2+} (1.9).

The developed research model was transferred and used to study amoxicillin complexes. As a result of an experimental study of the interaction of amoxicillin with these ions by electroimpedance spectroscopy, it was found that at a concentration ratio of 1: 1 there is a stable formation of a metal-ligand complex with Mg^{2+} , Ca^{2+} and Al^{3+} , which is confirmed by qualitative analysis and quantitatively by calculation the stability constant.

The calculated stability constants of amoxicillin complexes show that the most stable complexes are formed with iron ions (3.57). This value was almost equal to the corresponding value for aluminum (3.48). The stability constants of amoxicillin complexes with magnesium and calcium ions were 2.67 and 2.38, respectively.

According to the literature data, available, too low values of stability constants (from negative to 1) indicate that the metal-ligand complex not only dissolves in

water, but also easily dissociates into metal ions and ligands. Thus, all the studied complex compounds show a high stability.

In the fifth chapter, verification of methods for simultaneous identification, quantification, determination of impurities and testing of dissolution of combined tablets of amoxicillin and clavulanic acid recommended by the British Pharmacopoeia was performed. Verified techniques were transferred to the conditions of ultra-performance chromatography to increase the efficiency of the analysis process. To optimize the methods, some changes were made to the chromatography parameters. The methods were validated and met all relevant criteria: specificity, linearity, accuracy, precision, stability, and the limits of detection and quantification were calculated. UPLC method of assay allowed to reduce the duration of the analysis from 15 minutes up to 7.5 minutes. To compare HPLC and UPLC methods for the assay of combined tablets of amoxicillin and clavulanic acid, a comparative assessment of compliance with the principles of "green" chemistry and statistical evaluation of the results of the determination were performed. In terms of environmental friendliness, environmental impact and personnel, both methods are eco-friendly and safe. Statistical evaluation of both methods using the Passing-Bablok regression method showed consistency of the results obtained in both methods, so they can be recommended for analysis of combined tablets of amoxicillin and clavulanic acid.

Keywords: doxycycline, amoxicillin, clavulanic acid, drugs interaction, metal-complexes, electroimpedance spectroscopy

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	17
ВСТУП.....	18
РОЗДІЛ 1 ДОКСИЦИКЛІН ТА АМОКСИЦИЛІН: ЗАСТОСУВАННЯ	
У МЕДИЧНІЙ ПРАКТИЦІ, КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ, ДОСЛІДЖЕННЯ	
ВЗАЄМОДІЙ ТА ЇХ МЕТОДИ (огляд літератури)	26
1.1 Застосування у медичній практиці доксицикліну та амоксициліну	26
1.2 Доксициклін та амоксицилін: хімічні та фізико-хімічні властивості,	
методи синтезу та аналізу	28
1.2.1 Доксициклін: хімічні та фізико-хімічні властивості, методи синтезу	
та аналізу	28
1.2.2 Амоксицилін: хімічні та фізико-хімічні властивості, методи синтезу	
та аналізу	33
1.3 Взаємодія антибіотиків із солями металів, що входять до складу лікарських	
засобів, компонентів їжі та напоїв	38
1.3.1 Аналіз літературних джерел щодо взаємодії доксицикліну	
та амоксициліну із солями металів, лікарськими засобами	
та компонентами харчових продуктів	38
1.3.2 Хімічні та фізико-хімічні методи дослідження взаємодій	41
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 1	43
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	44
2.1 Об'єкти дослідження	44
2.2 Матеріали дослідження	45
2.3 Загальні методи аналізу	46
2.3.1 Абсорбційна УФ-спектрофотометрія.....	46
2.3.2 ВЕРХ та УЕРХ-дослідження.....	46
2.3.3 Модифікований тест розчинення	46
2.3.4 Електроімпедансна спектроскопія	47
2.4 Характеристика методів дослідження.....	47
РОЗДІЛ 3 ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ ДОКСИЦИКЛІНУ	
ТА АМОКСИЦИЛІНУ ІЗ СОЛЯМИ МЕТАЛІВ ЗА ДОПОМОГОЮ	
УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОГО МЕТОДУ	63
3.1 Можливості використання методу УФ-спектрофотометрії для визначення	
взаємодій.....	64
3.1.1 Застосування методу УФ-спектрофотометрії для визначення взаємодії	
доксицикліну.....	64
3.1.2 Попереднє дослідження взаємодії амоксициліну із солями металів	66

3.2 Дослідження взаємодії амоксициліну із солями металів методом УФ-спектрофотометрії	68
3.2.1 Метод стехіометричних співвідношень.....	68
3.2.2 Метод Джоба	70
3.3 Верифікація тесту розчинення для капсул доксицикліну хіклату	72
3.4 Визначення вмісту катіонів кальцію та магнію у відібраних зразках мінеральних/столових вод.....	77
3.4.1 Визначення вмісту катіонів кальцію та магнію в мінеральних/столових водах методом комплексонометричного титрування	77
3.4.2 Визначення вмісту катіонів кальцію та магнію в мінеральних/столових водах УЕРХ-методом	81
3.5 Моделювання та вивчення впливу мінеральних/столових вод на кінетику розчинення твердих дозованих лікарських форм доксицикліну та амоксициліну <i>in vitro</i>	83
3.5.1 Моделювання та вивчення впливу мінеральних/столових вод на кінетику розчинення капсул доксицикліну <i>in vitro</i>	83
3.5.2 Моделювання впливу мінеральних/столових вод на розчинення таблеток амоксициліну <i>in vitro</i>	86
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3	90
РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ УТВОРЕННЯ КОМПЛЕКСІВ МЕТАЛІВ ТА ДОСЛІДЖУВАНИХ АНТИБІОТИКІВ МЕТОДОМ ЕЛЕКТРОХІМІЧНОЇ ІМПЕДАНСНОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ	
4.1 Розробка методики оцінювання комплексоутворення за допомогою методу електрохімічної імпедансної спектроскопії на прикладі взаємодії доксицикліну та Fe^{3+}	91
4.2 Дослідження процесів взаємодії доксицикліну та солей магнію, кальцію та алюмінію за допомогою ЕІС-методу	102
4.3 Дослідження процесів взаємодії амоксициліну та солей магнію, кальцію, алюмінію та заліза(III) за допомогою ЕІС-методу	108
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 4	119
РОЗДІЛ 5 ВЕРИФІКАЦІЯ МЕТОДІВ АНАЛІЗУ КОМБІНОВАНИХ ТАБЛЕТОК АМОКСИЦИЛІНУ ТА КАЛІЮ КЛАВУЛАНАТУ З ПОДАЛЬШИМ ЇХ ПЕРЕНЕСЕННЯМ НА ВЕТІХ ТА УЕРХ – МЕТОДИ	
5.1 Ідентифікація комбінованих таблеток амоксициліну та калію клавуланату	120
5.1.1 Верифікація ТШХ-методу	120

	16
5.1.2 Перенесення умов ТШХ-методу на ВЕТШХ-пластину	123
5.2 Кількісне визначення амоксициліну тригідрату та калію клавуланату.....	125
5.2.1 Верифікація ВЕРХ-методу	125
5.2.2 Трансфер умов ВЕРХ-методу на УЕРХ-колонку	136
5.2.3 Порівняння ВЕРХ та УЕРХ-методів	146
5.2.3.1 Розрахування оцінки впливу аналітичних методів на навколишнє середовище	146
5.2.3.2 Статистичне оцінювання результатів, отриманих ВЕРХ та УЕРХ-методами.....	148
5.3 Верифікація методу для проведення тесту «Розчинення» для таблеток амоксициліну з клавуланатом.....	151
5.4 Визначення вмісту домішок у комбінованих таблетках амоксициліну та клавуланової кислоти.....	159
5.4.1 Верифікація ВЕРХ-методу	160
5.4.2 Трансфер умов аналізу на УЕРХ-метод.....	173
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 5	182
ВИСНОВКИ	183
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	186
ДОДАТКИ	203

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФІ	активний фармацевтичний інгредієнт
БФ	Британська фармакопея
ВООЗ	Всесвітня організація охорони здоров'я
ДФУ	Державна фармакопея України
ВЕРХ	високоефективна рідинна хроматографія
ВЕТШХ	високоефективна тонкошарова хроматографія
ЛЗ	лікарський засіб
ЛФ	лікарська форма
ММП	матричні металопротеази
ОД	одиниця дії
РСЗ	робочий стандартний зразок
США	Сполучені Штати Америки
ТШХ	тонкошарова хроматографія
УЕРХ	ультраефективна рідинна хроматографія
УФ	ультрафіолет
ФСЗ	фармакопейний стандартний зразок
ХОЗЛ	хронічне обструктивне захворювання легень
ШКТ	шлунково-кишковий тракт
ЯМР	ядерно-магнітний резонанс
6-АПК	6-амінопеніциланова кислота

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Сучасна терапія широкого класу захворювань, зумовлених бактеріальною інфекцією, базується на обов'язковому використанні антибактеріальних лікарських засобів. Відповідно до сучасних клінічних настанов і рекомендацій доксициклін та амоксицилін і його комбінацію з клавулановою кислотою внесено до протоколів лікування таких захворювань, як бактеріальна пневмонія, гострий пієлонефрит, хелікобактер-асоційовані гастрит та виразка шлунка, аутоімунні захворювання суглобів тощо. Так, Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) у своїх рекомендаціях щодо належного забезпечення адекватної антибіотикотерапії та запобігання антибіотикорезистентності зараховує ці лікарські засоби (ЛЗ) до групи «критично важливих» антибактеріальних препаратів, що їх використовують у терапії широкого кола захворювань, на які страждає велика кількість осіб. Досить часто доксициклін і амоксицилін призначають у комплексній фармакотерапії одночасно з препаратами, що містять залізо, алюміній, магній та кальцій, а також радять запивати мінеральними водами, що містять катіони кальцію та магнію. Попри те, що про утворення хелатних комплексів антибактеріальних ЛЗ групи тетрациклінів із катіонами різноманітних металів відомо достатньо давно, наявні в літературних джерелах дані є суперечливими. Так, часто дані екстраполюють результати досліджень одного з ЛЗ групи тетрациклінових на всі інші в групі, тоді як існують дослідження, які доводять, що доксициклін, на відміну від інших тетрациклінових, не вступає у реакції взаємодії із катіонами кальцію, магнію тощо. До того ж різні експериментальні дослідження було проведено в різних середовищах, що не дозволяє робити узагальнювальні висновки.

Відкритим також залишається питання взаємодії амоксициліну із зазначеними солями металів під час сумісного застосування. Цей ЛЗ входить до етіотропної терапії хелікобактер-асоційованих захворювань шлунково-кишкового тракту (ШКТ), тому частота одночасного застосування з препаратами, склад

яких містить солі цих металів, є достатньо високою. Дослідження щодо його можливої взаємодії із зазначеними лужноземельними металами та з солями заліза під час сумісного прийому відсутні, тоді як для азитроміцину – аналогічного за будовою ЛЗ – такі дослідження описано. Амоксицилін містить гідрокси- та карбоксильну групу, що потенційно здатні вступати у реакції комплексоутворення. Окрім того, наявні дані щодо направленого синтезу комплексів амоксициліну із деякими катіонами металів, зокрема заліза(III), заліза(II), цинку, кобальту та інших. Тому питання можливості утворення комплексів з амоксициліном в умовах організму людини під час одночасного прийому інших ЛЗ, харчових продуктів та напоїв, що містять солі металів, є актуальним.

Дослідження взаємодії доксицикліну та амоксициліну з солями заліза, алюмінію, магнію та кальцію потребує використання належних аналітичних методик. Тому актуальним питанням є розробка нових аналітичних методик та вдосконалення тих, якими послуговуються нині, задля якісного та кількісного визначення комплексоутворення між цими ЛЗ, солями вищезазначених металів, а також мінеральними/столовими водами, що містять катіони кальцію та магнію. Крім того, у Державній фармакопеї України (ДФУ), на момент планування дисертаційної роботи були відсутні методики для проведення тесту розчинення *in vitro* капсул доксицикліну, а також монографії щодо контролю якості комбінованої лікарської форми (ЛФ) амоксициліну та клавуланової кислоти в таблетках, що було додатковим чинником для проведення досліджень з розробки, валідації та верифікації методик контролю якості зазначених ЛЗ.

Отже, усе вищевикладене зумовило актуальність теми, мету, завдання, структуру та логічну побудову дисертаційної роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційну роботу виконано відповідно до плану проблемної комісії «Фармація» МОЗ та АМН України і плану наукових досліджень Національного фармацевтичного університету в рамках комплексної теми «Розробка та валідація методів контролю якості лікарських засобів аптечного та промислового виробництва» (номер державної реєстрації 0114U000949).

Мета і завдання дослідження

Метою дисертаційної роботи було дослідження взаємодії доксицикліну хіклату та амоксициліну з солями заліза(II), заліза(III), алюмінію, магнію та кальцію, з мінеральними/столовими водами, до складу яких входять солі цих металів, а також розробка, валідація, верифікація нових та удосконалення наявних методик аналізу.

Для реалізації визначеної мети необхідно було розв'язати *такі завдання*:

- провести систематичний пошук наукових джерел, проаналізувати та узагальнити дані щодо проблем взаємодії антибактеріальних лікарських засобів з іонами металів, розглянути застосування фізико-хімічних методів аналізу, що їх використовують у таких дослідженнях;

- дослідити взаємодію доксицикліну із солями металів методами УФ-спектрофотометрії, зокрема методами стехіометричних співвідношень та ізомольарних серій Джоба;

- провести верифікацію тесту розчинення для капсул доксицикліну хіклату, наведену у Фармакопеї США, на зразках лікарських засобів українських виробників;

- здійснити моделювання *in vitro* тесту розчинення капсул доксицикліну хіклату та таблеток у присутності мінеральних/столових вод в середовищі 0,1 М кислоти хлористоводневої, що відтворює умови взаємодії в шлунку в шлунку; оцінити вплив присутності мінеральних/столових вод та солей металів на кінетику вивільнення доксицикліну із капсул та амоксициліну із таблеток у порівнянні із контрольними профілями розчинення *in vitro*;

- розробити методику оцінювання комплексоутворення з використанням методу електрохімічної імпедансної спектроскопії на прикладі взаємодії доксицикліну та Fe^{3+} та за її допомогою дослідити процеси взаємодії доксицикліну та амоксициліну з солями заліза(III), алюмінію, магнію та кальцію;

- здійснити верифікацію наведеної у монографії Британської фармакопеї (БФ) методики тонкошарової хроматографії (ТШХ) для ідентифікації комбінованих ЛЗ амоксициліну та клавуланової кислоти в таблетках і перенести умови ТШХ на високоефективну тонкошарову хроматографію (ВЕТШХ);

– провести верифікацію наведених у монографії БФ методик кількісного визначення й тесту розчинення комбінованих ЛФ амоксициліну та клавуланової кислоти в таблетках та методики визначення вмісту домішок методом вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), а також здійснити трансфер умов ВЕРХ-методик на ультраефективну рідинну хроматографію (УЕРХ); здійснити статистичне порівняння результатів методики кількісного визначення вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) та ультраефективної рідинної хроматографії (УЕРХ), а також їх порівняння за шкалою екологічності;

Об'єкт дослідження – хімічна взаємодія амоксициліну та доксицикліну хіклату з антацидами, препаратами заліза, компонентами їжі та напоями, а також контроль якості твердих дозованих лікарських форм доксицикліну, амоксициліну та комбінованих ЛФ амоксициліну з клавулановою кислотою.

Предмет дослідження – процеси взаємодії доксицикліну та амоксициліну з солями заліза(II), заліза(III), алюмінію, магнію та кальцію; методики спектрофотометричного аналізу, методики розчинення для капсул доксицикліну хіклату та таблеток амоксициліну, методика оцінювання комплексоутворення за допомогою методу електроімпедансної спектроскопії (ЕІС), методики ідентифікації та кількісного визначення діючих речовин у капсулах доксицикліну, таблетках амоксициліну, а також амоксициліну з клавулановою кислотою, трансфер методик ТШХ і ВЕРХ на ВЕТШХ і УЕРХ-техніки відповідно.

Методи дослідження. На різних етапах наукової роботи було використано: спектрофотометричні методи аналізу в ультрафіолетовій (УФ) та видимій областях спектра, метод електрохімічної імпедансної спектроскопії (ЕІС), методи ТШХ, ВЕТШХ, ВЕРХ та УЕРХ, модифікований *in vitro* тест розчинення для таблеток і метод комплексонометричного титрування. Процедура верифікації аналітичних методик проведено відповідно до вимог ДФУ. Для кількісного оцінювання результатів електроімпедансної спектроскопії (ЕІС) було використано моделювання електрохімічних процесів за допомогою еквівалентних електричних ланцюгів. Для оброблення результатів

експериментальних досліджень було використано методи статистичного аналізу відповідно до вимог ДФУ, а також непараметричні методики згідно з сучасними рекомендаціями оцінювання результатів хімічного аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів

Уперше науково обґрунтовано та експериментально доведено можливість утворення стійких хелатних комплексів солей заліза(III), алюмінію, магнію та кальцію з доксицикліном та амоксициліном у змодельованих умовах одночасного прийому.

У процесі наукового дослідження верифіковано тест розчинення для капсул доксицикліну хіклату та запропоновано його модифікацію для вивчення взаємодії доксицикліну та амоксициліну з мінеральними/столовими водами.

Уперше досліджено вплив присутності мінеральних/столових вод та солей металів на кінетику вивільнення доксицикліну із капсул та амоксициліну з таблеток проти контрольних профілів розчинення *in vitro*.

Уперше розроблено методику оцінювання комплексоутворення з використанням методу ЕІС та за її допомогою досліджено процеси взаємодії доксицикліну та амоксициліну з солями заліза(III), алюмінію, магнію та кальцію, а також визначено константи комплексоутворення.

У процесі виконання дисертаційної роботи було проведено верифікацію ТШХ-методики ідентифікації, а також кількісного визначення, тесту розчинення і методики визначення вмісту домішок для комбінованих ЛФ амоксициліну та клавуланової кислоти за допомогою методу ВЕРХ.

Уперше запропоновано трансфер ТШХ і ВЕРХ-методик ідентифікації та кількісного визначення комбінованих ЛФ амоксициліну та клавуланової кислоти на ВЕТШХ і УЕРХ-методики відповідно, проведено валідацію та доведено їх відповідність усім критеріям щодо надійності, відтворюваності та достовірності.

Новизну досліджень підтверджено патентом України на корисну модель (Доброва А. О., Безрук І. В., Георгіянц В. А., Іванаускас Л., Головченко О. С.

Спосіб визначення калію клавуланату та амоксициліну в складі комбінованих лікарських форм: пат. на корисну модель № 142575 Україна № u202000686; заявл. 05.02.2020; опубл. 10.06.2020, Бюл. № 11).

Практичне значення одержаних результатів полягає в тому, що в комплексі вони складають науково-практичне обґрунтування раціонального застосування доксицикліну та амоксициліну з мінеральними/столовими водами, а також лікарськими засобами, що містять солі заліза(III), алюмінію, магнію та кальцію.

Верифіковані методики, а саме: тест розчинення для капсул доксицикліну хіклату, хроматографічні методики ідентифікації, кількісного визначення, розчинення, визначення вмісту домішок для комбінованих ЛФ амоксициліну та клавуланової кислоти – можуть бути впроваджені в практичну діяльність вітчизняних фармацевтичних підприємств і науково-дослідних лабораторій із контролю якості лікарських засобів та внесені до ДФУ.

Розширено кількість аналітичних методик для ідентифікації та кількісного визначення комплексоутворення доксицикліну та амоксициліну з мінеральними/столовими водами, а також лікарськими засобами, що містять солі заліза(III), алюмінію, магнію та кальцію.

Основні результати дисертації апробовано та впроваджено в освітню та науково-практичну діяльність Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького, Тернопільського національного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського, Запорізького державного медичного університету, Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова, Рівненської медичної академії.

Особистий внесок здобувача

Дисертаційну роботу виконано здобувачем самостійно: автором вивчено, проаналізовано та узагальнено дані літератури з питань, що стосуються напряму дослідження, виконано експериментальну частину, проведено графічне та статистичне оброблення одержаних результатів, оформлено всі розділи наукової праці, сформульовано висновки.

Експериментальні дослідження було проведено на кафедрі фармацевтичної хімії та в Державній науково-дослідній лабораторії з контролю якості лікарських засобів НФаУ (завідувач лабораторії – кандидат фарм. наук С. М. Губарь), на базі кафедри фізичної і біомедичної електроніки та комплексних інформаційних технологій Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна у співпраці з науковим співробітником, старшим викладачем Є. О. Антоненком, а також на базі лабораторії кафедри аналітичної та токсикологічної хімії Литовського університету наук про здоров'я (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas) за консультативної підтримки завідувача кафедри аналітичної та токсикологічної хімії Людаса Іванаускаса.

Персональний внесок дисертантки у всіх працях, опублікованих зі співавторами (Є. О. Антоненком, І. В. Безруком, Н. В. Гарною, С. В. Гарною, В. А. Георгіянц, О. С. Головченко, С. М. Губарь, Л. Іванаускасом, І. А. Зупанцем, А. С. Матерієнко, О. С. Поповим, Н. Б. Саїдовим, О. В. Ткаченко), зазначено в тексті дисертації у списку фахових публікацій за кожною роботою окремо.

Апробація результатів дисертації

Основні наукові результати дослідження презентовано в доповідях на міжнародних та всеукраїнських науково-практичних конференціях: International Conference of Pharmacy Students «Be in progress» (Люблін, 21-25 квітня 2016 р.), VI науково-практичній конференції з міжнародною участю «Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике» (Алмати, 24 листопада 2017 р.), The 8th International Conference on Pharmaceutical Sciences and Pharmacy Practice (Каунас, 15 грудня 2017 р.), Chemistry Conference for Young Scientists «ChemCys 2018» (Бланкенберге, 21-23 лютого 2018 р.), 34th Congress and international scientific-practical conference of the Lithuanian pharmaceutical association (Vilnius, 19 жовтня 2019 р.), V Міжнародному медико-фармацевтичному конгресі студентів і молодих учених ВІМСО 2018 (Чернівці, 4-6 квітня 2018 р.), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні питання сучасної медицини і фармації» (до 50-річчя заснування ЗДМУ) (Запоріжжя,

18-25 квітня 2018 р.), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Сучасні проблеми фармакології, косметології та аромології» (м. Одеса, 4 жовтня 2019 р.), науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України «Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку» (Харків, 19-20 вересня 2019 р.), XI, XIII і XIV науково-практичних конференціях «Управління якістю в фармації» (Харків, 19 травня 2017, 17 травня 2019, 22 травня 2020 р.), XXIV, XXV, XXVI International Scientific And Practical Conference of Young Scientists and Student «Topical issues of new medicines development» (Харків, 20 квітня 2017, 18-20 квітня 2018, 10-12 квітня 2019 р.),

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота, викладена на 221 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, 5 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та додатків. Обсяг основного тексту дисертації – 141 сторінки друкованого тексту. Роботу ілюстровано 52 таблицями та 95 рисунками. Список використаних джерел містить 161 найменування, з яких 133 – іноземні джерела.

РОЗДІЛ 1

ДОКСИЦИКЛІН ТА АМОКСИЦИЛІН: ЗАСТОСУВАННЯ У МЕДИЧНІЙ ПРАКТИЦІ, КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ, ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЙ ТА ЇХ МЕТОДИ (огляд літератури)

1.1 Застосування у медичній практиці доксицикліну та амоксициліну

Обидва досліджувані антибіотики входять до Списку основних лікарських засобів Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) (2019) [1]. 2018 року на зустрічі міністрів охорони здоров'я G20 для моніторингу та надійного управління застосування антибіотиків було ухвалено нову класифікацію антибіотиків – AWaRE (Access, Watch and Reserve) (доступ, спостереження та резерв) [2]. Відповідно до цієї класифікації як амоксицилін, так і доксициклін належать до класу антибіотиків Access (доступ), що є активними проти широкого кола патогенних мікроорганізмів і демонструють із цим нижчий потенціал резистентності, ніж антибіотики груп Watch (спостереження) та Reserve (резерв) [3]. Антибіотики цієї групи рекомендують як емпіричні варіанти лікування першого або другого вибору в разі інфекційних синдромів, розглянутих Експертним комітетом ВООЗ.

Доксициклін використовують для лікування інфекцій дихальних шляхів, таких, як позалікарняна пневмонія, гострі загострення хронічного бронхіту, хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ) [1, 4]. Його активність проти «нетипових» бактерій, зокрема *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila* spp., *Legionella* spp. і *Coxiella burnetii*, є вкрай важливою та дозволяє застосовувати його у випадках, коли збудники захворювань дихальних шляхів набувають резистентності до інших класів антибактеріальних препаратів. Водночас показники резистентності до «типових» бактерій, таких, як *Streptococcus pneumoniae* та *Haemophilus influenzae*, є різними та варіюються в різних частинах світу від 5 до 25 % [4-7]. Отже, доксициклін має активність проти дуже широкого спектра грампозитивних, грамнегативних та «нетипових» бактерій,

а також деяких найпростіших, зокрема бактерій малярії. Його широко використовують для лікування інфекцій, що передаються статевим шляхом, інфекцій дихальних шляхів, профілактики малярії та для терапії деяких рикетсійних інфекцій, що передаються членистоногими [8].

Крім того, протягом останніх років дослідники визначили низку інших дій доксицикліну, наприклад, загоєння ран, лікування акне тощо [9-11]. Відомо, що він інгібує певні матричні металопротеази (ММП), які є протеолітичними ферментами, що виробляються клітинами запалення. Це призводить до можливого використання доксицикліну як протизапального та протипухлинного ЛЗ [12,13].

Відповідно до Списку основних лікарських засобів Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) (2019) амоксицилін та його комбінацію із клавулановою кислотою рекомендують як ліки першого вибору для лікування широкого кола захворювань, спричинених основними патогенами [1]. Так, його застосовують у терапії захворювань верхніх та нижніх дихальних шляхів, наприклад, негоспітальної пневмонії, загострення хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ), госпітальної пневмонії [4, 14]. Крім того, амоксицилін рекомендовано в разі інфекцій нижніх сечовивідних шляхів дорослих та дітей [15-17], інфекцій шкіри та м'яких тканин, акушерських, гінекологічних та внутрішньочеревних інфекцій [18, 19]. З огляду на відносну безпеку вживання амоксициліну його часто призначають для амбулаторного лікування.

У комбінації з метронідазолом або кларитроміцином амоксицилін застосовують для лікування захворювань травного тракту, асоційованих із *Helicobacter pylori* [20, 21].

1.2 Доксидиклін та амоксицилін: хімічні та фізико-хімічні властивості, методи синтезу та аналізу

1.2.1 Доксидиклін: хімічні та фізико-хімічні властивості, методи синтезу та аналізу

Тетрациклінові антибіотики були одним з перших класів, розроблених після пеніциліну G та сульфаніламідів. Доксидиклін ((4*S*,4*aR*,5*S*,5*aR*,6*R*,12*aR*)-4-(диметиламіно)-1,5,10,11,12*a*-пентагідрокси-6-метил-3,12-діоксо-4*a*,5,5*a*,6-тетрагідро-4*H*-тетрацен-2-карбоксамід) було розроблено компанією Pfizer як напівсинтетичну похідну речовину окситетрацикліну, що вперше стала доступною 1967 року (рис. 1.1). Зміни у складі радикалів циклічної структури істотно впливають на антимікробну активність. Так, наприклад, диметиламіногрупа у четвертому положенні має важливе значення для антимікробної активності, а введення гідрокси-групи в п'яте положення допомагає підтримувати антимікробну активність [22].

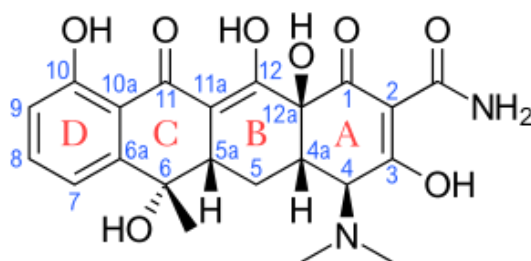


Рис. 1.1 Структурна формула доксидикліну

Доксидикліну хіклат ($C_{22}H_{25}ClN_2O_8$) – це кристалічна речовина світло-жовтого кольору, розчинна у воді, метанолі, мало розчинна у 96 % спирті, майже не розчинна в ацетоні. Має гігроскопічні властивості. Під дією світла утворюються домішки 4-епітетрацикліну, ангідротетрацикліну, 4-епіангідротетрацикліну та продукти їх подальшого перетворення, що зумовлюють потемніння речовини, тому доксидикліну хіклат, як і інші тетрациклінові, треба зберігати в сухому захищеному від світла місці, за кімнатної температури, у

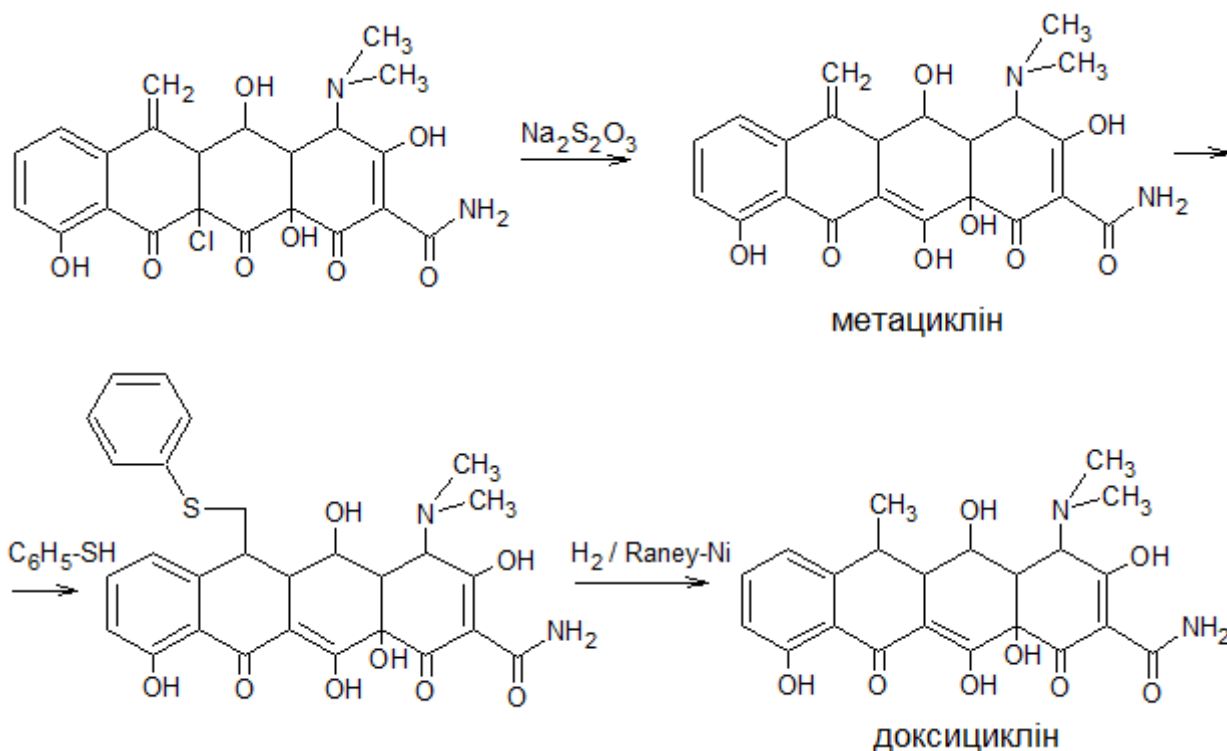


Рис. 1.3 Схема синтезу доксицикліну багатостадійна

Державна фармакопея України, Європейська та Британська фармакопеї рекомендують проводити ідентифікацію антибіотиків групи тетрацикліну хімічними та фізико-хімічними методами.

Фізико-хімічні методи

Ідентифікацію доксицикліну проводять методом тонкошарової хроматографії. Для цього готують випробовуваний розчин, розчиняючи субстанцію у метанолі, та розчин порівняння, розчиняючи у метанолі ФСЗ антибіотика. Обидва розчини наносять на хроматографічну пластинку із шаром силікагелю октадецилсилільного F_{254} .

Як рухому фазу використовують систему ацетонітрил – метанол – розчин 63 г/л кислоти шавлевої, рН якого попередньо доводять до 2 розчином аміаку концентрованим (20:20:60). Рухома фаза проходить $\frac{3}{4}$ пластинки, після чого її висушують на повітрі та проявляють в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм. На хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння, відповідна їй за розміром [28].

Можливе проведення ідентифікації доксицикліну методом УФ-спектрофотометрії за характером спектра, його максимумами і мінімумами поглинання [29, 30].

Оскільки тетрацикліни є сполуками з асиметричною структурою, для них характерна оптична активність – здатність обертати площину поляризації поляризованого променя світла. Тому для ідентифікації здійснюють визначення показника питомого оптичного обертання [28].

Хімічні методи

Згідно з вимогами Державної фармакопеї України для ідентифікації тетрациклінів проводять реакцію з концентрованою сірчаною кислотою на тетраценове ядро. У результаті реакції утворюються ангідропохідні характерного жовтого забарвлення. За цією реакцією також можна відрізнити тетрацикліни один від одного [28].

Для хлористоводневих солей тетрациклінів Державна фармакопея України рекомендує проводити реакцію на хлориди. Для цього до субстанції додають розчин аргентуму нітрату. Спостерігають утворення білого осаду аргентуму хлориду, що швидко розчиняється в розчині аміаку [28, 31].

Оскільки тетрацикліни містять фенольні гідроксили, то можна провести реакцію зі спиртовим розчином хлориду заліза(III). З цим спостерігається поява коричневого забарвлення [24, 31, 32].

Тетрацикліни дають реакцію з різноманітними діазореактивами у лужному середовищі. Діазосполука приєднується до антибіотика в положенні 9, утворюється азобарвник. Протягом 12-15 хвилин забарвлення розчину змінюється від жовтого до яскраво-помаранчевого або червоно-помаранчевого [33].

Властивість тетрациклінів окиснюватися з утворенням забарвлених продуктів дозволяє використовувати для їх ідентифікації такі окисники, як хлорамін Б, селеніста кислота, нінгідрин у різних розчинниках. Зазначені реактиви дозволяють також відрізнити тетрацикліни між собою [34-36].

Для ідентифікації антибіотиків групи тетрацикліну також можна використовувати їхню здатність утворювати забарвлені комплекси із солями

купруму(II), цинку. Окрім якісного, ці реакції можна застосовувати і для кількісного визначення із використанням УФ-спектрофотометрії [37, 38].

Методи кількісного визначення

ДФУ рекомендує проводити кількісне визначення субстанцій та лікарських форм доксицикліну методом вискоєфективної рідинної хроматографії. Для цього безпосередньо перед використанням готують випробовуваний розчин та розчин порівняння ФСЗ.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ-детектором. Як рухоми фазу використовують суміш 2-метил-2-пропанолу, дикалію гідрофосфату, тетрабутиламонію гідросульфату та натрію едетату. Детектування проводять спектрофотометрично за довжини хвилі 254 нм. Хроматографують поперемінно по 20 мкл випробовуваного розчину та 20 мкл розчину порівняння шість разів. Хроматографічну систему вважають придатною, якщо відносне стандартне відхилення для площі піку становить не менше 1,0 %. Вміст речовини обчислюють у відсотках [39, 40, 41].

У літературі також описано різноманітні альтернативні методики визначення доксицикліну в лікарських формах методом ВЕРХ [42, 43]. Наприклад, з використанням суміші 0,1 % розчину трифтороцтової кислоти у воді та 0,1 % розчину трифтороцтової кислоти в ацетонітрилі (60:40 (v/v)) як рухомої фази, колонки з розміром часток $250 \times 4,6$ мм, 5,0 мкм. Хроматографування проводять зі швидкістю потоку 1,0 мл/хв. Детектування виконують за допомогою УФ-детектора за довжини хвилі 360 нм за температури навколишнього середовища колонки 25°C [42].

З хімічних методів для кількісного визначення доксицикліну застосовують методи неводного титрування 0,1 М розчином хлорної кислоти. Титрують у суміші мурашиної, льодяної оцтової кислоти та діоксану у співвідношенні 5:10:10. Точку еквівалентності визначають потенціометрично [24]. Крім того, у літературних джерелах описано метод неводного титрування із використанням 0,01 М оцтового розчину хлорної кислоти в присутності ацетату ртуті в крижаний оцтовій кислоті, з кристалічним фіолетовим як індикатором візуального

виявлення кінцевої точки (метод А) або з комбінованим скляним електродом для потенціометричного визначення кінцевої точки титрування (метод Б) [44].

Останнім часом широкого розповсюдження набули такі фізико-хімічні методи, як спектрофотометрія в УФ-області, фотоколориметрія та флуориметрія, оскільки вони є відносно недорогими та простими у використанні. Тому кількісне визначення антибіотиків групи тетрацикліну також можна проводити вищезазначеними методами [29, 30, 45].

Також дослідники проводили титриметричне та спектрофотометричне визначення доксицикліну хіклату у лікарських препаратах та *in bulk* із використанням бромат-броміду, метилового оранжевого та індиго карміну як реагентів [46].

Біологічний метод

Доксициклін можна кількісно визначити біологічним методом, шляхом дифузії в агар. Для цього в живильне середовище вносять певну кількість суспензії мікроорганізмів, чутливих до антибіотика. Після внесення тест-мікроорганізму живильне середовище розливають у чашки Петрі, щоб утворився однорідний шар. Після цього готують розчини стандартного зразка з відомими концентраціями та розчини антибіотика з відповідними концентраціями. Активність антибіотиків визначають шляхом порівняння ступеня пригнічення росту чутливих мікроорганізмів у результаті дії випробовуваного антибіотика. З цим $1 \text{ мкг} = 1 \text{ ОД}$, отже, $1 \text{ г речовини} = 1000000 \text{ ОД}$ [39].

1.2.2 Амоксицилін: хімічні та фізико-хімічні властивості, методи синтезу та аналізу

Амоксицилін ((2S,5R,6R)-6-[[[(2R)-2-аміно-2-(4-гідроксифеніл) ацетил] аміно]-3,3-диметил-7-оксо-4-тіа-1-азабіцикло[3.2.0]гептан-2-карбонова кислота) є напівсинтетичним пеніциліном з класу амінопеніцилінів, що є похідними 6-амінопеніциланової кислоти або N-ацилпохідними (рис. 1.4). Напівсинтетичні бета-лактамі антибіотики було створено для розширення спектра дії. Крім того, вони мають кращі фармакокінетичні властивості, ніж натуральні

пеніциліни. Серед інших напівсинтетичних антибіотиків ампіцилін та амоксицилін мають найкраще всмоктування та розподіл у рідинах організму.

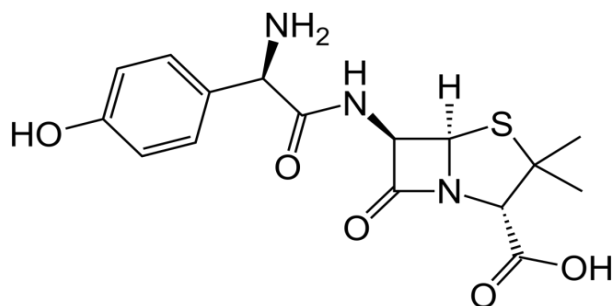


Рис. 1.4 Амоксицилін (*Amoxicillinum*)

Субстанція амоксициліну – це біла кристалічна речовина, що має гіркий смак та характерний «пеніциліновий» запах. Натрієва та калієва солі пеніцилінів легко або дуже легко розчинні у воді, важко розчиняються в органічних розчинниках, часто гігроскопічні [23, 47]. Молекулярна формула амоксициліну – $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ (безводна речовина), а його молекулярна маса 365,40 г / моль [48-50]. Молекулярна маса тригідрату амоксициліну, $C_{16}H_{19}N_3O_5S \cdot 3H_2O$, становить 419,40 г / моль [48, 50].

Останнім часом амоксицилін застосовують у комбінації з інгібітором бета-лактамаз – клавулановою кислотою. Існують комбінації у співвідношенні 4:1, 2:1, 7:1, 14:1, 16:1.

Клавуланову кислоту було розроблено 1974 року зі штаму *Streptomyces clavuligerus*, вона становить собою структуру, що також має бета-лактамне кільце, проте виявляє дуже слабкі протимікробні властивості (рис. 1.5). Клавуланова кислота незворотно зв'язується з бактеріальним ферментом бета-лактамазою та запобігає гідролізу амоксициліну [51-53].

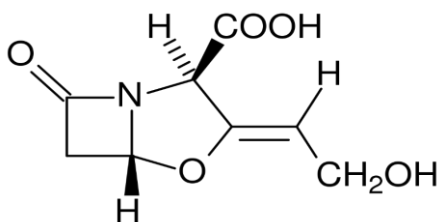


Рис. 1.5 Структурна формула клавуланової кислоти

Класичний метод отримання напівсинтетичних пеніцилінів, до яких належить і амоксицилін, полягає в гідролізі бензилпеніциліну, а потім ацетилюванні отриманої таким чином 6-АПК [54]:

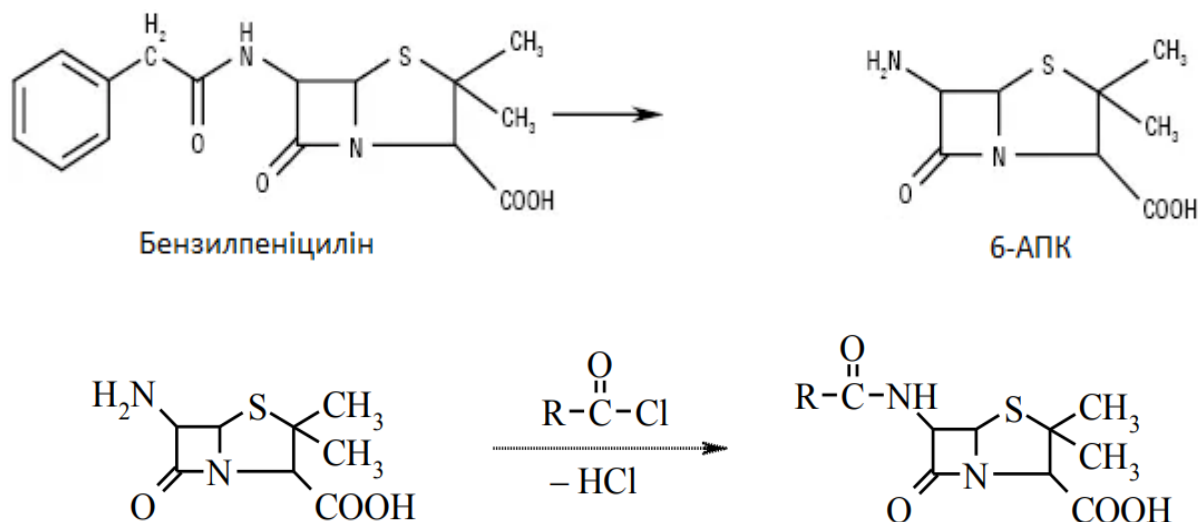


Рис. 1.6 Класична схема синтезу амоксициліну

Однак хоча конверсія пеніциліну G у 6-АПК відома вже майже п'ять десятиліть, упродовж останніх років багато компаній замінили хімічний гідроліз бічних ланцюгів на гідроліз, що каталізується пеніцилін ацилазою у водному середовищі. Це дозволило зменшити використання у виробництві більш токсичних речовин та таких розчинників, як пентахлорид фосфору та дихлорметан [55-57].

ДФУ наводить фізико-хімічні та хімічні методи ідентифікації для антибіотиків групи пеніцилінів. Британська фармакопея рекомендує використання ТШХ-методу для одночасної ідентифікації амоксициліну та клавуланової кислоти в комбінованих ЛФ. Як рухому фазу використовують суміш розчинників: 1-бутанол Р/ 0,1 % динатрію едетату у фосфатному буферному розчині з рН 4,0/оцтова кислота Р/бутил ацетат Р (1:2:6:10 об/об/об/об); як нерухому – пластинку із шаром силікагелю F254 Р розміром 20×20 см. Обробляють пластину сумішшю 0,1 % динатрію едетату у фосфатному буферному розчині з рН 4,0 та залишають пластину на ніч. Пластинку активують безпосередньо перед

аналізом, нагріваючи за температури 105 °С протягом 1 години. Проби наносять у вигляді смуг 7 мм по 1 мкл випробовуваного розчину та розчину порівняння. Відстань, що має пройти рухома фаза, складає 15 см від лінії старту. Пластинку висушують на повітрі та детектують за допомогою УФ-детектора за довжини хвилі 254 нм [50].

Американська фармакопея рекомендує проводити ідентифікацію амоксициліну за часом утримування основних піків досліджуваного розчину і піків розчину стандарту. Як рухомих фаз використовують метанол та буферний розчин натрію дигідрофосфату із рН 4,4 (1:19). Хроматографують з використанням колонки C18 зі швидкістю потоку 2 мл/хв. Детектують за допомогою УФ-детектора за довжини хвилі 220 нм [40]. Проте ДФУ не містить окремої монографії на комбіновану форму амоксициліну із клавулановою кислотою.

Фізико-хімічні методи

Субстанцію амоксициліну тригідрату можна ідентифікувати шляхом порівняння ІЧ-спектра з ІЧ-спектром ФСЗ амоксициліну [48, 50, 58].

Ідентифікацію амоксициліну тригідрату проводять методом тонкошарової хроматографії. Як випробовуваний розчин ДФУ рекомендує використовувати субстанцію, яку розчиняють у розчині натрію гідрокарбонату. Як розчин порівняння використовують ФСЗ амоксициліну тригідрату, який розчиняють у розчині натрію гідрокарбонату. Розчини наносять на хроматографічну пластинку із шаром силікагелю силанізованого. Як рухомих фаз використовують суміш ацетону та розчину амонію ацетату. Для виявлення пластину витримують у парі йоду до появи плям і переглядають за денного світла.

У результаті на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння, відповідна їй за розміром і забарвленням [48].

Хімічні методи

Попри широке застосування спектральних та хроматографічних методів ідентифікації в аналізі антибіотиків, дослідження кольорових хімічних реакцій досі вважають актуальними. Адже через поширення фальсифікацій використовувані методи ідентифікації потребують постійного вдосконалення.

У літературі описано сучасні експрес-методи аналізу амоксициліну, із застосуванням паперового колориметричного тестування із використанням камери телефону. Як реагенти для тесту використовували нінгідрин, п-диметиламінобензальдегід та реагент Фелінга [59].

Згідно з ДФУ для ідентифікації субстанції амоксициліну проводять реакцію з розчином формальдегіду в середовищі кислоти сірчаної. Нагрівають на водяній бані протягом 1 хвилини. З'являється темно-жовте забарвлення [60].

Нефармакопейні методи ідентифікації

Для випробовування амоксициліну використовують кольорову реакцію, в основі якої покладено розрив β -лактамного циклу з утворенням мідної солі гідроксамової кислоти – осад зеленого кольору [61, 62].

Також субстанцію амоксициліну ідентифікують реакцією з хромотроповою кислотою в присутності концентрованої сірчаної кислоти. Завдяки цій реакції можна відрізнити природні пеніциліни та напівсинтетичні пеніциліни через різне забарвлення продуктів реакції [63].

Методи кількісного визначення

Згідно з рекомендаціями світових фармакопей кількісне визначення субстанцій та лікарських форм антибіотиків групи пеніцилінів проводять методом рідинної хроматографії з УФ-детектуванням [40, 50, 60].

Для цього безпосередньо перед використанням готують випробовуваний розчин та розчин порівняння ФСЗ. Як нерухому фазу використовують силікагель для хроматографії октадецилсилільний. Як рухому фазу використовують систему: ацетонітрил Р – буферний розчин. Буферний розчин готують за методикою, зазначеною у ДФУ: до розчину калію дигідрофосфату додають розчин натрію гідроксиду, розведений для отримання рН 5,0. Як випробовуваний розчин використовують субстанцію амоксициліну, яку розчиняють у рухомій фазі. Як розчин порівняння готують ФСЗ амоксициліну тригідрату, який розчиняють у рухомій фазі. Відносне стандартне відхилення для розчину порівняння має становити не більше 1,0 % після 6 інжекцій. Ступінь розділення між піками амоксициліну та цефадроксилу має складати не менше 2.0. Вміст

амоксициліну, у відсотках, обчислюють, використовуючи зазначений вміст у ФСЗ амоксициліну тригідрату [60].

У комбінованих лікарських формах амоксициліну та клавуланової кислоти як Британська, так і Американська фармакопеї рекомендують застосування ВЕРХ-методів, однак самі параметри методів відрізняються.

Хімічні методи визначення

Як хімічні методи визначення кількісного вмісту амоксициліну можна застосовувати алкаліметрію, метод зворотного титрування [31]. Крім того, у літературі описано методики кількісного визначення амоксициліну в субстанції та лікарських формах методом титрування з використанням йодид-йодатної суміші, йодометричного титрування з використанням гідрогену пероксимоносульфату та інші [64, 65]. Також дослідниками було розроблено метод визначення амоксициліну в капсулах шляхом потенціометричного титрування [66].

1.3 Взаємодія антибіотиків із солями металів, що входять до складу лікарських засобів, компонентів їжі та напоїв

1.3.1 Аналіз літературних джерел щодо взаємодії доксицикліну та амоксициліну із солями металів, лікарськими засобами та компонентами харчових продуктів

Останнім часом інтерес дослідників привертають метало-органічні комплекси антибіотиків та їхні антибактеріальні властивості. Більшість фармацевтичних препаратів містять електронодонорні групи, які, ймовірно, зв'язуються з іонами металів. Давно відомо, що вони поведуться як відносно ефективні агенти і можуть утворювати комплекси різного складу й будови [67]. Проте дані, наявні в літературі, є суперечливими. Попри те, що можливість утворення хелатних комплексів тетрациклінів є відомим фактом, дослідження часто проводили для тетрацикліну, а результати екстраполювали на всі антибіотики групи. Наприклад, під час вивчення впливу деяких антацидів на розчинення тетрацикліну та метацикліну у висновках екстраполювали дані на

всю групу тетрациклінових [68]. Крім того, багато джерел пишуть про «хрестоматійну» взаємодію тетрациклінових антибіотиків з молоком. Проте проведені дослідження засвідчили деякі відмінності між різними похідними тетрацикліну у сприйнятливості до взаємодії з молоком. В одному перехресному дослідженні, у якому використовували 100 мг пероральних доз доксицикліну, концентрація в сироватці крові знижувалася приблизно на 20 %, коли одночасно вживали 240 мл знежиреного молока. Такий самий об'єм молока, вживаний одночасно з 300 мг демеклоцикліну, знизив рівень антибіотика в сироватці крові приблизно на 70 %. Маттіла та ін. (1972) повідомили, що вживання 300 мл молока з тетрацикліном (500 мг), окситетрацикліном (500 мг) або метацикліном (300 мг) знижує рівень сироватки на 50-60 %, але на поглинання доксицикліну (200 мг) це суттєво не впливає. Незважаючи на споживання молока, рівні доксицикліну в сироватці крові здебільшого перевищували 0,5-1,5 / -мг / мл. Науковці зробили висновок, що причина хорошого всмоктування доксицикліну навіть у присутності молока, напевно, пов'язана з їхньою високою ліпофільністю та низькою спорідненістю до кальцію [69-71]. Пізніше було проведено низку досліджень взаємодії антибіотиків групи тетрацикліну із кальцієм, наявним у плазмі крові. Було доведено можливість утворення комплексів у заданих умовах [72]. Крім того, автори вивчали можливості одночасного утворення бінарних комплексів сполук тетрациклінів. З усіх досліджуваних речовин доксициклін виявив неможливість утворення подібних сполук [73].

Нещодавні дослідження довели, що властивості та активність антибіотиків групи тетрацикліну прямо залежать від специфічних груп замісників у нафтаценовому скелеті [74]. Крім того, важливу роль має тип катіона. Гандур та ін. (1992) повідомили про константи утворення тетрацикліну та окситетрацикліну з Cr(III), Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Zn(II), Cd(II), Hg(II), Pb(II) та Al(III) з використанням потенціометричних титрувань [75]. Дослідниками також було визначено константи утворення тетрацикліну, окситетрацикліну та хлортетрацикліну з Cu(II) [76].

На жаль, величини в наявних дослідженнях дуже відрізняються, і важко використовувати ці значення для прогнозування впливу різних катіонів

важких металів на адсорбцію доксицикліну. До того ж, різняться висновки щодо наявності комплексоутворення та його впливу на ефективність препарату. Останнім часом побільшало досліджень щодо антибактеріальної активності комплексів метал-ліганд та можливого використання подібних структур у резистентних штамів. Наприклад, дослідниками було синтезовано декілька метанольних комплексів доксицикліну із залізом(III), що виявили активність проти штамів *S. Aureus* та *K. Pneumonia*, яка дорівнювала або майже дорівнювала чистому антибіотику [77].

Сьогодні є дані досліджень комплексоутворення перехідних металів нікелю(II), стануму(IV), кобальту(II), купруму(II), цинку(II), лантаніду та амоксициліну [78-80]. Refat та іншими в процесі проведення вивчення мікробіологічних властивостей комплексів амоксициліну із перехідними металами було доведено, що антимікробна властивість комплексів проти таких штамів, як *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. Aureus*, *C. albicans*, *A. flavus* знижується, на відміну від чистого амоксициліну [80]. Vozic та колеги довели комплексоутворення ампіциліну, амоксициліну та цефалексину з катіонами купруму(II) із використанням декількох методів дослідження. Вони з'ясували, що амоксицилін утворює комплекси з катіонами купруму за співвідношення 1:1, які знижують антимікробну активність амоксициліну та інших досліджуваних антибіотиків. Водночас пеніцилін G, що також вивчали ці вчені, не виявив взаємодії, тому було зроблено висновок, що саме бічна аміно-група вступає в процес взаємодії [81].

Zayed та інші синтезували та вивчили серію комплексних сполук у співвідношенні 1:1, 1:2 та 2:1 з залізом(II), кобальтом, залізом(III), нікелем(II), купрумом(II) та цинком(II). Вони довели, що координація відбувається через N-аміно-групу та кисень у бета-лактаміній групі [82]. Іншими дослідниками було синтезовано комплекси ципрофлоксацину, флоксациліну та амоксициліну із залізом(III). Комплекси показали покращену розчинність у воді, а також кращу термо- та кислотну стабільність, порівнюючи із лігандами. Однак антимікробні дослідження засвідчили зниження антимікробної активності новоутворених сполук [83].

Проте інші дані досліджень свідчать про покращення антибактеріальної активності комплексів амоксициліну із Ag(I), Cu(II), Co(II), Zn(II) та Ni(II) проти деяких штамів *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* [84].

Наявні в літературних джерелах дослідження доводять, що утворення комплексів залежить від природи розчинника, часу взаємодії, температури та pH середовища. Також варто зазначити, що більшість комплексів було отримано шляхом направленої органічної синтезу або з використанням органічних розчинників, що не дозволяє зробити висновок про можливість спонтанної взаємодії цих солей із досліджуваними антибіотиками в умовах організму.

1.3.2 Хімічні та фізико-хімічні методи дослідження взаємодій

Дослідження лікарських взаємодій можна проводити за допомогою різних методів [85]. Деякі методи застосовують для якісного оцінювання, тоді як інші можна використовувати як для якісного, так і для кількісного оцінювання. Кожен метод вимагає різних експериментальних умов, що призводить до різниці в інтерпретації результатів.

У літературних джерелах описано застосування таких фізико-хімічних методів, як УФ-спектроскопія та спектроскопія у видимій області. Вони мають низку переваг, з-поміж яких експресність, точність, відносна економічність. Для вивчення комплексоутворення широко застосовують метод Джоба, описаний 1928 року. Цей метод переважно використовують для визначення складу металевих комплексів, він є модифікованою версією спектроскопічного методу [86-90]. Останнім часом метод застосовують не тільки для вивчення метало-органічних комплексів, а й для вивчення взаємодій лікарських засобів між собою [91].

Взаємодію Zn(II), Cu(II), Co(II) та інших солей з ампіциліном та амоксициліном у водному розчині NaCl за різної іонної сили і за $t = 25^{\circ}\text{C}$ досліджували потенціометричним методом, УФ- та ^1H -ЯМР [92, 93].

Потенціометричним титруванням вивчали взаємодію ампіциліну та амоксициліну з катіонами мангану, вимірювання проводили в середовищі KCl за різних температурних умов [94, 95].

Також застосовували термодинамічні дослідження деяких комплексних сполук доксицикліну та амоксициліну [96, 97].

Gamel досліджувала синтезовані комплекси ампіциліну та амоксициліну з катіонами металів, серед яких були катіони кальцію та магнію. Співвідношення ліганд-метал складало 2:1 відповідно. Дослідження проводили методами мікробіологічного аналізу, ІЧ-спектроскопії, молярної електропровідності, термогравіметрії, ЯМР-спектроскопії тощо [98].

Кондуктометричні дослідження, як ще один електрохімічний метод, також часто використовують для вивчення комплексів метал-ліганд, зокрема для визначення співвідношення, за якого відбувається взаємодія, та констант стійкості комплексів [99].

Отже, більшість описаних досліджень з вивчення метало-органічних комплексів застосовують у комплексі для порівняння результатів та їх більш широкої інтерпретації.

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 1

1. Аналіз літературних джерел дозволив з'ясувати, що доксициклін та амоксицилін займають дуже важливе місце в схемах лікування таких поширених захворювань, як госпітальна та негоспітальна пневмонії, ускладнення внутрішньочеревних інфекцій, загострення хронічної обструктивної легеневої хвороби (ХОЗЛ), інфекції нижніх сечовивідних шляхів, ускладнення інфекційних захворювань шкіри тощо.

2. Комбінований препарат амоксициліну з клавулановою кислотою має переваги з погляду ефективності. Проте наразі ДФУ не містить окремої монографії, що регламентує контроль якості таких комбінованих лікарських форм. Тому необхідним є розробка методів контролю якості для впровадження у діяльність вітчизняних лабораторій.

3. Проаналізовано дані літературних джерел щодо проведених досліджень взаємодій доксицикліну та амоксициліну з катіонами різноманітних металів. Дані варіюються залежно від умов проведення досліджень, середовища, виду катіона, тому їх неможливо екстраполювати.

4. Дослідження метал-іонних комплексів найчастіше здійснюють з використанням таких сучасних фізико-хімічних методів, як УФ- спектрофотометрія, ІЧ-спектроскопія, кондуктометрія, термогравіметрія, електрохімічна імпедансна спектроскопія, ЯМР тощо, які дозволяють виконувати як якісне, так і кількісне оцінювання.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Об'єкти дослідження

Солі металів: кальцію хлорид безводний (CaCl_2), магнію сульфат гептагідрат ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), алюмінію сульфат ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$), заліза(II) сульфат (Fe_2SO_4) та заліза(III) хлорид (FeCl_3). Усі солі металів були класифікації «х.ч.».

Субстанція доксицикліну хіклату (Yangzhou Liberty Pharmaceutical Co., Ltd, Китай).

Капсули доксицикліну хіклату 100 мг (серія 030117/02/20, виробник: ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ», Україна).

Субстанція амоксициліну тригідрату (Yangzhou Liberty Pharmaceutical Co., Ltd, Китай).

Таблетки амоксициліну – АМОКСИЛ® 500 мг (серія 172489, серія 172496), № 20, Корпорація Артеріум.

Таблетки амоксициліну з клавулановою кислотою АМОКСИЛ- К 625 № 20, Корпорація Артеріум (серії 184153, 187489, 184111, 185691, 184117).

Таблетки амоксициліну з клавулановою кислотою Рапід-625 № 21, Іпка Лабораторіс Лімітед, Індія (серії 18337, 18764, 18403, 18441, 18449).

Для дослідження взаємодії було відібрано такі торговельні марки мінеральних, столових вод та напоїв, що реалізуються через торгову мережу в Україні та можуть мати високий вміст мінеральних речовин:

1) «Карпатська джерельна», серія/дата виробництва 23.11.16/2, серія/дата виробництва 02.03.18/2 виробник: ТОВ «Карпатські мінеральні води», с. Струтин, Золочівський район, Львівська обл., Україна;

2) «Єсентуки № 17», серія/дата виробництва 08:09:16 П254 03:40 СМ2, серія/дата виробництва П69/08.03.18 виробник: ТОВ «Єсентукський завод мінеральних вод на КМВ», м. Єсентуки, Ставропольський край, Російська Федерація;

3) «Трускавецька», серія/дата виробництва 07/10/16/8, в/07/03/18 виробник: ПП ТзОВ «Аква-ЕКО», м. Трускавець, Львівська обл., Україна;

4) Газований безалкогольний напій «Спрайт», серія/дата виробництва 27/04/17, виробник: ІП «Кока-Кола Беверіджис Україна Лімітед», Україна, 074442, Київська обл., Баварський р-н, смт Велика Димерка, до складу якого входять: вода артезіанська, діоксид вуглецю, регулятори кислотності лимонна кислота та цитрат натрію, підсолоджувачі сахаринат натрію та ацесульфам-К;

5) «Боржомі», серія/дата виробництва L2553/08.12.17, виробник: IDS Borjomi Georgia, м. Боржомі, Грузія;

Окрім того, для дослідження було обрано мінеральні води з міських харківських джерел: «Харківська-1» – джерело мінеральної води в Саржиному яру, «Харківська-2» – джерело мінеральної води в Кітлярчиному яру.

Попри переваги столових та мінеральних вод, пацієнти можуть вживати для запивання та загалом споживати водопровідну воду, тому в дослідженні було також використано проточну воду з міського водопроводу.

2.2 Матеріали дослідження

Для досліджень ВЕРХ та УЕРХ використовували розчинники класу ч.д.а. Систему очищення води Milli-Q system (США) використовували для отримання води для ВЕРХ та УЕРХ-методів.

Для взяття наважок та приготування розчинів використовували аналітичні ваги MettlerToledo AB-204/A та мірний посуд класу А. Усі досліджувані розчини використовували свіжоприготованими.

Для приготування розчинів порівняння використовували робочий стандартний зразок (РСЗ) доксицикліну (серія YD180301067, виробник: Yangzhou Liberty Pharmaceutical Co., Ltd, Китай).

Для верифікації та трансферу методик аналізу амоксициліну та калію клавуланату використовували стандартні зразки амоксициліну та клавуланату калію, придбані у Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Німеччина).

2.3 Загальні методи аналізу

2.3.1 Абсорбційна УФ-спектрофотометрія

Спектрофотометричні дослідження проводили згідно з вимогами статті ДФУ 2.0 «Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій і видимій областях» (2.2.25) [39]. Вимірювання проводили на спектрофотометрах «Specord 200» (Analytik Jena, Німеччина) та Evolution 60S (Thermo Scientific, США).

2.3.2 ВЕРХ та УЕРХ-дослідження

Дослідження проводили відповідно до вимог статті ДФУ 2.0 «Рідинна хроматографія (2.2.29) [39].

Для проведення аналізу було використано Shimadzu Nexera-X₂ (Шімадзу, Токіо, Японія), який складався з таких частин:

1. Насоси з онлайн-дегазатором LC-30 AD (Шімадзу, Токіо, Японія);
2. Автосамплер – SIL 30AC (Шімадзу, Токіо, Японія);
3. Термостат – CTO 20AC (Шімадзу, Токіо, Японія);
4. Детектор діодно-матричний– SPD M20A (DAD) (Шімадзу, Токіо, Японія).

Дослідження було проведено на базі лабораторії кафедри аналітичної та токсикологічної хімії Литовського університету наук про здоров'я (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas) за консультативної підтримки завідувача кафедри аналітичної та токсикологічної хімії Людаса Іванаускаса.

2.3.3 Модифікований тест розчинення

Тести розчинення для капсул доксицикліну та таблеток амоксициліну проводили відповідно до вимог статті ДФУ 2.9.3 тест «Розчинення» для твердих дозованих форм [39]. Дослідження здійснювали за допомогою приладу PharmaTest-DT70 (Німеччина). Роботу виконували на базі Державної науково-дослідної лабораторії з контролю якості лікарських засобів (ДНДЛ з КЯЛЗ) за консультації завідувачки лабораторії Світлани Миколаївни Губарь.

2.3.4 Електроімпедансна спектроскопія

Вимірювання повного імпедансу досліджуваних розчинів антибіотиків проводили за допомогою векторного аналізатора ланцюгів виробництва фірми Rohde&Schwarz ZNB40. У дослідженні використовували вимірювальну комірку, виготовлену з тефлону, об'ємом 1 мл, що мала 2 паралельні нікельовані сталеві електроди з діаметром 6 мм, дистанція між електродами складала 9 мм. Розчини готували безпосередньо перед вимірюванням. Вимірювання проводили за температури 296 ± 3 К.

Дослідження взаємодії доксицикліну та амоксициліну із солями металів методом ЕІС виконали на базі кафедри фізичної і біомедичної електроніки та комплексних інформаційних технологій Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна у співпраці з науковим співробітником, старшим викладачем Євгеном Олександровичем Антоненком.

2.4 Характеристика методів дослідження

Методика 1. УФ-спектрофотометричне дослідження взаємодії доксицикліну хіклату із солями металів

Для попереднього дослідження взаємодії доксицикліну з обраними солями металів було приготовлено такі розчини: 1) *контрольний розчин доксицикліну хіклату*: точну наважку 0,0400 г субстанції доксицикліну хіклату поміщали в мірну колбу на 100 мл, розчиняли у невеликій кількості 0,1 М кислоти хлористоводневої та доводили до мітки тим самим розчинником. 5,0 мл розчину відбирали піпеткою та поміщали в колбу на 100 мл, доводили до мітки тим самим розчинником; 2) *досліджуваний розчин доксицикліну хіклату із додаванням солей металів*: точну наважку 0,0400 г субстанції доксицикліну хіклату поміщали в мірну колбу на 100 мл, додавали точну наважку солей металів (наважку розраховували відповідно до валентності кожного з досліджуваних катіонів так, щоб стехіометричне співвідношення доксицикліну до катіона було

2:1 для солей кальцію, магнію та заліза(II); 3:1 для солей алюмінію та заліза(III)). Наважки розчиняли у невеликій кількості 0,1 М кислоти хлористоводневої, доводили до мітки та ретельно перемішували. 5,0 мл отриманого розчину відбирали піпеткою та поміщали в колбу на 100 мл, доводили до мітки тим самим розчинником. Оптичну густину досліджуваних розчинів вимірювали в ультрафіолетовій та видимій ділянці спектра від 220 до 400 нм. Як компенсаційний розчин за спектрофотометричного вимірювання використовували 0,1 М кислоту хлористоводневу.

Результати та обговорення досліджень, проведених за допомогою цієї методики, наведено в розд. 3, п. 3.1.

Методика 2. УФ-спектрофотометричне дослідження амоксициліну за допомогою методу стехіометричних співвідношень

Для виявлення можливості взаємодії амоксициліну із солями металів було використано апробований метод стехіометричних співвідношень, що продемонстрував свою дієвість під час дослідження взаємодії доксицикліну з тими ж солями. Для цього експерименту приготували такі розчини: 1) *контрольний розчин амоксициліну*: точну наважку 0,0100 г субстанції амоксициліну тригідрату поміщали в мірну колбу на 100 мл, розчиняли в невеликій кількості 0,1 М кислоти хлористоводневої та доводили до мітки тим самим розчинником. 5,0 мл розчину відбирали піпеткою та поміщали в колбу на 100 мл, доводили до мітки тим самим розчинником; 2) *досліджуваний розчин амоксициліну тригідрату із додаванням солей металів*: точну наважку 0,0100 г субстанції амоксициліну тригідрату поміщали в мірну колбу на 100 мл, додавали точну наважку солей металів (наважку розраховували відповідно до валентності кожного з досліджуваних катіонів так, щоб стехіометричне співвідношення доксицикліну до катіона було 2:1 для солей кальцію, магнію та заліза(II); 3:1 для солей алюмінію та заліза(III)). Наважки розчиняли у невеликій кількості 0,1 М кислоти хлористоводневої, доводили до мітки та ретельно перемішували. 5,0 мл отриманого розчину відбирали піпеткою та поміщали в колбу

на 100 мл, доводили до мітки тим самим розчинником. Оптичну густину досліджуваних розчинів вимірювали в ультрафіолетовій ділянці спектра від 210 до 300 нм. Як компенсаційний розчин за спектрофотометричного вимірювання використовували 0,1 М кислоти хлористоводневу.

Результати та обговорення досліджень, проведених за допомогою цієї методики, наведено в розд. 3, п. 3.2.1.

Методика 3. УФ-спектрофотометричне дослідження взаємодії амоксициліну з солями металів за допомогою методу Джоба

Для проведення дослідження було приготовано такі розчини: 1) *вихідний (ізомольярний) розчин амоксициліну тригідрату*: точну наважку субстанції амоксициліну тригідрату 0,1048 г поміщали в колбу на 250 мл, розчиняли у 0,1 М кислоти хлористоводневої та доводили до мітки тим самим розчинником; 2) *вихідний (ізомольярний) розчин солі металу* (кальцію, магнію, алюмінію, заліза(II), заліза(III)): точну наважку солі, розраховану таким чином, щоб отримати розчин концентрацією $1 \cdot 10^{-3}$ у 0,1 М кислоти хлористоводневої.

Розчини амоксициліну та солей металів змішували у стехіометричних співвідношеннях 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1 таким чином, щоб отримати кінцеві розчини однакової молярності. Отримані розчини оцінювали за допомогою УФ-спектрофотометрії за довжини хвилі 203 нм, 230 ± 1 нм та 272 ± 1 нм. Результати та їх обговорення наведено в розд. 3, п. 3.2.2.

Методика 4. Верифікація тесту розчинення для капсул доксицикліну хіклату

Як середовище розчинення використовували кислоту хлористоводневу 0,01 М об'ємом 900 мл. Застосовували апарат 2 (лопоть): 75 об/хв, між лопаттю та внутрішньою поверхнею дна колби підтримується відстань $4,5 \pm 0,5$ см протягом усього тесту. Час проведення дослідження 30 хв. Кількість доксицикліну, що розчинилась, визначали за допомогою методу УФ-спектрофотометрії за довжини хвилі 276 нм за формулою 2.1. Зразки досліджуваного розчину фільтрували та доводили до необхідної концентрації. Порівнювали зі стандартним

розчином у тому ж розчиннику. Не менше 80 % зазначеної кількості доксицикліну має розчинятися за 30 хв [40].

$$x, \% = \frac{A \cdot m_0 \cdot P \cdot (V - V_a) \cdot V_{\text{МК}_{\text{досл1}}} \cdot V_{\text{ПРС3}} \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 100,0 \cdot V_{\text{ПД}} \cdot V_{\text{МКРС31}} \cdot V_{\text{МКРС32}}}, \quad (2.1)$$

де A – оптична густина досліджуваного розчину;

A_0 – оптична густина розчину стандарту;

m – кількісний вміст доксицикліну у препараті, зазначений на пакуванні, мг;

m_0 – маса наважки РСЗ доксицикліну, мг;

P – кількісний вміст доксицикліну у РСЗ, %;

V – об'єм середовища розчинення;

V_a – об'єм відібраної аліквоти, мл.

Відповідно до вимог ДФУ для тесту розчинення проводили визначення таких валідаційних характеристик: правильність, прецизійність (збіжність, внутрішньолабораторна прецизійність), специфічність, лінійність, діапазон застосування.

Результати дослідження наведено в розд. 3., п. 3.3.

Методика 5. Визначення точного вмісту катіонів кальцію та магнію в мінеральних водах

Катіон кальцію. 50 мл попередньо дегазованої мінеральної води вміщують у конічну колбу для титрування, додають 10 мл розчину натрію гідроксиду розведеного Р до рН 12-13 та додають 50 мг індикаторної суміші мурексиду. Титрують 0,01 М розчином натрію едетату до зміни забарвлення від рожевого до фіолетового [39, 100, 101].

Сума кальцію карбонату та магнію гідроксиду. 50 мл попередньо дегазованої мінеральної води вміщують у конічну колбу, додають 10 мл аміачного буферного розчину до рН 9-10, додають 50 мг індикаторної суміші еріохрому чорного Т та титрують 0,01 М розчином натрію едетату до зміни забарвлення розчину від фіолетового до блакитного [39, 100, 101].

Для розрахування вмісту магнію гідроксиду використовували різницю об'єму титранту, що пішов на титрування суми катіонів металів, та об'єму титранту, витраченого на титрування кальцію карбонату [39, 100, 101].

Кількісний вміст кальцію карбонату та магнію оксиду розраховували за формулою комплексонометричного титрування в перерахунку на визначуваний катіон металу [39, 100, 101]:

$$x, \text{ мг} = \frac{V_{\text{ЕДТА}} \cdot K_{\text{ЕДТА}} \cdot T_{\text{ЕДТА/речов.}} \cdot 1 \text{ л}}{V_{\text{для аналізу}}}, \quad (2.2)$$

де $V_{\text{ЕДТА}}$ – об'єм 0,01 М розчину натрію едетату, що пішов на титрування впробовуваного розчину, мл;

$K_{\text{ЕДТА}}$ – коефіцієнт поправки 0,01 М розчину натрію едетату;

$T_{\text{ЕДТА/речов.}}$ – титр 0,01 М розчину натрію едетату за досліджуваним катіоном металу, г/мл;

$V_{\text{для аналізу}}$ – об'єм досліджуваного зразка мінеральної води, мл;

Результати наведено в розділі 3, п. 3.4.1.

Методика 6. Проведення модифікованого in vitro тесту розчинення для капсул доксицикліну

Для виявлення можливої взаємодії доксицикліну хіклату із солями кальцію та магнію було проведено вивчення впливу на вивільнення доксицикліну з капсул у середовищі 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої із додаванням порції низки мінеральних вод та напоїв, представлених на українському ринку. Дослідження взаємодії доксицикліну із мінеральними водами та напоями *in vitro* проводили в умовах тесту розчинення *in vitro*, наведеного у монографії Американської фармакопеї «Doxycycline capsules». Умови тесту було модифіковано так, щоб створити подібність одночасного прийому препарату та мінеральних вод в умовах організму людини [40, 102]. Так, як середовище розчинення використовували 0,1 М кислоти хлористоводневої об'ємом 900 мл. Тож рН та об'єм середовища відповідав умовам шлунка. Застосовували апарат

2 (лопать): 75 об/хв, між лопаттю та внутрішньою поверхнею дна колби підтримували відстань $4,5 \pm 0,5$ см відповідно до вимог упродовж усього тесту. Час проведення дослідження 45 хв.

Досліджувані зразки відбирали через 5, 10, 15, 30, 45 хв від початку дослідження. Кількість повторів для кожного із досліджень – 6.

Методика проведення дослідження: По 900 мл середовища розчинення ($\pm 1\%$) поміщали в посудину приладу. Після того як середовище розчинення нагрілось до температури $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, у ємкості із середовищем розчинення поміщали по 1 капсулі доксицикліну, обтяженої спіраллю з інертним матеріалом, та починали обертання перемішувального елемента зі швидкістю 75 об/хв.

Відбір проб проводили через зазначені інтервали часу, за допомогою піпетки об'ємом 10 мл, з області посередині між поверхнею середовища розчинення і верхньою частиною кошика, що обертається. Аліквоту для аналізу фільтрували через фільтр лабораторний знезолений «синя стрічка» та не компенсували рівним об'ємом середовища розчинення, а враховували в кінцевій формулі розрахунку кількості доксицикліну, що вивільнився.

Приготування розчину порівняння проводили за такою методикою: 50 мг РСЗ доксицикліну помістили у мірну колбу об'ємом 50 мл, розчинили в невеликій кількості 0,1 М розчину хлористоводневої кислоти та довели об'єм розчину до 50 мл тим самим розчинником. Після цього 1 мл одержаного розчину помістили у мірну колбу об'ємом 50 мл, довели об'єм розчину до позначки тим же розчинником та перемішали.

Кількісний вміст діючої речовини визначали спектрофотометрично в ультрафіолетовій області спектра методом стандарту. Вимірювання оптичної густини випробовуваного розчину та розчину порівняння проводили за довжини хвилі 269 нм щодо компенсаційного розчину. Як компенсаційний розчин використовували 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої. Кількісний вміст доксицикліну у відібраних пробах розраховували за формулою 2.1 [100].

Для визначення подібності профілів розчинення використовували розрахунок фактора подібності [39, 102]:

$$f_2 = 50 \cdot \log \left[\frac{100}{\sqrt{1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{t=1}^n (R_{(t)} - T_{(t)})^2}} \right], \quad (2.3)$$

де n – кількість точок контролю;

$R_{(t)}$ — середнє значення у відсотках розчиненого референтного препарату в час t після початку дослідження;

$T_{(t)}$ – середнє значення у відсотках розчиненого досліджуваного препарату в час t після початку дослідження.

Результати наведено в розділі 3 п. 3.5.1.

Методика 6. Проведення модифікованого in vitro тесту розчинення для таблеток амоксициліну

Для виявлення взаємодії амоксициліну тригідрату із солями кальцію та магнію було проведено вивчення впливу на вивільнення амоксициліну з таблеток у середовищі 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої із додаванням порції низки мінеральних вод та напоїв, представлених на українському ринку. Дослідження взаємодії амоксициліну з мінеральними водами та напоями *in vitro* проводили в умовах тесту розчинення, наведеного у монографії ДФУ «Таблетки амоксициліну», який модифікували таким чином, що його умови відповідали умовам одночасного вживання препарату та мінеральної води [39, 102]. Так, середовище розчинення було змінено на 0,1 М кислоту хлористоводневу, що відповідає за значенням рН шлунка. Для проведення тесту застосовували апарат 1 (кошик). Процедура проведення дослідження: по 900 мл середовища розчинення ($\pm 1\%$) поміщали в посудину приладу. Середовище розчинення нагрівали до температури 37°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$). Після цього в кошики апарата поміщали по 1 таблетці амоксициліну, занурювали у ємкості із середовищем розчинення та починали обертання перемішувального елемента зі швидкістю 150 об/хв.

Відбір проб проводили піпеткою об'ємом 10 мл через 5, 10, 15, 30 та 45 хв від початку дослідження. Аліквоту для аналізу фільтрували через фільтр лабораторний знезолений «синя стрічка». Об'єм середовища розчинення не компенсували рівним об'ємом, а враховували в кінцевій формулі розрахунку кількості амоксициліну, що вивільнився.

По закінченню тесту проводили пробопідготовку випробовуваних розчинів таким чином: 5,0 мл фільтрату досліджуваного розчину поміщали у мірну колбу місткістю 20,0 мл, доводили об'єм розчину до мітки 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої та перемішували.

Приготування розчину порівняння проводили за такою методикою: 62,0 мг амоксициліну помістили у мірну колбу місткістю 100 мл, розчинили в невеликій кількості 0,1 М розчину хлористоводневої кислоти та довели об'єм розчину до мітки тим самим розчинником. Після цього 5,0 мл одержаного розчину перенести у мірну колбу місткістю 20 мл, довести об'єм розчину до позначки тим же розчинником та перемішували.

Кількісний вміст діючої речовини визначали спектрофотометрично в ультрафіолетовій області спектра методом стандарту. Вимірювання оптичної густини випробовуваного розчину та розчину порівняння проводили за довжини хвилі 272 нм щодо компенсаційного розчину. Як компенсаційний розчин використовували 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої. Кількісний вміст доксицикліну у відібраних пробах розраховували за формулою 2.1.

Для визначення подібності профілів розчинення використовували розрахунок фактора подібності за формулою 2.3 [48, 102].

Результати наведено в розділі 3, п. 3.5.2.

Методика 7. Аналіз утворення комплексів металів та досліджуваних антибіотиків за допомогою методу електрохімічної імпедансної спектроскопії

Для визначення можливості комплексоутворення між доксицикліном та катіонами заліза, кальцію, магнію та алюмінію було вирішено застосувати метод електрохімічної імпедансної спектроскопії (EIC) [103]. Метод електрохімічної

імпедансної спектроскопії застосовують для області низьких напруженостей полів, де не проявляються тунельні і напівпровідникові ефекти. Частотний діапазон прояву дисперсії залежить від механізму поляризації молекул діелектрика. Полярні розчинники (вода, ацетон, етиловий спирт) мають більш високу діелектричну проникність ($\epsilon > 5$), ніж неполярні і слабополярні ($\epsilon < 5$), тому залежність імпедансу вимірювальної комірки від концентрації домішкового компонента яскраво виражена у довго- і середньохвильових діапазонах електромагнітного випромінювання. У випадку слабополярних або неполярних діелектриків (бензол, гексан, газ) дисперсія спостерігається у декаметровому діапазоні [104].

З огляду на те, що досліджували розчини речовин у воді, діапазон частот, у якому виміряли електрохімічний імпеданс, склав від 100 кГц до 1 ГГц. З цим визначали як частотні залежності зміни імпедансу, так і залежність його від співвідношення концентрацій досліджуваних об'єктів. Вимірювання повного імпедансу складалося із визначення частотної залежності його дійсної (Z_{Re}) та уявної частин (Z_{Im}), за якими далі визначали такі функціональні залежності, як залежність модулю повного імпедансу від частоти – $|Z| = z(f)$; залежність фазового кута повного імпедансу від частоти – $\varphi = \Phi(f)$ і взаємозв'язок між дійсною і уявною частинами повного імпедансу у вигляді залежності: $-Z_{Im} = \zeta(Z_{Re})$ [103]. Ці залежності можна подати графічно у вигляді кривих Найквіста: $-Z_{Im} = \zeta(Z_{Re})$ та Бода: $|Z| = f(\omega)$, $\varphi = \Phi(\omega)$. Далі для оцінювання електрохімічних процесів, які відбуваються в досліджуваному розчині, можна провести якісний аналіз цих кривих. Так, за зміною форми кривих Найквіста, залежно від змін концентрацій досліджуваних розчинів, можна якісно передбачити відсутність або наявність певних хімічних процесів, які можуть впливати на динаміку імпедансу, наприклад, дифузії, окислення-відновлення, переносу мас, швидкості кінетики тощо [105].

Разом із цим більш сучасним методом оцінювання є кількісне визначення певних електричних елементів (опору, ємності, індуктивності тощо), що їх розраховують на основі вищезазначених функціональних залежностей, і які можуть кількісно характеризувати електрохімічні особливості, вектор розвитку,

і за допомогою яких можна оцінити показники досліджуваних хімічних процесів (коефіцієнти дифузії, співвідношення концентрацій, константи швидкості реакцій тощо) [106, 107]. Вимірювальна комірка, яка містить електроди, та електрохімічні процеси, що відбуваються в ній під час вимірювання, можна змодельовати еквівалентним електричним ланцюгом [108]. З огляду на те, що в електрохімічній комірці під час вимірювання повного імпедансу досліджуваних хімічних розчинів відбувається перенос заряду між ними та електродами, тобто існують певні фарадеївські процеси, найбільш відповідною електричною моделлю вважають еквівалентний електричний ланцюг Рендлеса (рис. 2.1) [108, 109].

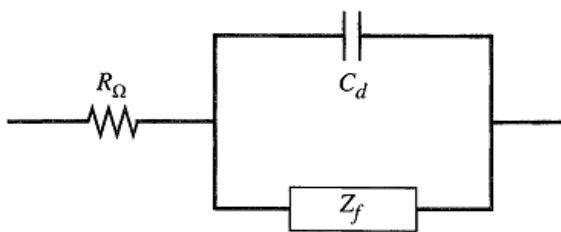


Рис. 2.1 Еквівалентний електричний ланцюг електрохімічної комірки з розчином

Ця електрична модель є послідовно-паралельним ланцюгом, у якому елемент R_Λ – це електричний опір досліджуваного розчину у вимірювальній комірці, а вимірювальні електроди комірки утворюють двошаровий електрохімічний конденсатор, еквівалентним відображенням якого є ємність C_d . Окислювально-відновлювальні реакції та інші електрохімічні процеси, що відбуваються в досліджуваних розчинах між пластинами цих електродів, ускладнюють цю систему, тому вони моделюються фарадеївським імпедансом – електричним опором Z_f , який залежить від частоти та розвитку електрохімічних процесів у досліджуваних розчинах і утворює з ємністю C_d паралельний ланцюг. Залежно від складності та особливостей електрохімічних процесів, що відбуваються в досліджуваних розчинах, розміщених у вимірювальній комірці, цей електричний елемент Z_f також можна подати у вигляді послідовного поєднання електричних елементів, наприклад, електричного опору R_s та ємності C_s

або електричного опору R_{ct} і так званого опору Варбурга Z_w , що залежить від частоти, тощо [109]. Ці електричні елементи ($R_{\square}$, R_{ct} , R_s , C_d , C_s тощо) розраховують за обраною моделлю еквівалентного електричного ланцюга, вони мають назву постійних фазових елементів. Постійні фазові елементи разом з опором Варбурга характеризують особливості та динаміку перебігу хімічних процесів у досліджуваних розчинах [105].

Отже, побудувавши за результатами вимірювань повного імпедансу відповідну електричну модель і розрахувавши її елементи, можемо оцінити особливості перебігу хімічних процесів та зробити висновки щодо комплексоутворення між досліджуваними речовинами та солями металів.

У ході проведення наших досліджень було використано обидва підходи – якісне оцінювання за кривими Найквіста і Бода та моделювання за допомогою електричного ланцюга, а також кількісне оцінювання його елементів і визначення за їх динамікою електрохімічних процесів, що відбувались у досліджуваних розчинах. Розраховували електричні моделі за допомогою програмного пакета EC-Lab V10.40, у якому реалізовано рандомізаційний і симплекс-методи обчислення параметрів електричних ланцюгів за повним циклом ітерацій до досягнення 5000 ітерацій.

Для шести молярних концентрацій амоксициліну, доксицикліну і кожного з досліджуваних металів, а також для таких співвідношень концентрацій амоксициліну або доксицикліну і відповідних металів: 0,17; 0,20; 0,25; 0,33; 0,50; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00 – було виміряно частотні залежності дійсної та уявної частин імпедансу, за якими побудовано криві Найквіста. Далі було проведено якісний аналіз кривих Найквіста, побудовано еквівалентні електричні моделі та розраховано їх електричні елементи ($R_{\square}$, C_d , Z_f).

Методика 8. ТШХ-метод для проведення ідентифікації в комбінованих таблетках амоксициліну та клавуланової кислоти

Розчинники для проведення аналізу:

0,1 М фосфатний буферний розчин з рН 7,0: 1,361 г калію дигідрофосфату Р розчиняють у воді Р і доводять тим самим розчинником до 100.0 мл. Доводять рН розчином 35г/л динатрію гідрофосфату Р.

Фосфатний буферний розчин з рН 4,0: 68,0 г калію дигідрофосфату Р розчиняють у воді Р, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 1000.0 мл та доводять рН до 4,0 фосфорною кислотою Р.

Суміш: 0,1 М фосфатний буферний розчин з рН 7,0/метанол Р (6/4 v/v)

Дослідження проводили на ТШХ-пластинці із шаром *силікагелю F254 Р* розміром 20×20 см. Обробляли пластину сумішшю 0,1 % динатрію едетату в фосфатному буферному розчині з рН 4,0 та залишали пластину на ніч. Пластинку активували безпосередньо перед аналізом, нагріваючи за температури 105 °С протягом 1 години. Пластину з нанесеними пробами поміщали у хроматографічну камеру, що містить суміш розчинників: *1-бутанол Р/ 0,1 % динатрію едетату у фосфатному буферному розчині з рН 4,0/оцтова кислота Р/бутил ацетат Р (1:2:6:10 об/об/об/об)*.

Об'єм проб: наносять у вигляді смуг 7 мм по 1 мкл випробовуваного розчину та розчину порівняння.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 15 см від лінії старту.

Висушування: на повітрі.

Виявлення: переглядають за довжини хвилі 254 нм.

Методика 9. ВЕТШХ- метод для проведення ідентифікації в комбінованих таблетках амоксициліну та клавуланової кислоти

Розчинники для проведення аналізу:

0,1 М фосфатний буферний розчин з рН 7,0: 1,361 г калію дигідрофосфату Р розчиняють у воді Р і доводять тим самим розчинником до 100.0 мл. Доводять рН розчином 35г/л динатрію гідрофосфату Р.

Фосфатний буферний розчин з рН 4,0: 68,0 г калію дигідрофосфату Р розчиняють у воді Р, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 1000,0 мл та доводять рН до 4,0 фосфорною кислотою Р.

Суміш: 0.1 М фосфатний буферний розчин з рН 7,0/метанол Р (6/4 v/v)

Аналіз проводили на пластині для ВЕТШХ з шаром *силікагелю F254 Р* розміром 10×10 см. Обробляли пластину сумішшю 0,1 % динатрію едетату в фосфатному буферному розчині з рН 4,0 та залишали пластинку на ніч.

Пластинку активували безпосередньо перед аналізом, нагріваючи за температури 105 °С протягом 1 години. Пластину з нанесеними пробами поміщали в камеру зі сумішшю розчинників: 1-бутанол *P* – 0,1 % динатрію едетату у фосфатному буферному розчині з рН 4,0 – оцтова кислота *P* – бутил ацетат *P* (1:2:6:10 об/об/об/об).

Об'єм проб: наносять у вигляді смуг 7 мм по 1 мкл випробовуваного розчину та розчину порівняння.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 8 см від лінії старту.

Висушування: на повітрі.

Виявлення: переглядають за довжини хвилі 254 нм.

Методика 10. Кількісне визначення амоксициліну тригідрату та калію клавуланату методом ВЕРХ

Розчини готують безпосередньо перед використанням.

Буферний розчин з рН 4,4. 7,8 г натрію дигідрофосфату розчиняють у 950 мл води *P* та доводять до рН 4,4±0,05 кислотою фосфорною розведеною *P*, після чого доводять до об'єму 1000,0 мл тим же розчинником та перемішують.

Для розділення компонентів було використано колонку ACE C18, заповнену силікагелем октадецилсилільним для хроматографії *P* (250 мм×4,6 мм, з розміром часток 5 мкм). Рухома фаза: буферний розчин з рН 4,4/метанол *P* (95/5 об/об), швидкістю руху 1,0 мл/хв, детектування речовин відбувалось за довжини хвилі 220 нм, об'єм інжекції – 20 мкл.

Методика 11. Кількісне визначення амоксициліну тригідрату та калію клавуланату методом УЕРХ

Розчини готують безпосередньо перед використанням.

Буферний розчин з рН 4,4. 7,8 г натрію дигідрофосфату розчиняють у 950 мл води *P* та доводять до рН 4,4±0,05 кислотою фосфорною розведеною *P*, після чого доводять до об'єму 1000,0 мл тим же розчинником та перемішують.

Аналіз виконували з використанням колонки ВЕН C18, заповненої силікагелем октадецилсилільним для хроматографії *P* (50 мм × 2.1 мм, з розміром

часток 1,7 мкм). Як рухому фазу було використано суміш *буферний розчин з рН 4,4/метанол Р* (98/2 об/об) зі швидкістю 0,1 Мл/хв. Об'єм інжекції складав 0,2 мкл, детектування відбувалось за довжини хвилі 220 нм.

Методика 12. Проведення тесту «Розчинення» для таблеток амоксициліну методом ВЕРХ

Середовище розчинення – вода Р, 900 мл.

Обладнання: прилад 2, швидкість обертання лопаті – 75 об/хв.

Час розчинення: 45 хв.

Температура середовища: 37 °С.

Буферний розчин з рН 4,4. 7,8 г натрію дигідрофосфату розчиняють у 950 мл води Р та доводять до рН $4,4 \pm 0,05$ кислотою фосфорною розведеною Р, після чого доводять до об'єму 1000,0 мл тим же розчинником та перемішують.

Для аналізу використали колонку, заповнену силікагелем *октадецилсилільним для хроматографії Р*, з розміром 250 мм×4,6 мм (наприклад, АСЕ С 18, яка має розмір часток 5 мкм). Рухома фаза: *буферний розчин з рН 4,4/метанол Р* (95/5 об/об), швидкість рухомої фази – 1 мл/хв. Детектування компонентів відбувалось за довжини хвилі 220 нм, об'єм інжекції розчинів складав 20 мкл.

Методика 13. Визначення вмісту домішок методом ВЕРХ

Буферний розчин рН 5,0. 250 мл 0,2 М розчину калію дигідроген фосфату доводять до рН $5,0 \pm 0,05$ 2 М розчином натрію гідроксиду та доводять до об'єму 1000,0 мл водою Р.

Для розділення компонентів було використано колонку, заповнену *силікагелем октилдецилсилільним для хроматографії Р* (наприклад, АСЕ С18, розміром 250 мм х 4,6 мм, 5 мкм). Як рухому фазу А було використано *буферний розчин з рН 5,0/ацетонітрилу Р* (99/1 об/об), як рухому фазу Б – *буферний розчин з рН 5,0/ацетонітрилу Р* (80/20 об/об). Програму градієнта наведено в таблиці 2.1. Швидкість потоку складала 1 мл/хв, детектування компонентів відбувалось за довжини хвилі 254 нм, об'єм інжекції 50 мкл.

Таблиця 2.1

Градiєнтна програма для методики 13

Час, хв	Рухома фаза А, %	Рухома фаза Б, %
0:00	92	8
9:00	92	8
34:00	0	100
49:00	0	100
50:00	92	8
65:00	92	8

Методика 14. Визначення вмісту домішок методом УЕРХ

Буферний розчин рН 5,0. 250 мл 0,2 М розчину калію дигідроген фосфату доводять до рН 5,0±0,05 2 М розчином натрію гідроксиду та доводять до об'єму 1000,0 мл водою Р.

Для аналізу використовували колонку із силікагелем октадецилсилільним для хроматографії Р (ВЕН С18 розміром 50 мм×2,1 мм, 1,7 мкм). Як рухомі фази використовували буферний розчин з рН 5,0/ацетонітрилу Р (99/1 об/об) (рухома фаза А) та буферний розчин з рН 5,0/ацетонітрилу Р (80/20 об/об) (рухома фаза Б). Швидкість потоку рухомої фази – 0,15 мл/хв, визначення речовин відбувалось за довжини хвилі 254 нм, об'єм інжекції становив 1 мкл. Програму градієнта наведено в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Градiєнтна програма для методики 14

Час, хв	Рухома фаза А, %	Рухома фаза Б, %
0:00	98	2
3:00	98	2
9:00	0	100
14:30	0	100
15:00	98	2
20:00	98	2

Методика 15. Визначення катіонного складу мінеральних вод методом УЕРХ

Нами було розглянуто методи, наявні в літературних джерелах [110-112]. Для визначення іонів методом УЕРХ дослідники пропонують такі умови: колонка ZIC-HILIC, PEEK 150*2,1мм, 3,5мкм, детектування за допомогою SEDEX 85LT, за температури колонки 40 °C та тиску 3,5 Бар, швидкість потоку 0,3 мл/хв, рухома фаза А – ацетонітрил, рухома фаза Б – амонію форміат, рН 3, градієнтне елюювання (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Градієнтна програма для методики 15

Час, хв	Рухома фаза А (%)	Рухома фаза Б (%)
0:00	20	80
3:00	20	80
10:00	80	20
13:00	80	20
15:00	20	80

Оскільки в нашому дослідженні ми використовували WATERS CORTECS UPLC HILIC У 1,6 мкм, швидкість потоку було зменшено до 0,2 мл / хв. Параметри детектора було змінено для детектора Waters ELS 2424: чутливість – 50, тиск – 50 psi, температура детектора 40 °C. Використовували ацетат амонію як буфер для рухомої фази А в тій же концентрації і доводили до рН 3,0.

Після оцінювання впливу рН розчину, швидкості потоку та умов детектування було розроблено оптимальні умови для проведення аналізу: рН 6 50мМ ацетатно-амонійного буфера та ацетонітрилу. Було розроблено градієнтну систему елюювання, аналіз тривав 40 хв. Швидкість потоку 0,1 Мл / хв. Градієнт А (буфер), Б (ацетонітрил): 0-7 хв (А) – 10 %, 16 хв (А) – 30 %, 16-21 хв (А) – 30 %, 22 хв (А) – 10 %, 22-40 хв (А) – 10 %.

РОЗДІЛ 3

ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ ДОКСИЦИКЛІНУ ТА АМОКСИЦИЛІНУ ІЗ СОЛЯМИ МЕТАЛІВ ЗА ДОПОМОГОЮ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОГО МЕТОДУ

Дослідження хімічних взаємодій лікарських засобів між собою є вкрай необхідним для забезпечення ефективної фармакотерапії. Експериментальне вивчення може бути проведено за допомогою як *in vivo*, так і *in vitro* методів. Результати хімічних та фізико-хімічних досліджень (*in vitro*) є значущими для визначення, коли *in vivo* дослідження необхідні для виявлення факту взаємодії, а коли їх можна не проводити та/або замінити на *in vivo* [85, 113].

Дослідження взаємодій *in vitro* можуть бути проведені з використанням різноманітних хімічних та фізико-хімічних методів [90, 96, 114]. Серед них найпростішими є основні методики якісного хімічного аналізу, так звані кольорові реакції. Проте не всі реакції взаємодії протікають із видимими змінами. Саме тому необхідні більш чутливі та точні методи, такі, як УФ-спектрофотометрія.

УФ-спектрофотометрія заснована на вимірюванні поглинання електромагнітного випромінювання речовиною, що аналізується [115]. Умовою поглинання є те, що енергія поглиненого кванта повинна дорівнювати різниці рівнів енергії досліджуваної системи. УФ-спектрофотометрія – це простий, швидкий та придатний метод для визначення формування комплексів у розчинах для систем, де процес комплексоутворення призводить до значної модифікації спектра поглинання молекули ліганду. Спектральні зміни дають інформацію про вплив комплексу на ефективність переносу електронів у хромофорі, а отже, корисні для визначення стехіометрії, стабільності та структури комплексів. Спектральні ефекти зазвичай асоціюються із зсувами або змінами інтенсивності смуги поглинання молекули ліганду. Формування комплексу антибіотик-метал може також проявлятися появою нових смуг поглинання або зникненням максимуму поглинання, у порівнянні із спектром вільного ліганду [116-118].

3.1 Можливості використання методу УФ-спектрофотометрії для визначення взаємодій

3.1.1 Застосування методу УФ-спектрофотометрії для визначення взаємодії доксицикліну

Широко відомо, що завдяки своїй хімічній будові антибіотики групи тетрацикліну здатні вступати у реакції взаємодії із різноманітними катіонами металів, утворюючи хелатні комплексні сполуки. Однак наявні в літературних джерелах дані свідчать, що, можливо, не всі антибіотики із групи здатні вступати у подібні реакції [119, 120].

Для розроблення та відпрацювання методики хімічного дослідження взаємодій, а також додаткової перевірки наявності взаємодії, нами було проведено попереднє дослідження із додаванням солей кальцію, магнію, алюмінію, заліза(II) та заліза(III) до доксицикліну із подальшою фіксацією змін за допомогою УФ-спектрофотометрії.

Для цього готували розчини доксицикліну із додаванням зазначених солей у стехіометричних співвідношеннях, відповідно до їхньої валентності: співвідношення доксицикліну до кальцію, магнію та заліза(II) складало 2:1, а для алюмінію та заліза(III) – 3:1. Як розчинник використовували 0, 1 М кислоту хлористоводневу. Детальну методику наведено в розд. 2, п. 2.2.

Після цього вимірювали оптичну густину отриманих розчинів в ультрафіолетовій та видимій ділянці спектра від 220 до 400 нм.

На рис. 3.1 наведено спектри поглинання розчинів доксицикліну із додаванням солей кальцію, магнію та алюмінію, а також контрольного розчину доксицикліну. На спектрі спостерігаємо два максимуми поглинання за довжини хвилі 270 та 346 нм. Водночас відбувається зміна оптичної густини розчинів доксицикліну із додаванням усіх трьох солей на обох максимумах, у порівнянні із контрольним розчином. Як видно з рис. 3.1, рис 3.2 та з даних порівняльних таблиць 3.1 та 3.2, найбільше зростання оптичної густини спостерігається для розчину доксицикліну із Al^{3+} – близько 21 % за двома максимумами.

Для розчину доксицикліну із додаванням солі кальцію зміна є меншою, але також значущою, тоді як за додавання до розчину доксицикліну солі магнію зміна складає всього близько 10 %. Найменшою є різниця оптичної густини солей заліза(II) та (III), її значення невисоке і коливається від 6 до 2,5 %.

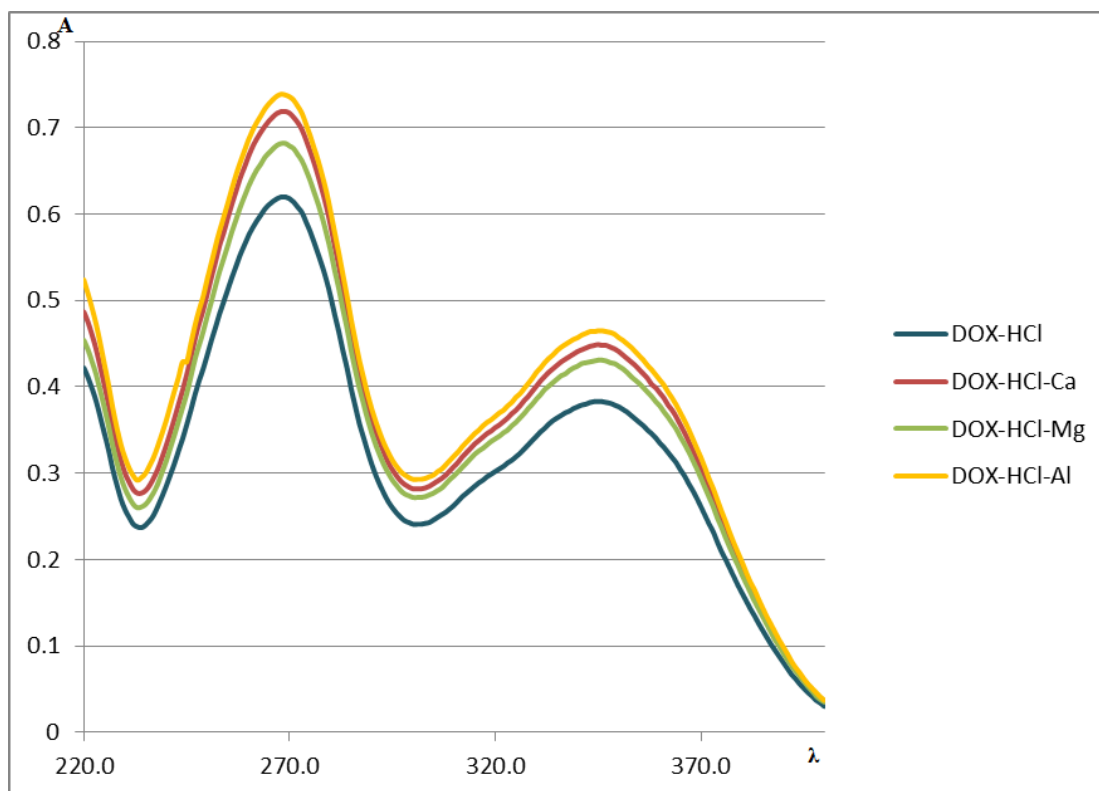


Рис. 3.1 Характеристичні УФ-спектри доксицикліну у середовищі 0,1 М кислоти хлористоводневої та з додаванням солей Ca, Mg, Al

Таблиця 3.1

**Порівняльна таблиця оптичної густини розчинів доксицикліну
із солями кальцію, магнію та алюмінію у 0,1 М HCl**

Розчин	A_{270}	Різниця, %	A_{346}	Різниця, %
Докс-HCl	0,618	-	0,383	-
Докс-Ca	0,719	16,3 %	0,448	17 %
Докс-Mg	0,679	9,8 %	0,431	12,5 %
Докс-Al	0,736	19 %	0,464	21 %

**Порівняльна таблиця оптичної густини розчинів доксицикліну
із солями заліза(II) та (III) у 0,1 М НСІ**

Розчин	A_{270}	Різниця, %	A_{346}	Різниця, %
Докс-НСІ	0,683	-	0,438	-
Докс-Fe(II)	0,642	-6,0 %	0,412	-5,9 %
Докс-Fe(III)	0,711	4,1 %	0,449	2,5 %

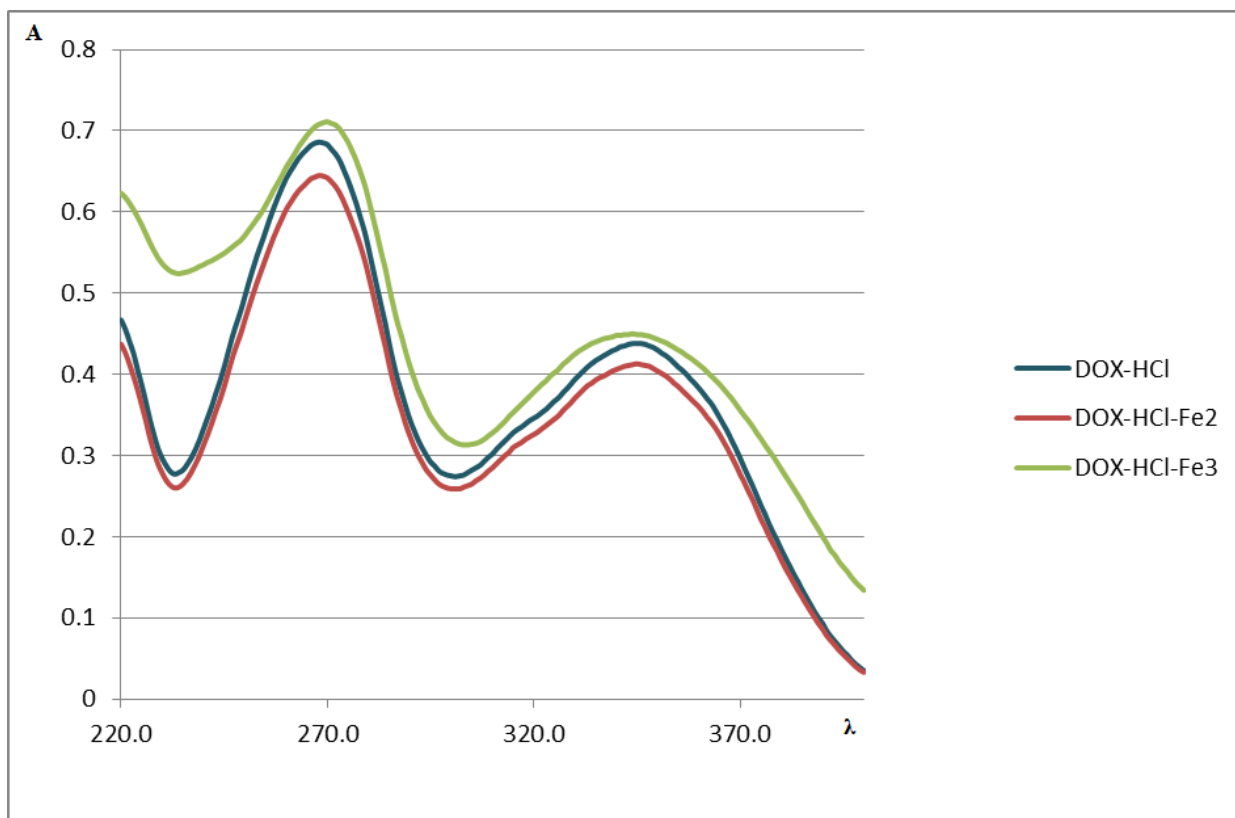


Рис. 3.2 Характеристичні УФ-спектри доксицикліну у середовищі 0,1 М кислоти хлористоводневої та з додаванням солей Fe(II), Fe(III)

3.1.2 Попереднє дослідження взаємодії амоксициліну із солями металів

Для виявлення можливої взаємодії солей металів із амоксициліном спочатку було вирішено провести якісні реакції з солями Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} у середовищі 0,1 М хлористоводневої кислоти, 0,1 М натрію гідроксиду та води очищеної (таблиця 3.3).

**Результати попередніх якісних реакцій взаємодії амоксициліну
із солями металів**

Сіль Розчинник	CaCl ₂	MgSO ₄	Al ₂ (SO ₄) ₃	FeSO ₄	FeCl ₃
0,1M HCl	Без візуальних змін	Без візуальних змін	Без візуальних змін	Опалесценція	Вишнево-червоне забарвлення
0,1M NaOH	Без візуальних змін	Без візуальних змін	Без візуальних змін	Осад зеленого кольору у вигляді пластівців	Розчин та осад жовтого кольору у вигляді пластівців
Вода очищена	Без візуальних змін	Без візуальних змін	Без візуальних змін	Без візуальних змін	Без візуальних змін

Оскільки реакції комплексоутворення не завжди супроводжуються візуальними змінами, на наступному етапі нашого дослідження було вирішено застосувати фізико-хімічні методи.

Розчин амоксициліну у 0,1 М HCl є прозорою рідиною. У середовищі 0,1 М HCl видимих змін у розчинах амоксициліну із солями кальцію, магнію та алюмінію не спостерігали, тоді як у розчині із додаванням солі заліза(II) з'явилась опалесценція. Розчин амоксициліну із додаванням заліза(III) хлориду набув вишнево-червоного кольору.

Під час проведення експерименту в середовищі 0,1 М NaOH для розчинів амоксициліну із солями кальцію, магнію та алюмінію видимих змін не спостерігали. За додавання до безбарвного розчину амоксициліну солей Fe²⁺ випав зелений осад у вигляді пластівців, з солями Fe³⁺ було отримано жовте забарвлення з жовтим осадом у вигляді пластівців. Подібні візуальні ефекти говорять про утворення гідроксидів заліза(II) та (III), що унеможливорює подальше проведення експерименту в середовищі 0,1 М NaOH.

3.2 Дослідження взаємодії амоксициліну із солями металів методом УФ-спектрофотометрії

3.2.1 Метод стехіометричних співвідношень

У цьому експерименті взаємодію солей металів з амоксициліном досліджували шляхом вимірювання оптичної густини розчинів амоксициліну з додаванням відповідних солей металів. Точну наважку солей металів розраховували у стехіометричних співвідношеннях, відповідно до їхньої валентності, та додавали до точної наважки субстанції амоксициліну. Так, співвідношення амоксициліну до кальцію, магнію та заліза(II) складало 2:1, а для алюмінію та заліза(III) – 3:1. Як розчинник використовували 0, 1 М кислоту хлористоводневу. Детальну методику наведено в розд. 2, п.2.2.

Оптичну густину розчинів вимірювали за довжини хвилі 210-300 нм. Спектри поглинання розчинів металів із амоксициліном подано на рис. 3.3 та рис. 3.4.

Як видно на рис. 3.3, максимуми поглинання амоксициліну в середовищі 0,1 М кислоти хлористоводневої спостерігаються за 230 ± 1 нм та 273 ± 1 нм. Спостерігається зміна оптичної густини розчинів амоксициліну із додаванням кальцію та магнію у порівнянні із контрольним розчином амоксициліну. Так, для контрольного розчину амоксициліну $A_{230}=0,236$, а для комплексів амоксициліну із кальцієм та магнієм – $A_{230}=0,268$ (збільшення інтенсивності оптичної густини на 13,5 %).

На рис. 3.4 для розчинів алюмінію, заліза(II) та (III) також спостерігається зміна оптичної густини. Крім того, важливо зазначити, що для розчину амоксициліну із додаванням солей заліза(III) також спостерігається зміна характеру спектра – максимум за довжини хвилі 273 нм майже відсутній.

Для контрольного розчину амоксициліну $A_{230}=0,161$, для комплексу амоксициліну з алюмінієм $A_{230}=0,188$ (збільшення інтенсивності оптичної густини на 17 %); для заліза(III) – $A_{230}=0,261$ (збільшення інтенсивності оптичної густини на 62 %); для заліза(II) спостерігалось незначне зменшення оптичної густини $A_{230}=0,153$ (5 %), проте цю зміну можна вважати несуттєвою.

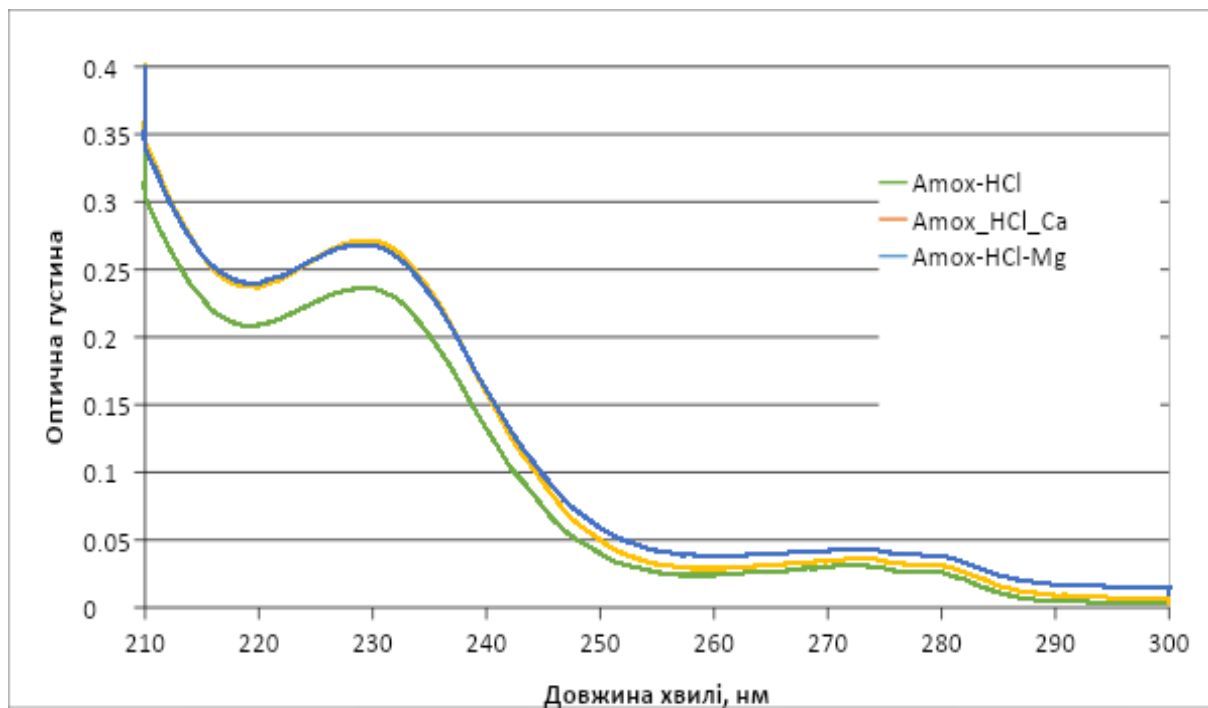


Рис. 3.3 Характеристичні УФ-спектри розчину амоксициліну в середовищі 0,1 М кислоти хлористоводневої та з додаванням солей Ca та Mg

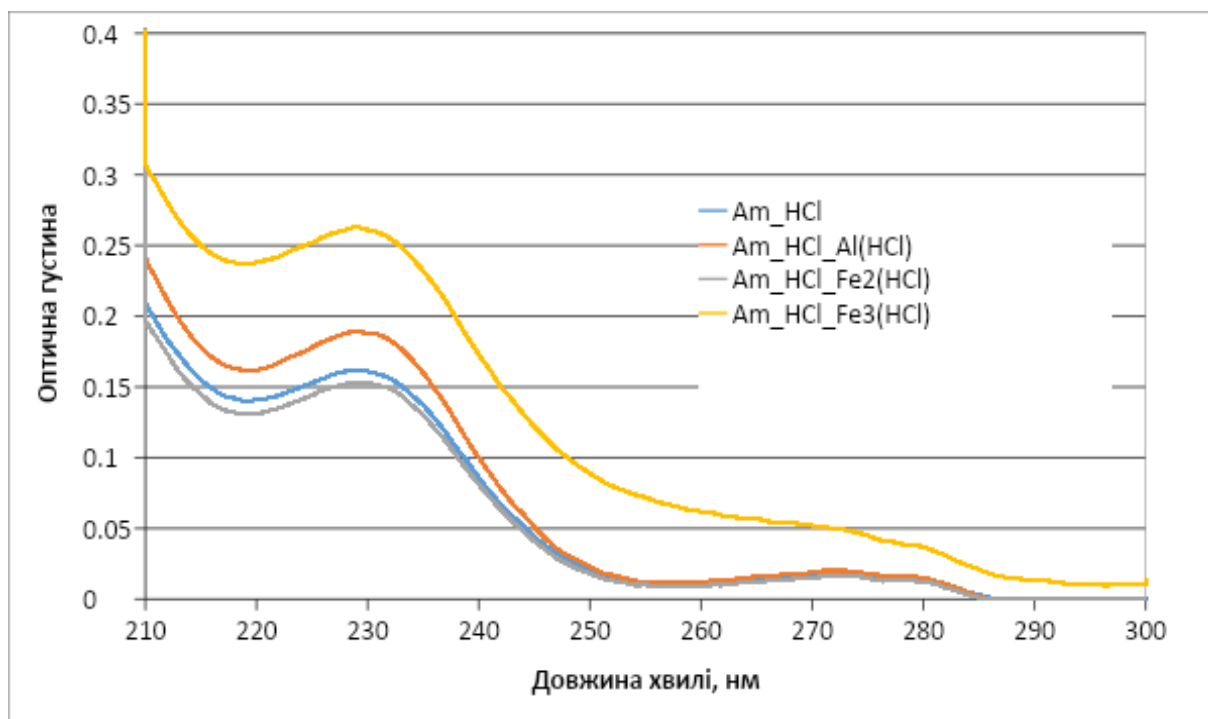


Рис. 3.4 Характеристичні УФ-спектри розчину амоксициліну в середовищі 0,1 М кислоти хлористоводневої та з додаванням солей Al, Fe(II), Fe(III)

Отже, за результатами попередніх досліджень можемо припустити, що амоксицилін здатен вступати у взаємодію із солями заліза(III), кальцію, магнію та алюмінію.

3.2.2 Метод Джоба

Для аналізу можливого комплексоутворення було використано метод ізомолярних серій Джоба, який широко застосовують для вивчення метало-органічних взаємодій [86, 121]. Зазвичай дослідження методом ізомолярних серій проводять, зливаючи ізоконцентратні (найчастіше ізомолярні) розчини компонентів у різних співвідношеннях, але за постійної суми вихідних об'ємів. Ізомолярності розчинника в цьому випадку досить точно дотримуються лише в разі роботи з розведеними розчинами. Після чого вихідні розчини змішують у відповідних концентраціях, отримують значення оптичної густини за певної визначеної довжини хвилі та будують графік залежності оптичної густини (або різниці оптичної густини) за певного співвідношення компонентів. На таких графіках, як правило, є точка перегину, яка відповідає співвідношенню, за якого утворюється комплекс метал -ліганд.

Тому в нашому експерименті ми приготували вихідні розчини амоксициліну та солей металів з однаковими молярними співвідношеннями (1×10^{-3} моль / л), які далі розводили 0,1 М кислотою хлористоводневою для отримання кінцевих співвідношень антибіотика та солі 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1. Поглинання отриманих розчинів вимірювали спектрофотометрично. УФ-спектр амоксициліну в 0,1 М кислоти хлористоводневої має три максимуми за довжини хвилі 203 нм, 230 ± 1 нм та 272 ± 1 нм. Перші максимуми коливаються за додавання різних солей від 202 до 208 нм. Для контролю було враховано зміни абсорбції на всіх максимумах. В експерименті з солями кальцію спостерігалось пропорційне збільшення оптичної густини в усіх трьох максимумах відповідно до збільшення концентрації антибіотика. Це може означати, що взаємодії із солями кальцію в заданих умовах не відбулось (рис. 3.5).

Під час додавання солей магнію максимум поглинання за 273 нм спостерігали на графіку Джоба для розчину із співвідношенням 5: 5 (1:1). Оптична густина досягла піку в цій точці, а потім залишалась стабільною – наступні розчини із співвідношенням 6:4 (3:2) і далі виявляють приблизно таку саму оптичну гуστину, як розчин 5: 5 (1:1) (рис. 3.6, рис. 3.7). Це може свідчити про утворення декількох комплексних сполук. Або про утворення тільки однієї комплексної сполуки зі співвідношенням амоксициліну до солі 1:1.

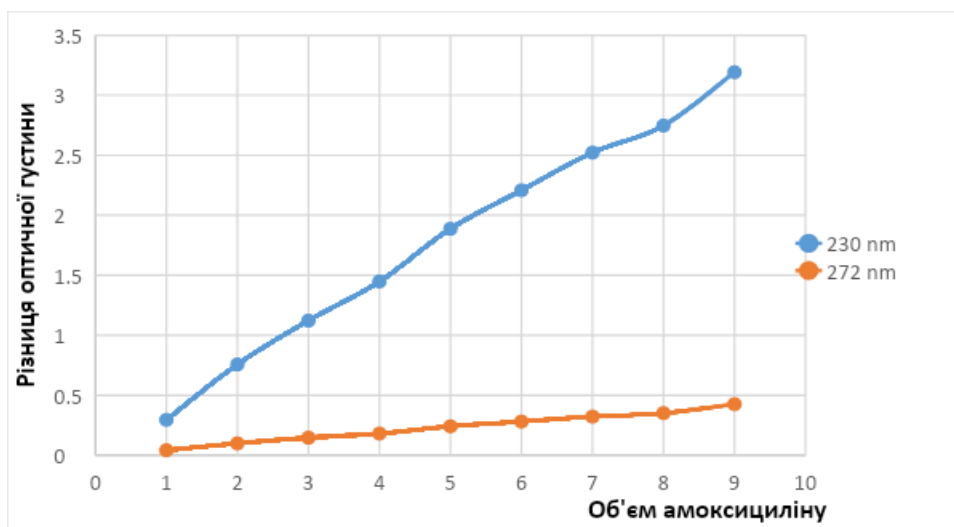


Рис 3.5 Графік Джоба для амоксициліну та кальцію у 0,1 М НСІ за довжин хвиль 230 нм, 272 нм

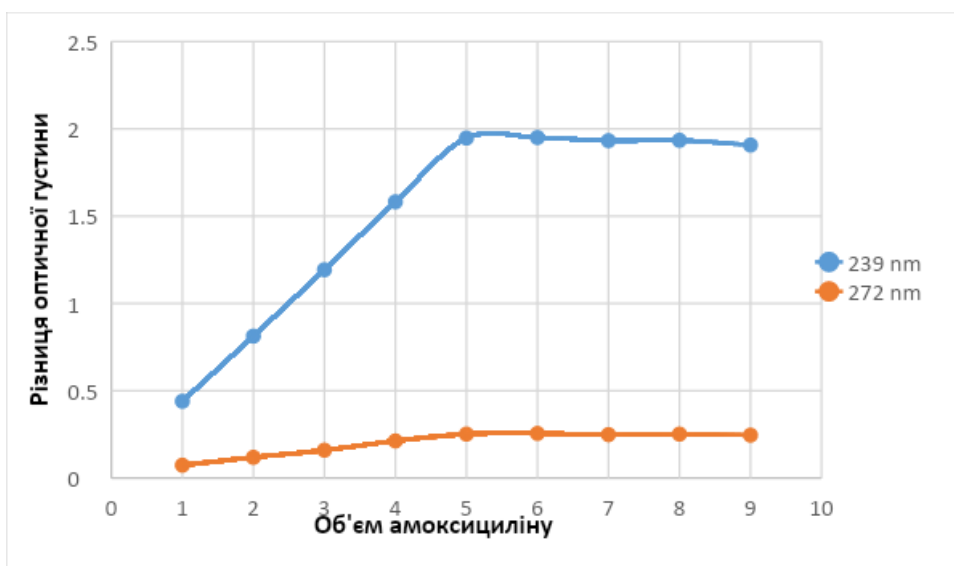


Рис 3.6 Графік Джоба для амоксициліну та магнію у 0,1 М НСІ за довжин хвиль 239 нм, 272 нм

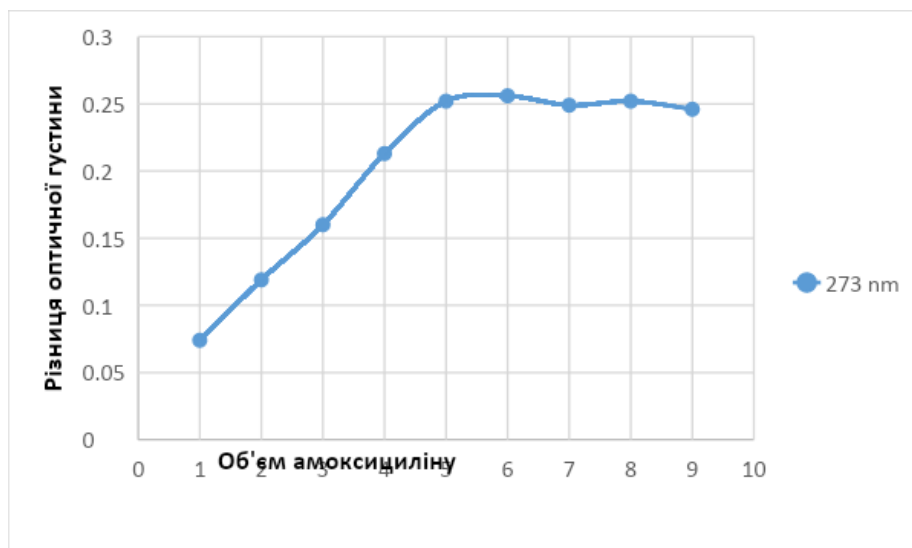


Рис 3.7 Графік Джоба для амоксициліну та магнію у 0,1 М НСІ за довжини хвилі 273 нм

3.3 Верифікація тесту розчинення для капсул доксицикліну хіклату

Тест розчинення – це лабораторний тест, який оцінює, як ефективно АФІ вивільняється зі своєї лікарської форми. Під час розробки ЛЗ профілі розчинення використовують для того, щоб зрозуміти вплив складу композиції та параметрів виробничого процесу на вивільнення АФІ *in vitro* [39, 102]. Тест розчинення *in vitro* є фармакопейним методом та широко використовується для контролю якості готових твердих лікарських форм, у процесі розробки лікарських засобів, а також для оцінювання біоеквівалентності ЛЗ методом «біовер» на основі біофармацевтичної класифікації (БСК) [39, 102].

Однак для проведення тесту розчинення капсул доксицикліну хіклату рекомендації в ДФУ відсутні. Американська фармакопея рекомендує проводити тест розчинення капсул доксицикліну з використанням апарата для проведення тесту розчинення, воду очищену та детектування за допомогою УФ-спектрофотометрії за довжини хвилі 276 нм [40]. Відповідно до сучасних фармакопейних вимог перед застосуванням у аналізі ЛЗ аналітична методика має бути валідована, для того щоб пересвідчитись, що певний склад ЛЗ не призводить до неприйнятних змін правильності, лінійності або точності методу [39,

122]. Для валідованих методик та тестів, внесених до фармакопеї, необхідна лише верифікація для підтвердження на основі експериментальних даних, що певна фармакопейна методика буде відтворена коректно в конкретній лабораторії [123, 124].

Дослідження проводили відповідно до методики, наведеній у розд. 2, п. 2.4.

Для встановлення повної невизначеності аналізу Δ_{AS} визначили невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) та невизначеність кінцевої аналітичної операції, враховуючи досліджуваний розчин та розчин порівняння, а також не менше ніж три паралельні вимірювання оптичної густини з вийманням кювети. Відповідно до проведених розрахунків повна невизначеність аналізу склала 1,04 %, що не перевищує визначений критерій у 3 % та відповідає вимогам [125, 126].

Для підтвердження специфічності методики досліджували вплив плацебо. Для цього приготували розчин препарату (A_{st}) та розчин плацебо (A_{plac}) – суміш лактози моногідрату та кальцію стеарату. Після чого проводили паралельне вимірювання оптичної густини розчину плацебо (A_{plac}) та розчину порівняння (A_{st}), роблячи три вимірювання із вийманням кювети. Було отримано такі результати дослідження специфічності методики : $A_{plac} = 0,0034$; $A_{st} = 0,648$. Сумарне поглинання розчину (T_{esc}^{TM}) складає : $\delta_{esc} = \frac{100 \cdot 0,0034}{0,648} = 0,51 \% \leq 0,32 \cdot 3,0 = 0,96$.

Отже, методику можна вважати специфічною, адже отримане значення систематичної похибки є меншим від критерію прийнятності аналітичної методики ($0,51 \% \leq 0,96 \%$), а також виконується задана рівність [125, 126].

Вивчення лінійності проводили на 9 точках у межах досліджуваного діапазону методики 55-135 %, з кроком 10 %. При цьому проводили паралельно по три вимірювання оптичної густини кожної концентрації досліджуваних зразків та зразків порівняння. Отримані результати обробляли за допомогою статистичних методів відповідно до вимог ДФУ.

На рис. 3.8 наведено графік залежності оптичної густини від концентрації доксицикліну хіклату в нормалізованих координатах. Розрахування параметрів лінійної залежності для доксицикліну було виконано методом найменших квадратів. Було розраховано кутовий коефіцієнт b , вільний член лінійної залежності a , залишкове стандартне відхилення, дисперсії констант b і a , стандартні відхилення s_b та s_a , коефіцієнт кореляції r , лінійний коефіцієнт кореляції та стандартне відхилення s_r . Результати цих розрахунків наведено в табл. 3.4 і 3.5.

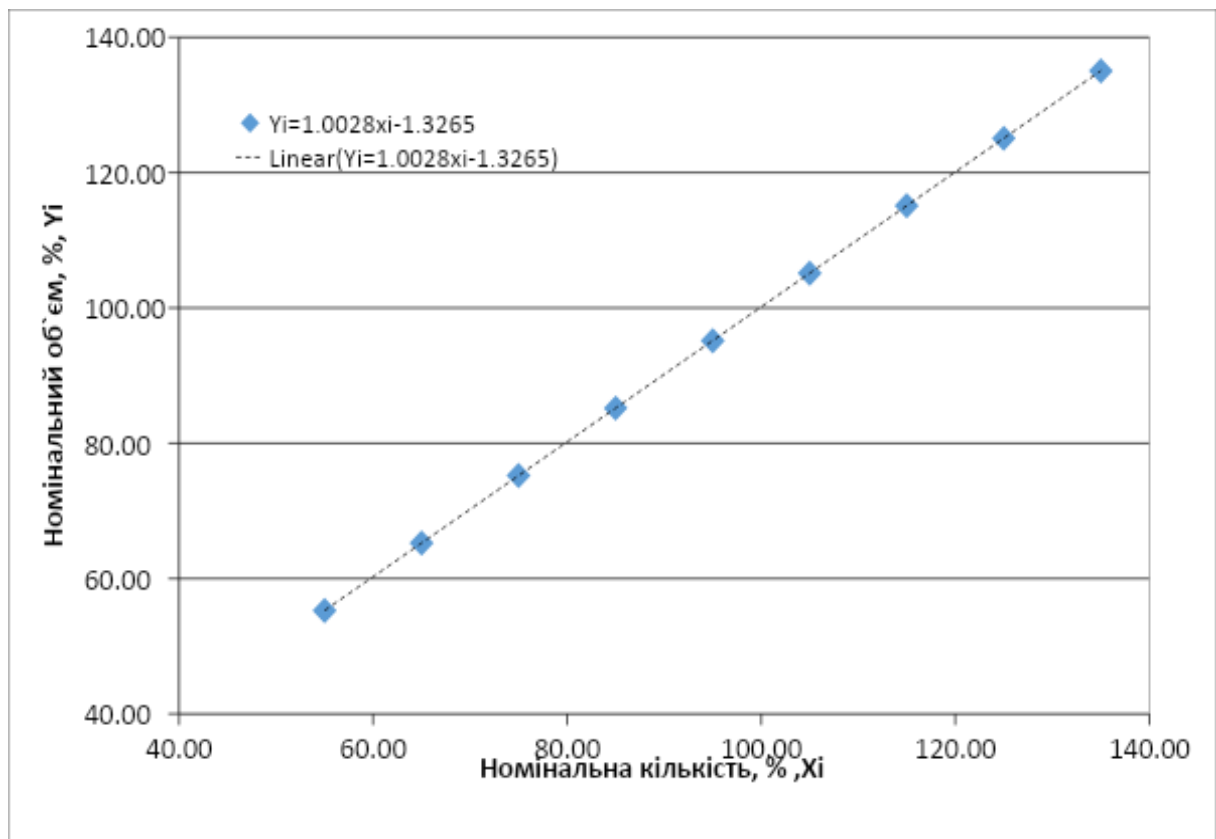


Рис. 3.8 Графік залежності оптичної густини від концентрації доксицикліну в нормалізованих координатах

Правильність оцінювали за двома критеріями: критерієм статистичної незначущості та критерієм практичної незначущості.

За результатом аналізу, систематична похибка досліджуваної методики, що дорівнює 0,22, не перевищує критерій статистичної незначущості 0,37 та

задовольняє вимоги [125]. Якщо наведене вище співвідношення не виконується, використовують критерій незначущості цієї систематичної похибки проти максимально припустимою невизначеністю аналізу, що дорівнює 0,96 [40, 124]. Отримані практичні значення не перевищують встановленого критерію.

Таблиця 3.4

**Результати вивчення лінійності на модельних сумішах
доксидикліну хіклату**

№ модельного розчину	Введено, X_i (%)	Оптична густина, A_i ($A_{st}=0,6820$)	Знайдено $Y_i = \frac{A_i}{A_{st}} \cdot 100$	$Y_i = b \cdot X_i + a$
1.	55,00	0,3803	55,67	55,28
2.	65,00	0,4403	64,45	65,25
3.	75,00	0,5150	75,38	75,22
4.	85,00	0,5913	86,55	85,19
5.	95,00	0,6503	95,18	95,16
6.	105,00	0,7073	103,53	105,13
7.	115,00	0,7867	115,14	115,10
8.	125,00	0,8507	124,50	125,08
9.	135,00	0,9297	136,07	135,05

Таблиця 3.5

**Метрологічні характеристики лінійної залежності
для модельних сумішей доксидикліну хіклату**

Величина	Значення	Критерій (для діапазону 55-135 %), $n = 9$	Висновок
b	0,9971	-	-
S_b	0,0125	-	-
a	0,4349	1) $\leq 1,8946 \cdot s_a = 3,1174$; 2) якщо не виконується 1), то $\leq 2,56$	Відповідає
S_a	1,2351	-	-
S_o	0,9746	$\frac{s_o}{b} = 0,9746 \leq 1,5834$;	Відповідає
r	0,9994	$\geq 0,9924$	Відповідає

Для визначення прецизійності було розраховано збіжність методики. Вона характеризує прецизійність методики за її виконання в одних і тих самих умовах протягом невеликого проміжку часу [39]. Збіжність аналітичної методики звичайно характеризують відхиленням, стандартним відхиленням або відносним стандартним відхиленням для серії вимірювань [39].

Було розраховано статистичні характеристики: середнє значення $\bar{Z}$ та відносне стандартне відхилення, що становлять 100,22 % та 1,0076 % відповідно. Згідно з вимогами однобічний довірчий інтервал Δ_Z не має перевищувати максимально допустиму невизначеність аналізу Δ_{AS} :

$$\Delta_Z = s_Z(\%) \cdot t(95\%, n - 1) \leq \max \Delta_{AS}; \Delta_Z = 1,0076 \cdot 1,8595 = 1,8736 \leq 3,0$$

Експериментальні дані, отримані під час дослідження, задовольняють вимогам систематичної похибки – довірчий інтервал не перевищує максимально припустиму невизначеність [126, 127].

Отримані та розраховані результати, а також їхні статистичні характеристики наведено в табл. 3.6.

Таблиця 3.6

Результати аналізу модельних сумішей доксицикліну хіклату

№	Аліквота, мл	Введено до номінальної кількості, (Xi, %)	Оптичні густини, A_i ($A_{st} = 0,682$)	Знайдено до номінального об'єму (Yi, %)	Знайдено у % до введенного $Z_i = 100 \cdot \frac{Y_i}{X_i}$
1	2	3	4	5	6
1	1,1	55,0	0,3803	55,67	101,21
2	1,3	65,0	0,4403	64,45	99,15
3	1,5	75,0	0,5150	75,38	100,50
4	1,7	85,0	0,5913	86,55	101,82
5	1,9	95,0	0,6503	95,18	100,19
6	2,1	105,0	0,7073	103,53	98,60
7	2,3	115,0	0,7867	115,14	100,12
8	2,5	125,0	0,8507	124,50	99,60

Продовження табл. 3.6

1	2	3	4	5	6
9	2,7	135,0	0,9297	136,07	100,79
Середнє значення, Z , %					100,22
Відносне стандартне відхилення, S_z , %					1,0076
Відносний довірчий інтервал, Δ_z , %= $t(95\%,8) \cdot S_z$					1,8737
Критичне значення для збіжності результатів, Δ_{AS} , %					3,0
Систематична похибка, δ , %					0,22
Критерій статистичної невизначеності систематичної похибки, δ , %					0,62
Критерій практичної невизначеності систематичної похибки, δ , %					0,96
Загальний висновок про методику					Коректна

У ході проведеного аналізу та верифікації модельних сумішей доксицикліну хіклату за методикою тесту «Розчинення», рекомендованою Фармакопеею США, доведено її коректність в умовах вітчизняної лабораторії [126]. Отримані експериментальні дані задовольняють усі встановлені критерії. Прогноз повної невизначеності запропонованої методики відповідає критеріям прийнятності, що підтверджує можливість застосування методики в подальших дослідженнях.

3.4 Визначення вмісту катіонів кальцію та магнію у відібраних зразках мінеральних/столових вод

3.4.1 Визначення вмісту катіонів кальцію та магнію в мінеральних/столових водах методом комплексометричного титрування

Для експерименту було обрано мінеральні води із найбільшим декларованим мінеральним складом серед усіх наявних на українському ринку. Вміст мінеральних речовин у складі мінеральних вод є регламентованим у певному діапазоні допускних концентрацій та зазначений виробником на пляшці. Тому на першому етапі необхідно було визначити точний кількісний вміст катіонів кальцію та магнію в обраних для дослідження зразках мінеральних вод.

Для цього було проведено титрування методом комплексометрії (відповідно до методики, описаної в розд. 2, п.2.4). Результати аналізу наведено в табл. 3.7.

Таблиця 3.7

**Результати кількісного визначення вмісту катіонів кальцію та магнію
у мінеральних водах, виконаного методом
комплексометричного титрування**

№	Об'єм титранту, мл			Кількісний вміст, х, мг/л					
	для титрування Ca ²⁺	для титрування суми катіонів	різниця об'ємів (об'єм для титрування Mg ²⁺)	Ca ²⁺			Mg ²⁺		
				визначений практично		зазначений виробником	визначений практично		зазначений виробником
					середнє			середнє	
«Карпатська джерельна»									
1	13,5	15,5	2	108,22	109,2	50- 200	9,72	9,72	<50
2	13,6	15,7	2,1	109,02			10,21		
3	13,7	15,6	1,9	109,82			9,24		
«Трускавецька»									
1	11,6	21,9	10,3	92,99	93,79	10- 180	50,08	49,43	<100
2	11,8	21,9	10,1	94,59			49,11		
3	11,7	21,8	10,1	93,79			49,11		
«Боржомі»									
1	9,2	15,2	6	73,75	73,75	70- 150	29,17	29,17	<50
2	9,0	14,9	5,9	72,14			28,69		
3	9,3	15,4	6,1	74,55			29,66		
«Єсентуки № 17»									
1	11,1	17,1	6	88,98	88,71	50- 200	29,17	29,82	<150
2	11,1	17,2	6,1	88,98			29,66		
3	11	17,3	6,3	88,18			30,63		

Результати проведеного дослідження засвідчили, що кількісний вміст кальцію є найбільший у зразках «Карпатська джерельна» та «Трускавецька», відповідає середньому значенню діапазону концентрацій, зазначеного виробником на пляшці. Вміст кальцію в інших водах є значно меншим за середнє значення, зазначене виробником (табл. 3.8). Водночас вміст магнію у всіх досліджуваних водах відповідає визначеним обмеженням та є мінімальний.

Для вивчення впливу мінеральних вод на розчинення таблеток амоксициліну використовували інші серії мінеральних вод. Оскільки відомим є те, що склад мінеральних вод може коливатись значно залежно від серії, для відібраних зразків мінеральних вод, що їх застосовували в експерименті з амоксициліном, було проведено визначення кількісного вмісту катіонів кальцію та магнію. Для цього було виконано титрування методом комплексометрії (відповідно до методики, описаної в розд. 2, п. 2.4). Результати аналізу наведено в табл. 3.8 та 3.9.

Таблиця 3.8

Результати кількісного визначення вмісту катіонів кальцію та магнію у мінеральних водах, виконаного методом комплексометричного титрування (2)

№	Об'єм титранту, мл			Кількісний вміст, х, мг						
	для титрування Ca ²⁺	для титрування суми катіонів	різниця об'ємів (об'єм для титрування Mg ²⁺)	Ca ²⁺			Mg ²⁺			
				визначений практично	середнє	зазначений виробником	визначений практично	середнє	зазначений виробником	
«Карпатська джерельна»										
1	6,1	7,5	1,4	48,41	48,41	50-200 мг/л	6,74	7,86	<50 мг/л	
2	6,5	8,5	2	51,58			9,63			
3	6,2	7,7	1,5	49,20			7,22			
«Боржомі»										
1	5,6	10,4	4,8	44,44	44,44	20-150 мг/л	23,10	24,55	<150 мг/л	
2	5,2	10,2	5	41,27			24,07			
3	5,1	10,6	5,5	40,47			26,47			
«Трускавецька»										
1	5,5	11,9	6,4	43,65	43,65	10-180 мг/л	30,81	28,26	<100 мг/л	
2	5,6	12	6,4	44,44			31,12			
3	7	11,7	4,7	55,55			22,85			
«Єсентукі № 17»										
1	6	11,7	5,7	47,62	47,09	50-200 мг/л	27,44	26,79	<150 мг/л	
2	5,6	11,5	5,9	44,44			28,40			
3	6,2	11,3	5,1	49,20			24,55			

Таблиця 3.9

Результати кількісного визначення вмісту катіонів кальцію та магнію у харківських джерельних та водопровідній водах, виконаного методом комплексонометричного титрування (3)

№	Об'єм титранту, мл			Кількісний вміст, х, мг			
	для титрування Ca^{2+}	для титрування суми катіонів	Різниця об'ємів (об'єм для титрування Mg^{2+})	Ca^{2+}		Mg^{2+}	
					Середнє		Середнє
«Харківська-1»							
1	8,9	10,4	1,5	70,63	64,02	7,22	11,23
2	7,2	10,7	3,5	57,14		16,85	
3	8,1	10,1	2	64,28		9,63	
«Харківська-2»							
1	7,7	9,4	1,7	61,11	56,61	8,18	10,91
2	6,7	9,8	3,1	53,17		14,92	
3	7	9	2	55,55		9,63	
Водопровідна вода							
1	6	8	2	47,62	47,09	9,63	11,71
2	6,1	8,9	2,8	48,41		13,48	
3	5,7	8,2	2,5	45,23		12,03	

Як видно з результатів, наведених у таблицях 3.8 та 3.9, вміст кальцію є найбільший у мінеральній воді «Харківська-1», «Харківська-2» та «Карпатська джерельна». Вміст катіонів кальцію в досліджуваних мінеральних водах «Боржомі» та «Трускавецька» відповідає діапазону концентрацій, зазначеному виробником. Вміст кальцію у водопровідній воді та мінеральній воді «Трускавецька» є найменший, а вміст катіонів кальцію у воді «Єсентуки № 17» та «Карпатська джерельна» є нижчим за середнє значення діапазону концентрації, зазначене виробником. Проте верхня межа цього діапазону відповідає високому показнику вмісту кальцію.

Вміст магнію є найбільший у мінеральній воді «Трускавецька» та в усіх досліджуваних зразках відповідає середньому значенню діапазону концентрацій, зазначеному виробником.

Сумарний вміст катіонів є найбільший у таких мінеральних вод, як «Харківська-1», «Єсентуки № 17» та «Трускавецька».

3.4.2 Визначення вмісту катіонів кальцію та магнію в мінеральних/столових водах УЕРХ-методом

Для підтвердження результатів титриметричного визначення було розроблено метод УЕРХ одночасного визначення вмісту катіонів Ca^{2+} , Mg^{2+} , а також Na^+ , K^+ ; аніонів Cl^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} .

Аналіз УЕРХ проводили за допомогою хроматографічної системи Waters 2695, для детектування використовували детектор Waters ELS 2424. Розділення проводили з використанням WATERS CORTECS UPLC HILIC 1,6 мкм. Колонка HILIC частково забезпечує одночасні властивості таких хроматографічних методів, як іонна хроматографія і рідинна хроматографія з оберненою фазою, що дозволяє розділяти навіть такі аналіти, як катіони та аніони. У ході досліджень оцінювали вплив рН розчину, швидкість потоку та умови детектування.

На першому етапі ми підготували розчин хлориду натрію в концентрації 0,1М, щоб дослідити вплив органічного вмісту рухомої фази на поділ аналітів. Згідно з отриманими даними, коли кількість ацетонітрилу складала 20 %, поділу не спостерігалось. У разі підвищення концентрації органічного розчинника час утримування обох іонів значно збільшився. Крім того, роздільна здатність між іонами зростала зі збільшенням вмісту органічного розчинника – ацетонітрилу. Коли кількість ацетонітрилу становила 80 %, було досягнуто прийнятне розділення між іонами, але час аналізу був занадто тривалим, тому ми вирішили використовувати градієнтний режим.

Оптимальні результати розділення було досягнуто використанням рН 6,0 50 ммоль ацетатно-амонійного буфера та ацетонітрилу. Було розроблено градієнтну систему елюювання, аналіз тривав 40 хв. Швидкість потоку 0,1 Мл / хв. Градієнт А (буфер), Б (ацетонітрил): 0-7 хв (А) – 10 %, 16 хв (А) – 30 %, 16-21 хв (А) – 30 %, 22 хв (А) – 10 %, 22-40 хв (А) – 10 %. У мінеральних водах виявлено іони хлоридів, сульфатів, натрію, калію та кальцію. Типову хроматограму подано на рис. 3.9. Часи утримування визначуваних катіонів та аніонів наведено в табл. 3.10.

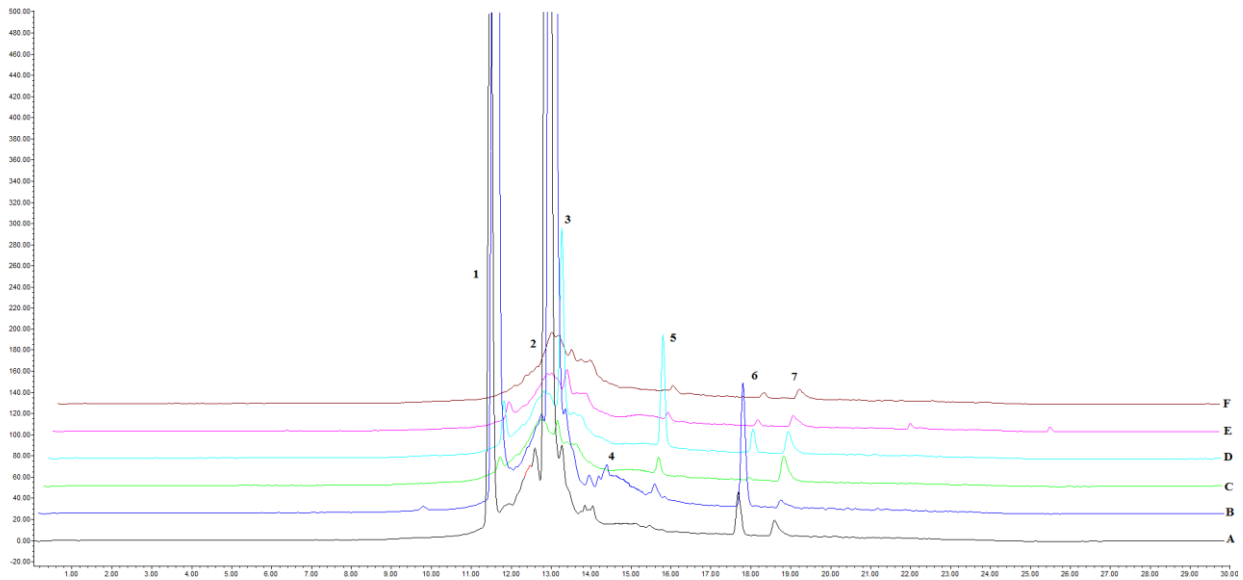


Рис. 3.9 Хроматограми дослідження компонентного складу досліджуваних вод (А – «Єсентуки № 17», В – «Боржомі», С – «Карпатська джерельна», D – водопровідна вода, E – «Харківська-1», F – «Харківська-2»)

Таблиця 3.10

Часи утримування катіонів та аніонів

№	Іон	Час утримування, хв
1	Cl^-	11,09
2	K^+	12,63
3	Na^+	12,92
4	PO_4^{3-}	14,44
5	SO_4^{2-}	15,37
6	Mg^{2+}	17,45
7	Ca^{2+}	18,39

Розрахунок кількісного вмісту катіонів та аніонів, наведений у таблиці 3.11, продемонстрував, що найбільша кількість катіонів кальцію міститься у мінеральній воді «Карпатська джерельна», а найменша – у «Харківській-2». Вміст катіонів магнію переважає у мінеральній воді «Єсентуки № 17» та «Боржомі». Усі концентрації перебувають у межах регламентованого виробником діапазону.

Мінеральний склад досліджуваних вод

	Кількісний вміст, мг/л					
Іон	«Боржомі»	«Карпатська джерельна»	«Єсентуки № 17»	Водо-провідна	«Харківська-1»	«Харківська-2»
Mg ²⁺	11,53	4,94	47,44	58,57	14,10	12,14
Ca ²⁺	73,92	122,74	98,53	50,18	50,58	44,57
Cl ⁻	843,09	13,93	3227,33	44,29	16,19	1,24
K ⁺	19,13	2,49	0	2,49	0	1,54
Na ⁺	1258,19	6,76	1449,41	74,88	8,59	2,78
PO ₄ ³⁻	108,03	0	0	0	0	0
SO ₄ ²⁻	7,46	45,59	33,16	288,53	20,28	17,62

3.5 Моделювання та вивчення впливу мінеральних/столових вод на кінетику розчинення твердих дозованих лікарських форм доксицикліну та амоксициліну *in vitro*

Для визначення впливу солей металів, що входять до складу мінеральних вод, на розчинення, вивільнення досліджуваних антибіотиків з твердих дозованих лікарських форм та їх біодоступність, було розроблено *in vitro* модель на основі тесту розчинення в середовищі, що відповідає умовам шлунка, із додаванням порції мінеральних вод [128-131].

3.5.1 Моделювання та вивчення впливу мінеральних/столових вод на кінетику розчинення капсул доксицикліну *in vitro*

Для розв'язання визначеного завдання проводили тест «розчинення» для капсул доксицикліну на основі верифікованої раніше методики, яку було нами модифіковано. Для контрольного дослідження вивільнення доксицикліну з капсул як середовище розчинення використовували 0,1 М розчин хлористоводневої кислоти об'ємом 900 мл, рН якої найбільш відповідає рН шлунка. Отже, загальний об'єм цього середовища відповідав об'єму шлунка та його рН [132].

Для дослідження впливу присутності мінеральних вод та напоїв на кінетику вивільнення доксицикліну із капсул з метою порівняння з контролем як середовище розчинення використовували 0,1 М розчин хлористоводневої кислоти об'ємом 800 мл із додаванням порції попередньо дегазованої на ультразвуковій ванні мінеральної води, напою «Спрайт» об'ємом 100 мл. Загальний об'єм середовища розчинення відповідав об'єму середовища контрольного зразка. Детальний опис етапів проведення дослідів наведено в розд. 2. п. 2.2 [133].

У такий спосіб проводили моделювання процесу запивання таблетки мінеральною водою та можливого впливу процесу комплексоутворення на розчинність, вивільнення діючої речовини таблетки впродовж певного часу. Час проведення дослідження склав 60 хв, досліджувані зразки відбирали через 5, 10, 15, 30, 45, 60 хв від початку. Кількість повторів для кожного із досліджень – 6.

На рис. 3.10 наведено характеристичні спектри поглинань досліджуваних розчинів та розчину порівняння.

Результати вивільнення АФІ з капсул у середовищі 0,1 М НСІ та профілі розчинення для досліджуваних зразків наведено в додатку А та на рис. 3.11.

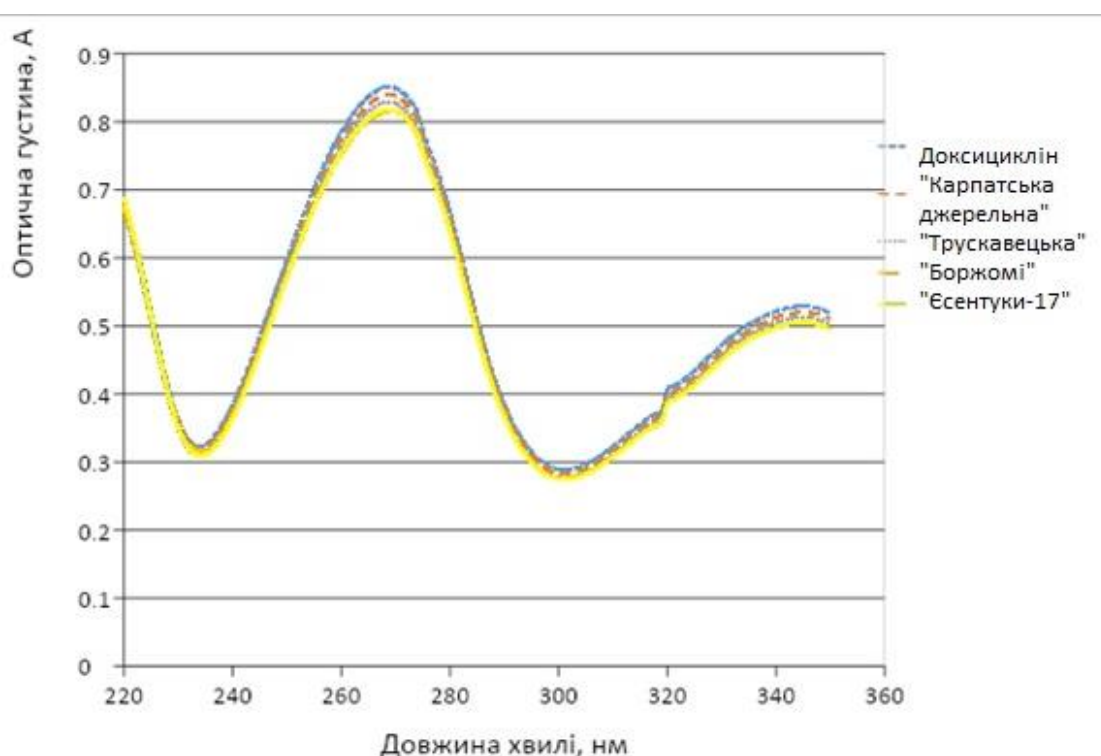


Рис. 3.10 Характеристичні спектри поглинань досліджуваних модельних розчинів та розчину порівняння доксицикліну

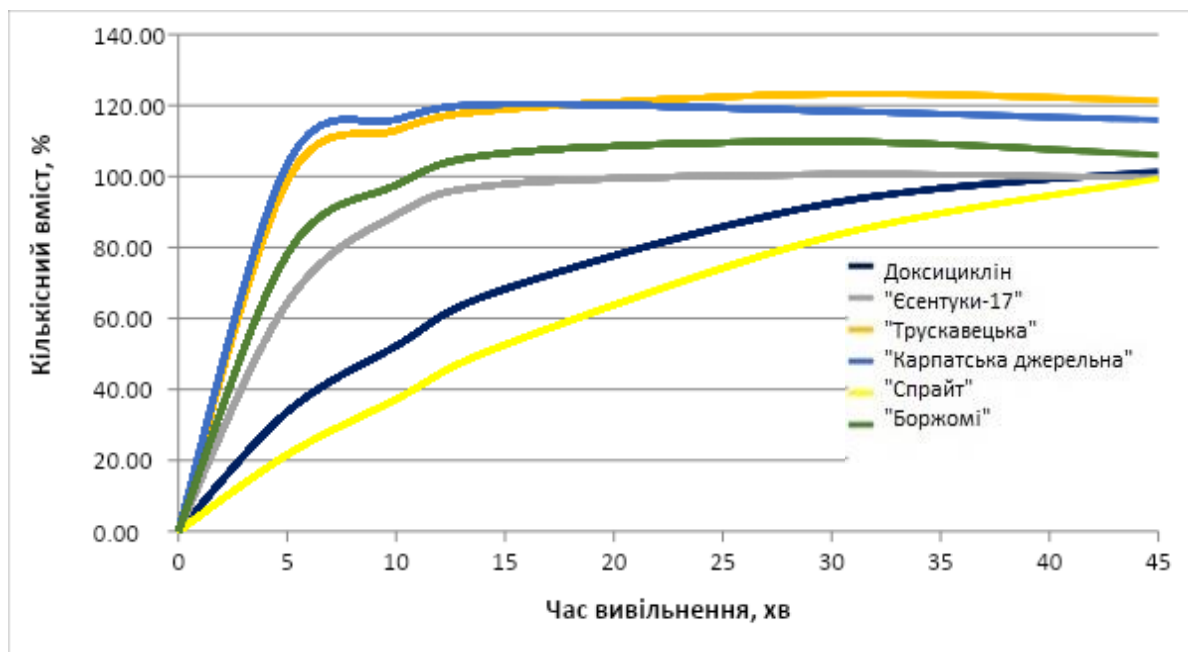


Рис. 3.11 Профілі розчинення доксицикліну в середовищі 0,1 М НСІ із додаванням мінеральних вод та напою «Спрайт»

На рис. 3.11 наведено профілі розчинення доксицикліну в середовищі 0,1 М НСІ із додаванням мінеральних вод. Спостерігається підвищення концентрації доксицикліну в період часу від початку дослідження до 30 хв у середовищі 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої із додаванням усіх досліджуваних мінеральних вод. Важливо також зазначити, що на контрольній точці 15 хв концентрація АФІ у зразках із додаванням мінеральної води «Карпатська джерельна» збільшилась на 80 %, а із додаванням мінеральної води «Трускавецька» – на 70 %, із додаванням мінеральної води «Есентуки № 17» – на 40 %, а води «Боржомі» – на 26 % [124].

Збільшення концентрації, що відображається на кривих розчинення, може бути обґрунтовано підвищенням оптичної густини розчину під час взаємодії доксицикліну із солями металів. Варто також зауважити, що капсули доксицикліну повністю розпадались упродовж 10-15 хв.

Для кожної з контрольних точок було розраховано відносне стандартне відхилення середнього результату RSD, що за вимогами має бути меншим ніж 20 % для першої точки контролю, та 10 % для решти точок [39, 102]. Усі розраховані значення відповідають вимогам (Додаток Б).

За вимогами до проведення тесту «Розчинення», якщо за 15 хв вивільнилось понад 80 % АФІ, розрахунок фактора подібності можна не проводити [102]. Проте для додаткового підтвердження можливого впливу присутності мінеральних вод нами було розраховано фактори подібності. Відповідно до вимог два профілі розчинення вважають аналогічними, якщо значення фактора подібності (f_2) перебуває в межах від 50 % до 100 %. Це свідчить про те, що біодоступність досліджуваного зразка та зразка порівняння є еквівалентна [102, 134].

Визначені фактори подібності досліджуваних зразків подано в табл. 3.12. Вони свідчать, що профілі розчинення капсул доксицикліну в середовищі 0,1 М НСІ із додаванням усіх досліджуваних зразків мінеральних вод та напою не відповідають визначеним вимогам та не є подібними у порівнянні із контрольним зразком. На практиці це означає, що одночасний прийом доксицикліну та вищезазначених мінеральних вод і напоїв є неприпустимим, оскільки може вплинути на ефективність лікарського засобу.

Таблиця 3.12

Фактори подібності при визначенні кінетики вивільнення доксицикліну з капсул у середовищі 0,1М у присутності мінеральних вод

	Фактори подібності				
	Середовище розчинення				
Час, хв	0,1 М НСІ із додаванням «Боржомі»	0,1 М НСІ із додаванням «Єсентуки № 17»	0,1 М НСІ із додаванням «Трускавецької»	0,1 М НСІ із додаванням «Карпатської джерельної»	0,1 М НСІ із додаванням «Спрайту»
f_2 , %	23,33	29,65	15,64	15,00	46,13

3.5.2 Моделювання впливу мінеральних/столових вод на розчинення таблеток амоксициліну *in vitro*

Для виявлення можливої взаємодії амоксициліну із солями кальцію та магнію було проведено дослідження впливу на розчинення та вивільнення амоксициліну із таблеток у середовищі 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої із додаванням мінеральних вод, представлених на ринку України.

Експериментальне моделювання взаємодії амоксициліну із солями кальцію та магнію, що входять до складу деяких мінеральних/столових вод, проводили *in vitro* в умовах модифікованого тесту «розчинення» для таблеток амоксициліну [134, 135].

Дослідження проводили в середовищі 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої об'ємом 800 мл, додаючи по 100 мл попередньо дегазованої на ультразвуковій ванні досліджуваної води. Отже, загальний об'єм середовища для розчинення складав 900 мл.

Для контрольного дослідження вивільнення амоксициліну з таблеток як середовище розчинення використовували 0,1 М розчин хлористоводневої кислоти об'ємом 800 мл. Час проведення тесту становив 45 хв. Кількість повторів для кожного із досліджень – 6.

Кількісний вміст діючої речовини визначали за допомогою УФ-спектрофотометрії методом стандарту. Вимірювання оптичної густини випробовуваного розчину та розчину порівняння проводили за довжини хвилі 272 нм. Як компенсаційний використовували 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої. Характеристичні спектри поглинань досліджуваних розчинів та розчину порівняння наведено на рис. 3.13.

Профіль розчинення амоксициліну з таблеток у середовищі 0,1 М HCl для досліджуваних зразків наведено в Додатку Б та на рис. 3.14.

Результати визначення вивільнення АФІ з таблеток амоксициліну в середовищі 0,1 М кислоти хлористоводневої із додаванням мінеральних вод наведено в Додатку Б та на рис. 3.14. Як видно із рисунку 3.14, у середовищі кислоти хлористоводневої із додаванням порції усіх досліджуваних вод спостерігається значне зниження концентрації вивільненого з таблеток амоксициліну, у порівнянні із контрольним зразком. Концентрація амоксициліну за додавання мінеральної води «Трускавецька» також знижується, проте менше.

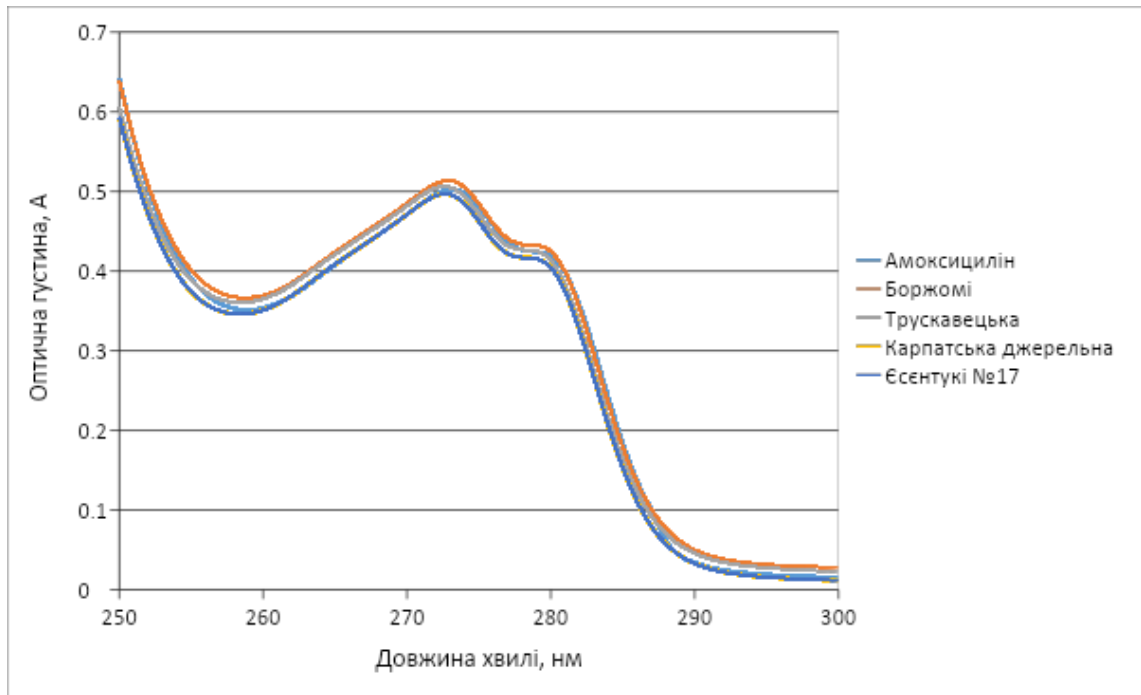


Рис. 3.13 Характеристичні спектри поглинань досліджуваних розчинів та розчину порівняння

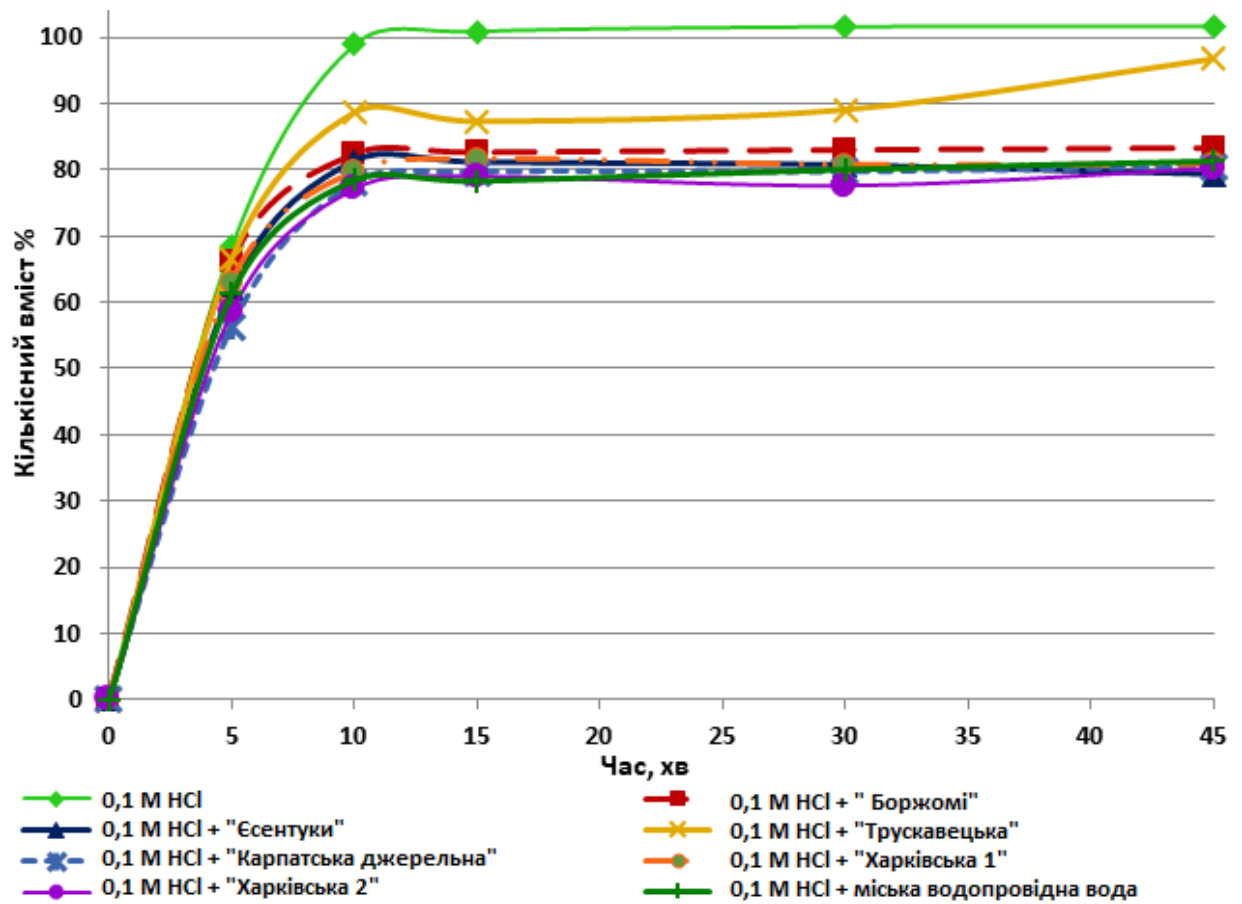


Рис. 3.14 Профілі розчинення амоксициліну з таблеток у середовищі 0,1 М НСІ та із додаванням досліджуваних вод

Для кожної контрольної точки було розраховано відносне стандартне відхилення середніх результатів. Відповідно до вимог ДФУ під час проведення тесту розчинення відносне стандартне відхилення має складати менше ніж 20 % для першої контрольної точки та менше ніж 10 % для всіх наступних [39, 102, 132]. Всі значення відповідають визначеним вимогам (Додаток Б).

Додавання усіх мінеральних вод, окрім Трускавецької, вплинуло на розчинення таблеток, оскільки у жодному з досліджуваних зразків за 15 хв 85 % діючої речовини не вивільнилось, у порівнянні з контрольним зразком. Тому на наступному етапі було розраховано фактори подібності досліджуваних зразків, що наведено в таблиці 3.13. Фактор подібності (f_2) має перебувати у визначеному діапазоні 50-100 %, тоді два профілі розчинності можна вважати подібними, а біодоступність тестових зразків – еквівалентною [102].

Розраховані фактори подібності (табл. 3.13) продемонстрували, що профілі розчинності таблеток амоксициліну в середовищі 0,1 М кислоти хлористоводневої із додаванням шести із семи досліджуваних мінеральних вод не є подібними та не відповідають визначеному критерію. Винятком є зразок із додаванням мінеральної води «Трускавецька», фактор подібності якого 50,19 %. У зв'язку з цим можна зробити висновок, що за одночасного прийому таблеток амоксициліну та мінеральних вод «Боржомі», «Єсентуки № 17», «Карпатська джерельна», «Харківська-1» та «Харківська-2», а також водопровідної води біодоступність діючої речовини може відрізнятись, що в подальшому призведе до зменшення ефективності дії лікарського засобу.

Таблиця 3.13

Фактори подібності таблеток амоксициліну в середовищі 0,1М розчину кислоти хлористоводневої у присутності досліджуваних вод

	0,1 М НСІ із дода- ванням «Боржомі»	0,1 М НСІ із дода- ванням «Єсентуки № 17»	0,1 М НСІ із дода- ванням «Труска- вецької»	0,1 М НСІ із дода- ванням «Карпат- ської дже- рельної»	0,1М НСІ із дода- ванням «Харківсь- кої-1»	0,1М НСІ із дода- ванням «Харківсь- кої-2»	0,1М НСІ із дода- ванням водо- провідної води
f_2 , %	42,24	40,23	50,19	36,45	39,79	36,39	37,11

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3

1. Результати проведеного УФ-спектрофотометричного дослідження дозволяють констатувати, що найбільш вірогідним є утворення комплексів амоксициліну із катіонами магнію(II) в середовищі 0,1 кислоти хлористоводневої. З використанням методу Джоба було виявлено, що в середовищі 0,1 М кислоти хлористоводневої амоксицилін утворює комплексну сполуку з катіоном магнію у стехіометричному співвідношенні 1:1.

2. Здійснено верифікацію методики тесту розчинення капсул доксицикліну хіклату, що дозволяє впровадити її в практику лабораторій з аналізу якості лікарських засобів та використовувати в подальшому під час проведення досліджень кінетики вивільнення активної субстанції з капсул.

3. Для дослідження можливої взаємодії доксицикліну хіклату з компонентами мінеральних вод було проведено моделювання тесту розчинення для капсул доксицикліну в середовищі 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої із додаванням порції мінеральних вод «Карпатська джерельна», «Єсентуки № 17», «Трускавецька», «Боржомі» та газованого безалкогольного напою «Спрайт».

4. Виявлено взаємодію доксицикліну з усіма досліджуваними мінеральними водами та газованим безалкогольним напоєм «Спрайт» у середовищі 0,1 М кислоти хлористоводневої. У практичному сенсі це означає неприпустимість одночасного прийому досліджуваних мінеральних вод та напоїв із капсулами доксицикліну хіклату.

5. Проведене моделювання одночасного прийому амоксициліну та мінеральних вод засвідчило взаємодію амоксициліну з мінеральними водами «Карпатська джерельна», «Єсентуки 17», «Боржомі», «Харківська-1», «Харківська-2» і з міською водопровідною водою в середовищі 0,1 М кислоти хлористоводневої. Оскільки профіль розчинення відрізнявся від контрольного, а фактор подібності був нижчий за визначені вимоги. Тож одночасний прийом цих мінеральних вод та амоксициліну може вплинути на біодоступність лікарського засобу.

РОЗДІЛ 4

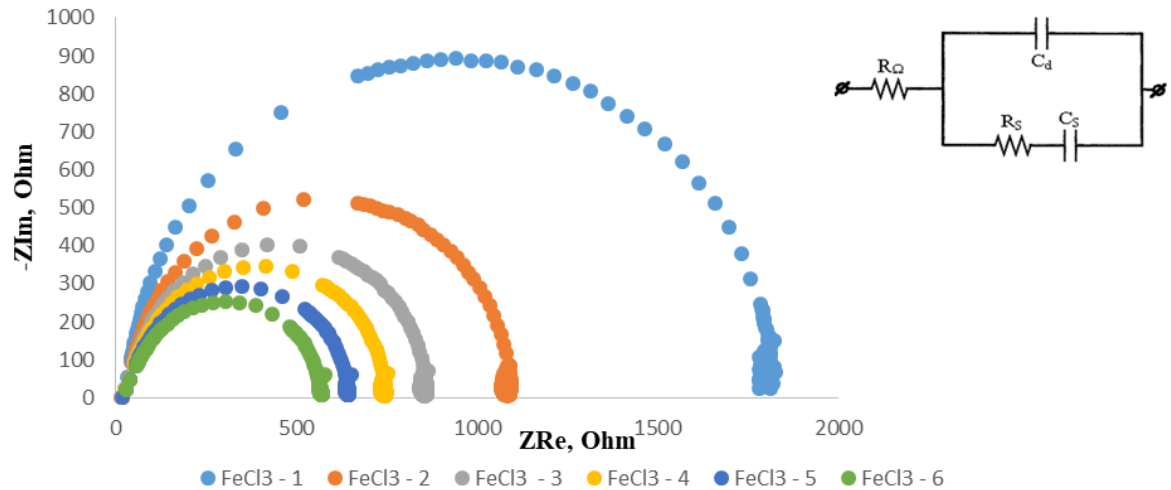
АНАЛІЗ УТВОРЕННЯ КОМПЛЕКСІВ МЕТАЛІВ ТА ДОСЛІДЖУВАНИХ АНТИБІОТИКІВ МЕТОДОМ ЕЛЕКТРОХІМІЧНОЇ ІМПЕДАНСНОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ

4.1 Розробка методики оцінювання комплексоутворення за допомогою методу електрохімічної імпедансної спектроскопії на прикладі взаємодії доксицикліну та Fe^{3+}

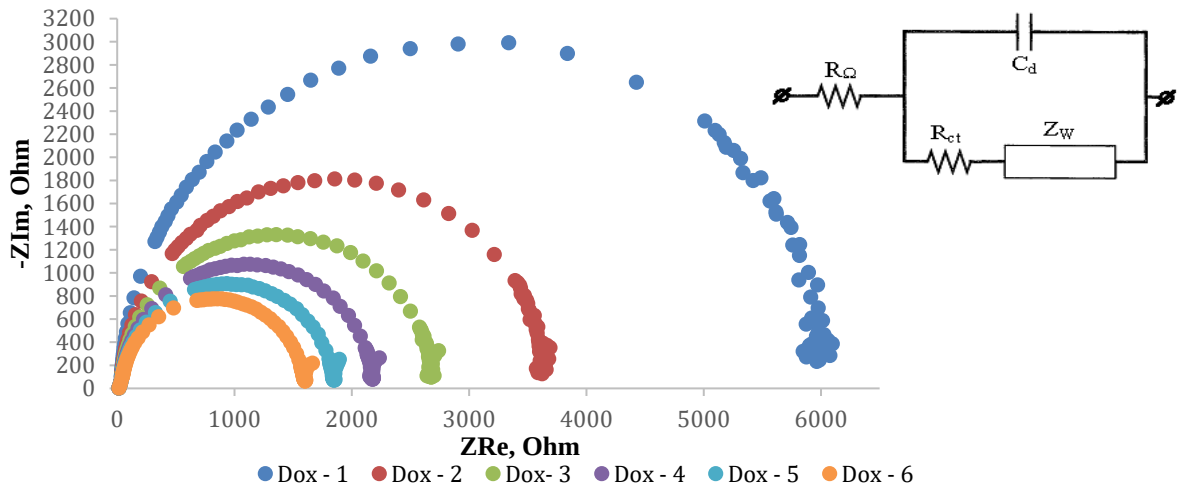
Для обґрунтування та розроблення підходів до дослідження комплексоутворення металів та антибактеріальних ЛЗ (амоксцикліну та доксицикліну) за допомогою методу ЕІС нами було вирішено обрати за модельний об'єкт взаємодію доксицикліну та металу Fe^{3+} . Такий вибір зумовлено тим, що ця взаємодія є достатньо добре доведеною і вивченою за допомогою різних аналітичних методів [75, 75, 124, 135]. З огляду на зазначене результати дослідження взаємодії доксицикліну та Fe^{3+} , отримані за допомогою ЕІС та електрохімічного моделювання, можна порівняти з попередніми оцінками та надати належної хімічної інтерпретації тим процесам, які при цьому відбуваються.

На першому етапі за допомогою ЕІС було виміряно повний імпеданс шести розчинів FeCl_3 , концентрація яких змінювалась від $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л до $6 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Також було виміряно повний імпеданс шести розчинів доксицикліну хіклату, концентрація яких змінювалась від $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л до $6 \cdot 10^{-3}$ моль/л. На рис. 4.1 наведені електроімпедансні спектральні характеристики розчинів різних концентрацій FeCl_3 та доксицикліну хіклату у вигляді кривих Найквіста. З діаграмам видно, що для розчинів FeCl_3 усіх концентрацій залежність має однакову форму у вигляді одного півкола, яке розпочинається на більш високих частотах і не має чітко визначеної хвостової частини на стороні низької частоти. Це свідчить про те, що у хімічній системі превалюють кінетичні процеси переносу заряду, тоді як масоперенос, зумовлений процесами дифузії, майже відсутній. За зростання концентрації FeCl_3 розмір півкола кривих

Найквіста зменшується. З цим його форма не змінюється та величина хвостової частини, яка характеризується імпедансом Варбурга, не збільшується, а перехід між нею і півколом залишається чітким.



a)



б)

Рис. 4.1 Криві Найквіста для 6 молярних концентрацій розчинів а) FeCl_3 , б) доксицикліну хіклат

Отже, збільшення концентрації FeCl_3 призводить до зменшення опору електрохімічної системи та, відповідно, до збільшення провідності, що зумовлено збільшенням у розчині іонів заліза. Водночас зменшення концентрації FeCl_3 не призводить до заміни домінуючих кінетичних процесів переносу

заряду на процеси масопереносу. Загалом можна зробити висновок, що в електрохімічній комірці з розчином FeCl_3 відбуваються фарадеївські процеси. Для їх моделювання можна обрати еквівалентний електрохімічний ланцюг з послідовним з'єднанням резистора $R_\square$, що моделює опір розчину у вимірювальній комірці, та паралельного з'єднання створеної вимірювальними електродами ємності C_d з електричним опором переносу заряду R_s і псевдоємністю C_s , які визначають електрохімічні процеси, що відбуваються в досліджуваних розчинах (рис. 4.1, а).

Розраховані за допомогою програмного пакета EC-Lab V10.40 значення еквівалентних електричних елементів для вищезазначеної електрохімічної моделі імпедансу розчину FeCl_3 , які надано в табл. 4.1, підтверджують, що зі збільшенням концентрації FeCl_3 відбувається зменшення величини електричного опору переносу заряду R_s втричі, з 1763 Ом ($C_1 = 1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) до 524 Ом ($C_6 = 6 \cdot 10^{-3}$ моль/л). Величина псевдоємності C_s збільшується вдвічі з 25,65 пФ до 56,91 пФ за збільшення концентрації FeCl_3 з 1 до 6 молей. Отже, загальна провідність електрохімічної системи розчину FeCl_3 збільшується за збільшення його концентрації, що зумовлено домінуванням процесу переносу заряду завдяки підвищенню концентрації іонів Fe^{3+} та Cl^- .

Для розчину доксицикліну хіклату спектральні криві Найквіста мають форму півкола, розмір якого за збільшення концентрації речовини зменшується (рис. 4.1, б). Тобто, у цій хімічній системі превалюють кінетичні процеси переносу заряду, так само як і для розчину FeCl_3 . Однак, на відміну від FeCl_3 , криві електрохімічного імпедансу для доксицикліну хіклату мають більш чітко виражений імпеданс Варбурга, який збільшується за підвищення концентрації речовини (рис. 4.1, б).

Появу імпедансу Варбурга в цій електрохімічній системі можна пояснити тим, що молекула доксицикліну хіклату має більш складну структуру. У середовищі води очищеної (рН 5,5-7,0) молекула доксицикліну має структуру цвітер-іона [136]. За основні властивості відповідає диметиламіногрупа, тоді як кислотні властивості проявляються завдяки фенольному гідроксилу в

кільці D та енольних групах. Така структура молекули пояснює той факт, що під час вимірювання електрохімічного імпедансу на низьких частотах під дією електричного поля дифузія речовини відбувається внаслідок процесів електроокиснення та електровідновлення. Це призводить до появи імпедансу Варбурга на спектральних кривих Найквіста (рис. 4.1, б), який складно моделювати постійними фазовими елементами, наприклад, псевдоємністю C_s . З огляду на це для розрахунку електрохімічної імпедансної системи розчину доксицикліну хіклату ми використали еквівалентний електричний ланцюг, що містить послідовно з'єднані резистор R_s та імпеданс Варбурга Z_w (рис. 4.1, б). У табл. 4.1 подано значення еквівалентних електричних елементів для вищезазначеної електрохімічної моделі імпедансу розчину доксицикліну хіклату.

Таблиця 4.1

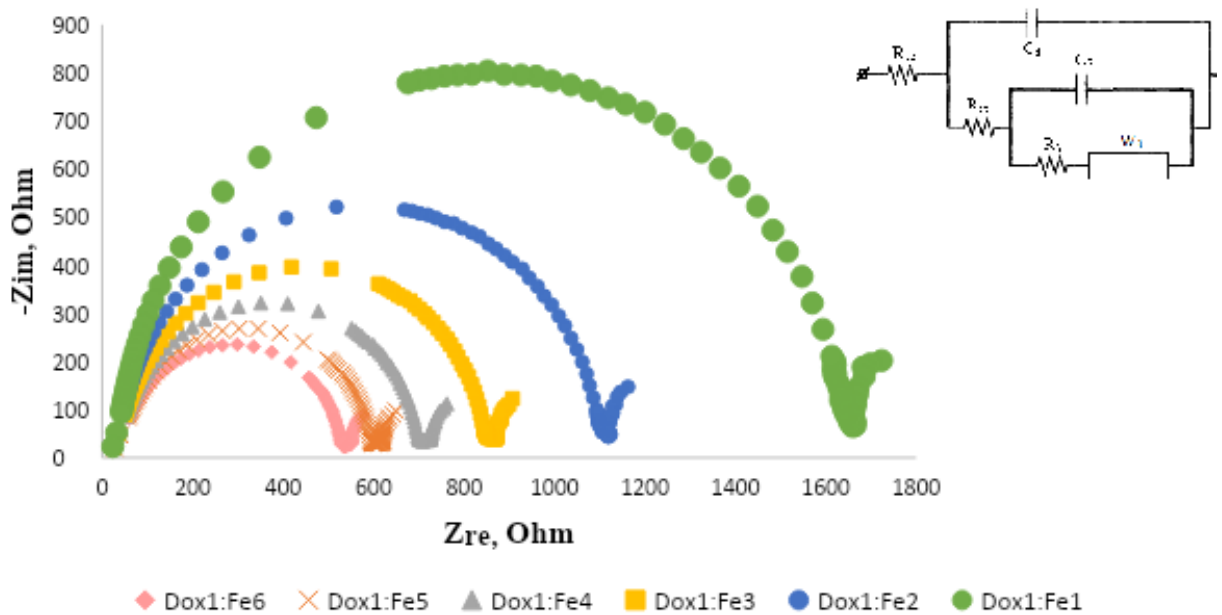
**Параметри електрохімічного імпедансу для розчинів $FeCl_3$
та доксицикліну хіклату різних концентрацій**

Концентрація розчину, моль	$R_{\wedge}$, Ом	C_d , $10^{-12}\Phi$	R_s , 10^3Ом	C_s , $10^{-9}\Phi$	Q_2 , $10^{-9}\Phi \cdot c^{(a_2-1)}$	a_2	$\dot{\Gamma}_2$, $\text{Ом} \cdot c^{-1/2}$
Розчин $FeCl_3$							
1	21,71	6,086	1,763	25,65	-	-	-
2	23,20	6,409	1,047	34,07	-	-	-
3	24,88	6,517	0,819	43,16	-	-	-
4	25,91	6,635	0,706	46,06	-	-	-
5	27,14	6,766	0,605	50,78	-	-	-
6	28,72	5,839	0,524	56,91	-	-	-
Розчин доксицикліну хіклату							
1	18,74	5,813	5,966	-	6,25	1	1541
2	19,49	5,947	3,575	-	7,79	0,997	17339
3	20,20	6,021	2,630	-	8,37	0,994	45873
4	20,68	6,102	2,129	-	11,36	0,985	55426
5	21,12	6,169	1,802	-	22,47	0,936	62711
6	21,71	6,218	1,554	-	43,65	0,883	67106

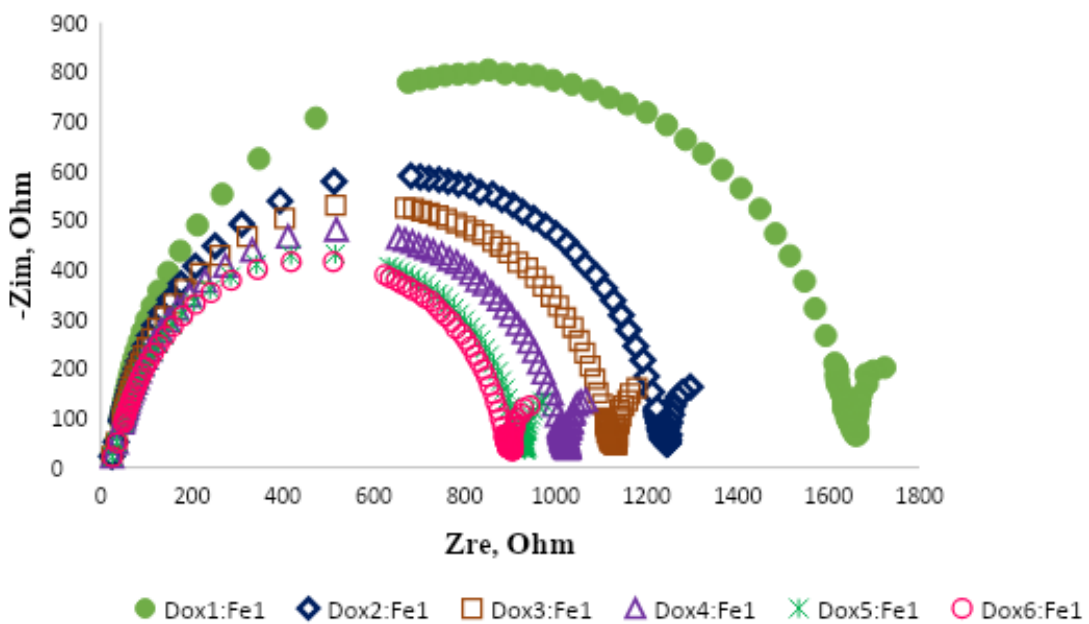
У разі збільшення концентрації доксицикліну хіклату відбувається зменшення величини електричного опору R_s в чотири рази, з 5966 Ом ($C_1 = 1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) до 1554 Ом ($C_6 = 6 \cdot 10^{-3}$ моль/л), в той же час суттєво зростає коефіцієнт масообміну (Γ_2), що характеризує суму внесків процесів окислення та відновлення в цій електрохімічній системі. Динаміка показника постійного фазового елемента – Q_2 та a_2 – показника девіації параметрів моделі характеризує, що при збільшенні концентрації доксицикліну хіклату відбувається відхилення параметрів електричної моделі від псевдоємності і збільшується вплив імпедансу Варбурга (табл. 4.1). Це можна пояснити тим, що молекули води частково заміщуються цвітер-іонами доксицикліну, зростає кількість цих іонів і повна провідність розчину доксицикліну хіклату та збільшується масоперенос.

На другому етапі було підготовлено 11 водних розчинів доксицикліну хіклату і $FeCl_3$ у таких молярних співвідношеннях концентрацій: 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, і для кожного з них виміряно електрохімічний імпеданс та побудовано електроімпедансні спектральні характеристики у вигляді діаграм Найквіста (рис. 4.2) і Бода (рис. 4.3).

Як видно з діаграм Найквіста (рис. 4.2), додавання $FeCl_3$ до доксицикліну хіклату спричинило зміни електроімпедансних спектральних характеристик як за формою (діаметр імпедансного півкола зменшився у порівнянні з відповідними діаграмами для чистого розчину доксицикліну хіклату, рис. 4.1 б), так і за чіткою появою імпедансу Варбурга навіть за найменшої концентрації доксицикліну хіклату – 1 моль. Важливо також зазначити, що в разі зростання концентрації $FeCl_3$ відбувається зменшення діаметра електроімпедансного півкола (рис. 4.2, а). Це якісно свідчить про зменшення величини електричного опору R_s цієї електрохімічної системи та, відповідно, про збільшення електрохімічної провідності за умови збільшення концентрації $FeCl_3$. Водночас, максимальний електричний опір спостерігається за співвідношення концентрацій розчинів доксицикліну хіклату та $FeCl_3$ – 1:1, а мінімальний – за 1:6.

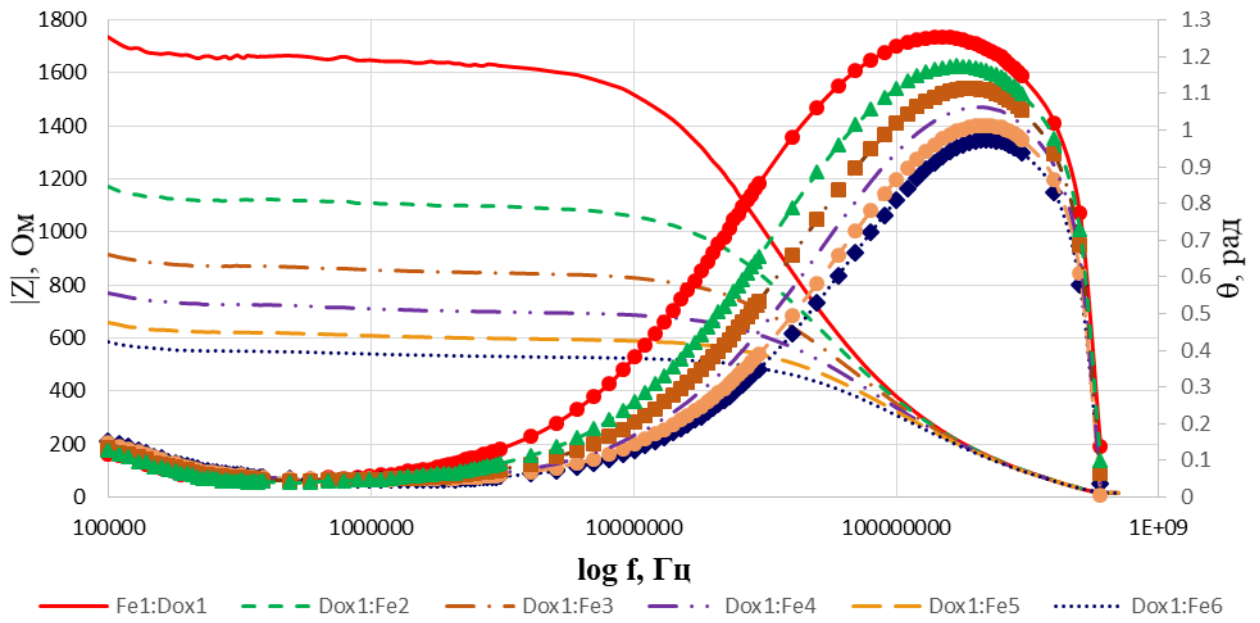


a)

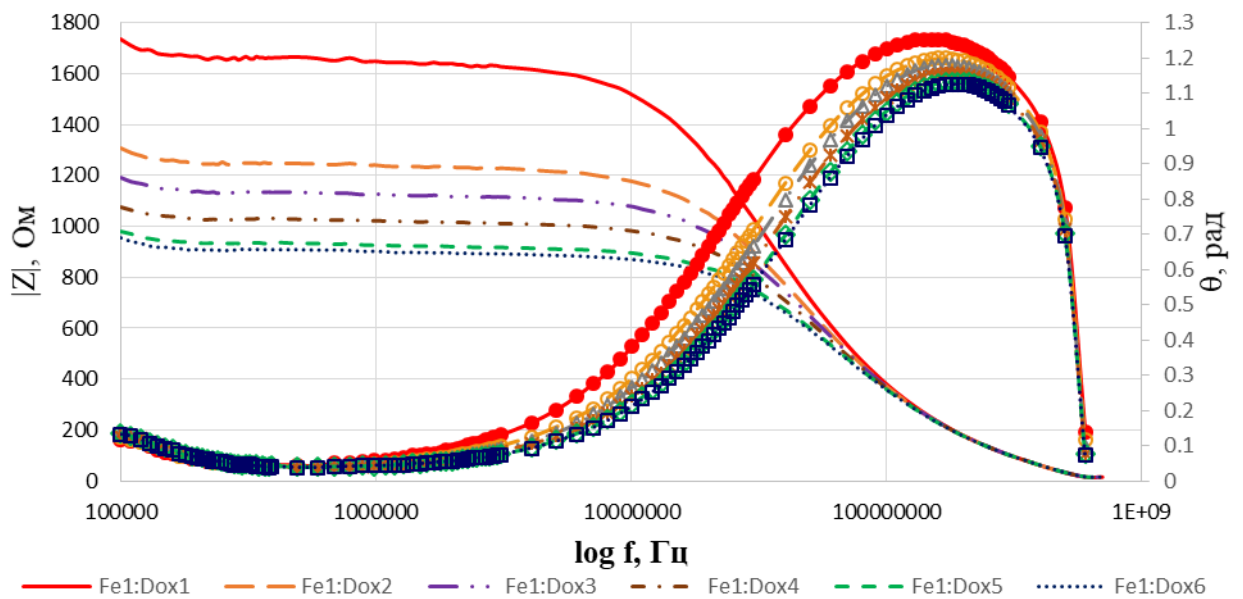


б)

Рис. 4.2 Криві Найквіста для розчинів доксицикліну та FeCl_3 у різних співвідношеннях концентрацій, виміряні за температури 295 К: а) збільшення концентрації Fe^{3+} , б) збільшення концентрації доксицикліну (продовження)



а)



б)

Рис. 4.3 Криві Бода (абсолютне значення комплексного електрохімічного опору та фаза досліджуваних систем) для розчинів доксицикліну та FeCl у різних співвідношеннях концентрацій, виміряні за температури 295 К: а) збільшення концентрації Fe^{3+} , б) збільшення концентрації доксицикліну

Результати дослідження розчинів, для яких збільшували концентрацію доксицикліну хіклату, дозволяють констатувати, що за зростання концентрації доксицикліну хіклату щодо FeCl_3 так само відбувається зменшення величини електричного опору R_s цієї електрохімічної системи і, відповідно, збільшення провідності (рис. 4.2, б). Максимальний електричний опір спостерігається за співвідношення концентрацій розчинів доксицикліну хіклату та FeCl_3 – 1:1, а мінімальний – за 6:1.

Отже, проведений EIS аналіз за кривими Найквіста водних розчинів доксицикліну хіклату і FeCl_3 у вищезазначених молярних співвідношеннях концентрацій виявив наявність зміни динаміки електричного опору за співвідношення речовин 1:1, що можна вважати якісною ознакою комплексоутворення в цій точці.

Аналіз динаміки абсолютного значення комплексного опору електрохімічної системи розчинів доксицикліну хіклату і FeCl_3 та її фазового кута (рис. 4.3) підтвердив вищезазначені тенденції взаємодії цих речовин. Так, зі збільшенням концентрації FeCl_3 зменшується кут нахилу та фазовий кут (рис. 4.3 а), і таку ж динаміку спостерігаємо за збільшення концентрації доксицикліну хіклату. Найбільший пік фазового кута 1,25 радіан спостерігається за співвідношення концентрацій 1:1 (рис. 4.3), що свідчить про наявність взаємодії між речовинами і комплексоутворення.

Для подальшого кількісного оцінювання показників комплексоутворення було проведено електрохімічне моделювання електрохімічної системи розчинів доксицикліну хіклату та FeCl_3 . За базову модель було обрано еквівалентний електричний ланцюг, який містить послідовно з'єднані резистор R_3 та імпеданс Варбурга Z_w (рис. 4.1, б). Крім того, з огляду на необхідність чіткого і поглибленого вивчення процесів взаємодії між складовими досліджуваної системи було вирішено додатково дослідити імпеданс Варбурга, тому було застосовано його моделювання у вигляді паралельного з'єднання псевдоємності C_3 та двох електричних опорів (рис. 4.4).

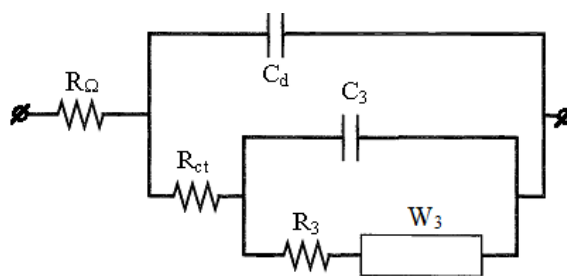


Рис. 4.4 Електрична модель типу $R_{\Omega} + C_d / (R_{ct} + C_3 / (R_3 + W_3))$ для системи вимірювальної комірки з досліджуваними розчинами у різних концентраціях

Розраховані модельні параметри електрохімічної системи водних розчинів доксицикліну хіклату і FeCl_3 у молярних співвідношеннях концентрацій: 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1 подано в Додатку В.

Аналіз динаміки ЕІС параметрів засвідчив, що в разі зменшення співвідношення концентрації іонів Fe^{3+} і кількості доксицикліну в досліджуваних розчинах спостерігається незначне коливання псевдоємності вимірювальної комірки C_d у межах 4,9...5,6 пФ, а також електричного опору досліджуваного розчину R_{Ω} у межах 39,33...31,36 Ом. Цю варіабельність можна не брати до уваги і вважати ці показники майже незмінними.

Водночас ЕІС параметри, що характеризують окислювально-відновлювальні реакції та інші електрохімічні процеси, що відбуваються в досліджуваних розчинах, суттєво залежать від співвідношення молярних концентрацій. Так, при зменшенні концентрації іонів Fe^{3+} з $6 \cdot 10^{-3}$ моль/л до $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л спостерігається збільшення опору переносу заряду R_{ct} в чотири рази, який досягає максимального значення 1,606 кОм за співвідношення концентрацій речовин 1:1 (Додаток В). Після чого відбувається його поступове зменшення майже в 2 рази при підвищенні концентрації доксицикліну з $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л до $6 \cdot 10^{-3}$ моль/л (Додаток В). Водночас для псевдоємності Q_2 , яка характеризує процеси масообміну і дифузії, спостерігається зворотна динаміка. Так, зменшення молярної концентрації іонів Fe^{3+} з $6 \cdot 10^{-3}$ моль/л до $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л призводить до зменшення псевдоємності в 17 разів з 1301 пФ до 75,16 пФ. Подальше збільшення концентрації доксицикліну хіклату призводить до зменшення величини

псевдоємності Q_2 вдвічі (Додаток В). Отже, за співвідношення молярних концентрацій доксицикліну хіклату та FeCl_3 1 : 1 як для опору переносу заряду R_s , так і для псевдоємності Q_2 спостерігається зміна динаміки, що є підтвердженням процесу комплексоутворення в цій точці.

Важливо також зауважити, що опір переносу заряду досліджуваних електрохімічних систем значно перевищує величину імпедансу Варбурга $R_s > R_z$ (Додаток В). Це означає, що активність переносу іонів Fe^{3+} вища, ніж активність процесу переносу дифузії під час окислювання доксицикліну хіклату, попри те, що зі зменшенням концентрації іонів Fe^{3+} збільшуються коефіцієнти масообміну σ_2 і σ_3 . Водночас як і для попередніх електрохімічних параметрів, так і для динаміки коефіцієнтів масообміну σ_2 і σ_3 співвідношення $[\text{Dox}]:[\text{Fe}^{3+}]=1:1$ є точкою переходу динаміки зі зменшення на зростання. Це ще раз підтверджує наявність комплексоутворення за цього співвідношення молярних концентрацій.

Для подальшого кількісного оцінювання стабільності комплексоутворення за показниками електрохімічного опору переносу заряду (Додаток В) було розраховано молярні провідності досліджуваних розчинів, залежність яких від співвідношення молярних концентрацій $[\text{Dox}]:[\text{Fe}^{3+}]$ подано на рис. 4.5.

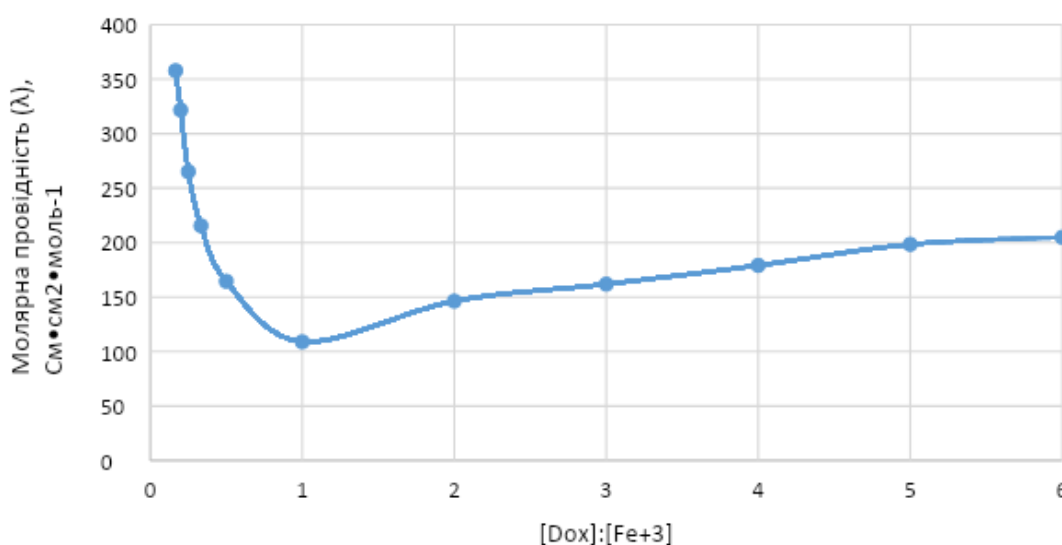


Рис. 4.5 Залежність молярної провідності від співвідношення молярних концентрацій $[\text{Dox}]:[\text{Fe}^{3+}]$, розчинених у воді очищеній за температури 295 К

Як видно з рис. 4.5, спочатку спостерігається постійне зменшення молярної провідності розчинів для катіонів Fe^{3+} . Це свідчить про те, що утворені комплекси були менш рухливими у порівнянні з вільними сольватованими катіонами. Далі нахил ділянки кривої молярної провідності змінюється в точці, де молярне співвідношення концентрацій доксицикліну хіклату та Fe^{3+} дорівнює 1:1, що свідчить про утворення в цій точці комплексів.

Константу стабільності (комплексоутворення) було розраховано за формулою [137]:

$$K_{ML+} = \frac{a_1 a_2}{a_2 a_3 [L]_t - a_1 a_3 [M]_t}, \quad (4.1)$$

де $a_1 = \lambda_{M+} - \lambda$, $a_2 = \lambda_{M+} - \lambda_{ML}$, $a_3 = \lambda - \lambda_{ML}$,

$$\lambda = \frac{1000 \cdot k}{c},$$

де λ_{M+} , λ_{ML} – молярні провідності розчину солі металу, а також досліджуваного розчину антибактеріального препарату та відповідної солі металу,

$[L]_t$ – молярна концентрація ліганду (антибактеріального препарату),

$[M]_t$ – молярна концентрація катіону (солі металу).

Враховуючи раніше обчислені молярні провідності досліджуваних розчинів, визначили, що за $T = 296 \pm 3$ К та рН у межах від 2,5 до 2,6 одиниць константа комплексоутворення розчину доксицикліну хіклату та FeCl_3 складає $\log_{10}(K_{ML+}) = 2,9$ одиниці. Таке значення константи стійкості свідчить про те, що доксицикліну хіклат утворює стійкий метал-лігандний комплекс з іонами заліза. Такий комплекс не розчиняється у воді та не дисоціює на іон металу і ліганд, а також впливатиме на фармакокінетику доксицикліну хіклату та його ефективність.

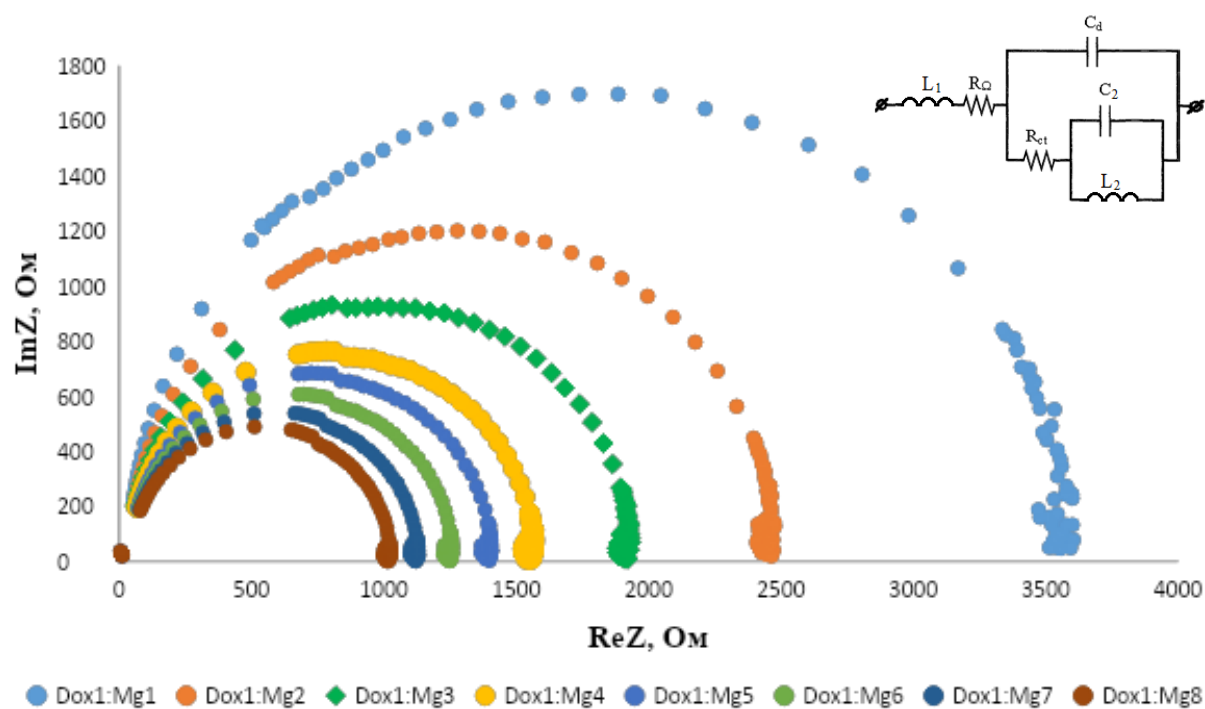
З огляду на все вищезазначене проведене нами на прикладі взаємодії доксицикліну та Fe^{3+} дослідження можливості використання методу ЕІС як інструмента оцінювання комплексоутворення антибактеріальних лікарських

засобів та солей металів продемонструвало дієвість цього методу та дозволило розробити підходи до його використання з метою подальшого вивчення фармакохімічних взаємодій препаратів і солей металів [138, 139].

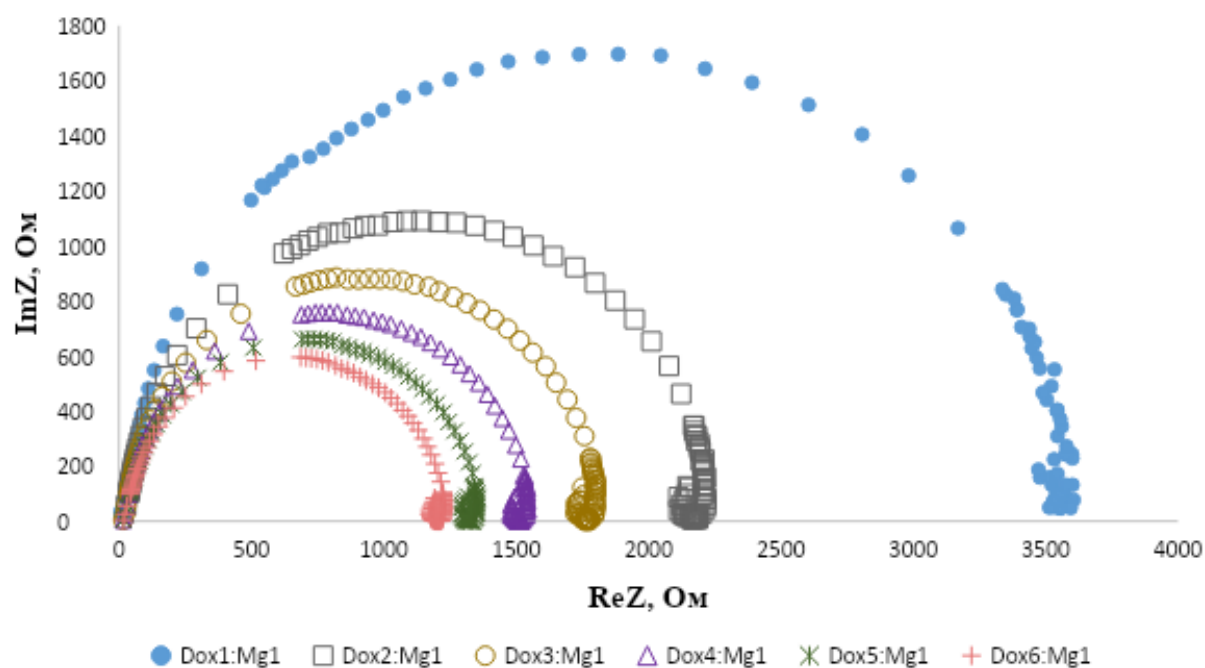
4.2 Дослідження процесів взаємодії доксицикліну та солей магнію, кальцію та алюмінію за допомогою ЕІС-методу

З огляду на запропоновані вище методичні підходи до дослідження процесу комплексоутворення шляхом ЕІС нами було оцінено взаємодії доксицикліну хіклату та солей Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} . Для цього було підготовлено водні розчини доксицикліну хіклату і відповідних солей у молярних співвідношеннях концентрацій $[Dox]:[Me^+]$ – 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1. Далі для кожного з цих розчинів було виміряно електрохімічні імпеданси і побудовано ЕІС-характеристики – діаграми Найквіста (рис. 4.6-4.8). Для всіх співвідношень концентрацій досліджуваних розчинів доксицикліну хіклату та катіонів металів Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} діаграми Найквіста мають однакову форму у вигляді одного чіткого півкола, яке розпочинається на більш високих частотах, а хвостова частина з боку низької частоти має загин усередину. Отже, у всіх досліджуваних хімічних системах превалюють кінетичні процеси переносу заряду та практично відсутні процеси дифузії. Проте наявність індуктивних петель на діаграмах Найквіста досліджуваних розчинів доксицикліну хіклату та солей металів необхідно врахувати під час вибору еквівалентних електрохімічних моделей для обчислення електрохімічної провідності.

З діаграм Найквіста чітко видно (рис. 4.6-4.8), що в разі зростання концентрації катіонів усіх досліджуваних металів спостерігається зменшення діаметра електроімпедансного півкола, що свідчить про зменшення величини еквівалентного електричного опору R_s цих електрохімічних систем. Водночас зростання концентрації доксицикліну хіклату від 1 до 6 молей призводить до зменшення еквівалентного електричного опору, а зміна динаміки відбувається за співвідношення 1:1, тобто це є точкою комплексоутворення для катіонів Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} .

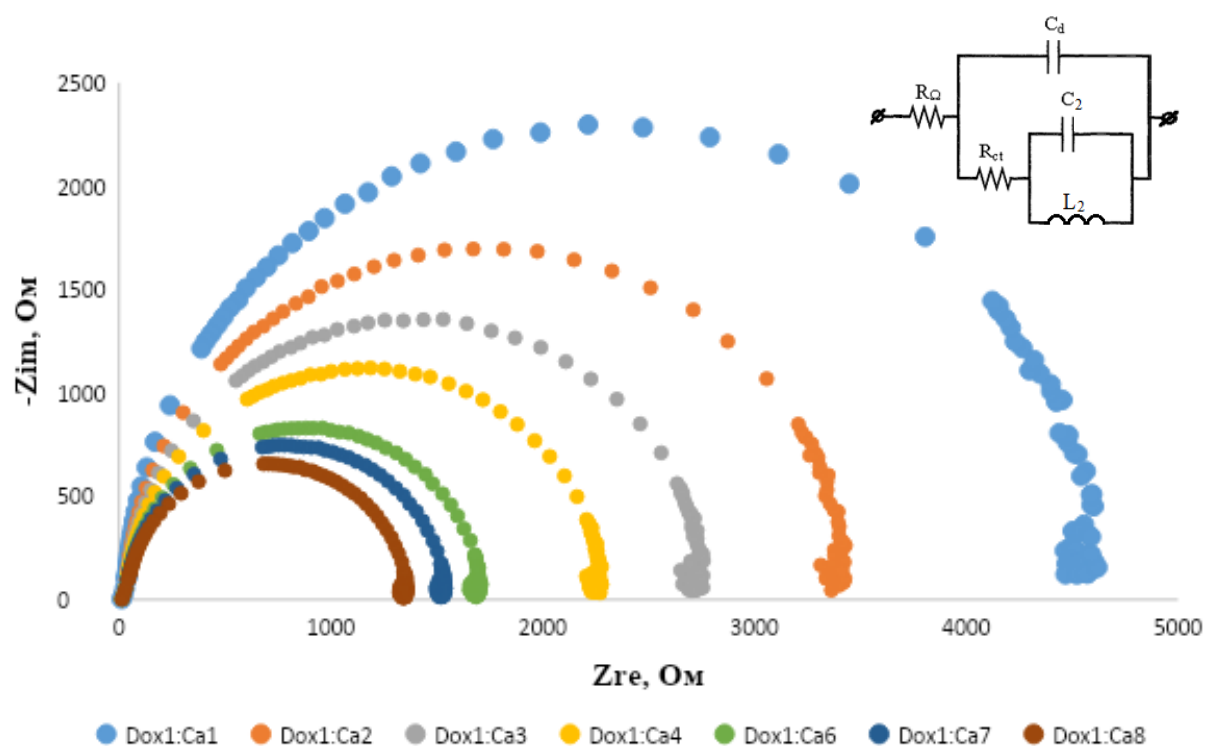


a)

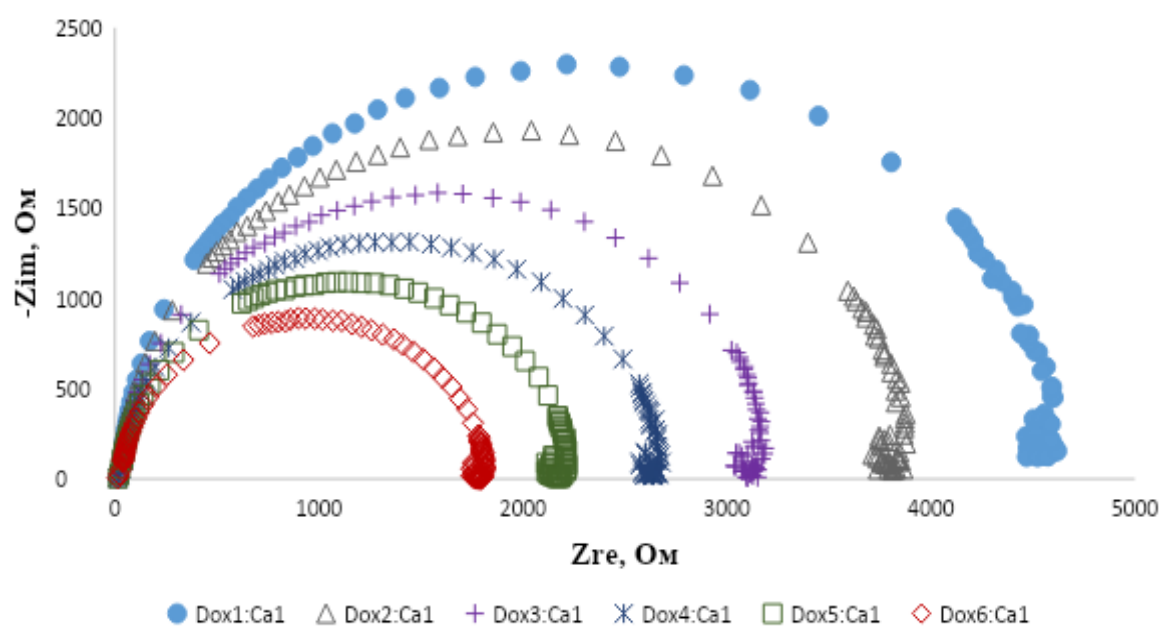


б)

Рис. 4.6 Криві Найквіста для розчинів доксицикліну та катіонів Mg^{2+} у різних співвідношеннях концентрацій, виміряні за температури 295 К: а) збільшення концентрації катіонів Mg^{2+} , б) збільшення концентрації доксицикліну

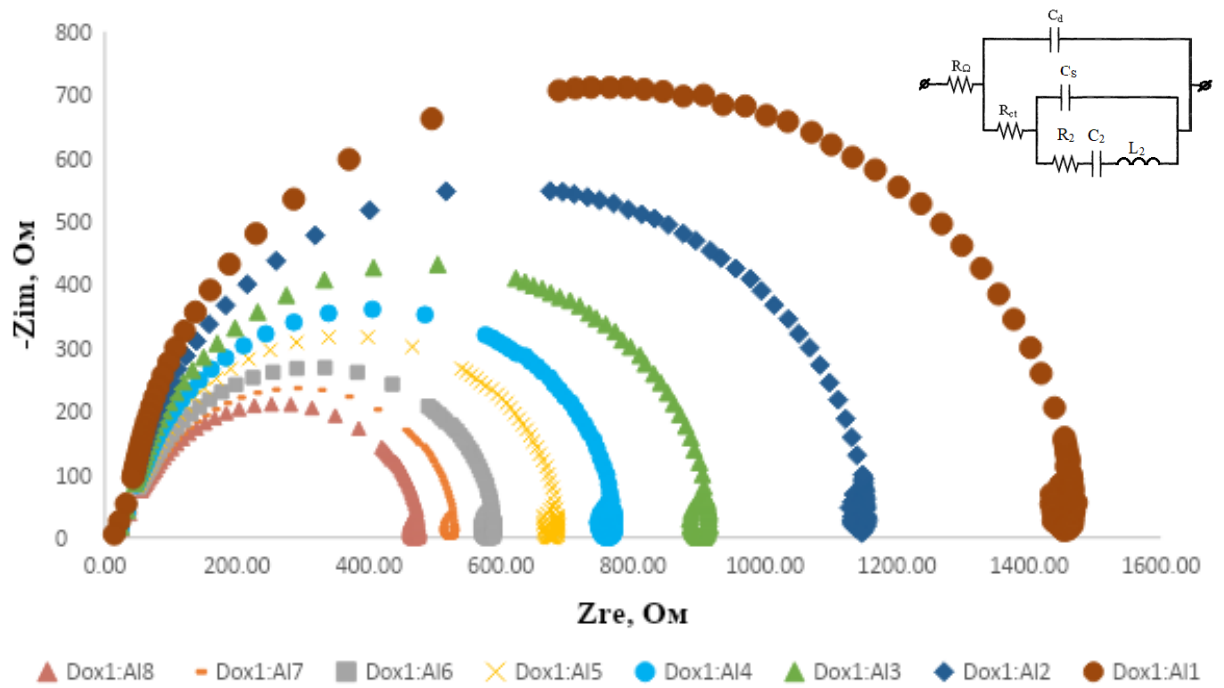


a)

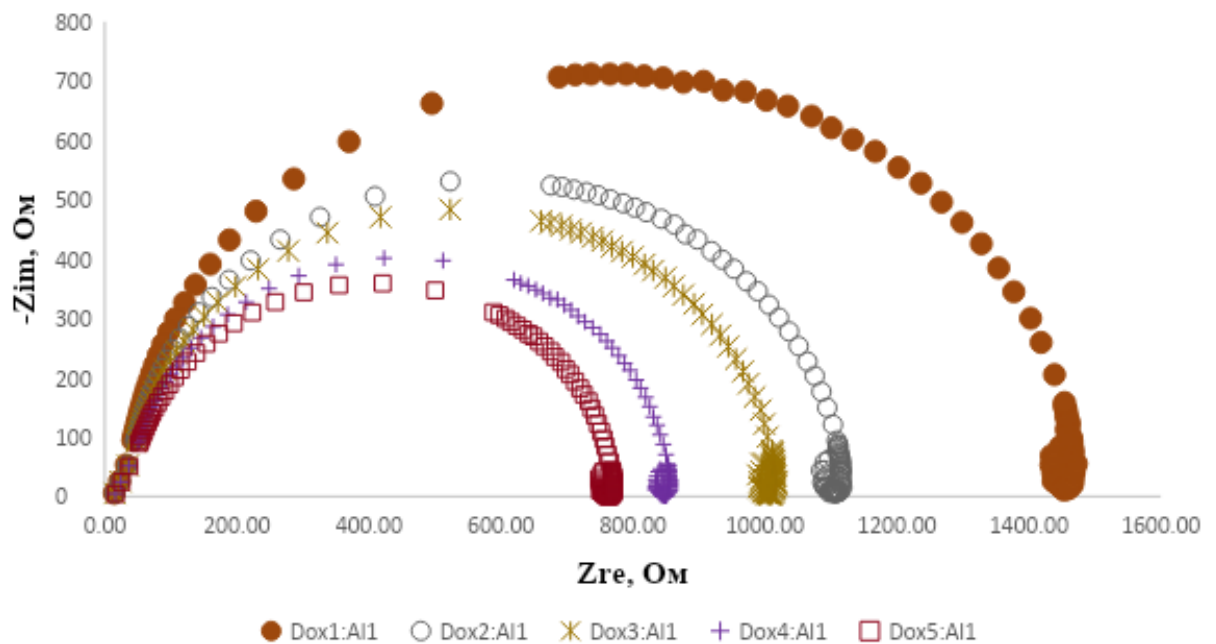


б)

Рис. 4.7 Діаграми Найквіста для розчинів доксицикліну та катіонів Ca^{2+} у різних співвідношеннях концентрацій, виміряні за температури 295 К: а) збільшення концентрації катіонів Ca^{2+} , б) збільшення концентрації доксицикліну



а)



б)

Рис. 4.8 Діаграми Найквіста для розчинів доксицикліну та катіонів Al^{3+} у різних співвідношеннях концентрацій, виміряні за температури 295 К: а) збільшення концентрації катіонів Al^{3+} , б) збільшення концентрації доксицикліну

З огляду на відсутність дифузійних обмежень і наявність індуктивних петель на усіх ЕІС кривих водних розчинів доксицикліну хіклату з солями металів Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} у різних молярних співвідношеннях концентрацій (рис. 4.6-4.8) для розрахування електрохімічних параметрів досліджуваних розчинів до фарадеївської електричної моделі було внесено індуктивності за різними варіантами під'єднання. З цим для оцінювання взаємодії доксицикліну хіклату з різними концентраціями солей магнію було обрано електрохімічну модель типу $L_1 + R_{\wedge} + C_d / (R_{ct} + C_3 / L_2)$ (рис. 4.6). Для оцінювання процесів комплексоутворення з солями кальцію цю електрохімічну модель спростили до структури $R_{\wedge} + C_d / (R_{ct} + C_3 / L_2)$ (рис. 4.7). Модель взаємодії доксицикліну хіклату з солями алюмінію побудовано на основі ЕІС-моделі взаємодії цього ліганду з $FeCl_3$, але зважаючи на відсутність дифузійних обмежень і наявність індуктивної петлі, імпеданс Варбурга Z_w замінили на послідовне з'єднання ємності (C_2) та індуктивності (L_2) (рис. 4.8). Далі відповідно до цих моделей за допомогою програмного пакета EC-Lab V10.40 нами було розраховано еквівалентні параметри електрохімічної системи водних розчинів доксицикліну хіклату та солей металів Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} у різних молярних співвідношеннях концентрацій (Додаток Г-Е).

Динаміка зміни параметрів ЕІС систем досліджуваних розчинів доксицикліну хіклату з солями металів Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} , які характеризують електрохімічні процеси, залежить від співвідношення молярних концентрацій (Додаток Г-Е). Так, за співвідношення молярних концентрацій 1:1 для всіх іонів металів спостерігається перехід динаміки електрохімічного опору переносу заряду (R_{ct}) зі зменшення на зростання. Отже, у цій точці відбувається утворення комплексів. Для подальшого кількісного визначення коефіцієнта комплексоутворення за показниками електрохімічного опору переносу заряду (R_{ct}) (Додаток Г-Е) було розраховано молярні провідності досліджуваних розчинів.

Залежності цих молярних провідностей від співвідношення молярних концентрацій розчинів доксицикліну хіклату та іонів металів Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} ($[Dox]:[Me^{+}]$) подано на рис. 4.9. Аналіз поведінки цих кривих свідчить, що в

разі збільшення концентрації доксицикліну хіклату відбувається зменшення молярної провідності для комплексів усіх трьох іонів. Це означає, що рухливість комплексів доксицикліну з вищезазначеними металами є нижчою, ніж рухливість сольватованих катіонів цих металів. У точці, де молярне співвідношення концентрацій доксицикліну хіклату та іонів Me^+ дорівнює 1:1, нахил кривих змінюється і провідність комплексу починає зростати. Це свідчить про утворення в цій точці комплексів доксицикліну хіклату та іонів металів Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} . Найбільше комплексоутворення відбувається при взаємодії препарату із розчином солі Al^{3+} , що проявляється максимальним значенням молярної провідності (рис. 4.9).

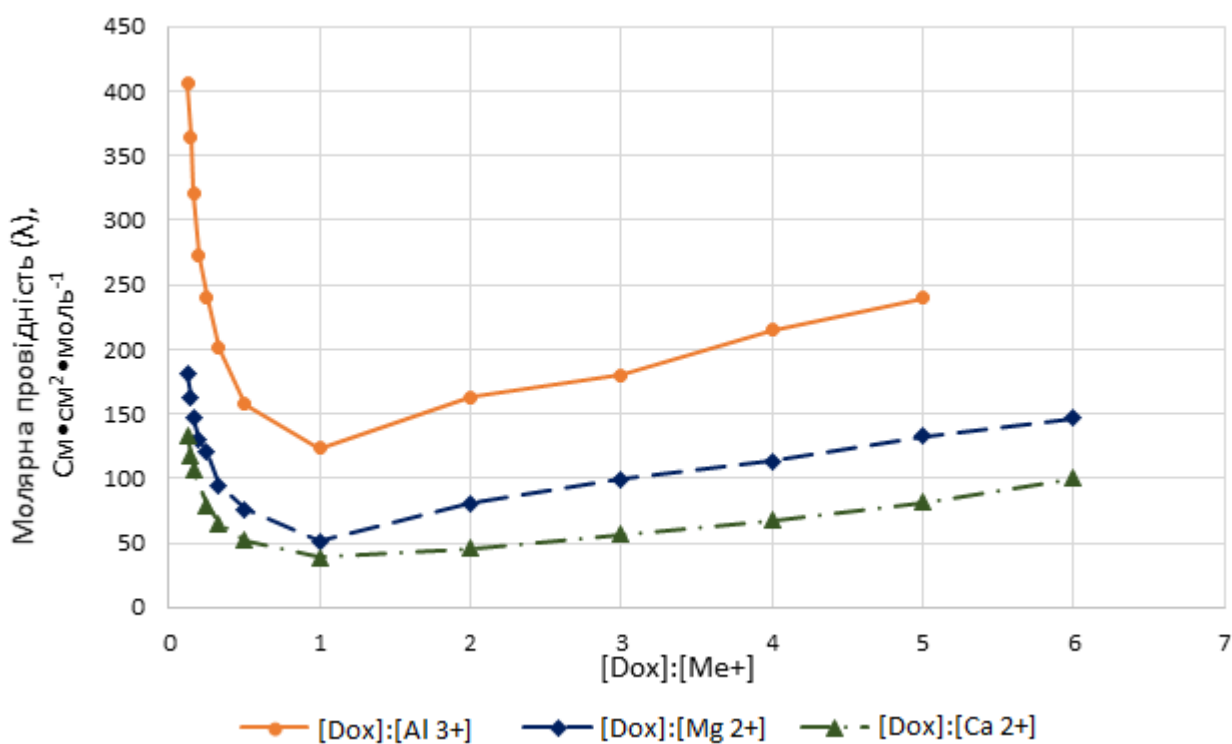


Рис. 4.9 Залежність молярної провідності від співвідношення молярних концентрацій $[Dox]:[Me^+]$, розчинених у воді очищеній за температури 296 К

Розрахунок констант утворення комплексів доксицикліну хіклату з іонами Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} доводить, що для всіх досліджуваних іонів величина константи перевищує 1 (табл. 4.2). Це свідчить про утворення стійких метал-лігандних комплексів з іонами Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} , найбільш виражене для іонів Al^{3+} і найменш – для іонів Ca^{2+} .

**Константи стійкості для комплексів доксицикліну хіклату –
катионів металів у розчині води очищеної**

Константа стійкості	Катіони металів		
	Al^{3+}	Mg^{2+}	Ca^{2+}
$Log_{10}(K_{ML+})$	2,65	2,43	1,90

Отже, за допомогою методу ЕІС-спектроскопії можливість утворення комплексів доксицикліну та катионів магнію, кальцію та алюмінію було підтверджено як якісно, так і кількісно. Відповідно до змін нахилів кривих молярної провідності, а також динаміки значення електричного опору, співвідношення, за якого утворюються комплекси з кожним із цих металів, складає 1:1. Розраховані константи стійкості свідчать про те, що найбільш виражена взаємодія доксицикліну спостерігається з іонами алюмінію, потім магнію, а найменша – кальцію. Утворення стабільного комплексу в результаті взаємодії доксицикліну з цими металами означає, що його ефективність може бути знижена за одночасного прийому препаратів, що містять ці метали.

4.3 Дослідження процесів взаємодії амоксициліну та солей магнію, кальцію, алюмінію та заліза(III) за допомогою ЕІС-методу

За допомогою ЕІС-методики оцінювання комплексоутворення нами було проведено дослідження комплексоутворення амоксициліну з іонами Fe^{3+} , Al^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} . Для цього було приготовано водні розчини амоксициліну й солей вищезазначених металів. Як розчинник використовували воду очищену. Концентрації амоксициліну та досліджуваних іонів металів Me^{+} варіювались від $1 \cdot 10^{-3}$ до $6 \cdot 10^{-3}$ моль/л. У ході експерименту для амоксициліну та кожного з досліджуваних металів було приготовано по 11 розчинів у таких молярних співвідношеннях концентрацій: 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1. Вимірювання проводили за температури 296 ± 3 К. Було виміряно електрохімічний імпеданс і побудовано ЕІС-характеристики, тобто діаграми Найквіста, для кожного з досліджуваних розчинів амоксициліну з відповідними іонами металів, а також обрано релевантні електричні моделі (рис. 4.10-4.13).

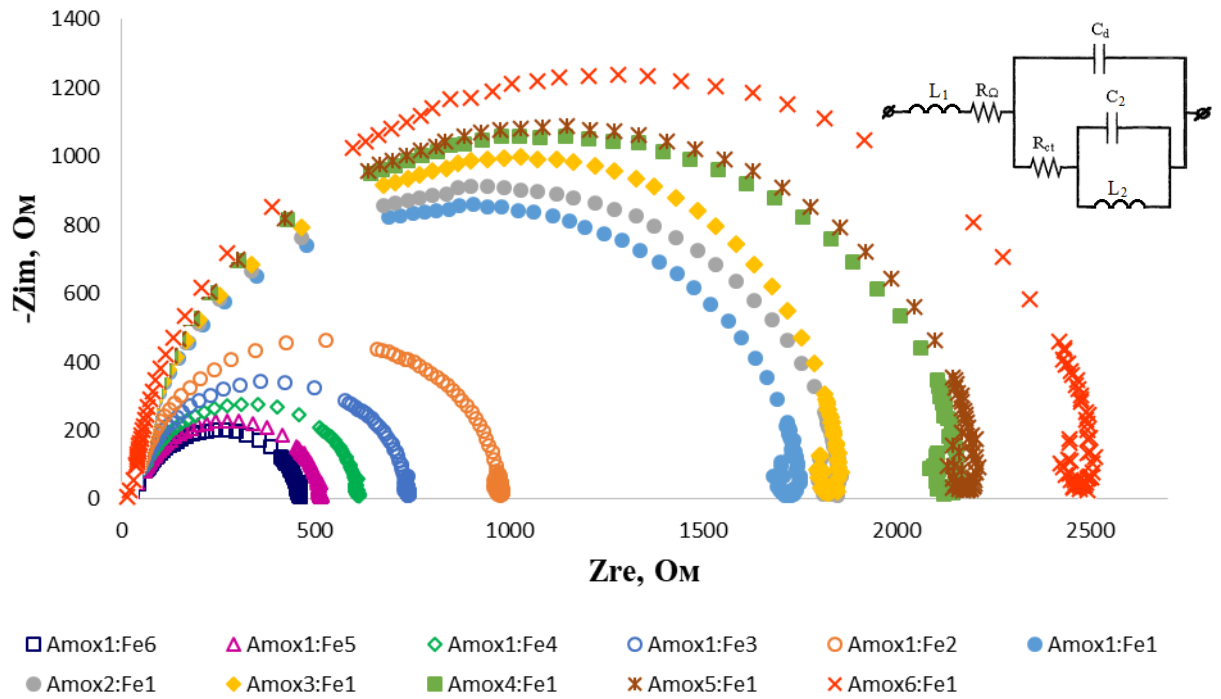


Рис. 4.10 Криві Найквіста для розчинів амоксициліну та Fe^{3+} у різних співвідношеннях концентрацій, виміряні за температури 295 К

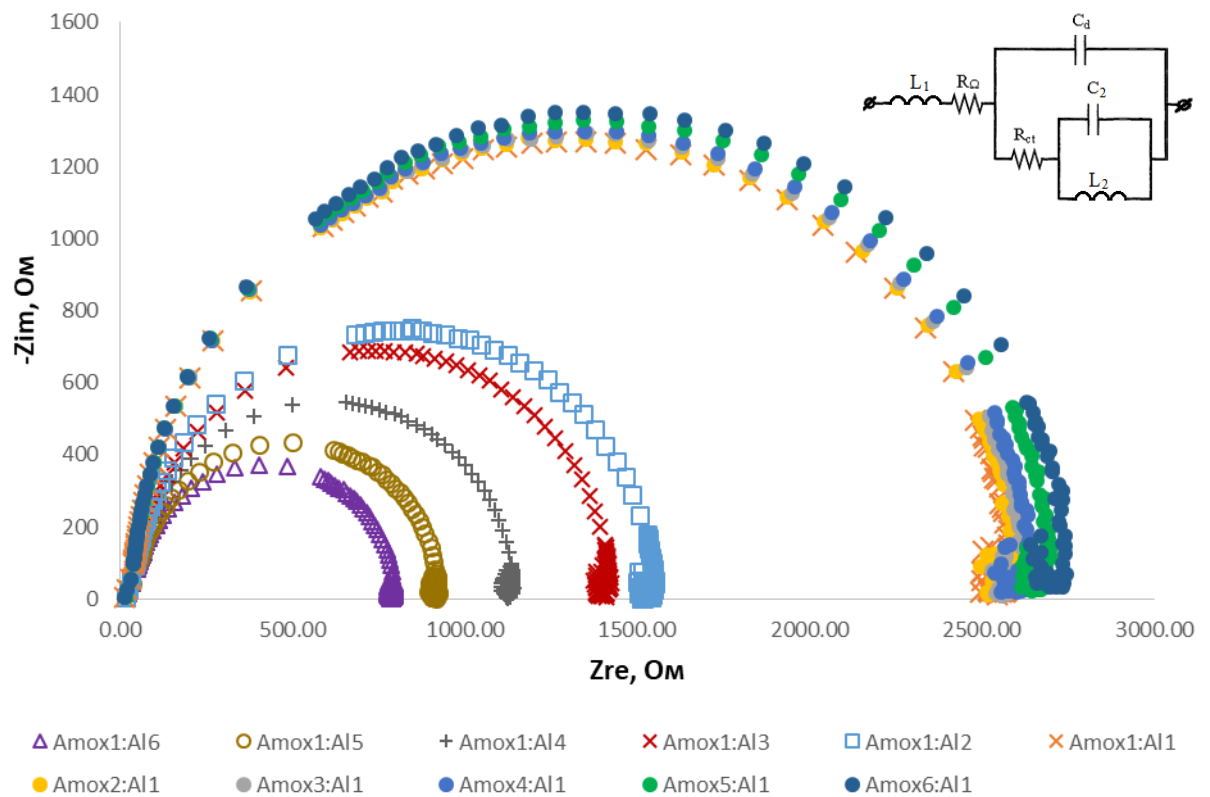
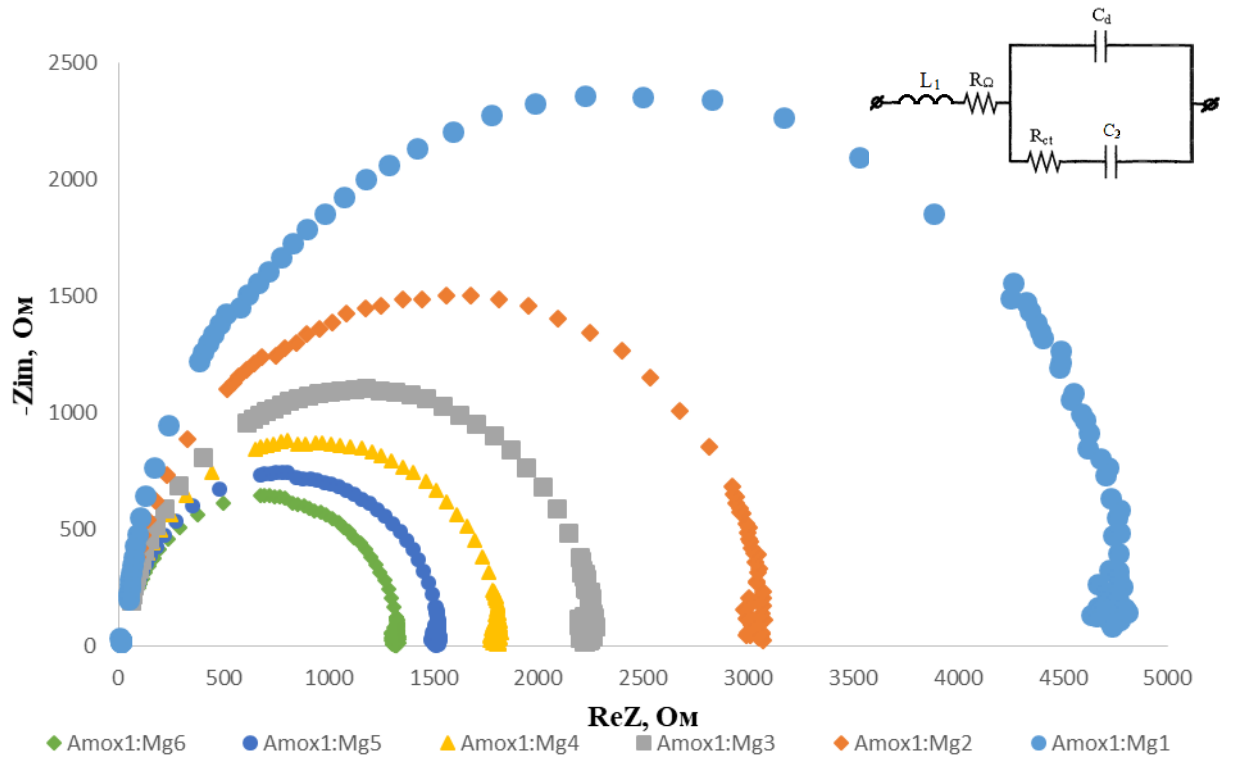
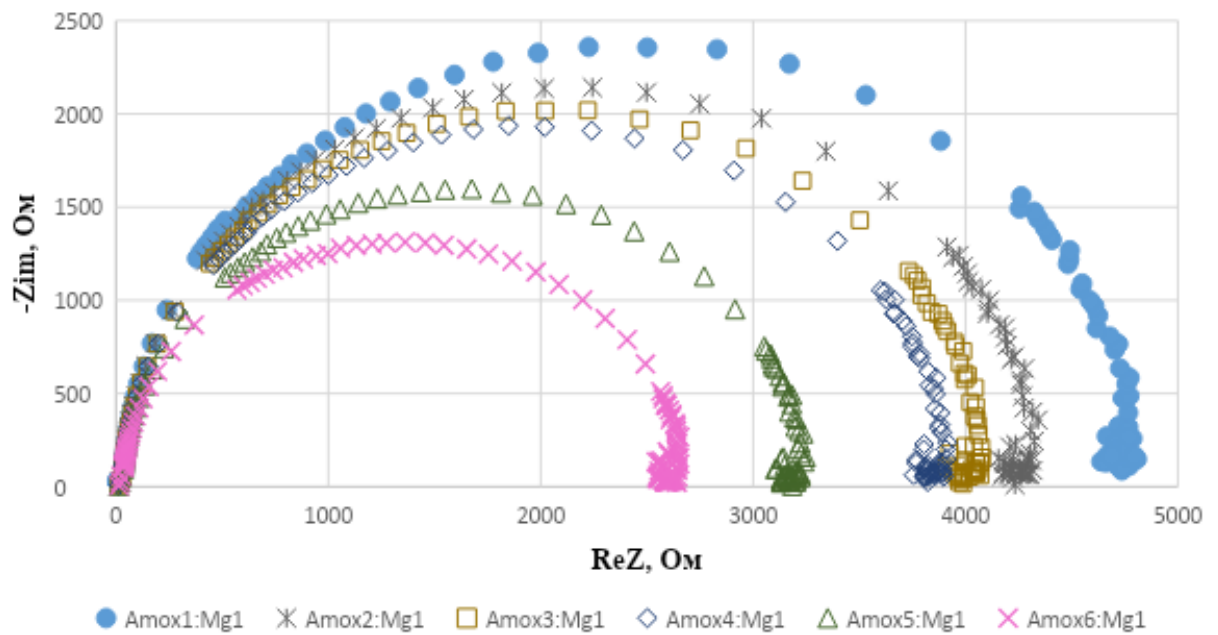


Рис. 4.11 Криві Найквіста для розчинів амоксициліну та іонів Al^{3+} у різних співвідношеннях концентрацій, виміряні за температури 295 К

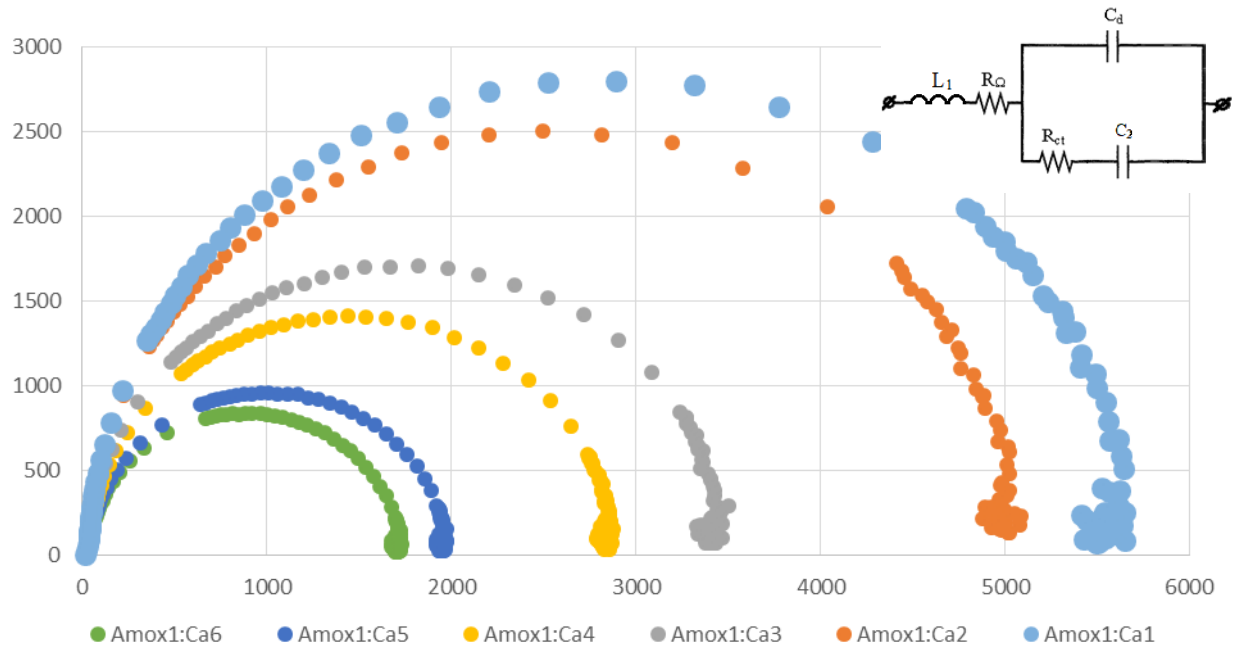


a)

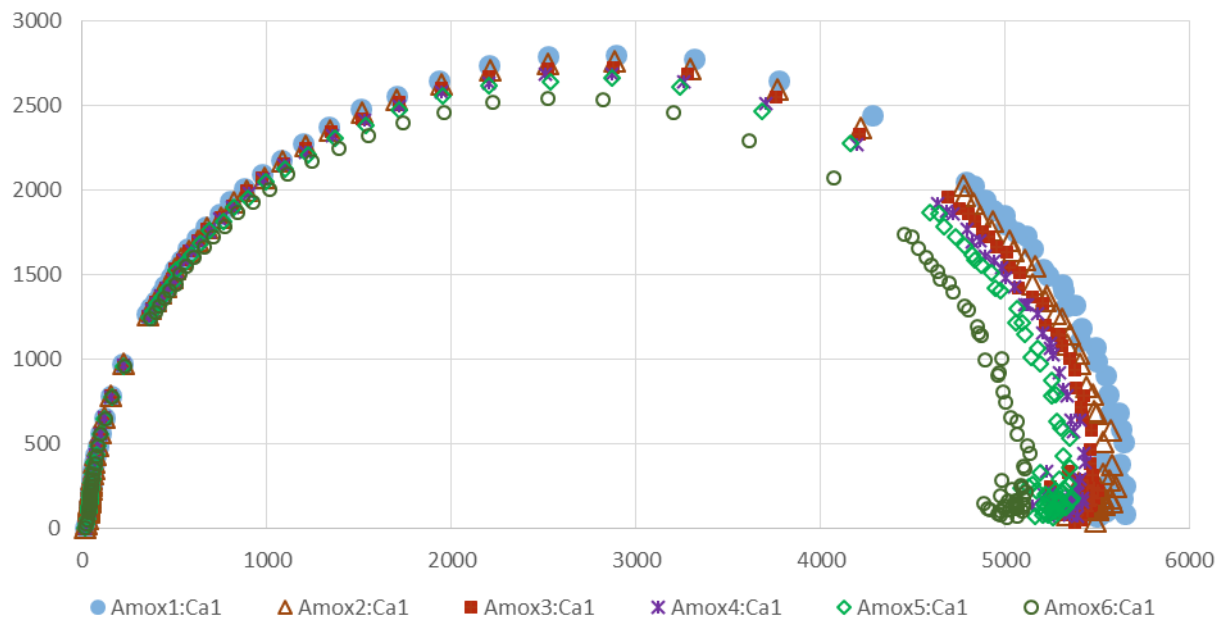


б)

Рис. 4.12 Криві Найквіста для розчинів амоксициліну та іонів Mg^{2+} у різних співвідношеннях концентрацій, виміряні за температури 295 К: а) збільшення концентрації катіонів Mg^{2+} , б) збільшення концентрації амоксициліну



а)



б)

Рис. 4.13 Криві Найквіста для розчинів амоксициліну та іонів Ca^{2+} у різних співвідношеннях концентрацій, виміряні за температури 295 К: а) збільшення концентрації Ca^{2+} , б) збільшення концентрації амоксициліну

Якісний аналіз ЕІС-характеристик розчинів амоксициліну та солей металів свідчить (рис. 4.10-4.13), що всі криві, незалежно від співвідношення концентрацій, мають вигляд чітко вираженого півкола з петльовими формами на низьких частотах. Це означає, що в цих розчинах, так само як і в дослідженнях взаємодії доксицикліну з солями металів, відбуваються фарадеївські процеси, тобто за базову модель можна обрати електричний ланцюг Ренделса. Однак, на відміну від досліджень комплексоутворення доксицикліну, під час взаємодії амоксициліну з іонами металів Fe^{3+} , Al^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} з'являється індуктивна компонента. Ці індуктивні процеси більш чітко виражені для електрохімічних систем розчинів амоксициліну з солями заліза й алюмінію, та менше для магнію та кальцію, що відображено на діаграмах Найквіста (рис. 4.10-4.13). Отже, для розрахунку електрохімічної імпедансної системи взаємодії розчинів амоксициліну з солями металів Fe^{3+} , Al^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} нами було вирішено додати до еквівалентного електричного ланцюга модельні індуктивності: L_1 , L_2 – для розчинів ліганду з іонами Fe^{3+} , Al^{3+} і L_1 – для іонів Mg^{2+} , Ca^{2+} .

Варіювання концентрацій досліджуваних розчинів $[\text{Амох}]:[\text{Me}^+]$ від 1:6 до 6:1 призводить до відповідної зміни діаметрів півкіл на діаграмах Найквіста, що якісно свідчить про зміну електрохімічного опору, а отже, й провідності досліджуваних систем. Так, за взаємодії амоксициліну з іонами Fe^{3+} і Al^{3+} відбувається збільшення півкола ЕІС-характеристики від мінімального значення за співвідношення концентрацій ліганду і металу, що дорівнює 1:6, до максимального за співвідношення $[\text{Амох}]:[\text{Me}^+] = 6:1$. Це означає, що в разі збільшення концентрації амоксициліну збільшується електрохімічний опір досліджуваних систем і зменшується провідність. Важливо зазначити, що динаміка наростання електрохімічного опору є високою до моменту досягнення концентрацій розчинів 1:1, як для взаємодії ліганду Fe^{3+} , так і для ліганду Al^{3+} (рис. 4.10, 4.11). Після цього для взаємодії амоксициліну з іонами Fe^{3+} збільшення концентрації ліганду не призводить до суттєвого збільшення діаметрів півкіл діаграм Найквіста (рис. 4.10), для взаємодії з іонами Al^{3+} збільшення діаметрів півкіл діаграм Найквіста практично зупиняється на рівні 1:1 (рис. 4.11).

Під час взаємодії амоксициліну з іонами Mg^{2+} і Ca^{2+} за співвідношення концентрацій 1:1 відбувається чітка зміна динаміки електрохімічного опору досліджуваних систем: збільшення від мінімального значення за $[Amox]:[Me^+] = 1:6$ до максимального за співвідношення 1:1 (рис. 4.12 а, 4.13 а), а далі зменшення від максимального до мінімального за $[Amox]:[Me^+] = 6:1$ (рис. 4.12 б, 4.13 б). Така поведінка кривих Найквіста схожа з тими, яку спостерігали за взаємодії іонів Mg^{2+} і Ca^{2+} з доксицикліном.

Отже, можна зробити попередній висновок, що в точці 1:1 очевидно спостерігається комплексоутворення, але уточнення цього має бути проведено під час розрахування модельних параметрів досліджуваних електрохімічних систем, зокрема шляхом дослідження динаміки опору переносу заряду R_{ct} . У Додатках Ж-Л наведено значення цих параметрів, розраховані для кожного з досліджуваних розчинів.

Аналіз динаміки ЕІС-параметрів засвідчив, що для всіх досліджуваних іонів металів у разі зменшення співвідношення їх концентрації до концентрації ліганду – амоксициліну спостерігається незначна варіабельність псевдоємності вимірювальної комірки C_d у межах 4 нФ, а також індуктивності L_1 на $1-2 \cdot 10^{-9}$ Гн (Додатки Ж-Л). Цю варіабельність можна не брати до уваги і вважати ці показники майже незмінним. Електричний опір досліджуваних розчинів R_Λ залежить від виду іонів, що взаємодіють з лігандом. Так, для іонів заліза і кальцію цей показник змінюється несуттєво під час зміни співвідношення концентрацій і залишається у межах 16...19 Ом – під час взаємодії з іонами Fe^{3+} , та у межах 15...16 Ом – для Ca^{2+} (Додатки Ж, Л). Таку динаміку також можна не брати до уваги і вважати ці показники майже незмінними. Водночас для іонів Al^{3+} і Mg^{2+} у разі збільшення їх концентрації спостерігається суттєве зростання електричного опору досліджуваних розчинів: у 1,5 раза для взаємодії ліганду з солями алюмінію – від 16, 31 Ом при співвідношенні концентрацій $[Amox]:[Al^{3+}] = 1:1$ до 23,87 Ом при 1:4, а також у 2 рази для взаємодії з солями магнію – 16, 46 Ом при $[Amox]:[Mg^{2+}] = 2:1$ та 37,78 Ом при 1:1 (Додатки И, К).

Далі проведено аналіз динаміки ЕІС-параметрів, що характеризують окислювально-відновлювальні реакції та інші електрохімічні процеси, що відбуваються в досліджуваних розчинах залежно від співвідношення молярних концентрацій.

Для розчинів амоксициліну та солей заліза, ЕІС-параметри яких розраховували за допомогою електрохімічної моделі $L_1 + R_{\wedge} + C_d / (R_{ct} + C_2 + L_2)$, зменшення концентрації іонів Fe^{3+} призводить до збільшення опору переносу заряду R_{ct} в 5,7 раза, мінімальне значення якого 435 Ом спостерігається при співвідношенні $[Amox]:[Fe^{3+}] = 1:6$, а максимальне 2,463 кОм – при співвідношенні 6:1 (Додаток Ж). Динаміка збільшення опору переносу заряду є високою до досягнення співвідношення концентрацій 1:1 ($R_{ct}(1:1)/R_{ct}(1:6) = 4$). Подальше збільшення концентрації ліганду призводить лише до помірного зростання величини опору переносу заряду ($R_{ct}(6:1)/R_{ct}(1:1) = 1,4$).

Важливо зауважити, що при співвідношенні $[Amox]:[Fe^{3+}] = 1:1$ спостерігається мінімальне значення псевдоємності $C_2 = 8,801 \cdot 10^{-12} \text{ Ф}$ та максимальне значення модельної індуктивності $L_2 = 7,975 \cdot 10^{-9} \text{ Гн}$ (табл. 4.7), що свідчить про уповільнення процесів масообміну і дифузії у цій точці. Отже, при співвідношенні молярних концентрацій $[Amox]:[Fe^{3+}] = 1:1$ спостерігається процес комплексоутворення.

Для розчинів амоксициліну та солей алюмінію, електрохімічні параметри яких розраховували так само за моделлю $L_1 + R_{\wedge} + C_d / (R_{ct} + C_2 + L_2)$, зменшення концентрації іонів Al^{3+} призводить до збільшення опору переносу заряду R_{ct} в 3,5 раза. Мінімальне значення $R_{ct} = 764 \text{ Ом}$ при співвідношенні $[Amox]:[Al^{3+}] = 1:6$, а максимальне 2,696 кОм – при співвідношенні 6:1 (Додаток И). Аналогічно до взаємодії з солями заліза для розчинів амоксициліну з іонами Al^{3+} у точці співвідношення концентрацій 1:1 спостерігається зміна динаміки збільшення опору переносу заряду. Так, у разі зменшення концентрації іонів Al^{3+} з $6 \cdot 10^{-3} \text{ моль/л}$ до $1 \cdot 10^{-3} \text{ моль/л}$ відбувається збільшення опору переносу заряду у 3,3 раза з 764 Ом до 2,536 кОм, а подальше збільшення концентрації ліганду практично не впливає на зростання величини опору переносу

заряду ($R_{ct}(6:1)/R_{ct}(1:1)=1,1$). У цій точці також відбувається зміна динаміки для значень модельної індуктивності L_2 , які збільшуються за підвищення концентрації ліганду у 18 разів, від $L_2(1:1)=0,842 \cdot 10^{-9} \text{ Гн}$ до $L_2(5:1)=15,41 \cdot 10^{-9} \text{ Гн}$ (Додаток І). Отже, при співвідношенні молярних концентрацій амоксициліну та іонів Al^{3+} на рівні 1:1 чітко визначається процес комплексоутворення між ними.

Для розчинів амоксициліну та солей магнію, для розрахування ЕІС-параметрів яких було обрано модель $L_1 + R_{\wedge} + C_d / (R_{ct} + C_2)$, при співвідношенні концентрацій 1:1 відбувається чітка зміна динаміки зростання опору переносу заряду R_{ct} на тенденцію його зменшення (Додаток К). При $[\text{Амох}]:[\text{Mg}^{2+}] = 1:1$ зростання опору переносу заряду досягає свого максимального значення $R_{ct}=4,730 \text{ кОм}$, що в 3,7 раза перевищує відповідний показник для співвідношення концентрацій ліганду й іону Mg^{2+} – 1:6 та в 1,8 раза для $[\text{Амох}]:[\text{Mg}^{2+}]=6:1$. Зауважмо, що при співвідношенні концентрацій $[\text{Амох}]:[\text{Mg}^{2+}]=1:1$ спостерігається також чітка зміна динаміки псевдоємності C_2 : зі зменшення її величини в разі зниження концентрації іону Mg^{2+} і досягнення мінімального рівня $C_2(1:1)=12,38 \text{ пФ}$ до подальшого зростання під час підвищення концентрації ліганду (Додаток К). Це свідчить, що в цій точці при $[\text{Амох}]:[\text{Mg}^{2+}]=1:1$ швидкість процесів масообміну і дифузії є максимально уповільненою, тобто відбувається процес комплексоутворення між амоксициліном і солями магнію.

Для розчинів амоксициліну та солей кальцію, розрахування ЕІС-параметрів яких проведено за моделлю $L_1 + R_{\wedge} + C_d / (R_{ct} + C_2)$, аналогічно до вищеописаного дослідження взаємодії з іонами Mg^{2+} , виявлено, що при співвідношенні концентрацій 1:1 так само відбувається чітко визначена зміна динаміки опору переносу заряду R_{ct} (Додаток Л). За $[\text{Амох}]:[\text{Ca}^{2+}] = 1:1$ зростання опору переносу заряду досягає свого максимального значення $R_{ct}(1:1)=7,491 \text{ кОм}$, що в 4,4 раза перевищує відповідний показник при співвідношенні концентрацій 1:6 $R_{ct}(1:6)=1,687 \text{ кОм}$, а також в 1,5 раза за співвідношення 6:1 $R_{ct}(6:1)=5,052 \text{ кОм}$. Також, при співвідношенні концентрацій $[\text{Амох}]:[\text{Ca}^{2+}]=1:1$ спостерігається

чітке зменшення величини псевдоємності C_2 за зниження концентрації іону Ca^{2+} і досягнення мінімального рівня $C_2(1:1)=4,55$ пФ, а також її подальше зростання в 11 разів за підвищення концентрації ліганду (Додаток Л). Така динаміка псевдоємності досліджуваних розчинів означає, що при $[\text{Amox}]:[\text{Ca}^{2+}]=1:1$ швидкість процесів масообміну і дифузії максимально уповільнюється. Отже, відповідно до зміни динаміки опору переносу заряду та псевдоємності чітко визначається, що при співвідношенні концентрацій 1:1 відбувається процес комплексоутворення між амоксициліном і солями кальцію.

Для оцінювання констант стабільності комплексоутворення амоксициліну з іонами Fe^{3+} , Al^{3+} , Mg^{2+} та Ca^{2+} було розраховано залежності молярних провідностей від співвідношення молярних концентрацій ліганду і солей досліджуваних металів (рис. 4.14).

Аналіз характеристик залежності молярних провідностей від співвідношення молярних концентрацій під час взаємодії амоксициліну з іонами заліза й алюмінію засвідчив, що в разі збільшення концентрації ліганду відбувається утворення комплексів, менш рухливих комплексів порівняно з вільними сольватованими катіонами (рис. 4.14). Це призводить до зменшення молярної провідності розчинів амоксициліну з іонами Fe^{3+} , Al^{3+} при зменшенні концентрації останніх. Нахил ділянки кривої молярної провідності змінюється в точці, де молярне співвідношення концентрацій амоксициліну та іонів Fe^{3+} , Al^{3+} дорівнює 1:1, що свідчить про утворення в цій точці стехіометричних комплексів.

Аналіз кривих, які визначають залежності молярних провідностей від співвідношення молярних концентрацій під час взаємодії амоксициліну з іонами магнію та кальцію, показав, що зменшення концентрації іонів металів призводить до зменшення молярної провідності цих розчинів. Мінімальне значення молярної провідності досягається при співвідношенні концентрацій 1:1, тобто в цій точці відбувається максимальне утворення комплексів і значно знижується рухливість вільних сольватованих катіонів (рис. 4.14). Подальше збільшення концентрації ліганду призводить до підвищення провідності

розчинів. Отже, при співвідношенні концентрацій ліганду й іонів магнію та кальцію 1:1 відбувається перегин кривих залежності молярної провідності розчинів від концентрацій, що свідчить про утворення в цій точці стехіометричних комплексів.

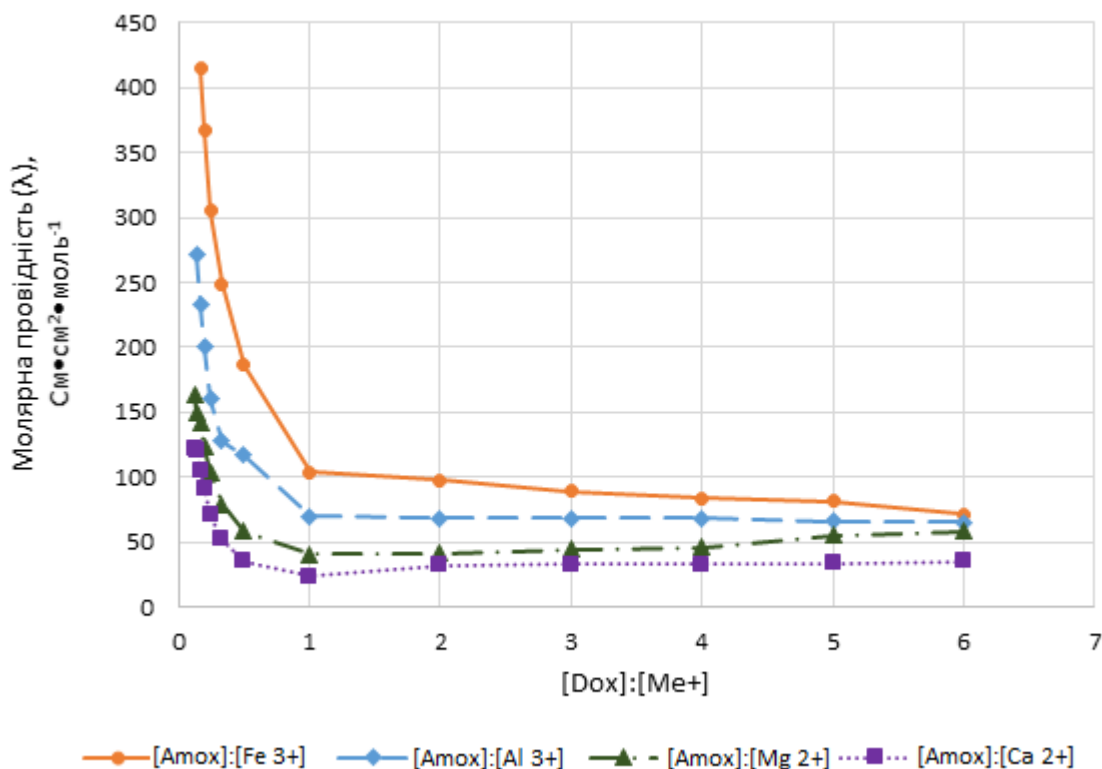


Рис. 4.14 Залежність молярної провідності від співвідношення молярних концентрацій $[Amox]:[Me^+]$, розчинених у воді очищеній за температури 295 К

Нахил ділянки кривої молярної провідності змінюється в точці, де молярне співвідношення концентрацій амоксициліну та Fe^{3+} дорівнює 1:1, що свідчить про утворення в цій точці стехіометричних комплексів.

Значення розрахованої за формулою (4.1) константи стійкості комплексів, утворених під час взаємодії амоксициліну та досліджуваних іонів, наведено в табл. 4.3.

Константа стійкості для комплексу амоксициліну та катіонів металів у розчині води очищеної

Константа стійкості	Катіони металів			
	Fe^{3+}	Al^{3+}	Mg^{2+}	Ca^{2+}
$\text{Log}_{10}(\text{K}_{\text{ML}+})$	3,57	3,48	2,67	2,38

Визначено, що для всіх досліджуваних водних розчинів солей металів константа стабільності комплексоутворення з амоксициліном ($\text{Log}_{10}(\text{K}_{\text{ML}+})$) за температури 296 К більша 2 і менше 6. Згідно з наявними літературними даними, надто низькі значення констант стабільності (від негативних до 1) свідчать про те, що комплекс метал-ліганд не тільки розчиняється у воді, але й легко дисоціює на іон металу та ліганд [140-142]. За величинами константи стійкості комплексу метал-ліганду можуть бути ранжовані від максимального значення 3,57 для комплексу амоксициліну з іоном Fe^{3+} до 2,38 для Ca^{2+} ($\text{Fe}^{3+} > \text{Al}^{3+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$).

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 4

1. Проведено вивчення можливості використання методу ЕІС як інструменту для оцінювання комплексоутворення антибактеріальних препаратів та солей металів на прикладі взаємодії доксицикліну хіклату та солей заліза(III). Можливість комплексоутворення доксицикліну та заліза(III) підтверджено як якісно, так і кількісно.

2. Відповідно до зміни нахилу кривої молярної провідності, а також максимального значення електричного опору, співвідношення, за якого утворюються комплекси, становить 1: 1. Константу утворення комплексу, яка склала 2,9, було визначено за розрахованими значеннями молярної провідності. Отримані результати підтвердили ефективність та можливість використання ЕІС для подальшого вивчення хімічних взаємодій ЛЗ та солей металів.

3. Результати оцінювання взаємодії доксицикліну хіклату та солей Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} за допомогою розроблених методичних підходів до дослідження процесу комплексоутворення шляхом ЕІС дозволяють констатувати, що при співвідношенні концентрацій 1:1 відбувається комплексоутворення ліганду та досліджуваних іонів. Розраховані константи утворення комплексів свідчать про те, що найбільш стійкі комплекси доксицикліну спостерігаються з іонами алюмінію (2,65), магнію (2,43), а найменш стійкі – з іонами кальцію (1,9).

4. Дослідження взаємодії амоксициліну та іонів металів Fe^{3+} , Al^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} за допомогою ЕІС-методу засвідчило, що при співвідношенні концентрацій 1:1 відбувається стійке утворення комплексу метал-ліганд, яке підтверджується якісним аналізом і кількісними оцінками за допомогою константи стійкості.

5. Для всіх досліджуваних водних розчинів солей металів константа утворення комплексу з амоксициліном за температури 296 К перевищує 2. Розраховані константи утворення комплексів амоксициліну демонструють, що найбільш виражена взаємодія спостерігається з іонами заліза (3,57), яка практично дорівнює відповідному показнику для алюмінію (3,48). Взаємодія амоксициліну з іонами магнію та кальцію була меншою, ніж з іонами заліза та алюмінію, а константи стійкості дорівнювали 2,67 і 2,38 для Mg^{2+} та Ca^{2+} відповідно.

РОЗДІЛ 5

ВЕРИФІКАЦІЯ МЕТОДІВ АНАЛІЗУ КОМБІНОВАНИХ ТАБЛЕТОК АМОКСИЦИЛІНУ ТА КАЛІЮ КЛАВУЛАНАТУ З ПОДАЛЬШИМ ЇХ ПЕРЕНЕСЕННЯМ НА ВЕТШІ ТА УЕРХ-МЕТОДИ

Ефективність терапії залежить від якості активних фармацевтичних інгредієнтів, що входять до складу лікарського засобу. У ДФУ не наведено жодних вимог щодо контролю якості комбінованих лікарських засобів, що містять амоксициліну тригідрат та калію клавуланат. Отже, для забезпечення ефективності та безпечності надання фармацевтичної допомоги необхідна розробка та/або верифікація методів контролю якості комбінованих ЛФ амоксициліну та клавуланової кислоти.

Деякі фармакопеї, зокрема АФ та БФ, мають статті для проведення випробування препаратів, що містять амоксициліну тригідрат та калію клавуланат [40, 50]. Для підтвердження якості необхідним є проведення ідентифікації основних речовин методом ТШХ, з подальшим дослідженням розчинення, кількісного визначення та визначення домішок методом ВЕРХ.

Верифікація методів аналізу препаратів, що містять амоксициліну тригідрат та калію клавуланат, необхідна для забезпечення пацієнтів препаратами кращої якості. Крім того, таке дослідження необхідно враховувати під час укладання статті в ДФУ.

5.1 Ідентифікація комбінованих таблеток амоксициліну та калію клавуланату

5.1.1 Верифікація ТШХ-методу

Метод ТШХ використовують для попереднього підтвердження якості препаратів, що містять амоксициліну тригідрат та калію клавуланат. Метод ТШХ є менш витратним, забезпечує кращу аналітичну точність та відтворюваність, зразки зі стандартами можуть бути оброблені одночасно за однакових умов.

Ідентифікацію таблеток, що містять амоксициліну тригідрат та калію клавуланат, проводять з використанням ТШХ-методу [50]. Крім цього, метод ТШХ застосовують також для визначення амоксициліну тригідрату в капсулах [143]. Хоча цей метод добре описано та валідовано, розділення між компонентами не є прийнятним. Результати, наведені в дослідженнях G. Indrayanto та ін., продемонстрували краще розділення компонентів [144]. Однак у літературних даних відсутня інформація щодо розробки чи трансферу умов ТШХ на ВЕТШХ-метод.

Для проведення ідентифікації ТШХ-методом було використано *методику 8* (розділ 2, п. 2.4).

Приготування розчинів

Випробовуваний розчин: 3,2 г порошку таблеток амоксициліну з клавуланатом поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 80 мл *суміші* та струшують на шейкері 400 об/хв протягом 20 хвилин, доводять до позначки тим же розчинником, ретельно перемішують та фільтрують через складчастий фільтр «синя стрічка», відкидаючи перші порції фільтрату.

Розчин порівняння: 4 мг калію клавуланату та 8 мг амоксициліну тригідрату розчиняють у 10 мл *суміші* та ретельно перемішують.

Розчин плацебо: 3,2 г порошку плацебо, що містить всі компоненти, крім амоксициліну тригідрату та калію клавуланату, поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 80 мл *суміші* та струшують на шейкері 400 об/хв протягом 20 хвилин, доводять до позначки тим же розчинником, ретельно перемішують та фільтрують через складчастий фільтр «синя стрічка» відкидаючи перші порції фільтрату.

Для верифікації методу було проведено дослідження на п'яти різних серіях таблеток амоксициліну з клавуланатом та розчинах порівняння (рис. 5.1).

ДФУ регламентує вивчення специфічності для підтвердження методів ідентифікації, тому в цих умовах також було проаналізовано розчин плацебо (рис. 5.1).

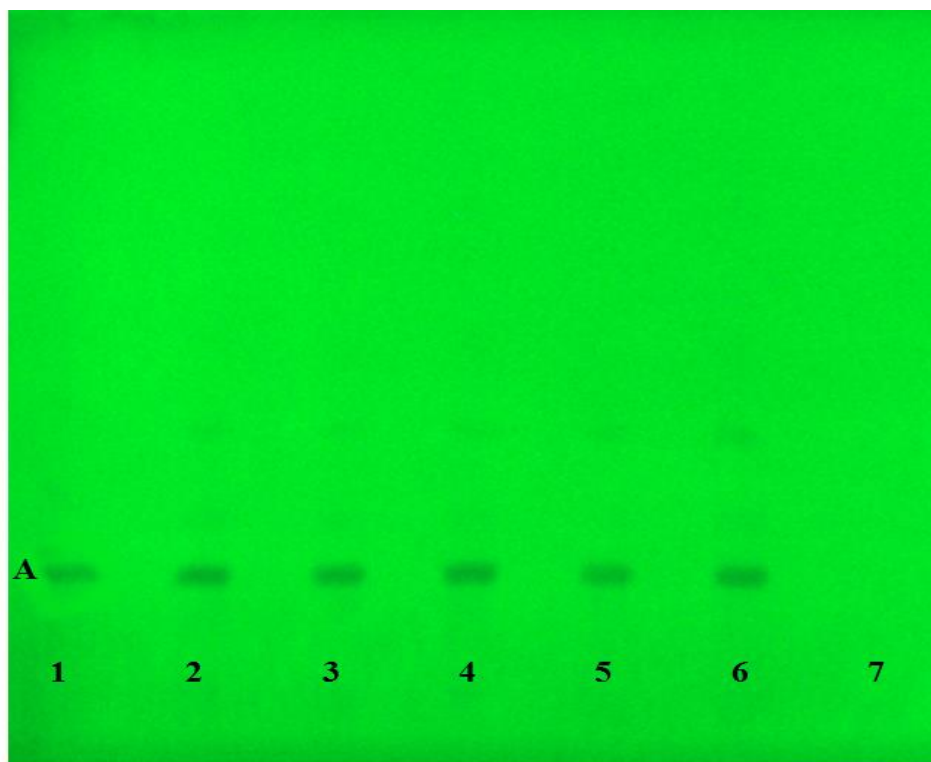


Рис. 5.1 ТШХ-хроматограма досліджень таблеток амоксициліну з клавуланатом (А – зона амоксициліну тригідрату, 1 – розчин порівняння, 2 – таблетки серії № 184117, 3 – № 185691, 4 – № 187489, 5 – № 184153, 6 – № 184111, 7 – плацебо таблеток)

У запропонованих умовах визначення калію клавуланату не можливе, оскільки в нього відсутнє поглинання за заданої довжини хвилі. Для підтвердження було вивчено УФ-спектри двох діючих компонентів у таблетках амоксициліну з клавуланатом (рис. 5.2). Отже, як бачимо, калію клавуланат не має поглинання за 254 нм, тому для його визначення варто використовувати іншу довжину хвилі. Цей факт потрібно враховувати під час розроблення методу ідентифікації лікарських засобів, що містять амоксицилін тригідрат та калію клавуланат.

БФ регламентує, що тестові розчини за основними зонами не мають відрізнятися від розчинів порівняння, тому всі зразки комбінованих таблеток амоксициліну з клавулановою кислотою відповідають визначеним нормам.

Також, як видно з рисунку 5.2, метод є специфічним, оскільки жодна речовина з плацебо не заважає проведенню ідентифікації.

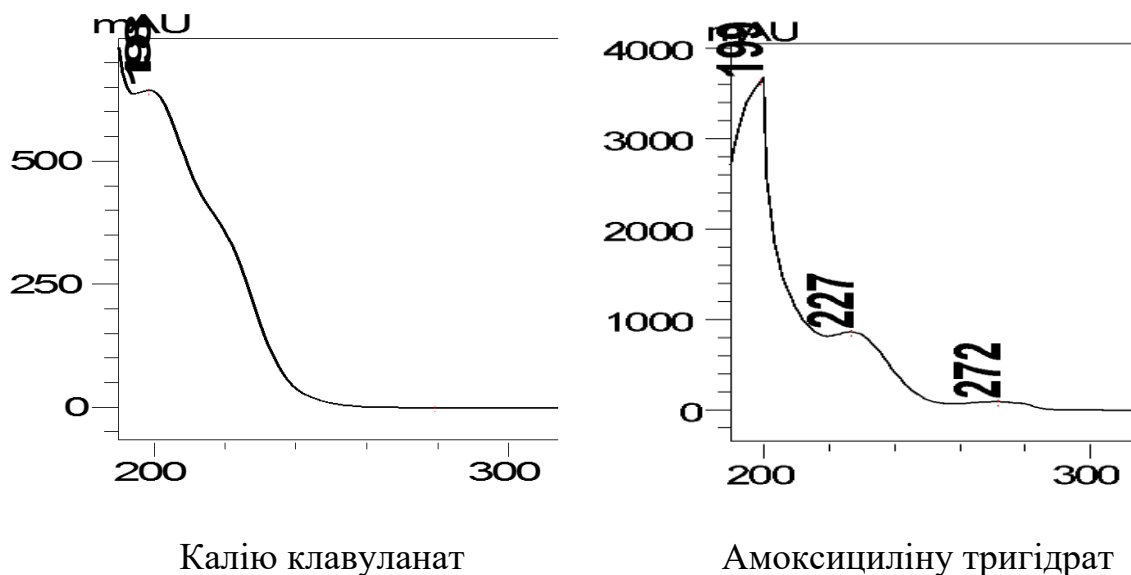


Рис. 5.2 Спектри поглинання діючих компонентів у комбінованих таблетках амоксициліну з клавуланатом

5.1.2 Перенесення умов ТШХ-методу на ВЕТШХ-пластину

Добре відомим є факт, що пластини ВЕТШХ мають певні переваги над звичайними ТШХ, зокрема більшу роздільну здатність на одиницю відстані пластини, більш швидкий час аналізу та зменшення кількості використання розчинників [145]. Тому застосування цього методу може бути рентабельним та менш трудомістким.

Умови, використовувані для проведення ТШХ-аналізу, було перенесено на ВЕТШХ-пластину. Їх детально описано в *методиці 9* (розділ 2, п. 2.4).

Приготування розчинів

Випробовуваний розчин: 3,2 г порошку комбінованих таблеток амоксициліну з клавуланатом поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 80 мл суміші та струшують на шейкері 400 об/хв протягом 20 хвилин, доводять до позначки тим же розчинником, ретельно перемішують та фільтрують через складчастий фільтр «синя стрічка», відкидаючи перші порції фільтрату.

Розчин порівняння: 4 мг калію клавуланату та 8 мг амоксициліну тригідрату розчиняють у 10 мл суміші та ретельно перемішують.

Розчин плацебо: 3,2 г порошку плацебо (містить всі компоненти, крім амоксициліну тригідрату та калію клавуланату) поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 80 мл суміші та струшують на шейкері 400 об/хв

протягом 20 хвилин, доводять до позначки тим же розчинником, ретельно перемішують та фільтрують через складчастий фільтр «синя стрічка», відкидаючи перші порції фільтрату.

Як і у випадку ТШХ-методу, досліджували п'ять різних серій таблеток амоксициліну з клавуланатом (рис. 5.3). Також для валідації методу було досліджено розчин плацебо (рис. 5.3).

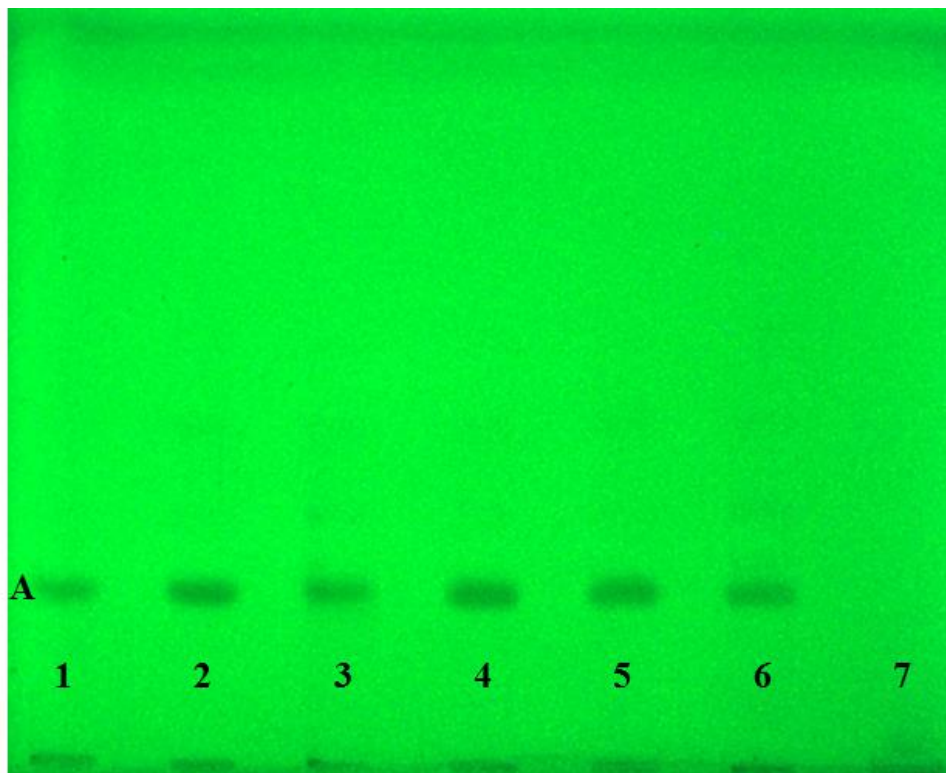


Рис. 5.3 ВЕТШХ-хроматограма ідентифікації таблеток амоксициліну з клавуланатом (А – зона амоксициліну тригідрату, 1 – розчин порівняння, 2 – таблетки серії № 184117, 3 – № 185691, 4 – № 187489, 5 – № 184153, 6 – № 184111, 7 – плацебо таблеток)

Кінцеві результати ВЕТШХ, а саме висока специфічність методу при аналізі, визначення амоксициліну тригідрату та відсутність плями калію клавуланату збігалися з даними, отриманими під час використання ТШХ-методу. Тому ці два методи можуть бути використані для проведення тесту ідентифікації комбінованих препаратів, що містять зазначені компоненти.

Ідентифікацію обох компонентів можна покращити, застосувавши для детектування меншу довжину хвилі.

5.2 Кількісне визначення амоксициліну тригідрату та калію клавуланату

5.2.1 Верифікація ВЕРХ-методу

У зв'язку з тим, що в ДФУ відсутня стаття для перевірки якості лікарських засобів, до складу яких входять амоксицилін та клавуланат калію, необхідно було провести верифікацію методики [146].

Верифікацію методики було виконано на лікарських засобах «Амоксил-К₆₂₅» виробництва ПАТ «Київмедпрепарат» серій №184117, №185691, №187489, №184153, №184111 та «Рапід-625» №21, Іпка Лабораторіс Лімітед, Індія серій №18337, №18764, №18403, №18441, №18449.

Для контролю кількісного вмісту БФ пропонує використовувати ВЕРХ, де необхідне дотримання таких умов:

- як стаціонарну фазу використовують колонку розміром 250×4,6 мм, заповнену *силікагелем октадецилсилільним для хроматографії Р* з передколоною, з розміром часток 5 мкм;
- швидкість рухомої фази: 2,0 мл/хв;
- температура колонки: температура навколишнього середовища, °С;
- детектування за довжини хвилі: 220 нм;
- об'єм інжекції: 20 мкл;
- рухома фаза А: *буферний розчин з рН 4.4 (0.78% розчин натрію дигідроген фосфату, доведеного до рН 4.4 з використанням фосфорної кислоти)/метанол Р (95/5 v/v).*

Під час верифікації методики швидкість потоку рухомої фази було змінено до 1 мл/хв через високий тиск. За заданої швидкості тиск системи не перевищував 200 Бар, тому цю швидкість було використано для проведення подальшого експерименту.

Параметри дослідження наведено в *методиці 10* (розділ 2, п. 2.4).

Приготування розчинів

Випробовуваний розчин: до 500 мг (точна наважка) порошку комбінованих таблеток амоксициліну та клавуланової кислоти (еквівалентної 250 мг

амоксициліну), додають 400 мл води Р, струшують на шейкері зі швидкістю 400 об/хв протягом 20 хвилин, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 500,0 мл.

Розчин порівняння: 100 мг (точна наважка) ФСЗ амоксициліну тригідрату та 80 мг (точна наважка) СЗ калію клавуланату поміщають у мірну колбу місткістю 200,0 мл, розчиняють у воді Р, доводять до мітки тим же розчинником та ретельно перемішують.

Розчин плацебо: 500 мг плацебо поміщають у мірну колбу місткістю 500,0 мл, додають 400 мл води Р, струшують на шейкері зі швидкістю 400 об/хв протягом 20 хвилин, доводять до мітки тим же розчинником та ретельно перемішують.

Розчини фільтрують через мембранний фільтр з діаметром пор 0.45μм.

Для розрахування вмісту компонентів необхідно використовувати такі формули.

Вміст амоксициліну (X_1) в 1 таблетці, у міліграмах, обчислюють за формулою:

$$X_1 = \frac{S_i \times m_0 \times 500 \times m_c \times P}{S_0 \times m_1 \times 200 \times 100} = \frac{S_i \times m_0 \times m_c \times P}{S_0 \times m_1 \times 40},$$

де: S_i – середнє значення площ піків амоксициліну, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину;

S_0 – середнє значення площ піків амоксициліну, розраховане з хроматограм *розчину порівняння*;

m_0 – маса наважки препарату, у міліграмах;

m_1 – маса наважки *ФСЗ амоксициліну тригідрату*, у міліграмах;

P – вміст основної речовини в стандарті амоксициліну тригідрату, у відсотках;

m_c – середня маса таблетки, у міліграмах.

Вміст клавуланової кислоти (X_2) в 1 таблетці, у міліграмах, обчислюють за формулою:

$$X_2 = \frac{S_i \times m_0 \times 500 \times m_c \times P}{S_0 \times m_2 \times 200 \times 100} = \frac{S_i \times m_0 \times m_c \times P}{S_0 \times m_2 \times 40},$$

де: S_i – середнє значення площ піків клавуланату, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину;

S_0 – середнє значення площ піків клавуланату, розраховане з хроматограм розчину порівняння;

m_0 – маса наважки препарату, у грамах;

m_2 – маса наважки *СЗ* калію клавуланату, у міліграмах;

m_c – середня маса таблетки, у міліграмах;

P – вміст основної речовини в стандарті калію клавуланату, у відсотках.

1 мг клавуланату відповідає 1,191 мг калію клавуланату.

Відповідно до регламентації ДФУ для верифікації методу було вивчено такі параметри: придатність хроматографічної системи, невизначеність пробопідготовки, специфічність, лінійність, правильність, внутрішньолабораторна прецизійність, робасність [39, 121].

Вивчення придатності хроматографічної системи проводили на стандартному розчині. Усі параметри відповідали вимогам, що висуваються БФ та ДФУ (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

Параметри хроматографічної системи, виявлені під час аналізу

Параметр	Вимоги	Знайдено
Коефіцієнт симетрії піку клавуланату на хроматограмі розчину порівняння	Не більше 1,5	1,04
Ступінь розділення між піками клавуланату та амоксициліну	Не менше 3,5	15,46

Максимально допустиму повну відносну невизначеність методики аналізу препарату $\Delta_{AS}\%$ було розраховано для амоксициліну тригідрату (табл. 5.2) та калію клавуланату (табл. 5.3). Цей параметр пов'язаний із симетричними допусками вмісту аналізованої речовини згідно зі специфікацією (В). Тобто:

$$\Delta AS \leq \frac{B_H - B_L}{2} \times 0,32,$$

де Н – верхня межа вмісту за специфікацією, %; L – нижня межа вмісту за специфікацією, %.

Для препаратів, що містять амоксициліну тригідрат та калію клавуланат, БФ регламентує вміст від 90 % до 105 % для двох компонентів, тому:

$$\Delta AS \leq \frac{105 - 90}{2} \times 0,32 = 2,4\%$$

Таблиця 5.2

**Розрахунок невизначеності пробопідготовки (Δ_{sp})
для амоксициліну тригідрату**

Операція пробопідготовки	Значення	Невизначеність, (Δ), %
<i>Випробовуваний розчин</i>		
Наважка (м)	500 мг	0,04
Невизначеність зважування	0,2 мг	
Доведення до об'єму	500 мл	0,07
<i>Розчин порівняння</i>		
Наважка (м)	100 мг	0,2
Невизначеність зважування	0,2 мг	
Доведення до об'єму	200 мл	0,1
<i>Повна невизначеність пробопідготовки $\Delta_{sp}\%$</i>		0,24
<i>Невизначеність кінцевої аналітичної операції Δ_{FAO} (рідинна хроматографія)</i>		1,35
<i>Повна невизначеність методики аналізу $\Delta_{AS}\%$</i> $\Delta_{AS}\% = \sqrt{(\Delta_{sp}\%)^2 + (\Delta_{FAO}\%)^2}$		1,37

Таблиця 5.3

Розрахунок невизначеності пробопідготовки (Δ_{sp}) для калію клавуланату

Операція пробопідготовки	Значення	Невизначеність, (Δ), %
<i>Випробовуваний розчин</i>		
Наважка (м)	500 мг	0,04
Невизначеність зважування	0,2 мг	
Доведення до об'єму	500 мл	0,07
<i>Розчин порівняння</i>		
Наважка (м)	40 мг	0,5
Невизначеність зважування	0,2 мг	
Доведення до об'єму	200 мл	0,1
<i>Повна невизначеність пробопідготовки $\Delta_{sp}\%$</i>		0,52
<i>Невизначеність кінцевої аналітичної операції Δ_{FAO} (рідинна хроматографія)</i>		1,35
<i>Повна невизначеність методики аналізу $\Delta_{AS}\%$</i>		1,45

Оскільки повна невизначеність методики аналізу амоксициліну тригідрату та калію клавуланату відповідає вимогам до цього параметра, то невизначеності пробопідготовки та аналізу мають забезпечити достатню точність вимірювання.

Для вивчення специфічності було приготовано такі розчини: розчинник (бланк), розчин порівняння, випробовуваний розчин та розчин плацебо. Специфічність методики підтверджено шляхом порівняння часів утримування амоксициліну тригідрату та калію клавуланату, отриманих із хроматограм випробовуваного розчину (рис. 5.4) та розчину порівняння (рис. 5.5). На хроматограмах розчинів бланку (рис. 5.6) та плацебо (рис. 5.7) не виявлено піків, час утримування яких збігався б з часами утримування піків основних речовин.

Лінійність методу визначали з використанням 9 модельних розчинів у діапазоні концентрацій діючих речовин. ДФУ визначає діапазон 80 – 120 % (з кроком 5%).

Параметри лінійності було розраховано для калію клавуланату (табл. 5.4) та амоксициліну тригідрату (табл. 5.6).

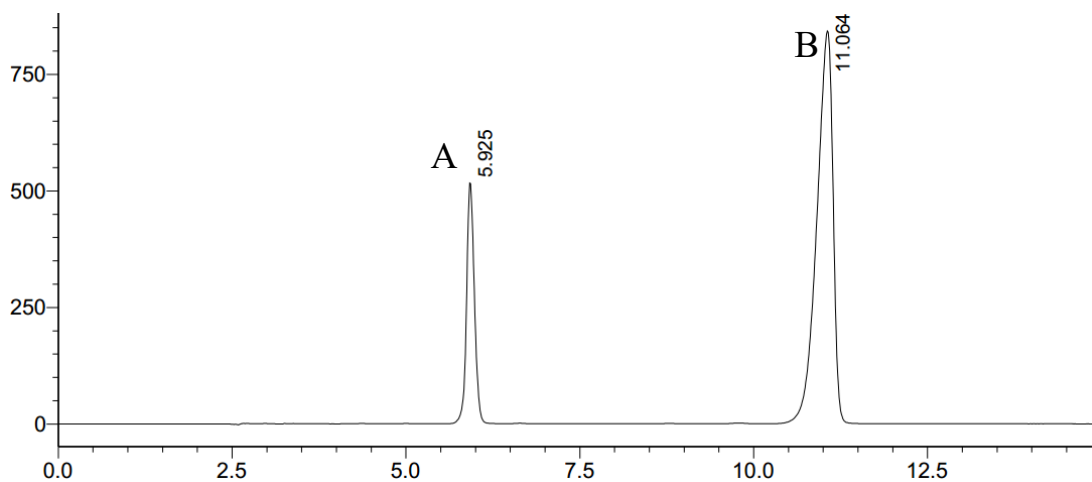


Рис. 5.4 Хроматограма ВЕРХ-методу кількісного визначення для розчину порівняння (А – калію клавуланату, В – амоксициліну тригідрату)

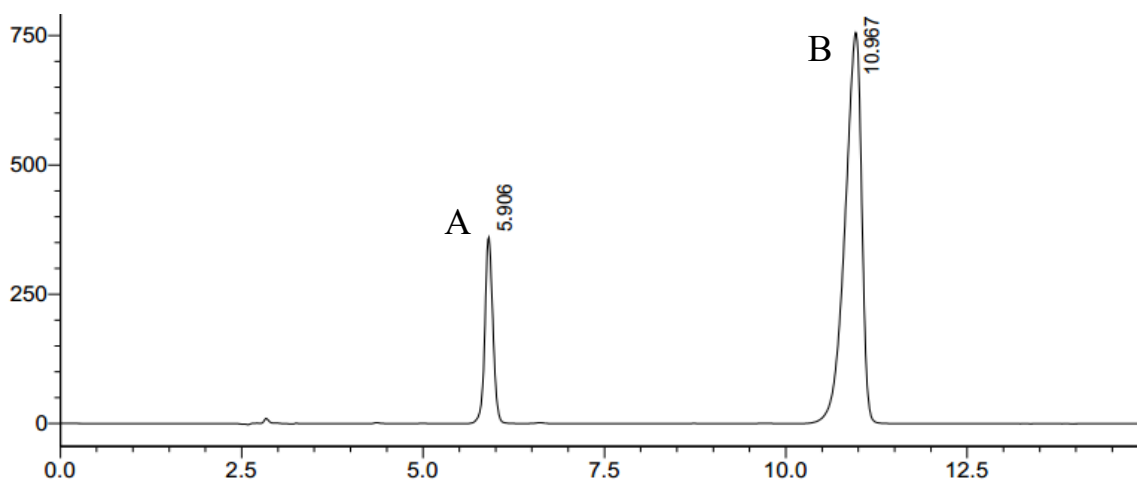


Рис. 5.5 Хроматограма ВЕРХ-методу кількісного визначення для розчину порівняння (А – калію клавуланату, В – амоксициліну тригідрату)

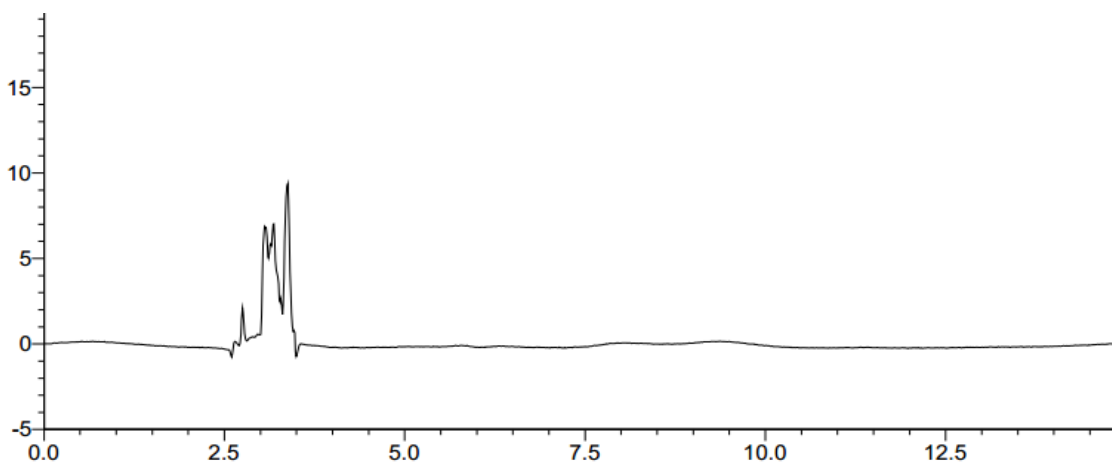


Рис. 5.6 Хроматограма ВЕРХ-методу кількісного визначення для бланк-розчину

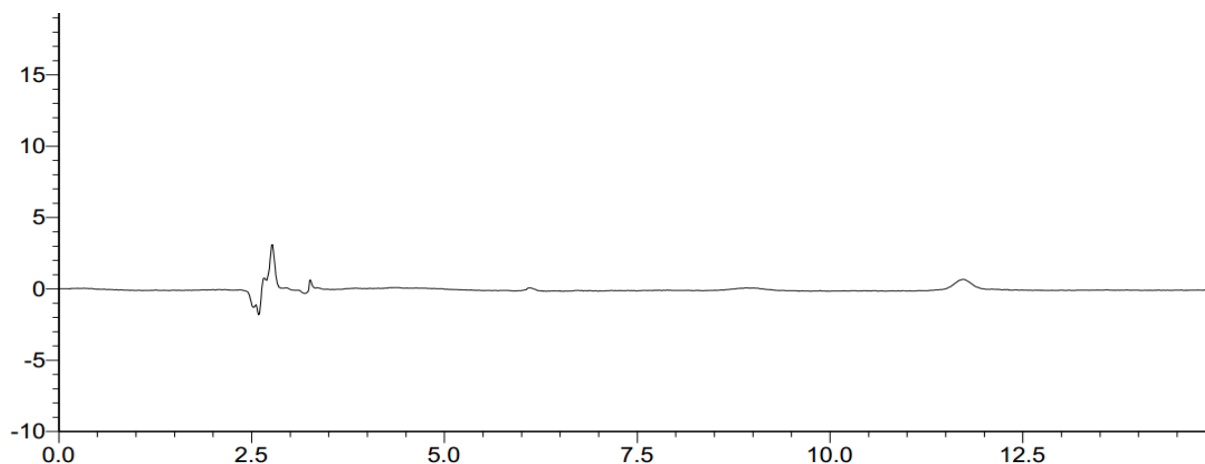


Рис. 5.7 Хроматограма ВЕРХ-методу кількісного визначення для розчину плацебо

Таблиця 5.4

**Розрахунок параметрів лінійності методики кількісного
визначення для калію клавуланату**

№	C, %	C (mg/ml)	C _{i/st}	Середнє значення площі піку	S _{i/st}
1	80	0,160	80,0	2311032	79,73
2	85	0,170	85,0	2467854	85,15
3	90	0,180	90,0	2601390	89,75
4	95	0,190	95,0	2756967	95,12
5	100	0,200	100,0	2900052	100,06
6	105	0,210	105,0	3046071	105,09
7	110	0,220	110,0	3189140	110,03
8	115	0,230	115,0	3331679	114,95
9	120	0,240	120,0	3474236	119,87
Стандарт	100	0,200	100,0	2898408	100,00

На рисунку 5.8 подано графік лінійної залежності аналітичного сигналу від фактичної концентрації розчину, для калію клавуланату, побудований в нормалізованих координатах відповідно до наведених даних у таблиці 5.4.

Як видно з таблиці 5.5, всі параметри лінійності для калію клавуланату відповідають вимогам, визначеним ДФУ.

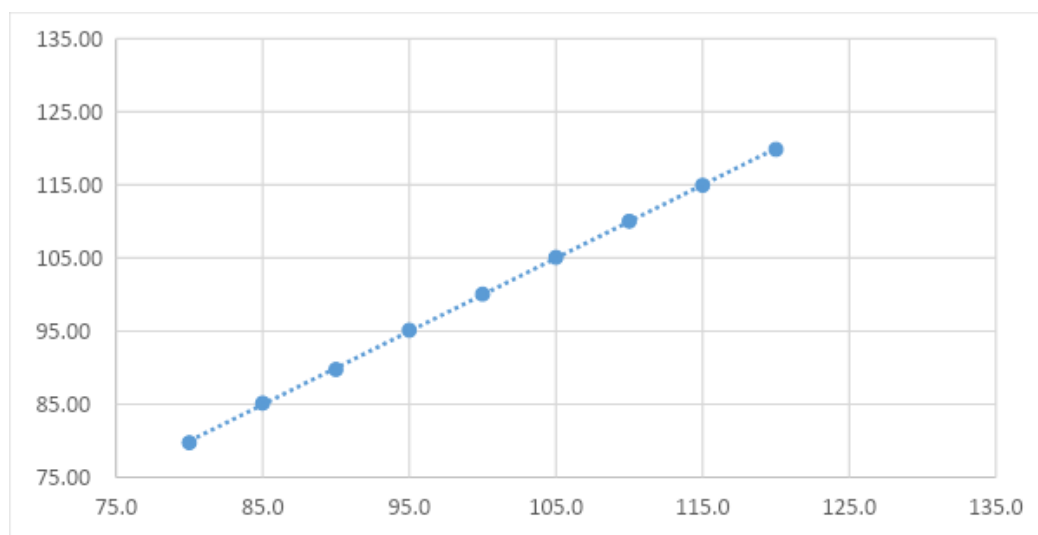


Рис. 5.8 Графік лінійності для калію клаваланату для кількісного визначення методом ВЕРХ в нормалізованих координатах

Таблиця 5.5

Дані перевірки лінійності методики кількісного визначення калію клаваланату методом ВЕРХ

з/п	Параметр	Вимоги	Отримане значення	Виконання критерію
1	$ a $	$\leq 3,8$	0,1851	Виконується
2	S_0	$\leq 1,27$	0,10	Виконується
3	R	$> 0,9957$	0,9999	Виконується

Таблиця 5.6

Розрахунок параметрів лінійності методики кількісного визначення для амоксициліну тригідрату

№	C, %	C (mg/ml)	$C_{i/st}$	Середнє значення площі піку	$S_{i/st}$
1	2	3	4	5	6
1	80	0,400	80,0	925643	79,71
2	85	0,425	85,0	982916	84,97
3	90	0,450	90,0	1039547	89,82
4	95	0,475	95,0	1093953	94,88

1	2	3	4	5	6
5	100	0,500	100,0	1152279	99,97
6	105	0,525	105,0	1217831	105,08
7	110	0,550	110,0	1279441	110,21
8	115	0,575	115,0	1328752	114,81
9	120	0,600	120,0	1388225	120,11
Стандарт	100	0,500	100,0	1156229	100,00

Також було побудовано графік лінійної залежності і для амоксициліну тригідрату (рис. 5.9).

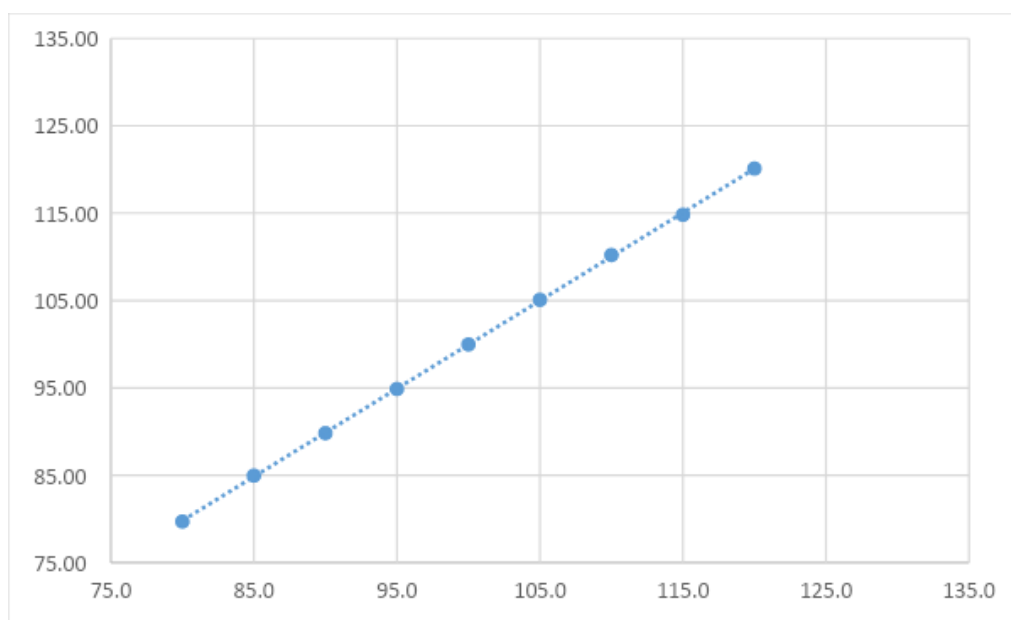


Рис. 5.9 Графік визначення лінійності для амоксициліну тригідрату для кількісного визначення методом ВЕРХ

Таблиця 5.7

**Дані перевірки лінійності методики кількісного визначення
для амоксициліну тригідрату ВЕРХ-методом**

з/п	Параметр	Вимоги	Отримане значення	Виконання критерію
1	$ a $	$\leq 3,8$	0,7512	Виконується
2	S_0	$\leq 1,27$	0,13	Виконується
3	R	$> 0,9957$	0,9999	Виконується

Усі параметри вивчення лінійності для амоксициліну тригідрату відповідають вимогам ДФУ (табл. 5.7).

Для дослідження правильності було приготовано 9 модельних розчинів у такому ж діапазоні концентрацій, як і у випадку визначення лінійності. Отримані дані вивчення правильності для кількісного визначення методом ВЕРХ наведено в Додатку П.

Результати проведених досліджень свідчать про те, методика кількісного визначення ВЕРХ є коректною, оскільки критерій систематичної похибки визначення калію клавуланату та амоксициліну тригідрату виконується для обох речовин.

Для вивчення внутрішньолабораторної прецизійності було досліджено 6 проб зразка двома аналітиками в різні дні протягом одного робочого тижня з використанням різного мірного посуду.

Таблиця 5.8

**Визначення параметрів внутрішньолабораторної прецизійності
ВЕРХ-методу для кількісного визначення калію клавуланату**

№	Аналітик № 1	Аналітик № 2
1	101,844	101,957
2	101,791	102,099
3	101,720	102,166
4	101,878	102,104
5	101,944	102,374
6	101,996	101,855
Середнє	101,862	102,093
Дисперсія, s^2	0,017	0,053
Загальне середнє		101,977
Відносне стандартне відхилення, RSD%		0,113
Довірчий інтервал, $(\Delta_{\text{intra}}=t(95\%, m \cdot n-1) \cdot \text{RSD}, \% = 1,7956 \cdot \text{RSD}, \%)$		0,23

Таблиця 5.9

**Визначення параметрів внутрішньолaborаторної прецизійності
ВЕРХ-методу для кількісного визначення калію клавуланату**

№	Аналітик № 1	Аналітик № 2
1	98,942	99,544
2	98,899	99,364
3	98,934	99,250
4	98,888	99,207
5	98,883	99,167
6	98,977	99,171
Середнє	98,921	99,284
Дисперсія, s^2	0,002	0,036
Загальне середнє		99,102
Відносне стандартне відхилення, RSD%		0,183
Довірчий інтервал, $(\Delta_{\text{intra}}=t(95\%, m \cdot n-1) \cdot \text{RSD}, \%)=1,7956 \cdot \text{RSD}, \%$		0,37

Метод відповідає визначеним вимогам, оскільки розраховані довірчі інтервали обох речовин нижчі за 2.4.

Робасність (стабільність) розчинів було перевірено протягом 9 годин (табл. 5.10).

Таблиця 5.10

Визначення стабільності стандартного розчину

Речовина	Середнє значення S піку свіжоприготованого розчину	Середнє значення S піку розчину через 9 год	Зміни параметра, у % через 9 год
Клавуланат	2828919	2819358	0,338
Амоксицилін	12841513	12794970	0,362

Відмінності між отриманими значеннями площ піків не повинні перевищувати критерій незначущості порівняно з максимально допустимою невизначеністю результатів аналізу ($\Delta AS, \text{insig}$), тобто 0,768 %. За результатами

визначення встановлено, що для оптимальних умов хроматографування необхідно використовувати свіжоприготований розчин порівняння протягом 9 годин.

Запропонований метод дозволяє проводити одночасний аналіз комбінованих таблеток амоксициліну та клавуланової кислоти, отримати точні результати та забезпечує необхідне розділення між речовинами. Отже, його можна рекомендувати для проведення тесту «Визначення кількісного вмісту» для калію клавуланату та амоксициліну тригідрату.

5.2.2 Трансфер умов ВЕРХ-методу на УЕРХ-колонку

Завдяки своїй вдосконаленій технології метод УЕРХ забезпечує певні переваги над ВЕРХ, зокрема більшу швидкість аналізу, зі збереженням із цим високої чутливості, та роздільну здатність. Використання методу УЕРХ може бути вигідним для виробника, оскільки він дозволяє знизити витрати під час аналізу.

Для трансферу було взято умови ВЕРХ-методу та перенесено на УЕРХ-колонку. Об'єм інжекції було зменшено до 1 мкл, а швидкість потоку – до 0,2 мл/хв (рис. 5.10).

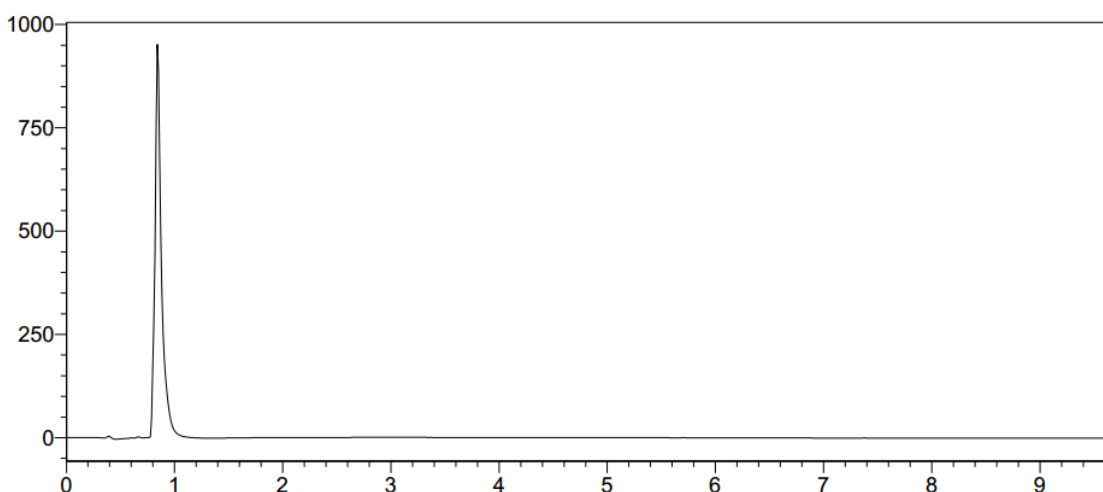


Рис. 5.10 Отримана хроматограма речовин зі швидкістю рухомої фази 0,2 мл/хв

Як видно з рисунка 5.10, піки калію клавуланату та амоксициліну тригідрату не поділилися. Тому швидкість рухомої фази було знижено до 0,1 мл/хв (рис. 5.11).

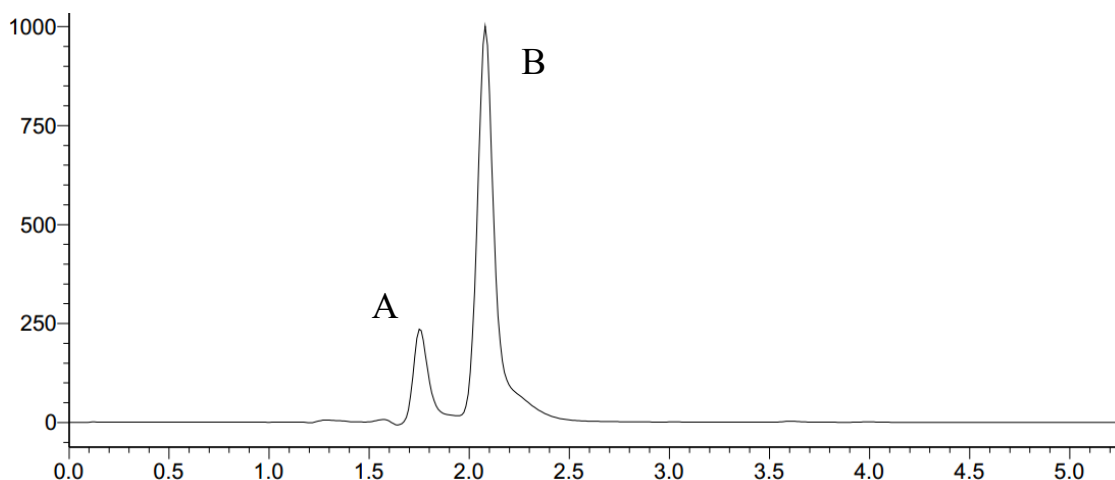


Рис. 5.11 Хроматограма зі швидкістю рухомої фази 0,1 мл/хв (А – калію клавуланат, В – амоксициліну тригідрат)

Після зміни швидкості піки розділилися, проте ступінь розділення між ними складала 2,02, крім того, час виходу клавуланату був дуже близький до мертвого об'єму.

Для покращення розділення було вирішено змінити рН буферного розчину з 4,0 (рис. 5.12) до 6,0 (рис. 5.13). Змінені умови не призвели до покращення розділення між речовинами, оскільки за рН 4,0 розділення між речовинами зовсім не спостерігалось, у разі збільшення рН розділення між речовинами збільшилось, проте все ще залишалось менше 3,5. Тому було вирішено повернути значення рН буферного розчину до 4,4 та зменшити кількість *метанолу Р* до 3 %, а об'єм інжекції до 0,5 мкл (рис. 5.14).

Розділення між піками стало значно більшим, проте для покращення умов вміст *метанолу Р* було зменшено до 2 %, а об'єм інжекції знижено до 0,2 мкл (рис. 5.15).

У змінених умовах параметри хроматографічної системи відповідали всім вимогам (табл. 5.11).

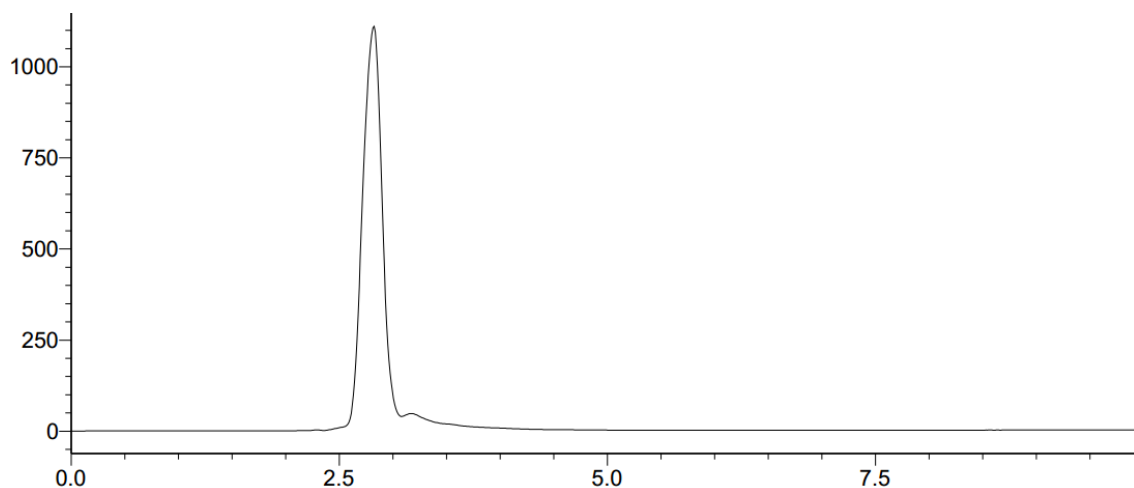


Рис. 5.12 Хроматограма з буферним розчином за рН 4,0

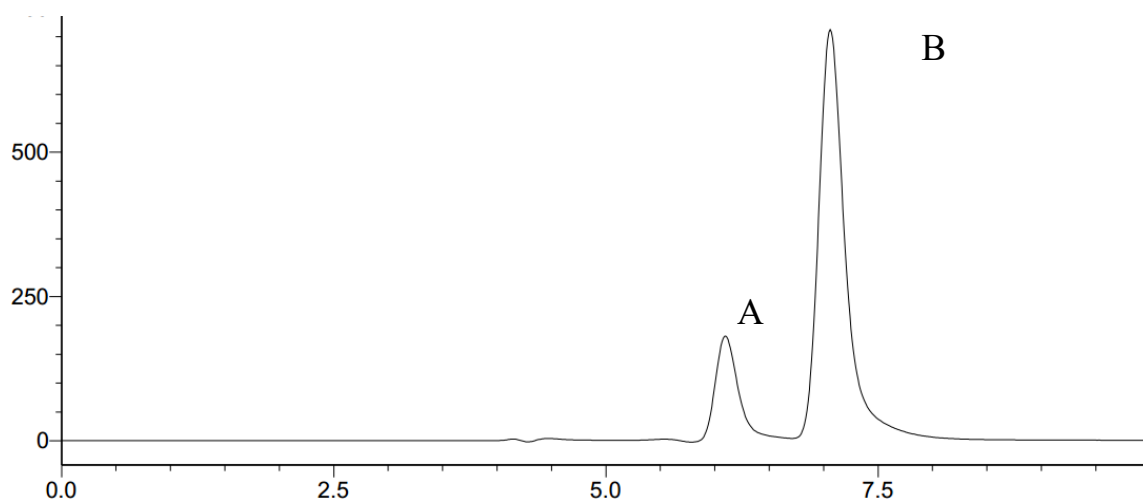


Рис. 5.13 Хроматограма з буферним розчином за рН 6,0 (А – калію клавуланат, В – амоксициліну тригідрат)

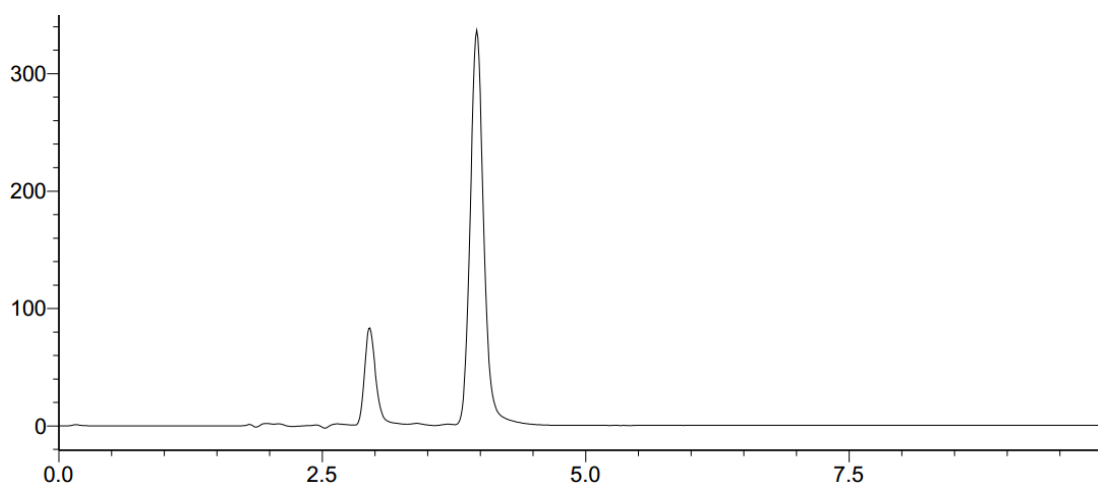


Рис. 5.14 Хроматограма зі зменшеним вмістом метанолу *P* до 3% та зменшеним об'ємом інжекції до 0,5 мкл

Дослідження проводили відповідно до умов, зазначених в *методиці 11* (розділ 2, п. 2.4). Приготування всіх розчинів та розрахунків кількісного вмісту калію клавуланату та амоксициліну тригідрату були такі самі, як і для ВЕРХ-методу (розділ 3, п. 3.2.1).

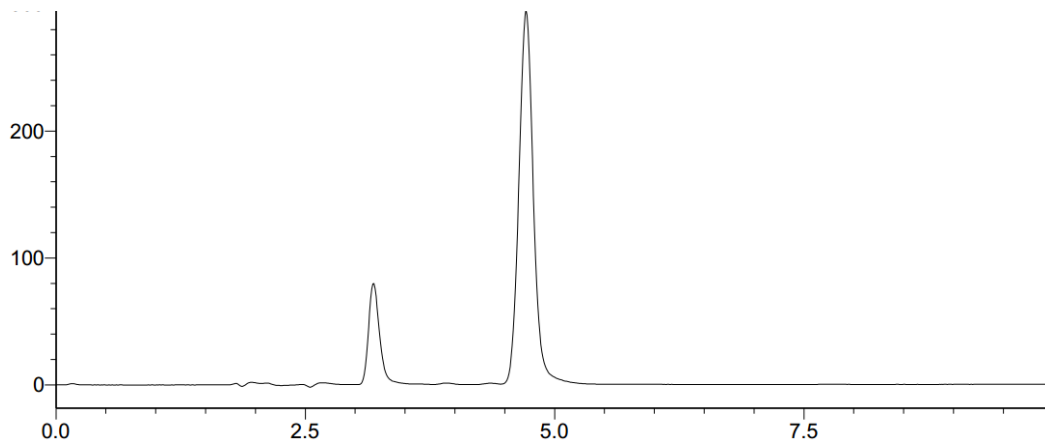


Рис. 5.15 Хроматограма зі зменшеним вмістом метанолу *P* до 2 % та зниженим об'ємом інжекції до 0,2 мкл

Таблиця 5.11

Параметри хроматографічної системи для кількісного визначення калію клавуланату та амоксициліну тригідрату методом УЕРХ

Параметр	Вимоги	Виявлено
Коефіцієнт симетрії піку калію клавуланату на хроматограмі розчину порівняння	Не більше 1,5	1,27
Ступінь розділення між піками калію клавуланату та амоксициліну	Не менше 3,5	7,93

Розроблений метод валідовано відповідно до вимог ДФУ за такими параметрами: специфічність, лінійність, правильність, прецизійність, робастність.

Оскільки кількісний вміст компонентів має перебувати в межах $\pm 7.5\%$, то значення для $\Delta_{AS}\%$ має бути 2,4 %.

Для визначення специфічності методу було використано такі розчини: бланк-розчин (рис. 5.16), розчин порівняння (рис. 5.17), випробовуваний розчин (рис. 5.18), розчин плацебо (рис. 5.19).

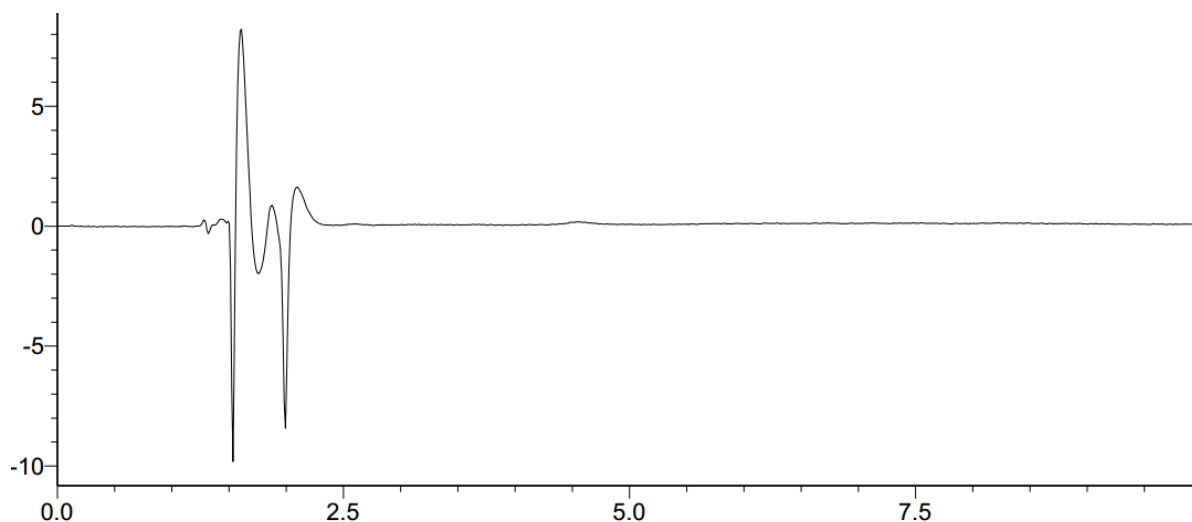


Рис. 5.16 Хроматограма бланк-розчину для кількісного визначення вмісту компонентів методом УЕРХ

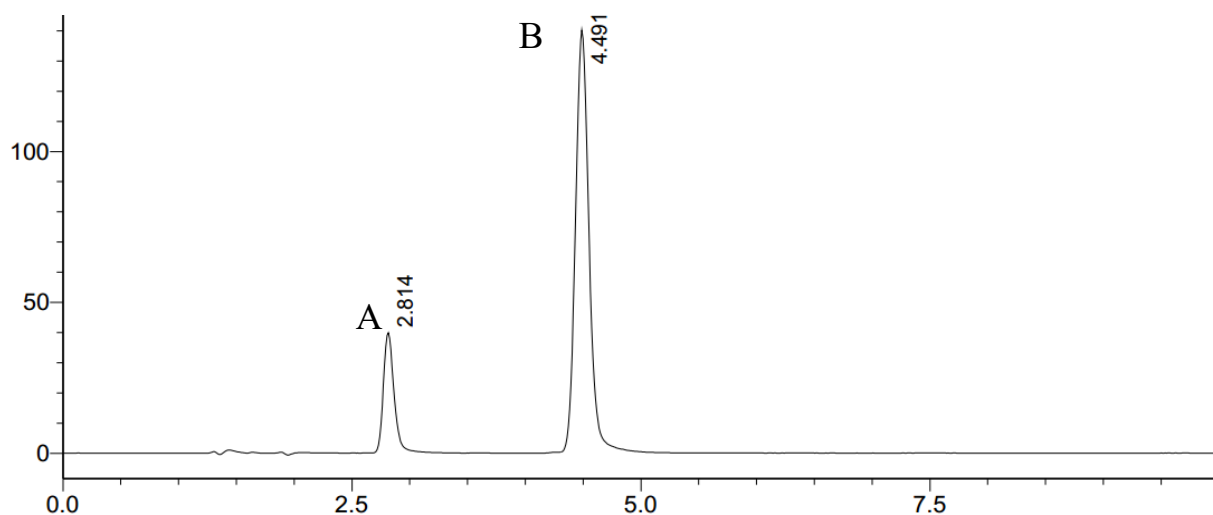


Рис. 5.17 Хроматограма розчину порівняння для кількісного визначення вмісту методом УЕРХ (А – калію клавуланат, В – амоксицилін тригідрат)

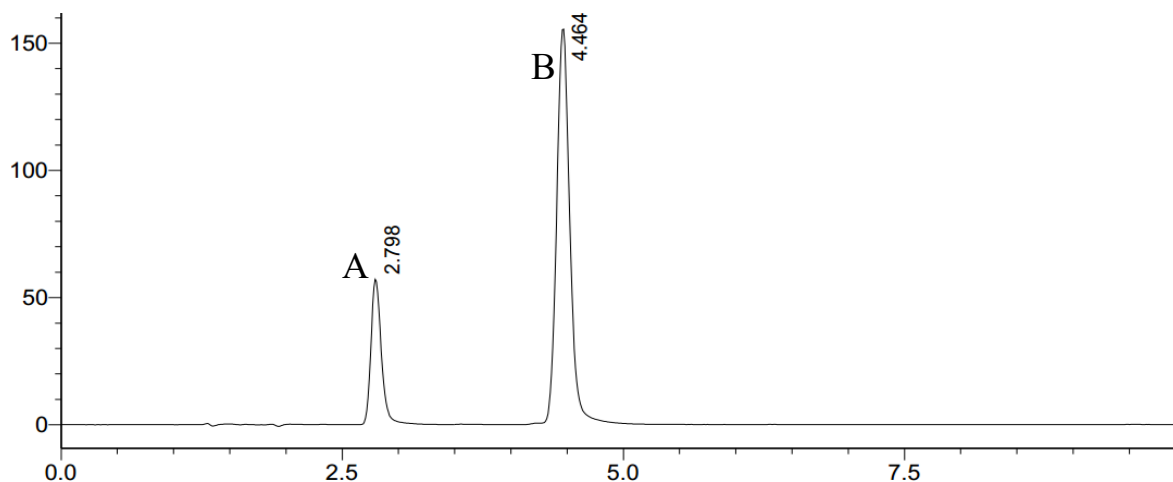


Рис. 5.18 Хроматограма випробовуваного розчину для кількісного визначення вмісту методом УЕРХ (А – калію клавуланат, В – амоксициліну тригідрат)

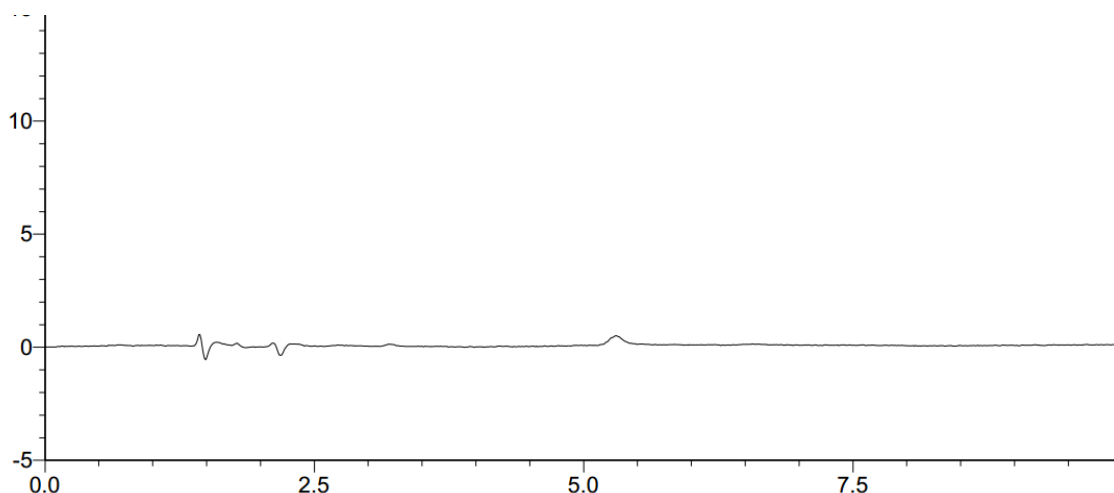


Рис. 5.19 Хроматограма розчину плацебо для кількісного визначення вмісту методом УЕРХ

Метод відповідає вимогам, визначеним для специфічності. По-перше, часи утримування основних речовин з випробовуваного розчину збігалися з часами утримування речовин з розчину порівняння. По-друге, у бланк-розчині та плацебо не було детектовано речовини, яка заважала б визначенню амоксициліну тригідрату або калію клавуланату.

Вивчення лінійної залежності площі піку від концентрації проводили на 9 модельних розчинах у діапазоні застосування методики відповідно до регламентації ДФУ. Для кількісного визначення цей діапазон складав від 80 % до 120 % з кроком 5%. Розчин на кожному рівні концентрацій було проаналізовано тричі. Для розрахунків використовували середні значення площ піків.

Розрахунки проводили в нормалізованих координатах, що дозволяє сформулювати єдині критерії, які пов'язані тільки з допусками вмісту, але не залежать від специфіки конкретних речовин. Отримані результати для калію клавуланату та амоксициліну тригідрату подано в таблицях 5.12-5.14, вони відповідають вимогам, встановленим ДФУ.

**Розрахунок параметрів лінійності УЕРХ-методу
кількісного визначення калію клавуланату**

№	C, %	C (mg/ml)	C _{i/st}	Середнє значення площі піку	S _{i/st}
1	80	0,160	80,0	200664	80,06
2	85	0,170	85,0	213439	85,15
3	90	0,180	90,0	224934	89,74
4	95	0,190	95,0	238234	95,05
5	100	0,200	100,0	250982	100,13
6	105	0,210	105,0	263549	105,15
7	110	0,220	110,0	275527	109,92
8	115	0,230	115,0	287913	114,87
9	120	0,240	120,0	300431	119,86
Стандарт	100	0,200	100,0	250652	100,00

За даними, наведеними в таблиці, було побудовано графік лінійної залежності (рис. 5.20).

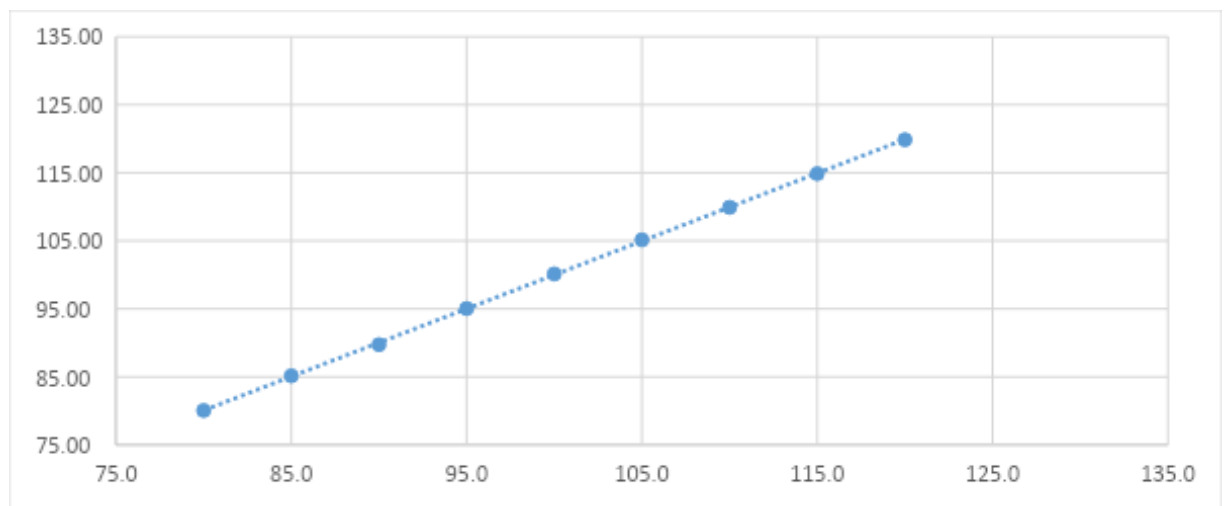


Рис. 5.20 Графік лінійної залежності для кількісного визначення калію клавуланату методом УЕРХ

Таблиця 5.13

**Дані перевірки лінійності методики кількісного
визначення калію клавуланату методом УЕРХ**

з/п	Параметр	Вимоги	Отримане значення	Виконання критерію
1	$ a $	$\leq 3,8$	0,3857	Виконується
2	S_0	$\leq 1,27$	0,15	Виконується
3	r	$> 0,9957$	0,9999	Виконується

Таблиця 5.14

**Розрахунок параметрів лінійності УЕРХ-методу
для кількісного визначення амоксициліну тригідрату**

№	C, %	C (mg/ml)	$C_{i/st}$	Середнє значення площі піку	$S_{i/st}$
1	80	0,400	80,0	941543	79,99
2	85	0,425	85,0	1001943	85,12
3	90	0,450	90,0	1058571	89,94
4	95	0,475	95,0	1119388	95,10
5	100	0,500	100,0	1175448	99,87
6	105	0,525	105,0	1231472	104,63
7	110	0,550	110,0	1295823	110,09
8	115	0,575	115,0	1353855	115,02
9	120	0,600	120,0	1412015	119,96
Стандарт	100	0,500	100,0	1177032	100,00

На рисунку 5.21 зображено графік лінійної залежності аналітичного сигналу від фактичної концентрації розчину, побудований у нормалізованих координатах для амоксициліну тригідрату з урахуванням наведених в таблиці даних.

Отримані результати, представлені у таблиці 5.15, свідчать, що за показником лінійності метод придатний для кількісного визначення амоксициліну тригідрату.

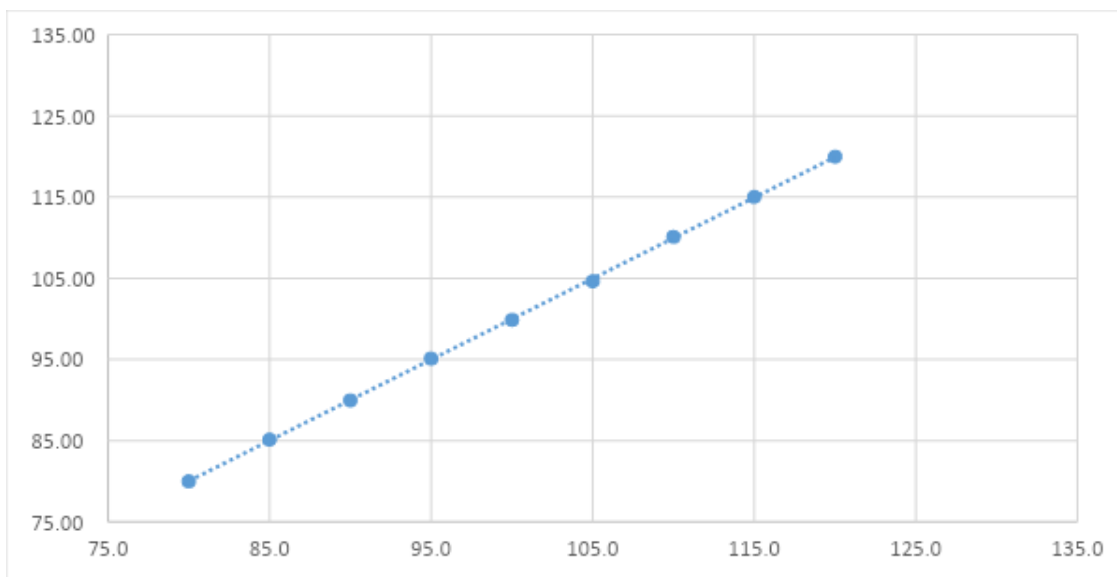


Рис. 5.21 Графік лінійної залежності для кількісного визначення калію клавуланату методом УЕРХ

Таблиця 5.15

**Дані перевірки лінійності методики кількісного визначення
амоксициліну тригідрату методом УЕРХ**

з/п	Параметр	Вимоги	Отримане значення	Виконання критерію
1	$ a $	$\leq 3,8$	0,1645	Виконується
2	S_0	$\leq 1,27$	0,11	Виконується
3	r	$> 0,9957$	0,9999	Виконується

Для того, щоб методика відповідала критерію «правильність», вона не повинна мати систематичної похибки [147]. Вивчення проводили на 9 модельних розчинах у тому ж діапазоні концентрацій, що і лінійність (Додаток Н).

Отримані результати свідчать, що методика відповідає встановленим критеріям правильності, оскільки систематичні похибки визначення обох речовин менші за вимоги статистичної незначущості та практичної незначущості. Дослідження параметрів внутрішньолaborаторної прецизійності для визначення калію клавуланату (табл. 5.16) та амоксициліну тригідрату (табл. 5.17) проводили з використанням 6 проб одного зразка з концентраціями, приготованими відповідно до зазначеної методології. Зразки було проаналізовано різними аналітиками в різні дні.

Таблиця 5.16

**Визначення параметрів внутрішньолaborаторної прецизійності
для кількісного визначення калію клавуланату методом УЕРХ**

№	Аналітик № 1	Аналітик № 2
1	99,13	98,62
2	99,10	98,84
3	99,32	98,68
4	98,81	98,69
5	99,19	98,18
6	99,05	98,56
Середнє	99,10	98,59
Дисперсія, s^2	0,047	0,082
Загальне середнє		98,85
Відносне стандартне відхилення, RSD%		0,26
Довірчий інтервал, ($\Delta_{\text{intra}}=t(95\%, m*n-1)*RSD, \%=1,7956$ *RSD, %)		0,52

Таблиця 5.17

**Визначення параметрів внутрішньолaborаторної прецизійності
для кількісного визначення амоксициліну тригідрату методом УЕРХ**

№	Аналітик № 1	Аналітик № 2
1	102,63	102,32
2	101,97	102,73
3	102,19	102,61
4	102,89	103,34
5	102,64	103,49
6	102,26	103,63
Середнє	102,43	103,02
Дисперсія, s^2	0,196	0,473
Загальне середнє		102,73
Відносне стандартне відхилення, RSD%		0,28
Довірчий інтервал, ($\Delta_{\text{intra}}=t(95\%, m*n-1)*$ RSD, $\%=1,7956$ *RSD, %)		0,57

Оскільки довірчі інтервали нижчі за визначені вимогами, методика прийнятна для кількісного визначення калію клавуланату та амоксициліну тригідрату.

Робасність (стабільність) розчинів проводили протягом 9 годин (табл. 5.18).

Таблиця 5.18

Визначення стабільності для УЕРХ-методу

Речовина	Середнє значення S піку свіжоприготованого розчину	Середнє значення S піку розчину через 9 год	Зміни параметра, у % через 9 год
Клавуланат калію	257800	256793	0,391
Амоксициліну тригідрат	1154605	1152713	0,164

Відмінність між отриманими значеннями площ піків не перевищує критерій незначущості. Тож для отримання оптимальних результатів аналізу необхідно використати свіжоприготований розчин упродовж 9 годин.

Запропоновані умови дозволяють проводити визначення компонентів комбінованих препаратів амоксициліну та клавуланової кислоти методом УЕРХ. Методику було валідовано, що підтверджує її точність та можливість використання для проведення тесту «Визначення кількісного вмісту» для препаратів, що містять калію клавуланат та амоксициліну тригідрат [148, 149].

5.2.3 Порівняння ВЕРХ та УЕРХ-методів

5.2.3.1 Розрахування оцінки впливу аналітичних методів на навколишнє середовище

Вплив аналітичних методів на навколишнє середовище залежить від таких параметрів аналітичної методики, як кількість необхідних реагентів, їх безпека, енергія та відходи [150].

Порівняння методів проведено за допомогою екошкали, де ідеальний метод з погляду «зеленої хімії» має значення 100. Якщо якийсь параметр

методу відходить від принципів ідеального «зеленого» аналізу, призначають штрафні бали. Суму штрафних балів використовують для обчислення екошкали за такою формулою: Аналітична екошкала = 100 – штрафні бали.

Результати дослідження можна класифікувати за такими критеріями:

- > 75 становить відмінний метод аналізу з погляду «зеленої хімії»;
- > 50 становить прийнятний метод аналізу з погляду «зеленої хімії»;
- < 50 становить неприйнятний метод аналізу з погляду «зеленої хімії».

Гармонізована система Глобальної класифікації та маркування хімічних речовин забезпечує повну інформацію про визначення класу безпечності реагентів відповідно до впливу на фізичний стан людини та екологію [151]. Для простоти обчислень деякі дослідження [152] пропонують розраховувати штрафні бали за кожен реагент шляхом множення кількості піктограм небезпеки на ступінь загрози (за позначки «warning» множимо на 1, за «danger» – на 2). Штрафні бали за енергію призначають відповідно до енергоємних лабораторних практик та інструментів [153]. Отже, до методів з найменшим споживанням енергії (<0,1 кВт на зразок) можна зарахувати імуноферментний аналіз, титрування, спектрофотометрію, УЕРХ, ВЕТШХ тощо. Найбільш енерговитратними (>1,5 кВт на зразок) є ЯМР, ГХ-МС, РХ-МС, рентгенівська дифракція.

Також штрафні бали призначають за небезпеку на виробництві та утворення відходів.

Обидва розроблені хроматографічні методи аналізу оцінювали щодо їхньої «зеленості», використовуючи аналітичну екошкалу, і обирали метод з найменшим впливом на навколишнє середовище (табл. 5.19). Оскільки метод УЕРХ потребує меншої кількості розчинників, гіпотетично його можна вважати більш екологічним та менш шкідливим для здоров'я аналітиків [153].

Отримані результати свідчать, що обидва методи є відмінними з погляду «зеленої хімії». Хоча УЕРХ-метод проти методу ВЕРХ продемонстрував дещо вищі результати – 85 і 82 відповідно.

**Оцінка екологічності методів для кількісного визначення
калію клавуланату та амоксициліну тригідрату**

	Штрафні бали	
	ВЕРХ	УЕРХ
Реагенти		
Метанол Р	6	6
Вода Р	0	0
Натрію дигідрофосфат	0	0
Прилад		
Тип приладу	1	0
Відходи	8	6
Виробнича небезпека	3	3
Приготування розчинів		
Вода Р	0	0
Разом штрафних балів	18	15
Загальний бал за екологічною шкалою	82	85

5.2.3.2 Статистичне оцінювання результатів, отриманих ВЕРХ та УЕРХ-методами

Порівняння методів проводили з використанням значень, отриманих у результаті кількісної оцінки методом ВЕРХ і методом УЕРХ 27-ми зразків таблеток. Для всіх аналітів кореляцію між методами було протестовано за допомогою статистичного методу Пассінга-Баблока. Цей метод було обрано тому, що попередня перевірка даних на відповідність нормальному розподілу засвідчила, що зразки амоксициліну (виміряні методом УЕРХ) та клавуланату калію (виміряні методом ВЕРХ) не відповідали нормальному розподілу ($p < 0,01$). Це обмежує використання звичайного методу найменших квадратів для регресійного аналізу. Саме тому для статистичного порівняння результатів двох методів було обрано непараметричний метод Пассінга-Баблока, за яким проведено оцінювання параметрів регресійної моделі (α , β), розраховано 95% ДІ для цих параметрів, виконано тестування за гіпотезами: $\beta = 1$, $\alpha = 0$, а також

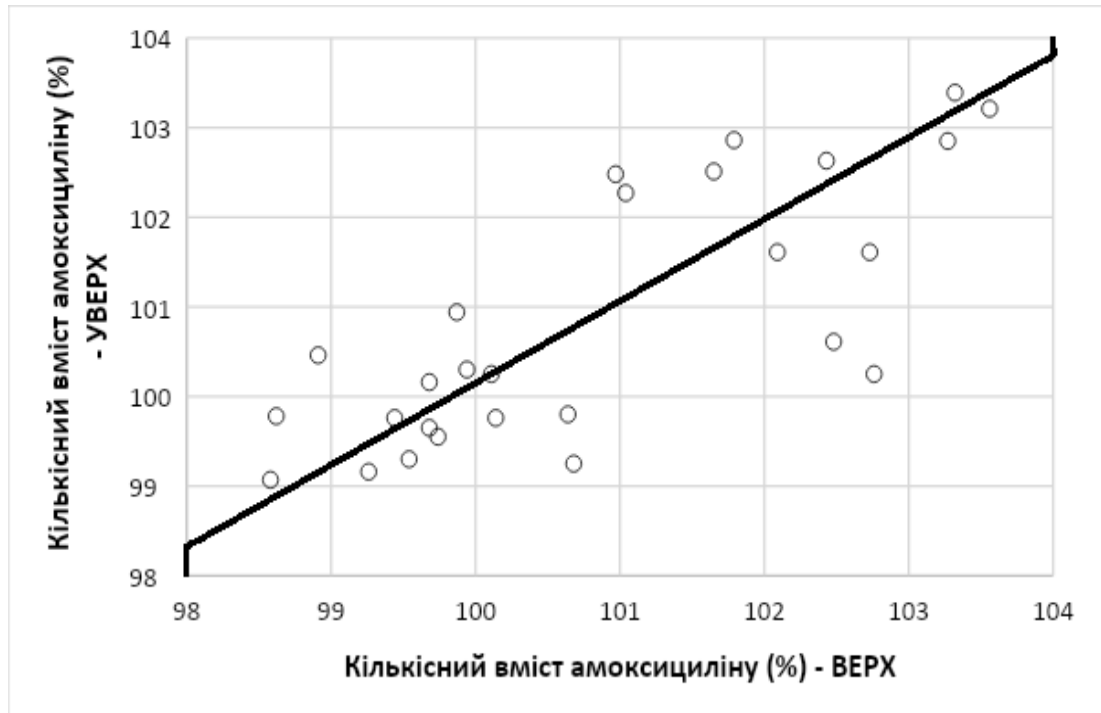
досліджено припущення про лінійність [154-156]. Процедуру порівняння проводили на програмному забезпеченні Microsoft Excel 2013.

Результати розрахунків та кількісного оцінювання регресійної моделі відповідності методик ВЕРХ і УЕРХ для амоксициліну та клавуланату калію, а також якісне порівняння цієї регресії з реальними даними вимірювань наведено на рис. 5.22 і в табл. 5.20. На графіках лінії регресії (безперервні) перебувають у діапазоні амоксициліну та калію клавуланату, оцінений кількісний вміст – від 98 % до 104 %. Статистичний тест припущення про лінійність довів лінійність між методами ВЕРХ та УЕРХ як для амоксициліну, так і для клавуланату калію (табл. 5.20). Для обох досліджуваних речовин 95% ДІ містили значення 1 для кута нахилу β і значення 0 для параметра α , що продемонструвало відсутність статистично значущої різниці між старим та новим методами визначення цих речовин [157].

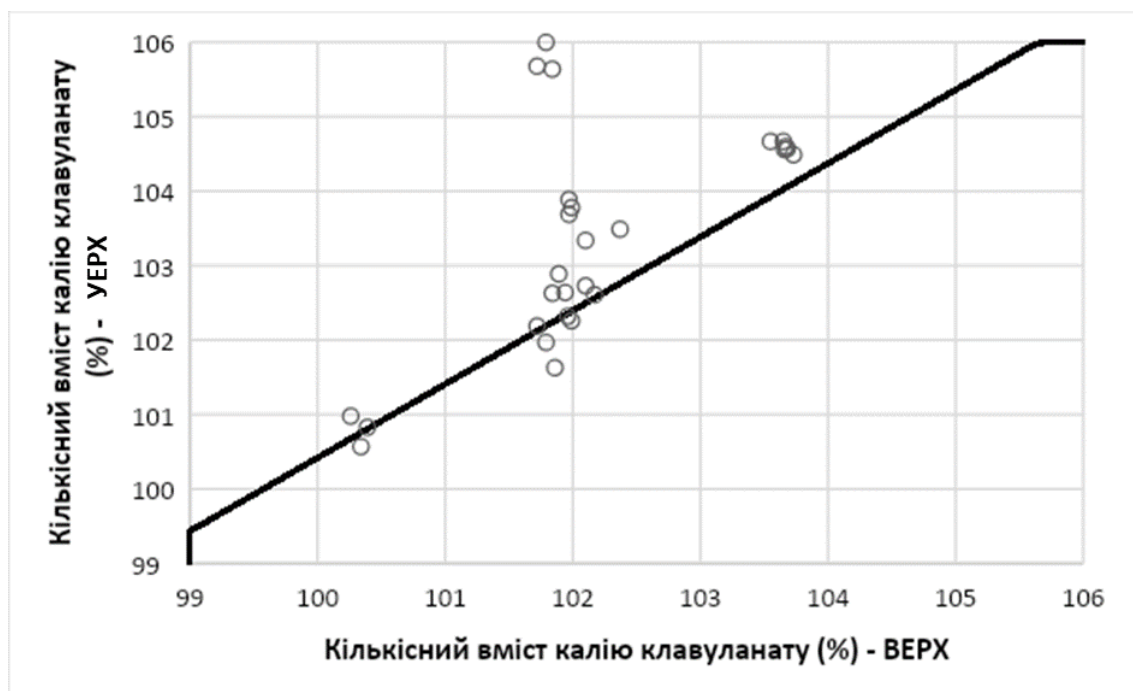
Таблиця 5.20

**Тест відповідності вимірювань методами ВЕРХ та УЕРХ
для одночасного визначення амоксициліну та калію клавуланату
в таблетках**

Визначений параметр $Y = bx + a$		Амоксициліну тригідрат	Калію клавуланат
Кут нахилу β	B	0,91	0,95
	b-low (нижня межа 95% ДІ)	0,66	0,79
	b-up (верхня межа 95% ДІ)	1,25	1,26
	Тестова гіпотеза $\beta=1$	+	+
Параметр α	A	8,73	5,73
	a-low (нижня межа 95% ДІ)	-25,27	-26,30
	a-up (верхня межа 95% ДІ)	34,21	21,95
	Тестова гіпотеза $\alpha=0$	+	+
Статистичний тест припущення лінійності	h-stat	0,53	1,06
	p-level	0,93	0,20
	p-level > 0,05	+	+
	Статистично значущого відхилення від лінійності немає		



A)



B)

Рис. 5.22 Графіки регресії порівняння між ВЕРХ та УЕРХ для амоксициліну (А) та клавуланату калію (В) методом Пассінга-Баблока

5.3 Верифікація методу для проведення тесту «Розчинення» для таблеток амоксициліну з клавуланатом

ДФУ висуває вимоги до якості таблеток, зокрема до їхньої розчинності, тому проведення тесту «Розчинення» є необхідним критерієм для визначення відповідності розчинення твердих дозованих лікарських форм для перорального застосування визначеним фармакопейним вимогам [39]. Оскільки БФ має статтю для таблеток, що містять калію клавуланат та амоксициліну тригідрат, для підтвердження можливості використання методики для аналізу необхідне проведення верифікації тесту «Розчинення». Для цього відповідно до вимог ДФУ потрібно вивчити такі валідаційні характеристики: правильність, прецизійність, лінійність [39, 121,122].

Параметри дослідження зазначено в *методиці 12* (розділ 2, п. 2.4).

Приготування розчинів

Випробовуваний розчин: у склянку для розчинення поміщають 1 таблетку препарату, вмикають прилад, через 45 хв відбирають 20 мл розчину з центру посудини для розчинення, фільтрують через фільтр «синя стрічка», відкидаючи перші порції фільтрату. 5,0 мл отриманого розчину переносять до мірної колби 100,0 мл та доводять до мітки *водою Р* і ретельно перемішують.

Розчин порівняння: 100 мг ФСЗ амоксициліну тригідрату та 40 СЗ калію клавуланату поміщають у мірну колбу місткістю 200,0 мл, розчиняють у 160 мл *води Р*, доводять до мітки тим же розчинником та ретельно перемішують. 10,0 мл отриманого розчину переносять до мірної колби місткістю 200,0 мл та доводять до мітки *водою Р*.

Перед хроматографуванням розчини фільтрують крізь мембранний фільтр з розміром пор не більше 0,45 мкм.

Вміст калію клавуланату (X_3) на одну таблетку обчислюють за формулою:

$$X_3 = \frac{S_1 \times m_0 \times 900 \times 20 \times 10 \times P}{S_0 \times 1 \times 200 \times 100 \times a \times F} = \frac{S_1 \times m_0 \times P \times 9}{S_0 \times a \times F},$$

де: S_1 – значення площі піку клавуланату, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину;

S_0 – середнє значення площ піків калію *клавуланату*, розраховане з хроматограм *розчину порівняння*;

m_0 – маса наважки *СЗ калію клавуланату*, взятої для приготування розчину порівняння, у міліграмах;

a – номінальний вміст калію *клавуланату*, зазначений у складі препарату, у міліграмах;

P – вміст основної речовини в стандарті калію клавуланату, взятого для приготування розчину порівняння, у відсотках.

F – коефіцієнт перерахунку (1 мг клавуланувої кислоти відповідає 1,191 мг калію клавуланату).

Вміст амоксициліну тригідрату (X_4) на одну таблетку обчислюють за формулою:

$$X_4 = \frac{S_1 \times m_0 \times 900 \times 20 \times 10 \times P}{S_0 \times 1 \times 200 \times 100 \times a} = \frac{S_1 \times m_0 \times P \times 9}{S_0 \times a},$$

де: S_1 – значення площі піку амоксициліну, розраховане з хроматограм *випробовуваного розчину*;

S_0 – середнє значення площ піків *амоксициліну*, розраховане з хроматограм *розчину порівняння*;

m_0 – маса наважки *ФСЗ амоксициліну тригідрату*, взятої для приготування розчину порівняння, у міліграмах;

a – номінальний вміст *амоксициліну*, зазначений у складі препарату, у міліграмах;

P – вміст основної речовини в стандарті амоксициліну, взятого для приготування розчину порівняння, у відсотках.

Параметри придатності хроматографічної системи було перевірено на розчині порівняння (табл. 5.21). Усі параметри відповідали вимогам, визначеним БФ.

**Параметри перевірки придатності хроматографічної системи
для тесту «Розчинення» таблеток амоксициліну
та клавуланату**

Параметр	Вимоги	Знайдено
Коефіцієнт симетрії піку клавуланату калію на хроматограмі розчину порівняння	Не більше 1,5	1,03
Ступінь розділення між піками клавуланату калію та амоксициліну	Не менше 3,5	11,99

Для верифікації методу його перевіряли за такими показниками: специфічність, лінійність, правильність, внутрішньолабораторна прецизійність та робасність (стабільність).

Для вивчення специфічності було приготовано розчини: бланк-розчин, розчин порівняння, а також випробовуваний розчин (рис. 5.23-5.25).

Часи утримування основних речовин з хроматограм випробовуваного розчину та розчину порівняння збігалися. Також жодна речовина з бланк-розчину не заважала проведенню визначення калію клавуланату та амоксициліну тригідрату. З огляду на отримані результати можна зробити висновок, що метод є специфічним та може використовуватися для проведення тесту «Розчинення» комбінованих таблеток амоксициліну та клавуланової кислоти [158].

Для тесту лінійності за значення $Q=80\%$ ДФУ встановлює діапазон застосування методики кількісного визначення від 55 % до 135%. Для підтвердження лінійності калію клавуланату (табл. 5.22-5.23) та амоксициліну тригідрату (табл. 5.24-5.25) в тесті «Розчинення» було приготовано 9 модельних розчинів, концентрація яких змінюється рівномірно в межах діапазону застосування (крок 10 %).

Відповідно до отриманих результатів було побудовано графік лінійної залежності площ піку від концентрації калію клавуланату (рис. 5.26).

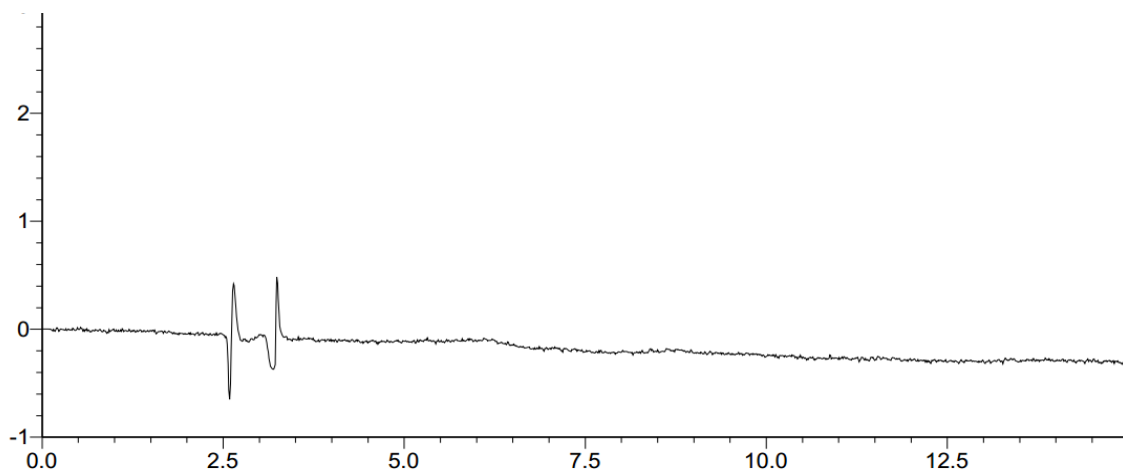


Рис. 5.23 Хроматограма бланк-розчину для тесту «Розчинення» методом ВЕРХ

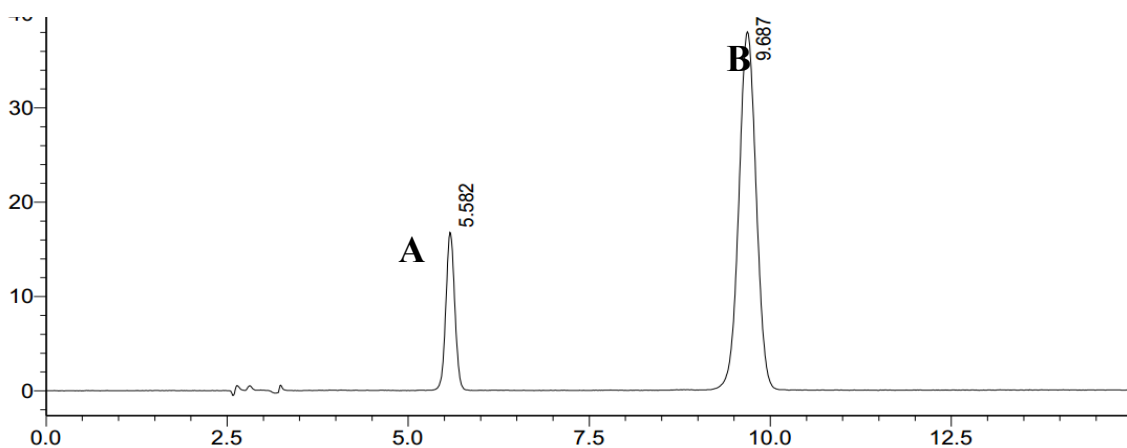


Рис. 5.24 Хроматограма випробовуваного розчину для тесту «Розчинення» методом ВЕРХ (А – калію клавуланат, В – амоксициліну тригідрат)

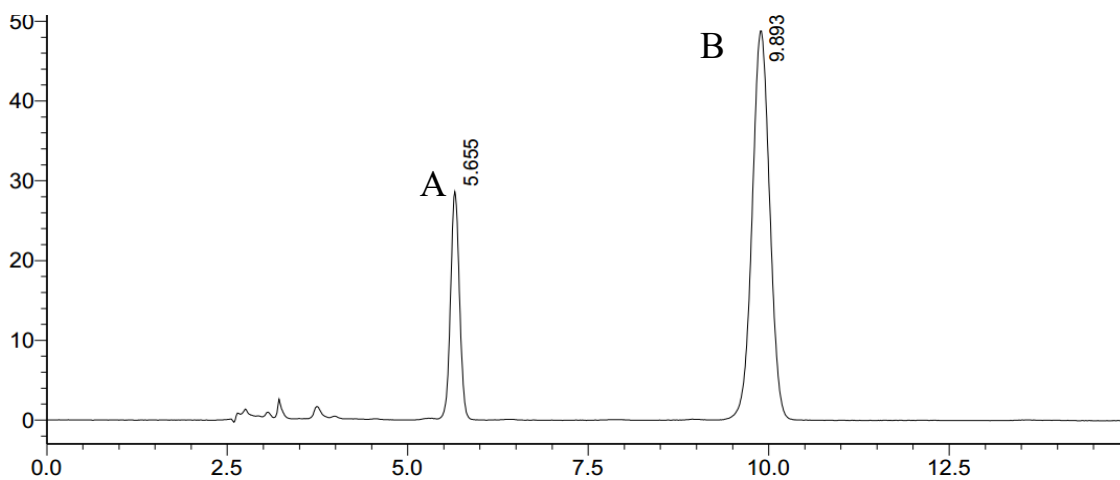


Рис. 5.25 Хроматограма розчину порівняння для тесту «Розчинення» методом ВЕРХ (А – калію клавуланат, В – амоксициліну тригідрат)

**Розрахунок параметрів лінійності методики
для тесту «Розчинення» калію клавуланату**

№	C, %	C_i , $\mu\text{g}/\text{мл}$	$C_{i/st}$, %	Середнє значення площі піку	$S_{i/st}$, %
1	55	5,5	55,0	78688	55,19
2	65	6,5	65,0	92928	65,17
3	75	7,5	75,0	107220	75,20
4	85	8,5	85,0	121629	85,30
5	95	9,5	95,0	135547	95,06
6	105	10,5	105,0	149084	104,56
7	115	11,5	115,0	164402	115,30
8	125	12,5	125,0	178112	124,92
9	135	13,5	135,0	192368	134,91
Стандарт	100	10,0		142586	

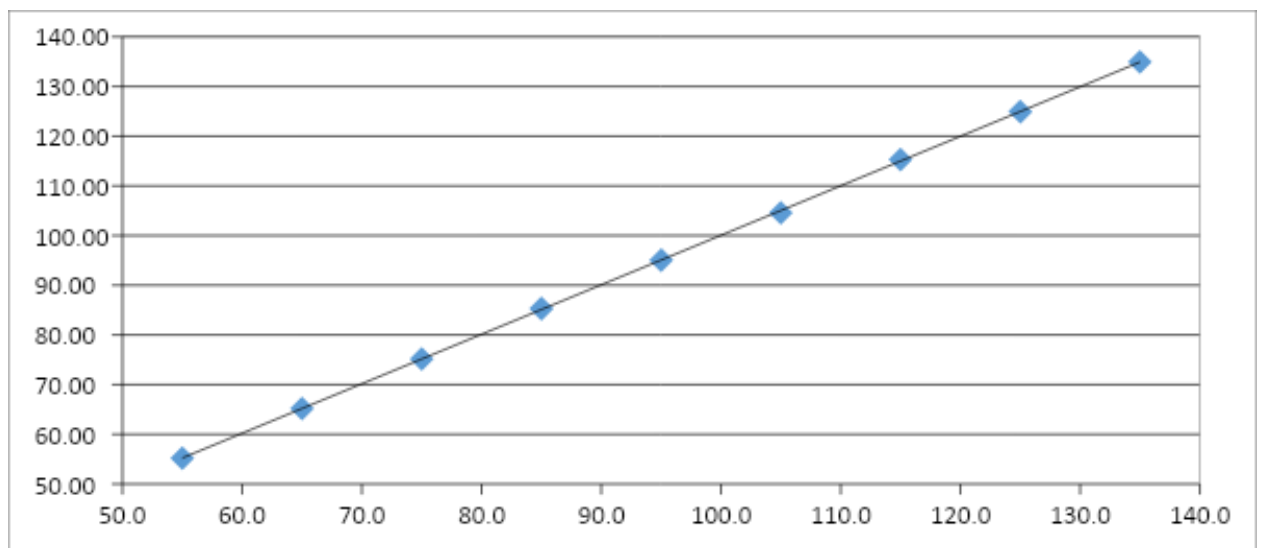


Рис. 5.26 Графік лінійної залежності тесту «Розчинення» калію клавуланату методом ВЕРХ

Таблиця 5.23

**Дані перевірки лінійності методики тесту «Розчинення»
для калію клавуланату**

з/п	Параметр	Вимоги	Отримане значення	Виконання критерію
1	a	$\leq 2,1$	0,4476	Виконується
2	S ₀	$\leq 1,58$	0,4062	Виконується
3	R	$> 0,9984$	0,9999	Виконується

Отримані результати (табл. 5.23) підтверджують наявність лінійної залежності для калію клавуланату.

Таблиця 5.24

**Розрахунок параметрів лінійності методики для тесту «Розчинення»
амоксициліну тригідрату**

№	C, %	C _i , $\mu\text{г/мл}$	C _{i/st} , %	Середнє значення площі піку	S _{i/st} , %
1	55	13,75	55,0	348974	55,51
2	65	16,25	65,0	408827	65,03
3	75	18,75	75,0	471518	75,00
4	85	21,25	85,0	534626	85,04
5	95	23,75	95,0	597395	95,02
6	105	26,25	105,0	657806	104,63
7	115	28,75	115,0	723620	115,10
8	125	31,25	125,0	786508	125,10
9	135	33,75	135,0	849216	135,07
Стандарт	100	25		628700	

На рис. 5.27 зображено графік лінійної залежності аналітичного сигналу від фактичної концентрації розчину амоксициліну тригідрату, побудований у нормалізованих координатах з урахуванням наведених у таблиці 5.26 даних.

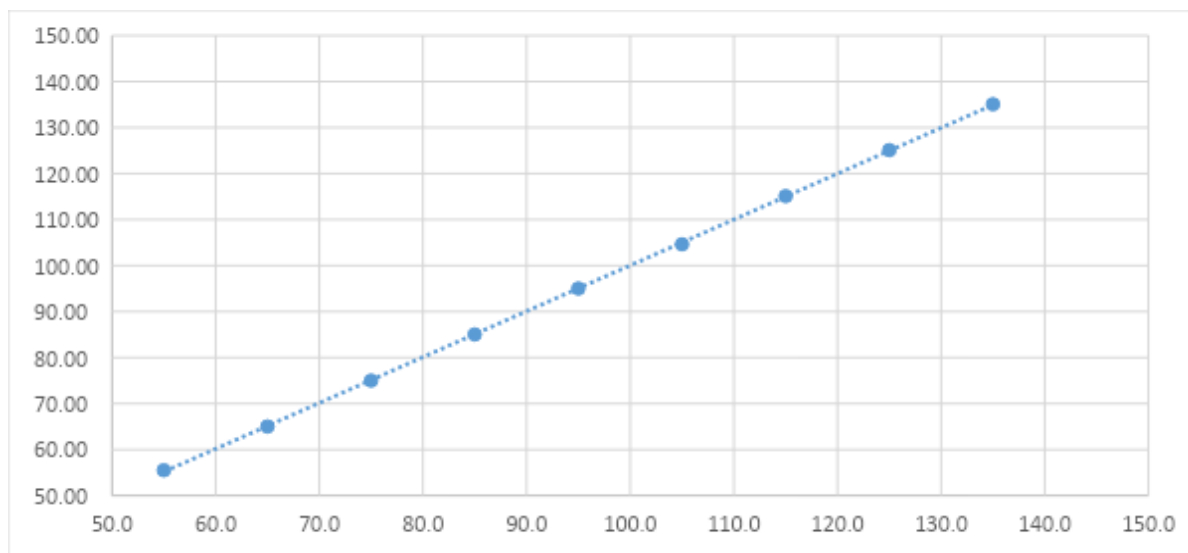


Рис. 5.27 Графік лінійної залежності тесту «Розчинення» амоксициліну тригідрату методом ВЕРХ

Таблиця 5.25

**Дані перевірки лінійності методики тесту «Розчинення»
для амоксициліну тригідрату**

з/п	Параметр	Вимоги	Отримане значення	Виконання критерію
1	a	$\leq 2,1$	0,327	Виконується
2	S_0	$\leq 1,58$	0,3759	Виконується
3	R	$> 0,9984$	0,9999	Виконується

Отримані результати свідчать, що амоксициліну тригідрат має лінійну залежність площі піку від концентрації речовини, тому цю речовину можна аналізувати методом ВЕРХ.

Вивчення робастності (стабільності) проводили відразу після приготування розчину та через 10 годин (табл. 5.26).

Таблиця 5.26

Визначення стабільності розчину

Речовина	Середнє значення S піків свіжоприготованого розчину	Середнє значення S піків через 10 год	Зміни S, у відсотках, через 10 год
Клавуланат	143282	142871	0,287
Амоксицилін	628664	627881	0,125

Відмінності між отриманими значеннями площ піків не перевищували визначені критерії (0,96 %). За результатами аналізу визначено, що для оптимальних умов хроматографування необхідно використовувати свіжоприготований розчин упродовж 10 годин.

Внутрішньолабораторну прецизійність вивчали різні аналітики в два різні дні протягом одного робочого тижня. Результати дослідження для калію клавуланату та амоксициліну наведено в таблицях 5.27 та 5.28 відповідно.

Таблиця 5.27

**Визначення параметрів внутрішньолабораторної прецизійності
для тесту «Розчинення» калію клавуланату методом ВЕРХ**

№	Аналітик № 1	Аналітик № 2
1	100,19	99,89
2	97,95	99,60
3	100,12	100,34
4	99,71	99,54
5	100,52	99,56
6	100,30	97,31
Середнє	99,80	99,37
Дисперсія, s^2	1,482	1,865
Загальне середнє		99,59
Відносне стандартне відхилення, RSD%		0,94
Довірчий інтервал, $(\Delta_{\text{intra}}=t(95\%, m*n-1)*$ $RSD, \%=1,7956 * RSD, \%$		1,90

Таблиця 5.28

**Визначення параметрів внутрішньолабораторної прецизійності
для тесту «Розчинення» амоксициліну тригідрату методом ВЕРХ**

№	Аналітик № 1	Аналітик № 2
1	2	3
1	101,17	98,85
2	97,36	98,80
3	100,79	100,53
4	99,41	100,75

1	2	3
5	101,55	99,16
6	100,16	97,70
Середнє	100,07	99,30
Дисперсія, s^2	3,908	2,217
Загальне середнє		99,69
Відносне стандартне відхилення, RSD%		1,30
Довірчий інтервал, $(\Delta_{\text{intra}}=t(95\%, m \cdot n - 1) \cdot \text{RSD}, \% = 1,7956 \cdot \text{RSD}, \%)$		2,62

Правильність вивчали в тому ж діапазоні концентрацій, що і лінійність (Додаток М). Отримані дані підтверджують, що метод досить точний для проведення тесту «Розчинення» препаратів, що містять калію клавуланат та амоксициліну тригідрат.

Отримані дані дозволяють зробити висновок, що пропонується ВЕРХ-метод можна використовувати для проведення тесту «Розчинення» комбінованих таблеток амоксициліну та клавуланової кислоти, оскільки він забезпечує точні та відтворювані результати.

5.4 Визначення вмісту домішок у комбінованих таблетках амоксициліну та клавуланової кислоти

Для забезпечення якості лікарського засобу, що містить синтетичні речовини, відповідно до вимог ДФУ необхідно провести визначення вмісту домішок. Такі вимоги висувуються через те, що під час виробництва компонентів використовують різні розчинники та реагенти. Усі ці речовини, так само як проміжні продукти синтезу, можуть забруднювати АФІ та загрожувати здоров'ю пацієнтів [159, 160]. БФ також містить метод для дослідження домішок, тому потрібна верифікація методів для визначення якості комбінованих таблеток амоксициліну та клавуланової кислоти [50].

5.4.1 Верифікація ВЕРХ-методу

За рекомендаціями БФ розчини для аналізу треба готувати таким чином.

Випробовуваний розчин: 60 мг порошку комбінованих таблеток амоксициліну та клавуланової кислоти поміщають у мірну колбу місткістю 20,0 мл, додають 15 мл рухомої фази А та обробляють на УЗ-бані протягом 20 хвилин, з періодичними помішуваннями суміші, після чого доводять до мітки тим же розчинником, перемішують та фільтрують через мембранний фільтр з діаметром пор 0,45µм.

Розчин порівняння (а): 1,0 мл випробовуваного розчину переносять до мірної колби місткістю 100,0 мл та доводять до мітки рухомою фазою А.

Розчин порівняння (в): 60 мг ФСЗ амоксициліну тригідрату та 8 мг СЗ цефадроксилу переносять до мірної колби місткістю 200,0 мл та розчиняють у рухомій фазі А. 1,0 мл отриманого розчину переносять до мірної колби місткістю 100,0 мл та доводять до мітки рухомою фазою А.

Розчин порівняння (с): 15 мг ФЗС калію клавуланату переносять до мірної колби місткістю 200,0 мл та розчиняють у рухомій фазі А.

Розчин плацебо: 60 мг плацебо поміщають у мірну колбу місткістю 20,0 мл, додають 15 мл рухомої фази А та обробляють на УЗ-бані протягом 20 хвилин, з періодичними помішуваннями суміші, після чого доводять до мітки тим же розчинником, перемішують та фільтрують через мембранний фільтр з діаметром пор 0,45µм.

Параметри методу відповідали зазначеним у *методиці 6 «Визначення вмісту домішок методом ВЕРХ»*.

Для нормування рівня домішок БФ висуває такі вимоги:

- *домішка амоксициліну димеру:* площа піку з відносним часом утримування до амоксициліну 4,1 не має перевищувати 2,0 площі основного піка на хроматограмі *розчину порівняння (а)* (2,0%);
- *будь-яка інша домішка:* площа піку не має перевищувати 1,0 площі основного піку на хроматограмі *розчину порівняння (а)* (1,0%);
- *не враховують піки:* пік, час утримування якого збігається з часом утримування основного піку з хроматограми *розчину порівняння с*, та піки,

площа яких менше 0,1 площі основного піку на хроматограмі *розчину порівняння*.

Під час дослідження таблеток було вирішено залишити такі самі рівні домішок.

Перевірку придатності хроматографічної системи було проведено з використанням *розчину порівняння в* (рис. 5.28). Оскільки ступінь розділення між піками амоксициліну тригідрату та цефадроксилу з *розчину порівняння в* складала більше ніж 2 (10,81), то метод можна вважати придатним для аналізу домішок у комбінованих таблетках амоксициліну та клавуланової кислоти [161].

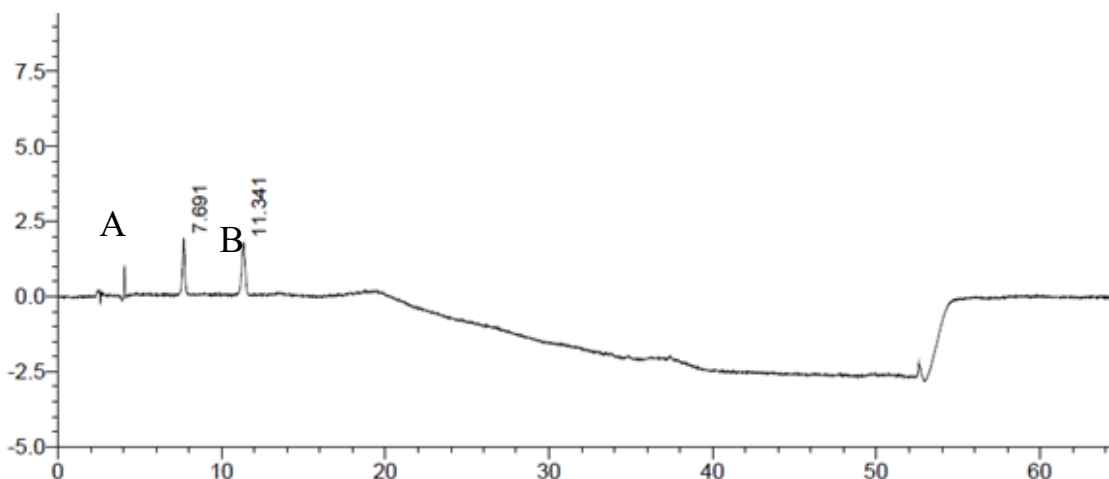


Рис. 5.28 Хроматограма *розчину порівняння в* (A – амоксициліну тригідрат, B – цефадроксил)

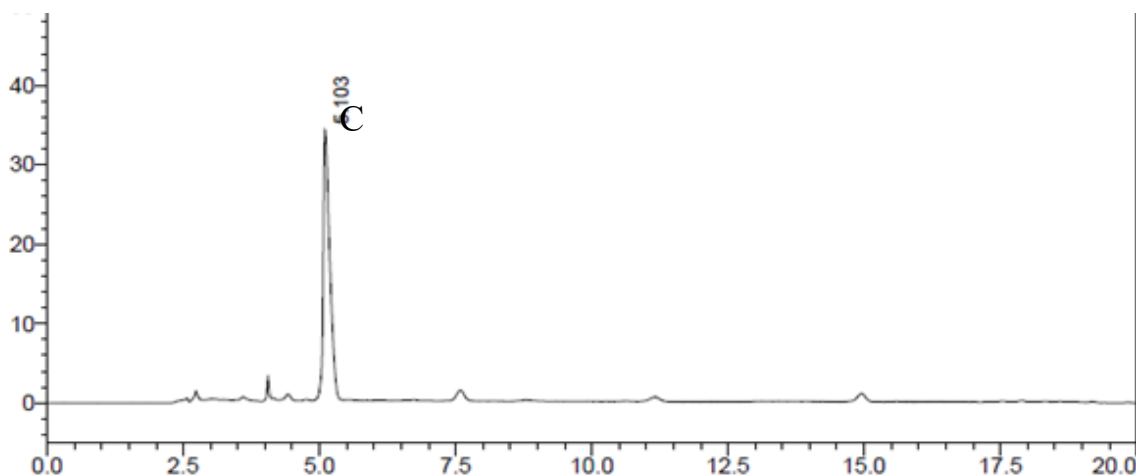


Рис. 5.29 Хроматограма *розчину порівняння с* (C – калію клавуланат)

Для ідентифікації речовин було використано *розчини порівняння в та с*. Час утримування та відносні часи утримування калію клавуланату – 5,10 хв; 0,66, а амоксициліну тригідрату – 7,69 хв; 1,00 (рис. 5.29).

Обов'язковими характеристиками випробування на граничний вміст домішок згідно з вимогами ДФУ є: специфічність, межа виявлення та робастність.

Для визначення специфічності використовували бланк-розчин, випробований розчин, *розчини порівняння в та с* і розчин плацебо (рис. 5.28-5.32).

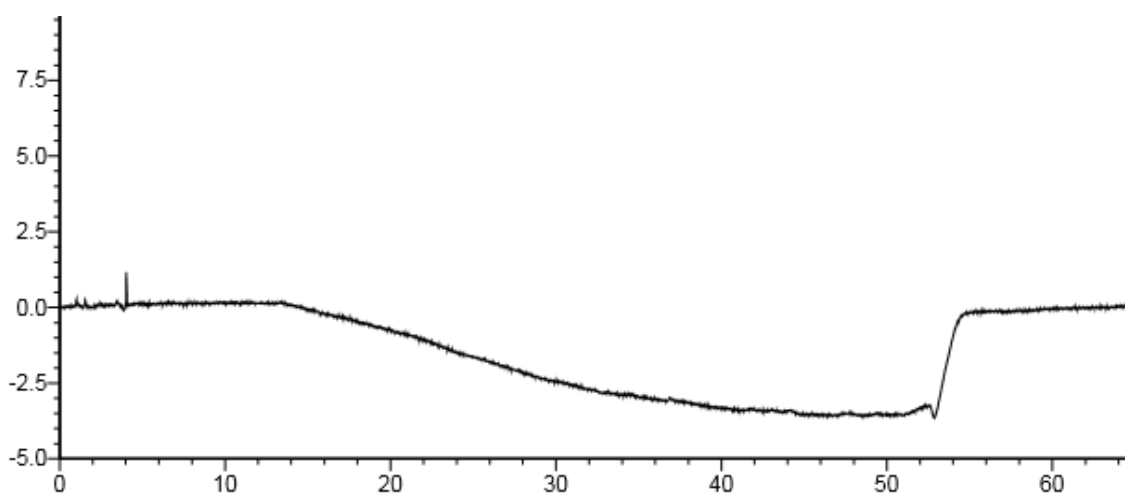


Рис. 5.30 Хроматограма бланк-розчину для визначення домішок у комбінованих таблетках амоксициліну та клавуланової кислоти ВЕРХ-методом

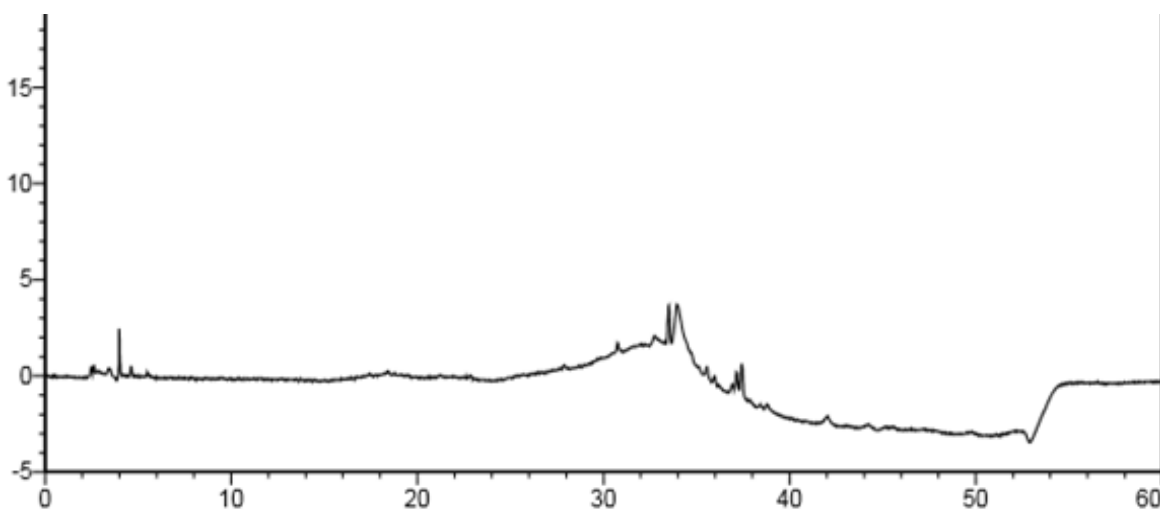


Рис. 5.31 Хроматограма розчину плацебо для визначення домішок у комбінованих таблетках амоксициліну та клавуланової кислоти ВЕРХ-методом

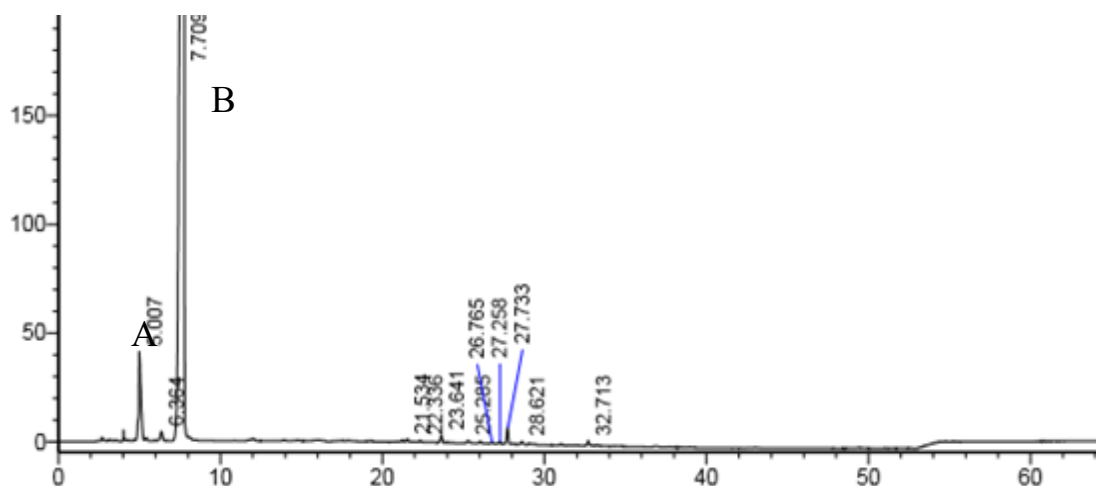


Рис. 5.32 Хроматограма випробовуваного розчину для визначення домішок у комбінованих таблетках амоксициліну та клавуланової кислоти ВЕРХ-методом (А – калію клавуланат, В – амоксициліну тригідрат)

Порівняння хроматограм свідчить, що в умовах методики визначенню домішок не заважають ні розчинник, ні рухома фаза, ні основні речовини, що доводить специфічність методики.

Для дослідження межі виявлення порівнювали сигнали, отримані з бланк-розчину та зразків з низькими концентраціями сполуки, що визначається (визначення співвідношення сигнал/шум). На підставі отриманих даних визначено мінімальну концентрацію, для якої відношення сигналу до шуму складає понад 3/1.

З розчину порівняння *a* відбирають по 1,0 мл розчину та переносять у мірну колбу місткістю 10,0 та 100,0 мл та доводять рухомою фазою до позначки й перемішують (табл. 5.29).

Навіть для розчину з концентрацією 0,15 мкг/мл відношення сигналу до шуму перевищує 3:1, відповідно, межа виявлення складає навіть менше за 0,15 мкг/мл (рис. 5.33-5.34).

Вивчення робасності проводили за такими параметрами: температура колонки, співвідношення рухомих фаз, швидкість потоку рухомої фази.

Для перевірки впливу цих параметрів *розчин порівняння в* аналізували за різних температур: 20 °С, 30°С; різних швидкостей потоку: 0,9 мл/хв, 1,0 мл/хв та 1,1 мл/хв та зміни початкового співвідношення рухомих фаз $\pm 5\%$ (рис. 5.35–5.40).

**Дослідження межі виявлення для тесту «Розчинення»
амоксициліну тригідрату та калію клавуланату**

Розчин порівняння а, концентрація	Розведення розчину порівняння а	Концентрація розчину	% від вмісту амоксициліну	% від допустимого вмісту домішки	Співвідношення сигнал/шум
15,0 мкг/мл	1:10	1,5 мкг/мл	0,1	0,1	Більше ніж 3:1
15,0 мкг/мл	1:100	0,15 мкг/мл	0,01	0,01	Більше ніж 3:1

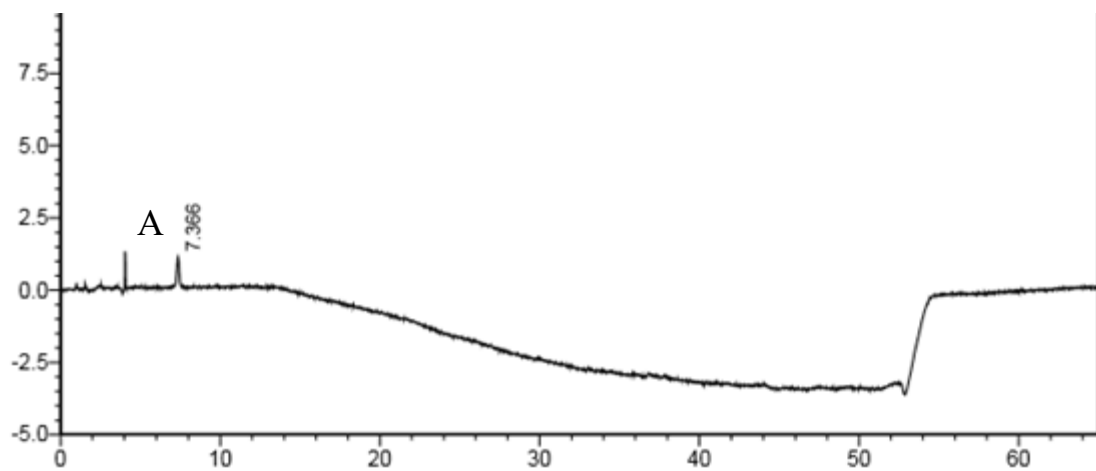


Рис. 5.33 Хроматограма розчину для визначення межі виявлення (1,5 мкг/мл) домішок у комбінованих таблетках амоксициліну та клавуланової кислоти ВЕРХ-методом

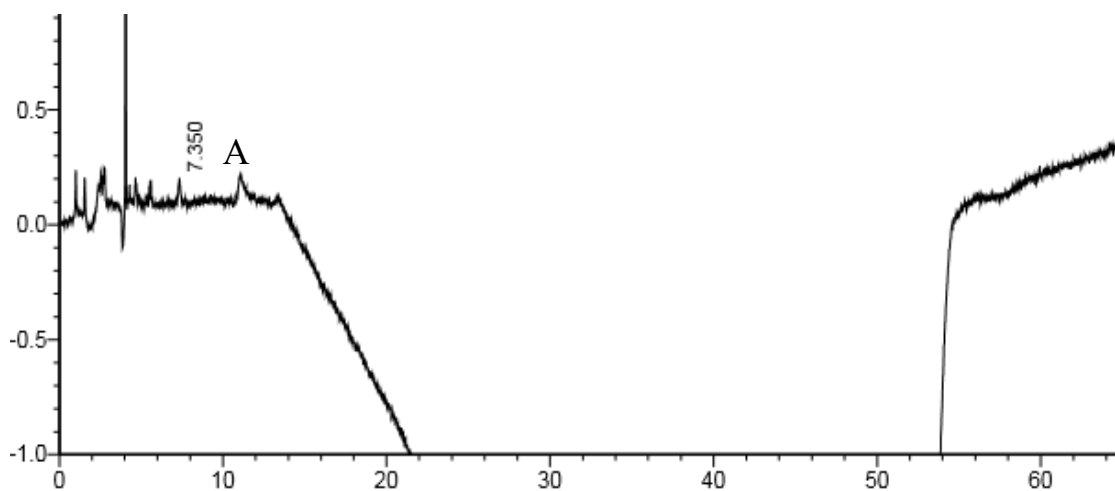


Рис. 5.34 Хроматограма розчину для визначення межі виявлення (0,15 мкг/мл) при визначенні домішок у комбінованих таблетках амоксициліну та клавуланової кислоти ВЕРХ-методом

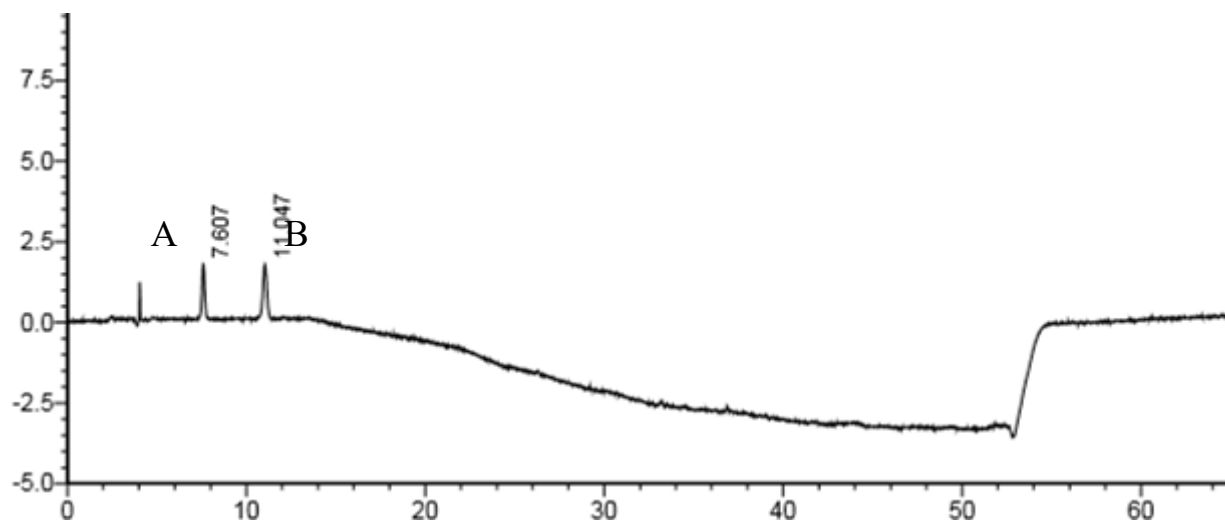


Рис. 5.35 Хроматограма розчину порівняння в за 20 °С, 1,0 мл/хв, звичайного співвідношення рухомих фаз (А – амоксициліну тригідрат, В – цефадоксил)

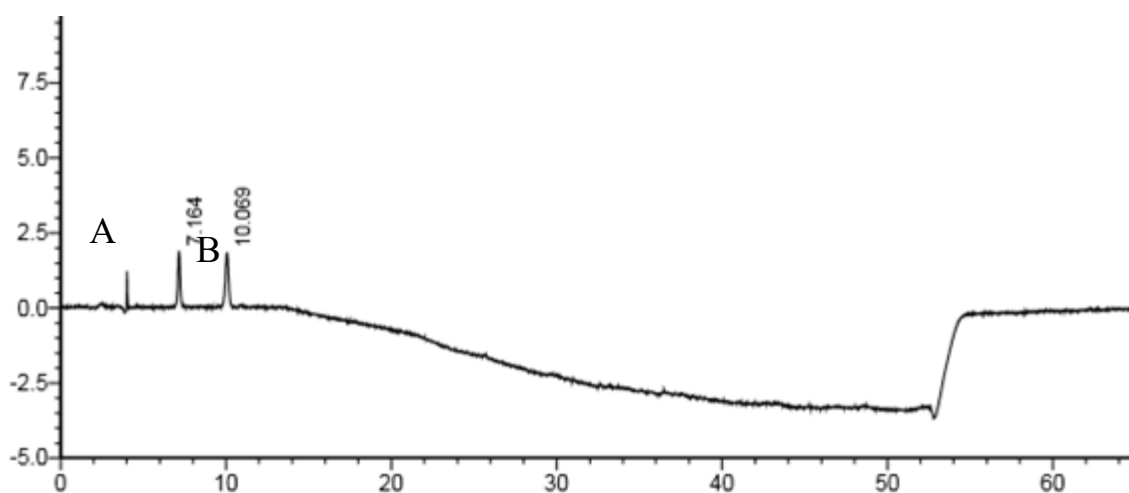


Рис. 5.36 Хроматограма розчину порівняння в за 30°С, 1,0 мл/хв, звичайного співвідношення рухомих фаз (А – амоксициліну тригідрат, В – цефадоксил)

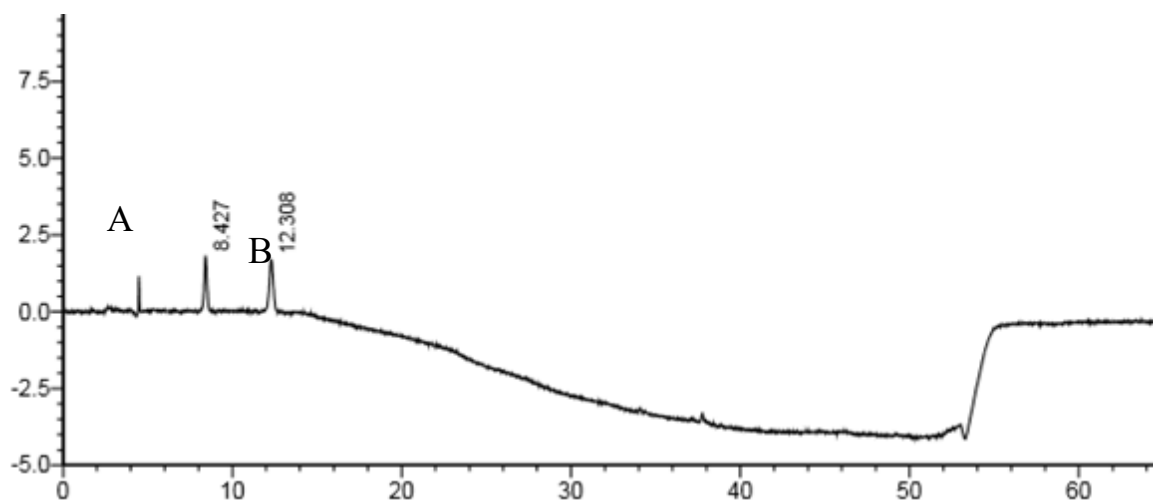


Рис. 5.37 Хроматограма розчину порівняння в за 0,9 мл/хв та звичайного співвідношення рухомих фаз (А – амоксициліну тригідрат, В – цефадоксил)

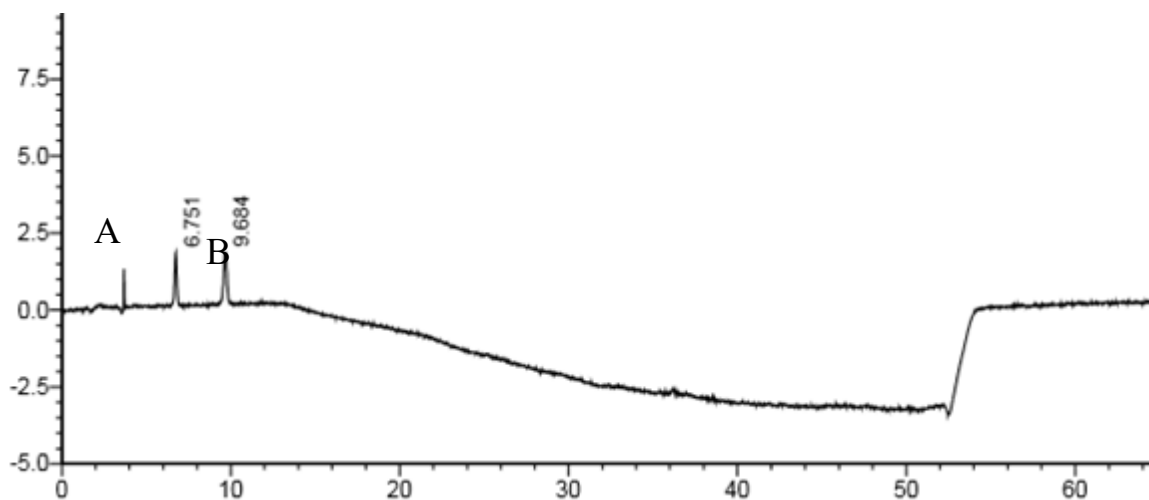


Рис. 5.38 Хроматограма розчину порівняння в за 1,1 мл/хв та звичайного співвідношення рухомих фаз (А – амоксициліну тригідрат, В – цефадроксил)

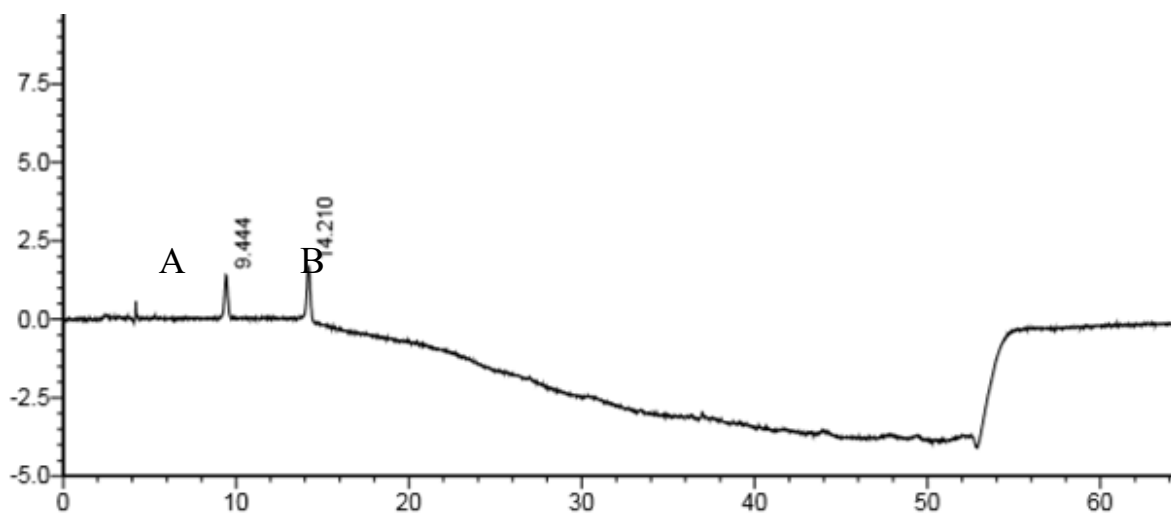


Рис. 5.39 Хроматограма розчину порівняння в за 1,0 мл/хв та початкового значення рухомої фази В 3% (А – амоксициліну тригідрат, В – цефадроксил)

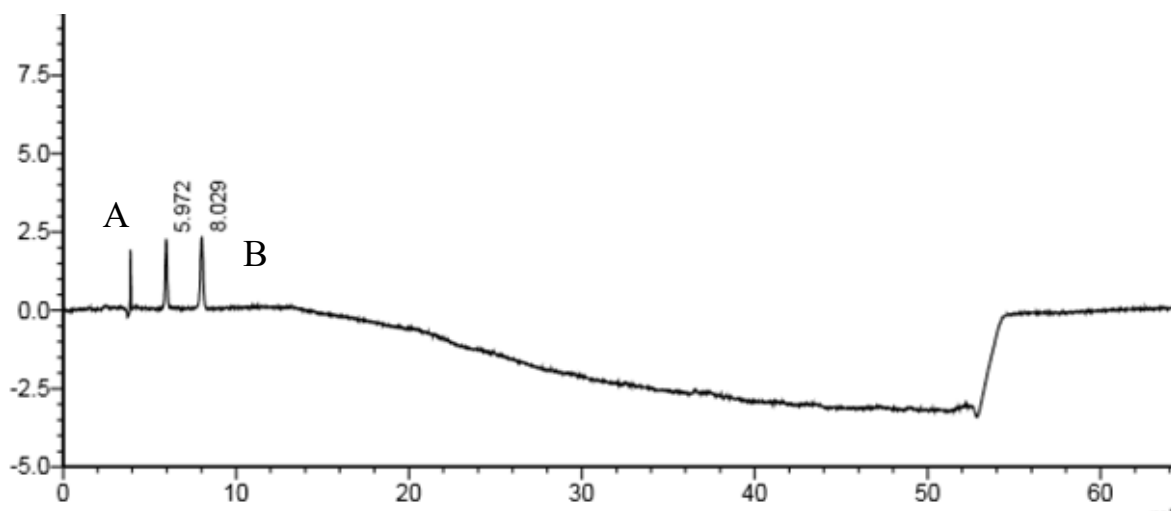


Рис. 5.40 Хроматограма розчину порівняння в за 1,0 мл/хв та початкового значення рухомої фази В 13% (А – амоксициліну тригідрат, В – цефадроксил)

Зміни температури колонки та швидкості рухомої фази впливають на час утримування компонентів, проте не впливають на розділення між піками. Аналогічний вплив спостерігається за різних співвідношень рухомих фаз, де час утримування змінюється, але ступінь розділення між сполуками залишається прийнятним.

Також було досліджено прискорену деградацію для випробовуваного розчину з використанням кислотного, лужного, пероксидного та температурного впливу.

1. *Кислотна деградація* (рис. 5.41). 60 мг комбінованих таблеток амоксициліну та клавуланової кислоти поміщають у мірну колбу місткістю 20,0 мл, додають 15 мл рухомої фази А та обробляють на УЗ-бані протягом 20 хвилин, з періодичними помішуваннями суміші, додають 2 мл 1 М розчину хлористоводневої кислоти. Витримують розчин протягом двох годин у темному місці. Кислоту нейтралізують 2 мл 1 М розчином натрію гідроксиду та доводять об'єм рухомою фазою А до мітки й перемішують.

2. *Лужна деградація* (рис. 5.42). 60 мг комбінованих таблеток амоксициліну та клавуланової кислоти поміщають у мірну колбу місткістю 20,0 мл, додають 15 мл рухомої фази А та обробляють на УЗ-бані протягом 20 хвилин, з періодичними помішуваннями суміші, додають 2 мл 1 М розчину натрію гідроксиду. Витримують розчин протягом двох годин у темному місці. Нейтралізують 2 мл 1 М розчином хлористоводневої кислоти та доводять об'єм рухомою фазою А до мітки й перемішують.

3. *Пероксидна деградація* (рис. 5.43). 60 мг комбінованих таблеток амоксициліну та клавуланової кислоти поміщають у мірну колбу місткістю 20,0 мл, додають 15 мл рухомої фази А та обробляють на УЗ-бані протягом 20 хвилин, з періодичними помішуваннями суміші, додають 2 мл 3% розчину перекису водню. Витримують розчин протягом двох годин у темному місці та доводять об'єм рухомою фазою до мітки й перемішують.

4. *Температурна деградація* (рис. 5.44). 60 мг комбінованих таблеток амоксициліну та клавуланової кислоти поміщають у мірну колбу місткістю

20,0 мл, додають 15 мл рухомої фази А та обробляють на УЗ-бані протягом 20 хвилин, із періодичними помішуваннями суміші, після чого нагрівають за температури 100 °С протягом двох годин. Потім розчин охолоджують і доводять об'єм тим самим розчинником до позначки, перемішують.

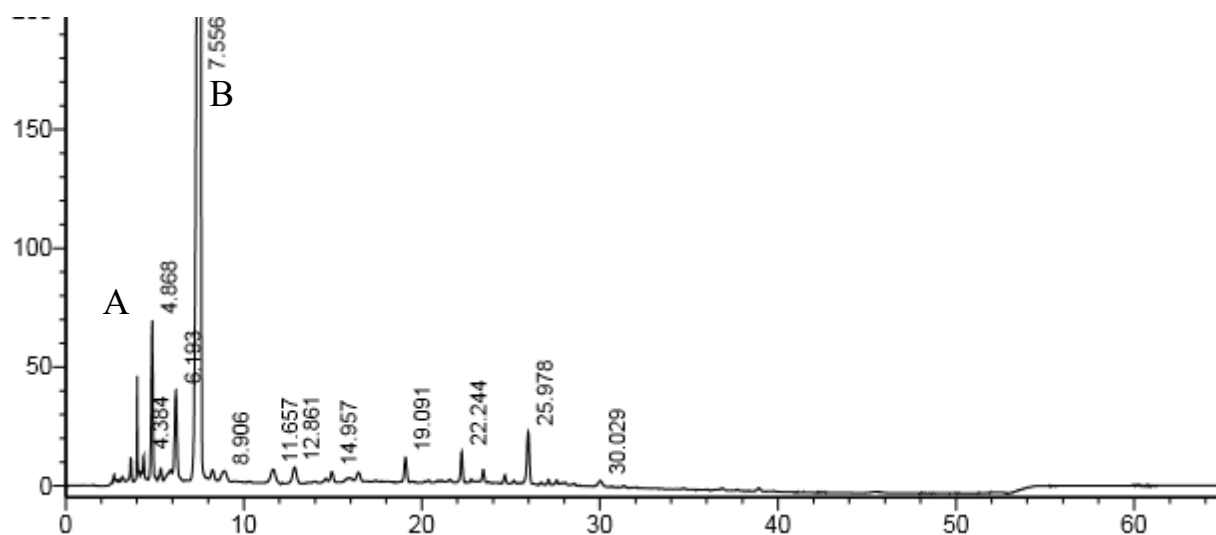


Рис. 5.41 Хроматограма розчину препарату після кислотного розкладання (А – калію клавуланат, В – амоксициліну тригідрат)

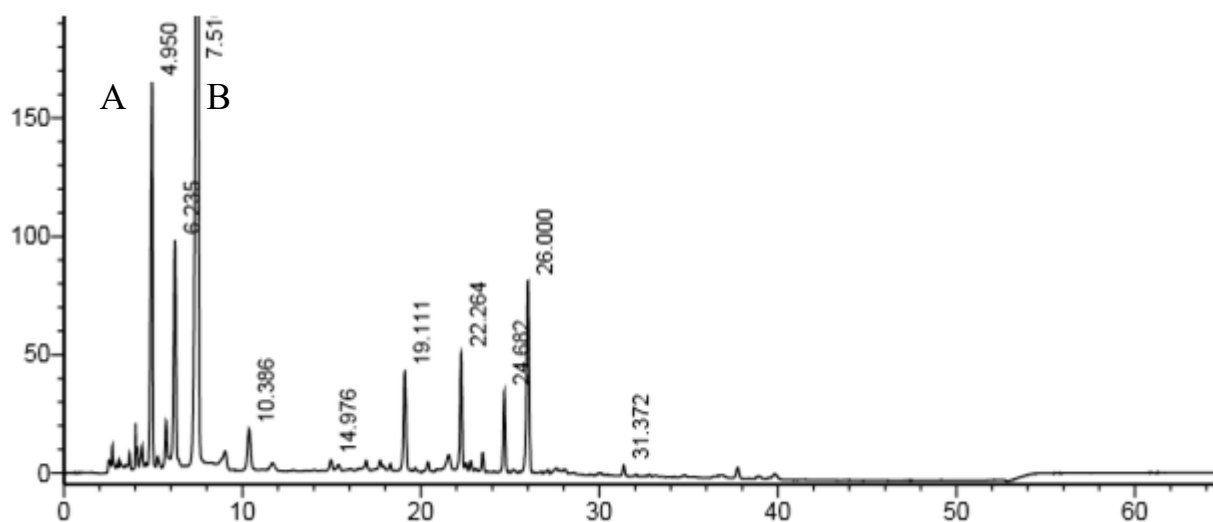


Рис. 5.42 Хроматограма розчину препарату після лужного розкладання (А – калію клавуланат, В – амоксициліну тригідрат)

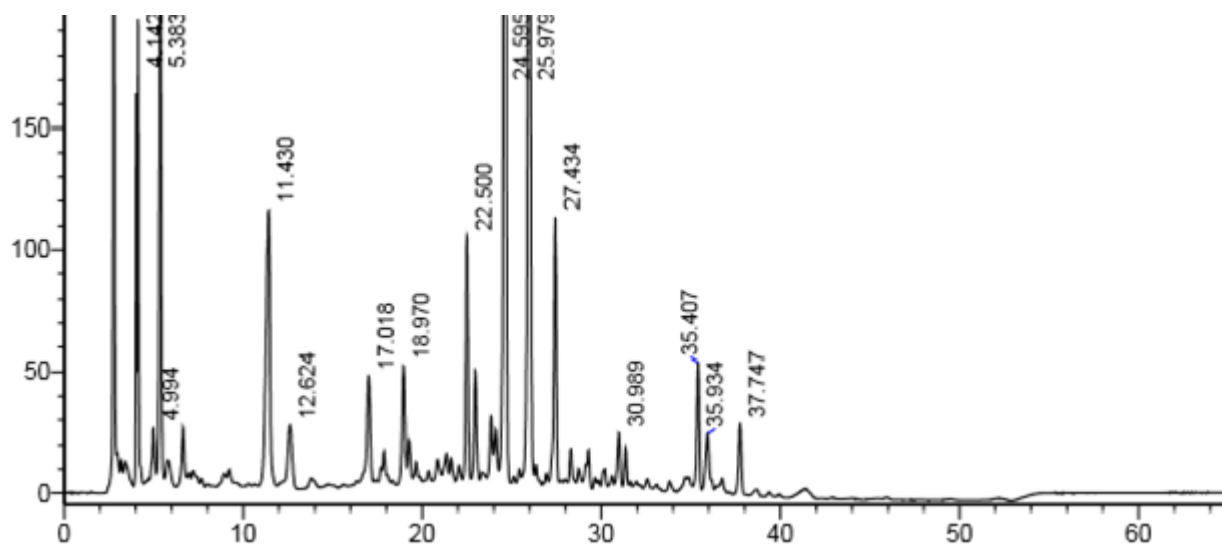


Рис. 5.43 Хроматограма розчину препарату після пероксидного розкладання

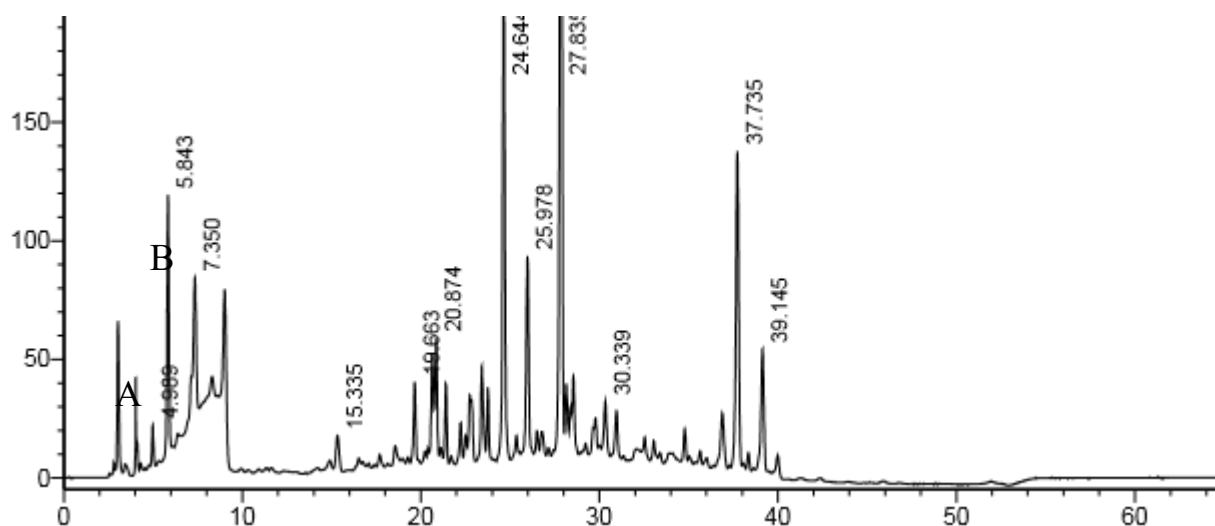


Рис. 5.44 Хроматограма розчину препарату після температурного розкладання (А– калію клавуланат, В – амоксициліну тригідрат)

Отримані дані свідчать, що проаналізовані зразки комбінованих таблеток амоксициліну та клавуланової кислоти відповідають вимогам БФ та ДФУ тесту «Супровідні домішки». На хроматограмах випробуваних розчинів було зафіксовано низку неідентифікованих домішок, проте їхня кількість не перевищувала зазначеного рівня (табл. 5.30).

Результати аналізу серій таблеток амоксициліну/клавуланової кислоти

	184111 (%)	184117 (%)	184153 (%)	18449 (%)	187489 (%)
Неідентифікована домішка 1 (6,36 хв)	0,40	0,42	0,42	0,45	0,39
Неідентифікована домішка 2 (21,53 хв)	0,09	0,10	0,21	0,10	-
Неідентифікована домішка 3 (22,34 хв)	0,05	0,31	0,32	0,24	0,26
Неідентифікована домішка 4 (23,64 хв)	0,25	0,18	0,16	0,18	-
Неідентифікована домішка 5 (25,29)	0,13	0,11	0,11	0,07	-
Неідентифікована домішка 6 (26,77 хв)	0,05	0,06	0,08	0,05	-
Неідентифікована домішка 7 (27,26 хв)	0,08	0,07	0,53	0,49	0,49
Неідентифікована домішка 8 (27,73 хв)	0,55	0,52	-	0,11	0,10
Неідентифікована домішка 9 (28,62 хв)	0,12	0,12	0,11	0,16	0,16
Неідентифікована домішка 10 (32,71 хв)	0,16	0,14	0,14	0,07	-
Неідентифікована домішка 11 (33,26 хв)	-	0,10	-	-	-
Неідентифікована домішка 12 (33,29)	-	-	0,10	-	-
Неідентифікована домішка 13 (21,23 хв)	-	-	0,07	0,07	-
Неідентифікована домішка 14 (12,07 хв)	-	-	-	0,23	0,14
Неідентифікована домішка 15 (27,27 хв)	-	-	-	0,08	-
Неідентифікована домішка 16 (19,35)	-	-	-	-	0,05

**Результати аналізу комбінованих таблеток амоксициліну
та клавуланату після проведеної деградації для методу ВЕРХ**

Назва	1 М розчин NaOH (%)	1 М розчин HCl (%)	3 % розчин H ₂ O ₂ (%)	Температура (%)
1	2	3	4	5
Неідентифікована домішка 1 (6,36 хв)	7,83	3,06	-	-
Неідентифікована домішка 4 (27,41 хв)	-	-	9,57	-
Неідентифікована домішка 5 (25,98 хв)	7,82	2,16	42,82	8,08
Неідентифікована домішка 8 (27,84 хв)	-	-	-	39,59
Неідентифікована домішка 16 (19,11 хв)	4,01	0,97	4,51	-
Неідентифікована домішка 17 (7,51 хв)	42,04	-	-	-
Неідентифікована домішка 18 (10,39 хв)	2,04	-	-	-
Неідентифікована домішка 19 (14,98 хв)	-	0,41	-	-
Неідентифікована домішка 20 (22,26 хв)	3,64	1,05	7,93	-
Неідентифікована домішка 21 (24,68 хв)	2,68	-	55,13	-
Домішка 22 (31,37 хв) амоксицилін димер	0,36	-	-	-
Неідентифікована домішка 23 (4,14 хв)	-	0,38	13,58	-
Неідентифікована домішка 24 (5,38 хв)	-	-	17,48	-
Неідентифікована домішка 25 (11,43 хв)	-	-	17,56	-
Неідентифікована домішка 26 (12,62 хв)	-	1,07	3,83	-
Неідентифікована домішка 27 (17,02 хв)	-	-	5,54	-
Неідентифікована домішка 28(35,41 хв)	-	-	4,94	-

Продовження табл. 5.31

1	2	3	4	5
Неідентифікована домішка 29 (8,91 хв)	-	0,84	-	-
Неідентифікована домішка 30 (11,66 хв)	-	1,05	-	-
Неідентифікована домішка 31 (30,03 хв)	-	0,39	-	1,79
Неідентифікована домішка 32 (15,54 хв)	-	-	-	1,66
Неідентифікована домішка 33 (19,66 хв)	-	-	-	2,93
Неідентифікована домішка 34 (20,87 хв)	-	-	-	7,28
Неідентифікована домішка 35 (37,74 хв)	-	-	3,18	14,83
Неідентифікована домішка 36 (39,15 хв)	-	-	-	5,84
Неідентифікована домішка 37 (35,93 хв)	-	-	3,37	-

Як видно з результатів, досліджуваний препарат є нестійким до дій кислотного, лужного, пероксидного та температурного розкладань (табл. 5.31).

За пероксидного розкладання було виявлено такі неідентифіковані домішки: 4, 5, 16, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 35, 37 (з часами утримування 27.41, 25.98, 18.97, 22.5, 24.6, 4.14, 5.38, 11.43, 12.62, 17.02, 35.41, 37.74, 35.93 хв відповідно).

В умовах температурного розкладання спостерігається утворення неідентифікованих домішок: 5, 8, 21, 24, 30, 32, 33, 34, 35, 36 (з часами утримування 25.98, 27.84, 24.64, 5.84, 30.34, 15.34, 19.66, 20.87, 37.74, 39.15 хв відповідно).

За умов лужного гідролізу з'являються неідентифіковані домішки: 1, 5, 16, 17, 18, 19, 20, 21 та амоксициліну димеру (з часами утримування 6.24, 26.00, 7.51, 19.11, 10.39, 14.98, 22.26, 24.68, 31.37 хв відповідно).

Кислотний гідроліз призводить до утворення неідентифікованих домішок: 1, 5, 16, 19, 23, 26, 29, 30, 31 (з часами утримування 6.19, 25.98, 19.09, 14.96, 4.38, 12.86, 8.91, 11.66, 30.03 хв відповідно).

Отримані результати верифікації свідчать, що пропонований метод можна використовувати для аналізу домішок комбінованих таблеток амоксициліну та клавуланату калію.

5.4.2 Трансфер умов аналізу на УЕРХ-метод

Приготування всіх розчинів та нормування домішок зазначено в розділі 3, пункт 3.4.1.

Параметри методу відображено в *методиці 14 «Визначення вмісту домішок методом УЕРХ»* (розділ 2, п. 2.4).

На першому етапі дослідження перевірили придатність хроматографічної системи з використанням *розчину порівняння в* (рис. 5.45).

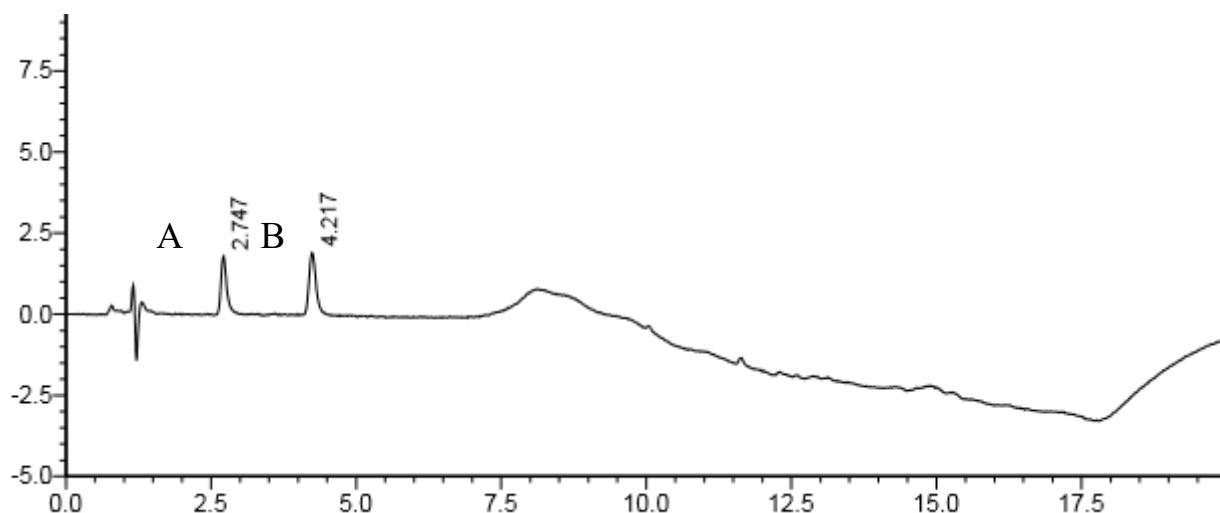


Рис. 5.45 Хроматограма *розчину порівняння в* для визначення домішок у комбінованих таблетках амоксициліну та клавуланату УЕРХ-методом (А – амоксициліну тригідрат, В – цефадроксил)

Отримані результати свідчать, що система придатна для аналізу, оскільки ступінь розділення між піками амоксициліну тригідрату та цефадроксилу був 10.81.

Пропонований метод було валідовано за такими показниками: специфічність, межа виявлення та робастність.

Вивчення специфічності було проведено на бланк-розчині, випробовуваному розчині, плацебо та *розчині порівняння в та с* (рис. 5.46-5.49).

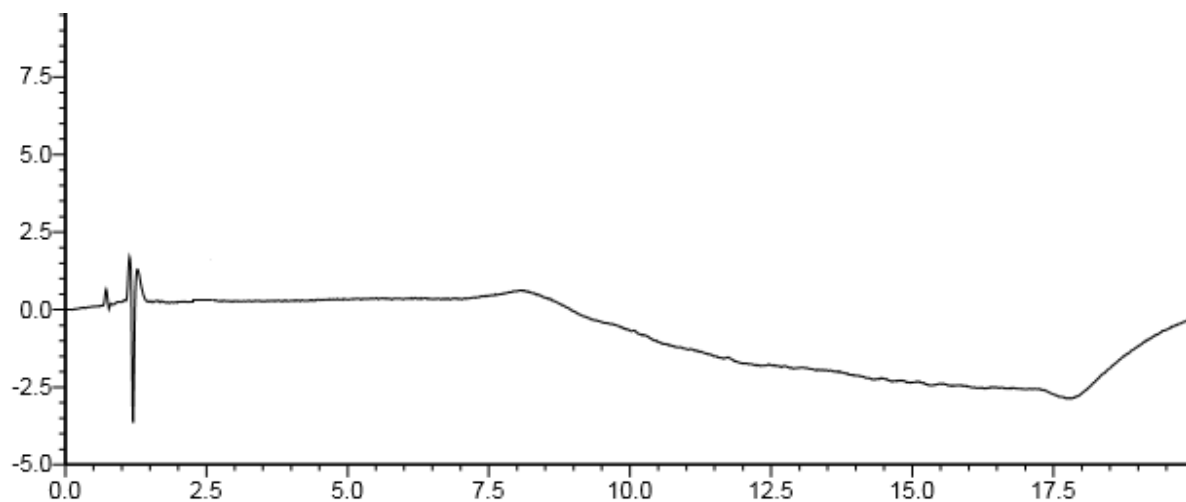


Рис. 5.46 Хроматограма бланк-розчину для визначення домішок у таблетках амоксициліну та клавуланату УЕРХ-методом

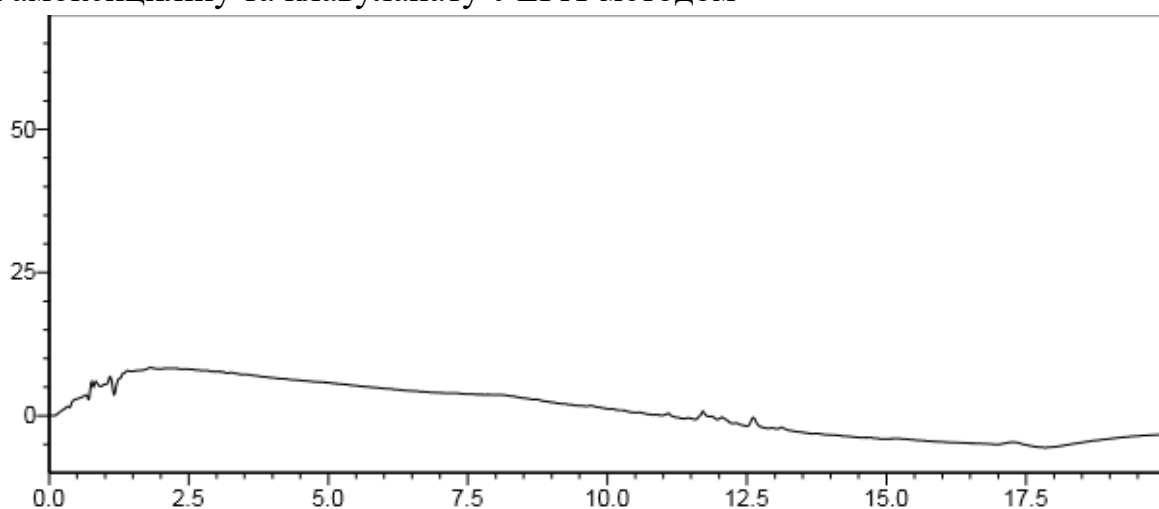


Рис. 5.47 Хроматограма розчину плацебо для визначення домішок у комбінованих таблетках амоксициліну та клавуланату УЕРХ-методом

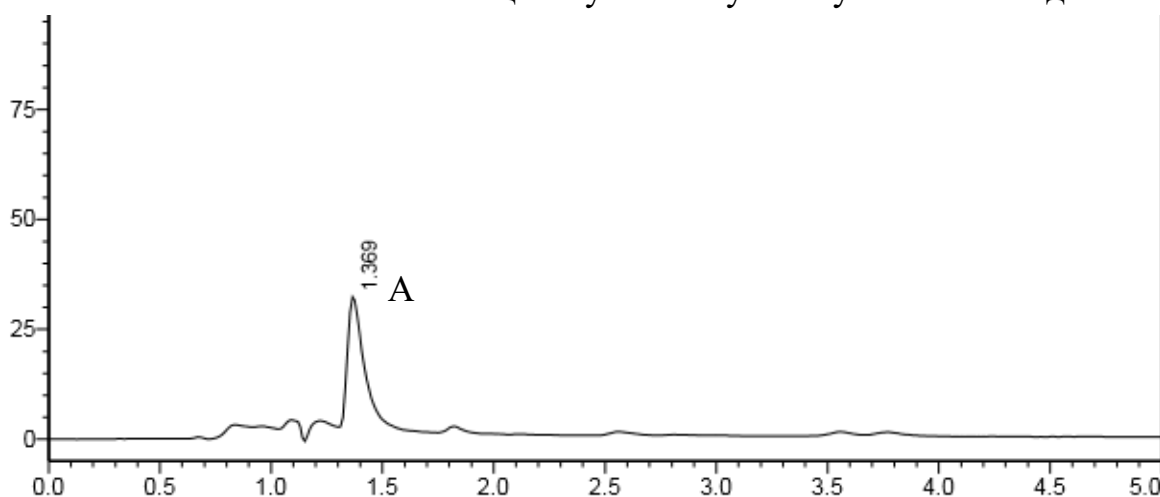


Рис. 5.48 Хроматограма розчину порівняння *c* для визначення домішок у комбінованих таблетках амоксициліну та клавуланату УЕРХ-методом (А – калію клавуланат)

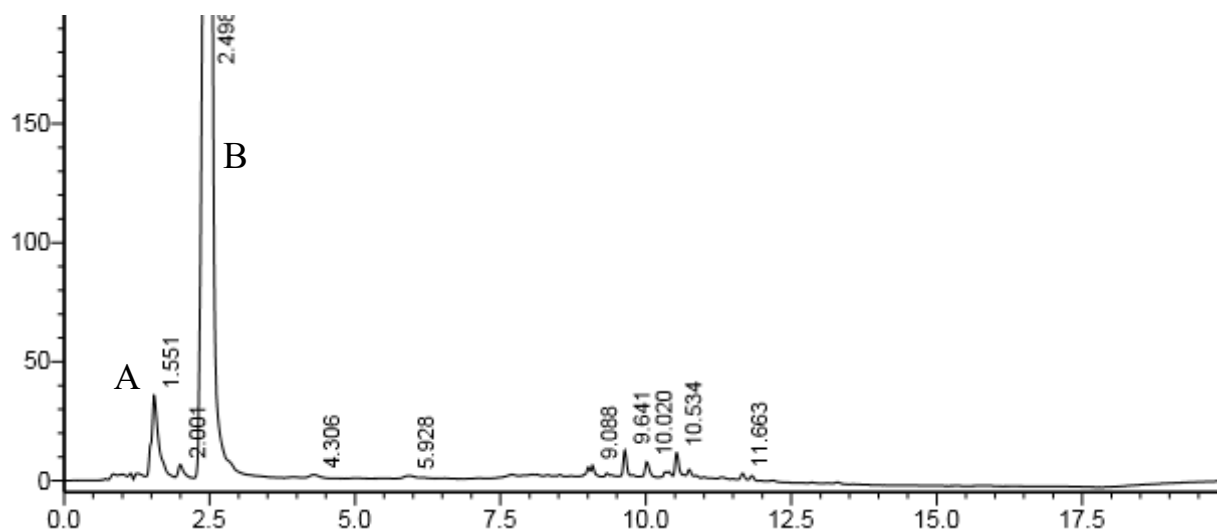


Рис. 5.49 Хроматограма випробовуваного розчину для визначення домішок у комбінованих таблетках амоксициліну та клавуланової кислоти УЕРХ-методом (А – калію клавуланат, В – амоксициліну тригідрат)

Отримані результати свідчать, що метод забезпечує достатню специфічність для аналізу домішок у комбінованих таблетках амоксициліну та клавуланової кислоти.

Для межі виявлення було приготовано розчини, що містили низькі концентрації основної речовини. Після чого проаналізували кожний розчин і визначили відношення сигналу до шуму. На підставі проведених досліджень було виявлено мінімальні концентрації визначення, для яких це співвідношення складало понад 3:1 (табл. 5.32). Розчин, що містив 0,15 мкг/мл основної речовини, було проаналізовано з використанням зазначеного методу УЕРХ (рис. 5.50).

Таблиця 5.32

Дослідження межі виявлення тесту «Розчинення» амоксициліну тригідрату та калію клавуланату для УЕРХ- методу

Розчин порівняння а, концентрація	Розведення розчину порівняння а	Концентрація розчину	% від вмісту амоксициліну	% від допускнуго вмісту домішки	Співвідношення сигнал/шум
15,0 мкг/мл	1:100	0,15 мкг/мл	0,01	0,01	Більше ніж 1:3

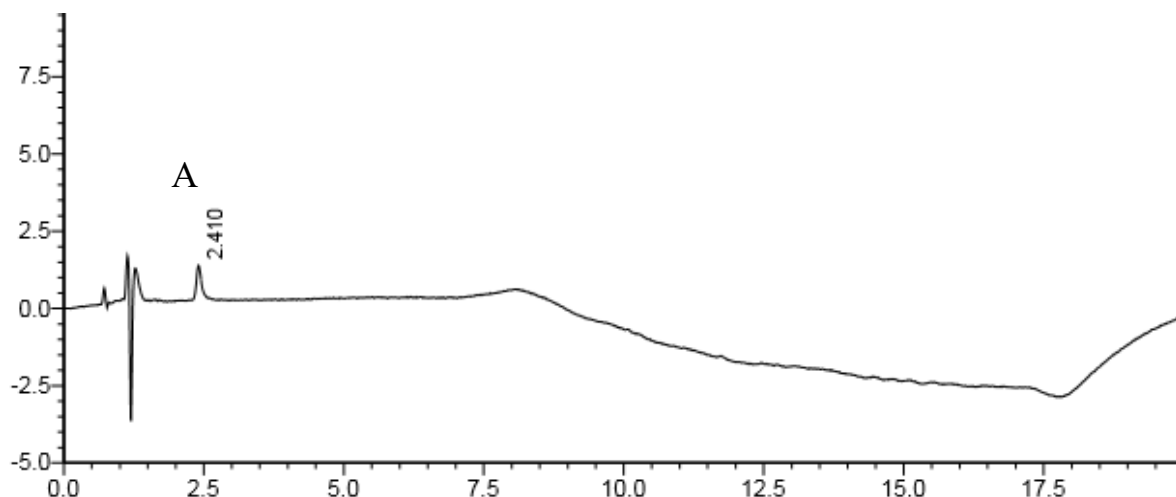


Рис. 5.50 Хроматограма розчину визначення межі виявлення (0,15 мкг/мл) для УЕРХ- методу (А – амоксициліну тригідрат)

За результатами, для розчину з концентрацією 0,15 мкг/мл співвідношення сигнал/шум перевищувало 3:1, а отже, межа виявлення складає навіть менше 0,15 мкг/мл.

Робасність методу вивчали на таких параметрах: температура колонки, співвідношення рухомих фаз, швидкість потоку рухомої фази. Для перевірки впливу цих параметрів *розчин порівняння* в аналізували за різних температур: 20°C, 30°C; різних швидкостей потоку 0,1 мл/хв, 0,15 мл/хв та 0,2 мл/хв та зміни початкового співвідношення рухомих фаз (рис. 5.51-5.56).

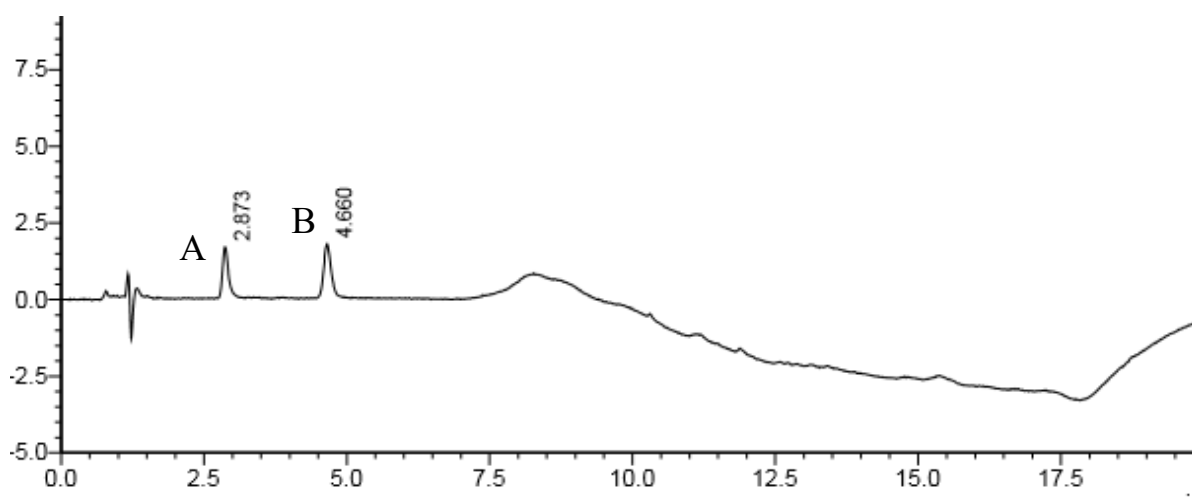


Рис. 5.51 Хроматограма *розчину порівняння* в за 20 °С, 0,15 мл/хв, звичайного співвідношення рухомих фаз (А – амоксициліну тригідрат, В – цефад-роксил)

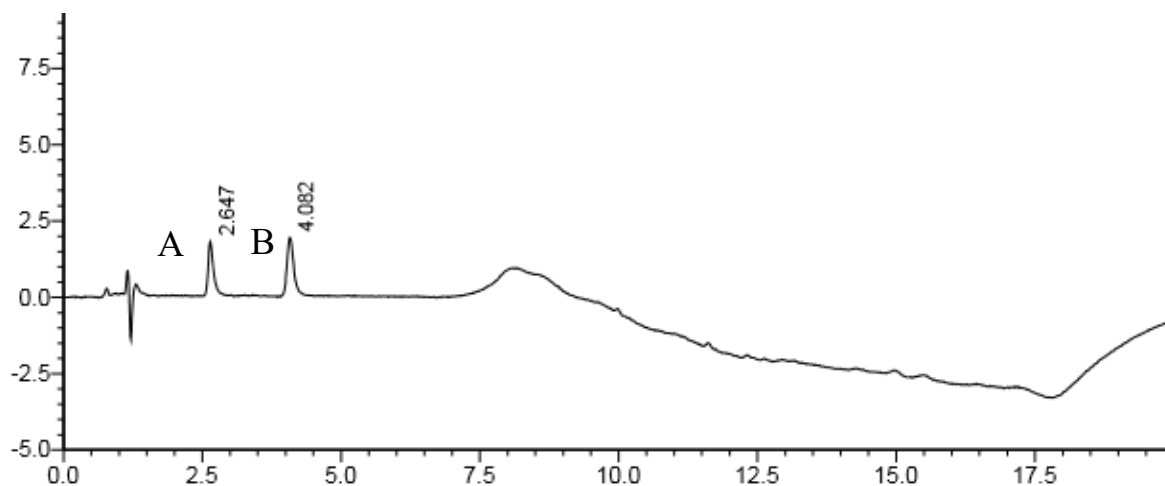


Рис. 5.52 Хроматограма розчину порівняння в за 30°C, 0,15 мл/хв, звичайного співвідношення рухомих фаз (А – амоксициліну тригідрат, В – цефадроксил)

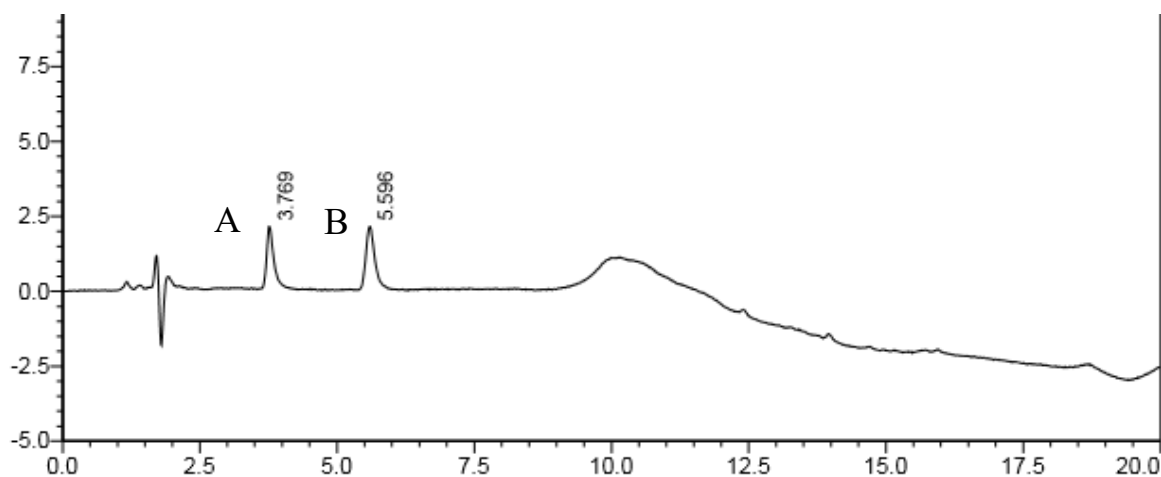


Рис. 5.53 Хроматограма розчину порівняння в за 0,1 мл/хв, співвідношення рухомих фаз (А – амоксициліну тригідрат, В – цефадроксил)

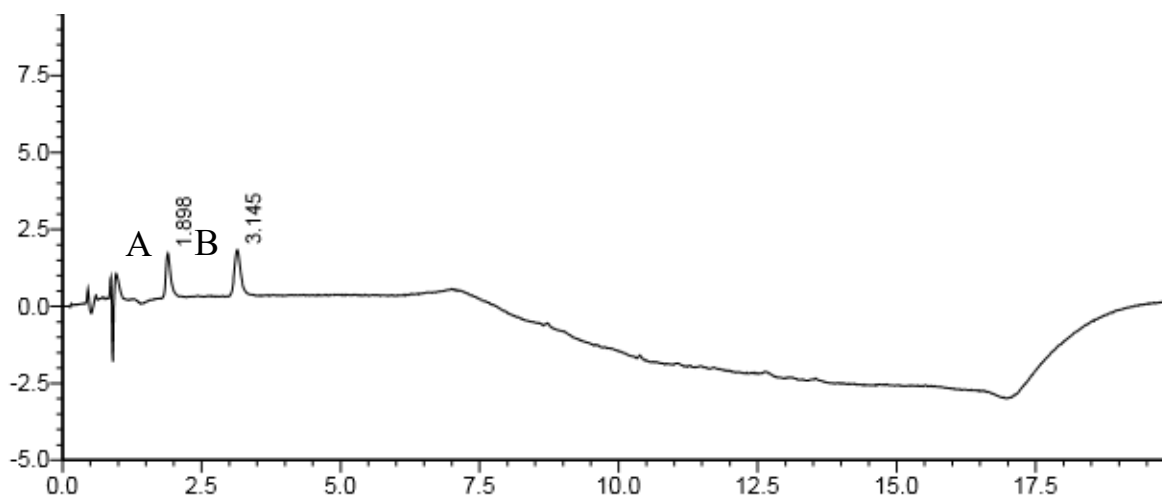


Рис. 5.54 Хроматограма розчину порівняння в за 0,2 мл/хв, співвідношення рухомих фаз (А – амоксициліну тригідрат, В – цефадроксил)

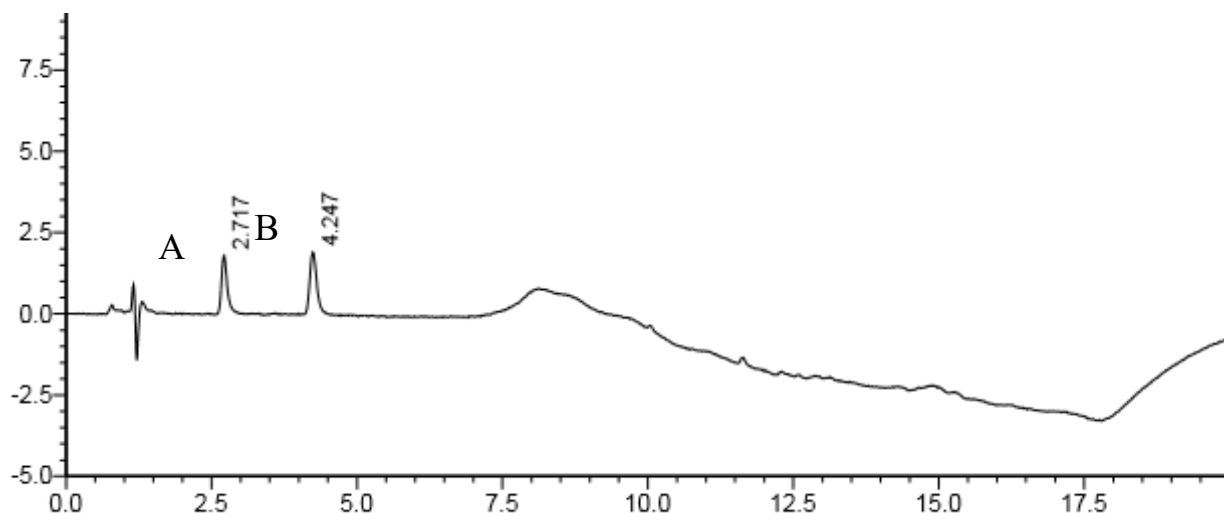


Рис. 5.55 Хроматограма розчину порівняння в за 0,15 мл/хв, початкової кількості рухомої фази Б 1% (А – амоксициліну тригідрат, В – цефадроксил)

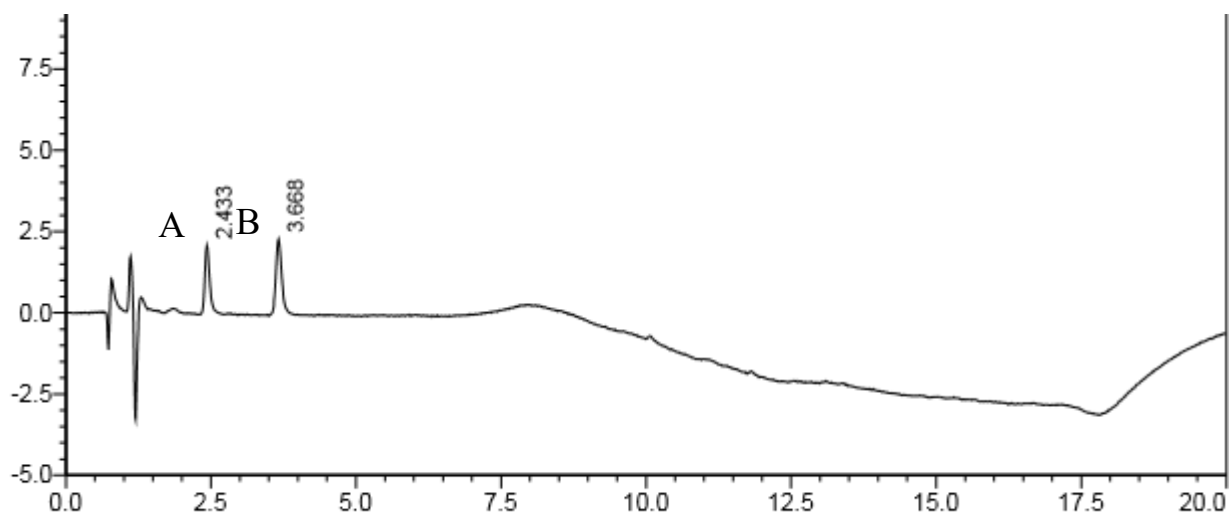


Рис. 5.56 Хроматограма розчину порівняння в за 0,15 мл/хв, початкової кількості рухомої фази Б 6% (А – амоксициліну тригідрат, В – цефадроксил)

Усі змінені параметри не суттєво впливали на час утримування речовин, проте не впливали й на розділення між ними.

Для визначення можливого профілю домішок аналізованого препарату було застосовано прискорену деградацію з використанням лужного (рис. 5.57), кислотного (рис. 5.58), температурного (рис. 5.59) та пероксидного (рис. 5.60) розкладань. Приготування розчинів було здійснено, як описано в розділі 5, п. 5.4.1.

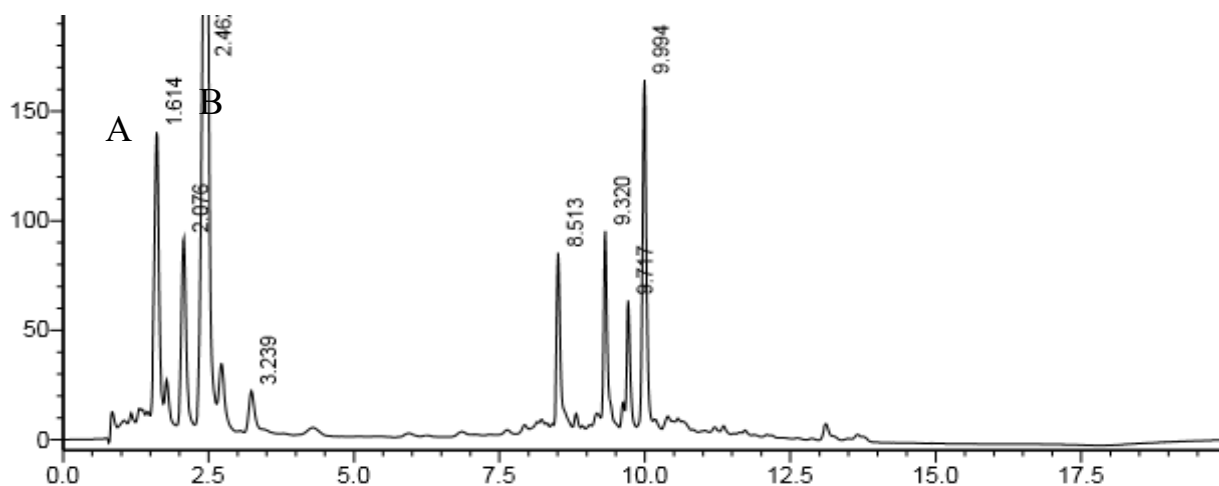


Рис. 5.57 Хроматограма розчину препарату після лужного розкладання (А – калію клавуланат, В – амоксициліну тригідрат)

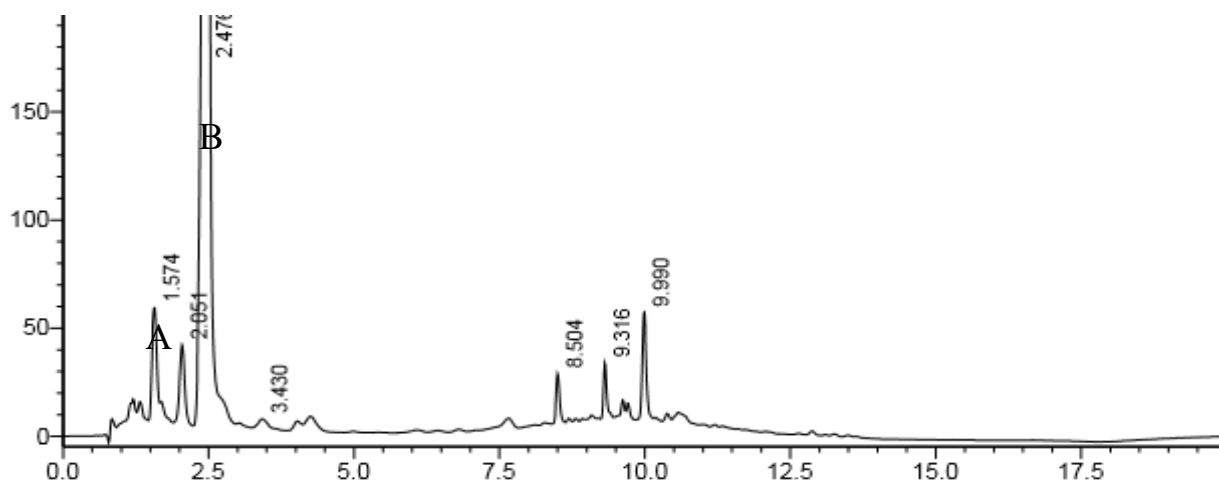


Рис. 5.58 Хроматограма розчину препарату після кислотного розкладання (А – калію клавуланат, В – амоксициліну тригідрат)

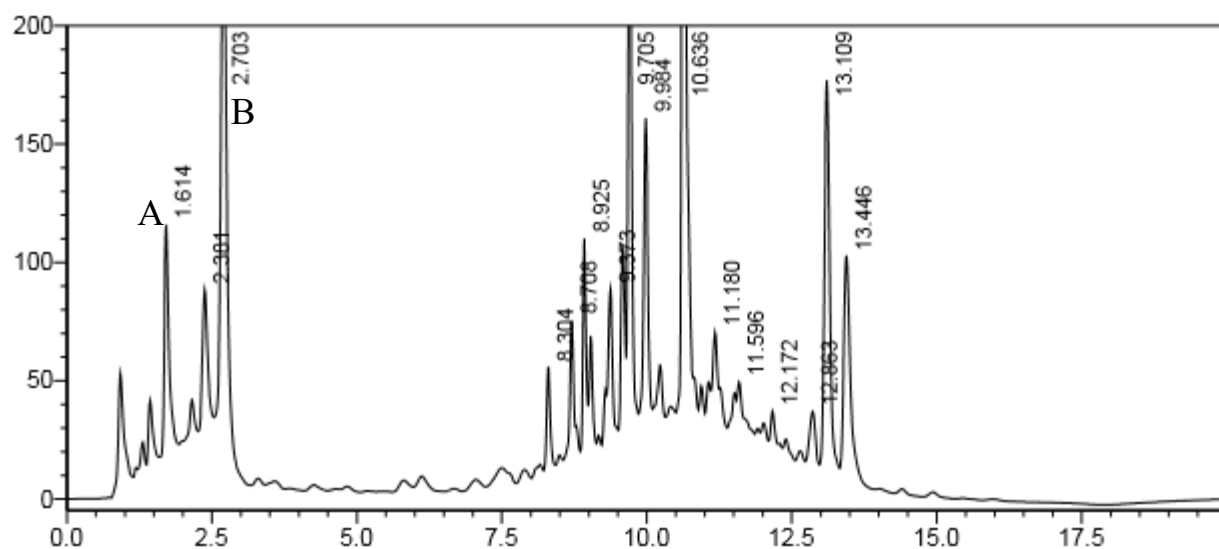


Рис. 5.59 Хроматограма розчину препарату після температурного розкладання (А – калію клавуланат, В – амоксициліну тригідрат)

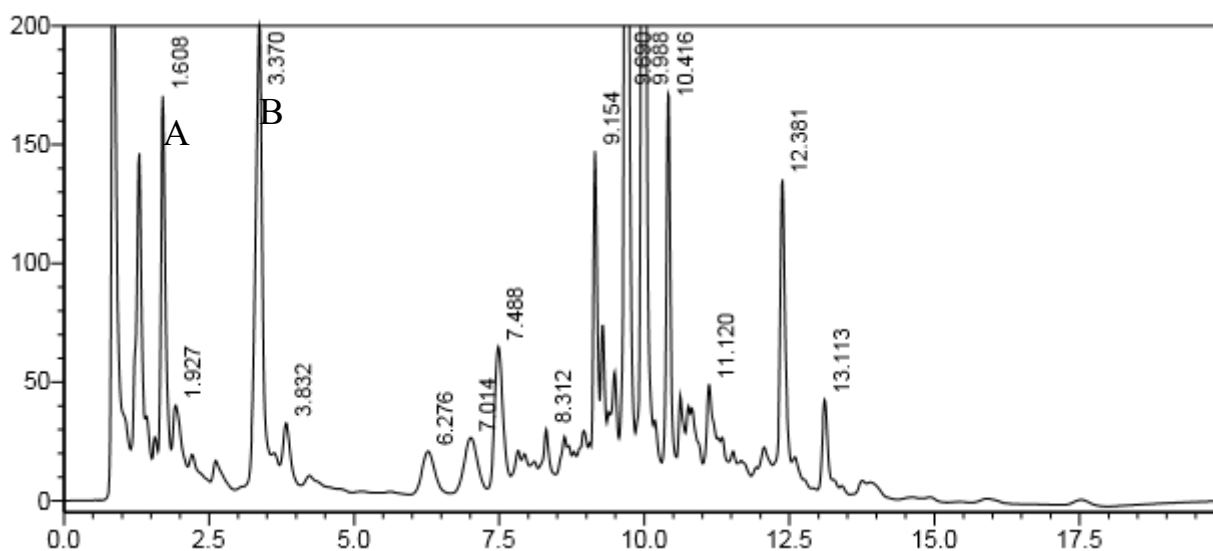


Рис. 5.60 Хроматограма розчину препарату після пероксидного розкладання

Результати свідчать про те, що досліджувані комбіновані таблетки амоксициліну та клавуланової кислоти відповідають вимогам БФ та ДФУ, проте є нестійкими до дій кислотного, лужного, пероксидного та температурного розкладань (табл. 5.33).

За пероксидного розкладання було виявлено такі неідентифіковані домішки: 1, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19 (з часами утримування 1.93, 9.15, 9.69, 9.99, 10.42, 3.37, 6.28, 7.01, 7.49, 12.38, 13.11, 8.31, 3.83, 11.12 хв відповідно).

В умовах температурного розкладання спостерігається утворення неідентифікованих домішок 2, 4, 5, 6, 7, 8, 14, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 23 (з часами утримування 2.38, 8.93, 9.71, 9.98, 10.64, 11.59, 12.17, 13.11, 8.30, 13.45, 8.71, 9.37, 11.18, 12.86 хв відповідно).

В умовах лужного гідролізу з'являються неідентифіковані домішки 1, 4, 5, 6, 10, 16 (з часами утримування 2.08, 9.32, 9.71, 9.99, 3.24, 8.51 хв відповідно).

Кислотний гідроліз призводить до утворення неідентифікованих домішок 1, 5, 6, 10, 16 (з часами утримування 2.05, 9.32, 9.99, 3.43, 8.50 хв відповідно).

**Результати аналізу таблеток амоксициліну та клавуланової кислоти
після проведеної деградації для методу ВЕРХ**

Назва	184111 (%)	187489 (%)	1 М роз- чин NaOH (%)	1 М роз- чин HCl (%)	3 % роз- чин H ₂ O ₂ (%)	Темпера- тура (%)
Домішка 1 (2,08 хв)	0,47	0,57	9,91	3,81	1,93	-
Домішка 2 (4,31 хв)	0,23	0,19	-	-	-	5,20
Домішка 3 (5,93 хв)	0,22	0,48	-	-	-	-
Домішка 4 (9,09 хв)	0,56	0,40	9,32	-	9,15	4,07
Домішка 5 (9,64 хв)	0,61	0,39	9,72	1,33	9,69	23,63
Домішка 6 (10,02 хв)	0,48	0,31	9,99	3,57	9,99	8,83
Домішка 7 (10,53 хв)	0,61	0,33	-	-	10,42	39,54
Домішка 8 (11,66 хв)	0,16	0,49	-	-	-	1,06
Домішка 9 (11,82 хв)	-	0,10	-	-	-	-
Домішка 10 (3,24 хв)	-	-	1,84	0,65	3,37	-
Домішка 11 (6,28 хв)	-	-	-	-	6,28	-
Домішка 12 (7,01 хв)	-	-	-	-	7,01	-
Домішка 13 (7,49 хв)	-	-	-	-	7,49	-
Домішка 14 (12,38 хв)	-	-	-	-	12,38	0,81
Домішка 15 (13,11 хв)	-	-	-	-	13,11	15,09
Домішка 16 (8,30 хв)	-	-	8,51	1,48	1,43	2,83
Домішка 17 (13,45 хв)	-	-	-	-	-	10,61
Домішка 18 (3,83 хв)	-	-	-	-	1,51	-
Домішка 19 (11,12 хв)	-	-	-	-	2,55	-
Домішка 20 (11,60 хв)	-	-	-	-	-	2,66
Домішка 21 (9,37 хв)	-	-	-	-	-	5,24
Домішка 22 (11,18 хв)	-	-	-	-	-	1,29
Домішка 23 (12,86 хв)	-	-	-	-	-	2,06

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 5

1. З метою включення до ДФУ верифіковано методики монографії БФ «*Co-amoxiclav tablets*»: ідентифікація, кількісне визначення, тест «Розчинення» та визначення вмісту домішок.

2. Під час перенесення методики ТШХ в умови ВЕТШХ було визначено, що отримані за використання ВЕТШХ-методу результати збігаються з результатами ТШХ-методу. Обидва методи продемонстрували високу специфічність, можливість ідентифікувати амоксициліну тригідрат та відсутність плями калію клавуланату. У зв'язку з цим ці два методи можна використовувати для проведення ідентифікації комбінованих препаратів, що містять зазначені компоненти.

3. Методику ВЕРХ для одночасного визначення амоксициліну та калію клавуланату було перенесено в УЕРХ-умови. Для оптимізації умов аналізу змінено співвідношення рухомих фаз, швидкість потоку та об'єм інжекції. Окрім того, УЕРХ-метод дозволив зменшити тривалість аналізу з 15 хв до 7,5 хв. УЕРХ-методику було повністю валідовано, вона продемонструвала відповідність усім критеріям, тому цей метод можна рекомендувати для аналізу комбінованих таблеток амоксициліну та клавуланової кислоти.

4. ВЕРХ та УЕРХ-методи кількісного визначення порівняли на відповідність принципам «зеленої хімії». Загалом, обидва методи є екологічно безпечні, хоча УЕРХ-метод, із 85 балами за екошколою, продемонстрував трохи вищий результат, ніж ВЕРХ, що отримав 82 бали.

5. Статистичне оцінювання обох методів за допомогою регресійного методу Пассінга-Баблока засвідчило схожість методів в отриманих результатах. Обидва методи надійні та можуть бути використані в лабораторіях для контролю якості.

6. Умови верифікованої ВЕРХ-методики визначення домішок було перенесено на УЕРХ. Для оптимізації методу було внесено деякі зміни: швидкість потоку знижено з 1 мл/хв до 0,15 мл/хв, а об'єм інжекції змінено з 50 мкл на 1 мкл. Методику зі зміненими параметрами було валідовано, вона продемонструвала відповідність усім встановленим критеріям.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі надано теоретичне узагальнення та практичне розв'язання наукової проблеми, що полягає в дослідженні взаємодії доксицикліну хіклату та амоксициліну з солями заліза(II), заліза(III), алюмінію, магнію, кальцію та з мінеральними/столовими водами, до складу яких входять солі цих металів, а також у розробленні нових методик контролю якості цих ЛЗ і удосконаленні та верифікації вже існуючих.

1. Проведено систематичний пошук і аналіз наукових джерел, узагальнено дані щодо проблем взаємодії антибактеріальних лікарських засобів з іншими ЛЗ, солями металів, їжею та напоями. Досліджено можливості й особливості застосування УФ-спектрофотометрії, ЕІС-методу, хроматографічних методів для аналізу взаємодії доксицикліну хіклату, амоксициліну з солями заліза(II), заліза(III), алюмінію, магнію та кальцію, а також з мінеральними/столовими водами, до складу яких входять солі цих металів, та для контролю їх якості.

2. В умовах хімічного експерименту методами прямої УФ-спектрофотометрії було якісно підтверджено взаємодію доксицикліну з солями заліза(II), заліза(III), алюмінію, магнію та кальцію. Вивчено закономірності взаємодії досліджуваних ЛЗ з цими катіонами в різних середовищах. Найбільшу здатність до комплексоутворення з доксицикліном проявили катіони алюмінію(III) і кальцію(II), а з амоксициліном – катіони магнію(II). З використанням методу Джоба було виявлено, що амоксицилін утворює комплексну сполуку з катіоном магнію за стехіометричного співвідношення 1:1.

3. Здійснено верифікацію методики тесту розчинення капсул доксицикліну хіклату, для лікарських засобів українського виробництва, що дозволяє впровадити її в практику лабораторій з аналізу якості лікарських засобів та використовувати під час проведення досліджень кінетики вивільнення активної субстанції з капсул.

4. Проведено моделювання *in vitro* тесту розчинення в середовищі 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої, що відтворює умови взаємодії в шлунку, для капсул доксицикліну хіклату та таблеток амоксициліну із мінеральними водами «Карпатська джерельна», «Єсентуки № 17», «Трускавецька», «Боржомі» та газованим безалкогольним напоєм «Спрайт». За профілем розчинення та фактором подібності було виявлено взаємодію доксицикліну із компонентами усіх досліджуваних мінеральних/столових вод та газованого безалкогольного напою «Спрайт», а також взаємодію амоксициліну із компонентами мінеральних/столових вод «Карпатська джерельна», «Єсентуки 17», «Боржомі», «Харківська-1», «Харківська-2» і з міською водопровідною водою. Отже, одночасний прийом цих вод із досліджуваними ЛЗ може впливати на їх біодоступність, що необхідно враховувати у рекомендаціях з фармацевтичної опіки.

5. Розроблено методику якісного та кількісного оцінювання комплексоутворення антибактеріальних препаратів та солей металів за допомогою методу ЕІС на прикладі взаємодії доксицикліну та солі заліза(III). Виявлено, що при співвідношенні концентрацій 1:1 відбувається стійке комплексоутворення досліджуваних лігандів та іонів металів заліза(III), алюмінію(III), магнію(II) та кальцію(II). Розраховані константи стабільності утворення комплексів свідчать про те, що як для доксицикліну, так і для амоксициліну найбільш виражена взаємодія спостерігається з солями заліза(III), а далі за зменшенням – алюмінію, магнію і кальцію. Експериментально доведено, що для амоксициліну спостерігається більш стійке комплексоутворення з іонами досліджуваних металів, ніж для доксицикліну.

6. Для забезпечення контролю якості комбінованих ЛФ амоксициліну та клавуланової кислоти в таблетках і з метою включення до ДФУ було адаптовано та верифіковано методики монографії БФ «*Co-amoxiclav tablets*»: ідентифікація, кількісне визначення, тест розчинення та визначення вмісту домішок.

7. Запропоновано перенесення верифікованої методики ТШХ на ВЕТШХ-пластину, визначено, що отримані за використання ВЕТШХ-методу

результати збігаються з результатами ТШХ-методу за високою специфічністю, можливістю ідентифікувати амоксицилін тригідрат та відсутністю плями калію клавуланату, тому обидва методи можуть бути використані для проведення ідентифікації комбінованих препаратів, що містять зазначені компоненти.

8. Запропоновано перенесення верифікованих ВЕРХ-методик на УЕРХ умови для одночасного кількісного визначення амоксициліну та калію клавуланату, а також для визначення домішок. Для оптимізації умов аналізу було змінено співвідношення рухомих фаз, швидкість потоку та об'єм інжекції. Крім того, УЕРХ-метод дозволив зменшити тривалість аналізу з 15 хв до 7,5 хв. УЕРХ-методики було повністю валідовано, вони продемонстрували відповідність усім критеріям, тому можуть бути рекомендовані для фармацевтичного аналізу комбінованих таблеток амоксициліну та клавуланової кислоти у лабораторіях, а також внесені у ДФУ для контролю якості зазначених ЛЗ. Статистична оцінка обох методів за допомогою регресійного методу Пассінга-Баблока показала схожість методів в отриманих результатах, обидва методи виявились екологічно безпечними за екошкалою - 82 бали для УЕРХ та 85 балів – для ВЕРХ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Model List of Essential Medicines, 21st List / World Health Organization. Geneva : World Health Organization, 2019. URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325771/WHO-MVP-EMPIAU-2019.06-eng.pdf> Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO (Date of access: 2.09.2021).
2. Declaration G20 Meeting of Health Ministers. October 4th 2018, Mar del Plata, Argentina. URL: <http://www.g20.utoronto.ca/2018/2018-10-04-health.pdf> (Date of access: 2.09.2021).
3. Executive summary: the selection and use of essential medicines 2019: report of the 22nd WHO Expert Committee on the selection and use of essential medicines: WHO Headquarters, Geneva, 1–5 April 2019 / World Health Organization. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/325773>. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO (Date of access: 2.09.2021).
4. Негоспітальна пневмонія у дорослих осіб: етіологія, патогенез, класифікація, діагностика, антибактеріальна терапія та профілактика. Уніфікований протокол надання медичної допомоги дорослим хворим на негоспітальну пневмонію. 2016. URL: http://www.ifp.kiev.ua/doc/staff/pneumonia_guidelines_2016 (дата звернення: 2.09.2021).
5. Brunton L. L., Lazo J. S., Parker K. L. Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. 11st ed. Rio de Janeiro : McGraw Hill Interamericana do Brasil, 2006. 2112 p.
6. Jacobs M. R., Bajaksouzian S., Windau A. Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* to 17 oral antimicrobial agents based on pharmacodynamic parameters: 1998–2001 US Surveillance Study. *Clin. Lab. Med.* 2004. № 24. P. 503–530.
7. Jones R. N., Sader H. S., Fritsche T. R. Doxycycline use for community-acquired pneumonia: contemporary in vitro spectrum of activity against *Streptococcus pneumoniae* (1999–2002). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2004. № 49. P. 147–149.

8. Martindale. The Complete Drug Reference. 36th ed. London : Pharmaceutical Press, 2009. 3712 p.
9. Ramamurthy N. S., Rifkin B. R., Greenwald R. A. Inhibition of matrix metalloproteinase-mediated periodontal bone loss in rats: a comparison of 6 chemically modified tetracyclines. *J. Periodontol.* 2002. № 73. P. 726–734.
10. Sapadin A. N., Fleischmajer R. J. Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications. *Am. Acad. Dermatol.* 2006. № 54. P. 258–265.
11. Skidmore R., Kovach R., Walker C. Effects of subantimicrobial-dose doxycycline in the treatment of moderate acne. *Arch. Dermatol.* 2003. № 139. P. 459–464.
12. Weinberg J. M. The anti-inflammatory effects of tetracyclines. *Cutis.* 2005. № 75. P. 6–11.
13. Дослідження протизапальної активності композицій на основі доксицикліну гідрохлориду і глюкозаміну гідрохлориду / І. А. Зупанець та ін. *Український журнал клінічної та лабораторної медицини.* 2014. Т. 9, № 3. С. 37–40.
14. Antibiotics in chronic obstructive pulmonary disease exacerbations: a meta-analysis / S. Saint et al. *JAMA.* 1995. Vol. 273. P. 957–960.
15. Urinary Tract Infection in Children / A. K. C. Leung et al. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* 2019. Vol. 13, № 1. P. 2–18.
16. Tan C. W., Chlebicki M. P. Urinary tract infections in adults. *Singapore Med. J.* 2016. Vol. 57, № 9. P. 485–490.
17. Gasser T. C., Larsen E. H., Madsen P. O. Amoxicillin/clavulanate in urinary tract infection. *Urology.* 1987. Vol. 29, № 1. P. 111–114.
18. Antibiotic treatment of skin and soft tissue infections / Y. Gillet et al. *Arch. Pediatr.* 2017. № 24 (12S). P. S30–S35.
19. Ball P. The clinical development and launch of amoxicillin/clavulanate for the treatment of a range of community-acquired infections. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2007. Vol. 30, Suppl. 2. P. 113–117.
20. Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report / P. Malfertheiner et al. *Gut.* 2017. Vol. 66, № 1. P. 6–30.

21. Fischbach W., Malfertheiner P. Helicobacter Pylori Infection. *Dtsch. Arztebl. Int.* 2018. Vol. 115, № 25. P. 429–436.
22. Kogawa A. C., Salgado H. Doxycycline hyclate: a review of properties, applications and analytical. *International Journal of Life Science & Pharma Research.* 2012. Vol. 2, Iss. 4. P. 11–25.
23. От субстанции к лекарству : учеб. пособие / под ред. В. П. Черных. Харьков : НФаУ : Золотые страницы, 2005. 1244 с.
24. Беликов В. Г. Фармацевтическая химия : учеб. пособие : в 2-х ч. 4-е изд., перераб. и доп. Москва : МЕДпресс-информ, 2007. 624 с.
25. Chopra I., Roberts M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001. Vol. 65, № 2. URL: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001> (Date of access: 2.09.2021).
26. A convergent enantioselective route to structurally diverse 6-deoxytetracycline antibiotics / M. G. Charest et al. *Science.* 2005. Vol. 308, № 5720. P. 395–398.
27. Vardanyan R., Hruby V. J. Synthesis of Essential Drugs. Amsterdam : Elsevier, 2006. 600 p.
28. Державна Фармакопея України. Доповнення 2 / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Харків : ДП «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. 620 с.
29. Kumar A., Nanda S., Chomwal R. Spectrophotometric methods for determination of doxycycline in Tablet formulation. *Int. Journal of Pharm. Tech. Research.* 2010. Vol. 2, № 1. P. 599–602.
30. UV assay method for the determination of Doxycycline Hyclate in Bulk and pharmaceutical Formulation / S. Sreeram et al. *Chemical Science Transactions.* 2015. Vol. 4., № 1. P. 69–74.
31. Фармацевтична хімія : підруч. для студентів вищ. фармацевт. навч. закл. і фармацевт. ф-тів вищ. мед. навч. закл. III–IV рівнів акредитації / за заг. ред. П. О. Безуглого. 3-е вид. Вінниця : Нова Книга, 2017. 560 с.

32. Khammas Z. A. A., Rana, A. R. Visible spectrophotometric analysis for the mutual determination of doxycycline hydrochloride and iron in real samples after cloud point extraction. *Int. J. Chem. Sci.* 2016. Vol. 14, № 2. P. 955–977.
33. Abbas R. F., Wheeb A. A., Abdullwahid A. A. Spectrophotometric Determination of Doxycycline Hyclate in Pure and Capsule using Diazotization. *Al-Mustansiriyah Journal of Science.* 2016. Vol. 27, № 5.
34. A simple spectrophotometric method for the determination of tetracycline and doxycycline in pharmaceutical formulations using chloramine-T / J. L. Rufino et al. *Eclética Química.* 2010. Vol. 35, № 4. P. 139–146.
35. Bhushan R., Martens J., Batra S. Amino Acids. Thin-Layer (Planar) Chromatography. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering.* Amsterdam : Elsevier, 2014. P. 1–27.
36. Friedman M. Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2004. Vol. 52, № 3. P. 385–406.
37. Paz J. L. L., Calatayud, J. M. Copper carbonate as a solid-bed reactor for spectrophotometric determination of doxycycline and oxytetracycline in an unsegmented continuous flow assembly. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 1993. Vol. 11, № 11–12. P. 1093–1098.
38. Saha U. Colorimetric determination of tetracycline derivatives in pharmaceutical preparations. *Assoc. Off. Anal. Chem.* 1989. № 72. P. 242–245.
39. Державна Фармакопея України : в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. Т. 1. 1128 с.
40. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 40-NF 35). Maine Edition. Rockville : United States Pharmacopeial Convention, 2017. 998 p.
41. European Pharmacopoeia 8.0 / European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care. Strasbourg, 2014. Vol. 2. P. 632–636.

42. Kogawa A. C., Salgado H. R. Quantification of Doxycycline Hyclate in Tablets by HPLC–UV Method. *Journal of Chromatographic Science*. 2013. Vol. 51, Iss. 10. P. 919–925.
43. Monser L., Darghouth F. Rapid liquid chromatographic method for simultaneous determination of tetracyclines antibiotics and 6-epi-doxycycline in pharmaceutical products using porous graphitic carbon column. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000. Vol. 15, № 23 (2–3). P. 353–362.
44. Basavaiah R. P. J., Rajendraprasad N., Kanakapura B. V. Non–aqueous titrimetric assay of doxycycline hyclate in pharmaceutical preparations. *International Journal of Chem. Tech. Research*. 2010. № 2. P. 584–591.
45. Leng F., Zhao X. J., Wang J., Li Y. F. Visual detection of tetracycline antibiotics with the turned on fluorescence induced by a metal-organic coordination polymer. *Talanta*. 2013. Vol. 30, № 107. P. 396–401.
46. Titrimetric and spectrophotometric determination of doxycycline hyclate using bromate-bromide, methyl orange and indigo carmine / R. Jagannathamurthy et al. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*. 2010. Vol. 16, № 2. P. 139–148.
47. Amoxicillin. Compound Summary. *National Center for Biotechnology Information. PubChem*. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Amoxicillin> (Date of access: 2.09.2021).
48. Державна Фармакопея України : в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2–е вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. Т. 3. 540 с.
49. Sweetman S. C. Martindale: The Complete Drug Reference. 7th ed. London : The Pharmaceutical Press, 2007. 4142 p.
50. British Pharmacopoeia / British Pharmacopoeia Commission. London : TSO 2017. Vol. III. 6128 p.
51. Finlay J., Miller L., Poupard J. A. A review of the antimicrobial activity of clavulanate. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003. Vol. 52, № 1. P. 18–23.

52. Reading C., Cole M. Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1977. Vol. 11, № 5. P. 852–857.

53. Oral amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid: properties, indications and usage / A. Huttner et. al. *Clin. Microbiol. Infect.* 2020. Vol. 26, № 7. P. 871–879.

54. Bruggink A., Roy P. D. Industrial Synthesis of Semisynthetic Antibiotics. *Synthesis of β -Lactam Antibiotics*. 2001. P. 12–54.

55. Bruggink A., Roos E. C., de Vroom E. Penicillin Acylase in the Industrial Production of β -Lactam Antibiotics. *Organic Process Research & Development*. 1998. Vol. 2, № 2. P. 128–133.

56. Ferreira A. L. O., Giordano R. L. C., Giordano R. C. Improving selectivity and productivity of the enzymatic synthesis of ampicillin with immobilized penicillin G acylase. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2004. Vol. 21, № 4. P. 519–529.

57. Dynamic Modelling and Optimisation of the Batch Enzymatic Synthesis of Amoxicillin / A. B. Cuthbertson et al. *Processes*. 2019. Vol. 7, № 318. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr7060318> (Date of access: 2.09.2021).

58. The International Pharmacopoeia. 9–th ed. Geneva : WHO, 2019. Vol. 1–2.

59. Marakaeva A. V., Kosyreva I. V. Express analysis of amoxicillin via colorimetric testing. *Chem. Pap.* 2020. № 74. P. 2381–2388.

60. Державна Фармакопея України : в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2–е вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. Т. 2. С. 38.

61. Llinás A., Page M. I. Intramolecular general acid catalysis in the aminolysis of β -lactam antibiotics. *Org. Biomol. Chem.* 2004. Vol. 2, № 5. P. 651–654.

62. Pippich S., Bartsch H., Holzer W. Studies on ring opening reactions of β -lactams. *Tetrahedron*. 1997. Vol. 53, Iss. 25. P. 8439–8446.

63. Parker G., Cox R. J., Richards D. The Purification and Characterisation of Penicillin V. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1955. Vol. 7, № 1. P. 683–691.
64. New Applications For Amoxicillin Determination in Pure Form and Pharmaceuticals Based on Iodate-Iodide Mixture: Titrimetry and Spectroscopy Studies / N. A. S. Qarah et al. *Química Nova*. 2020. Vol. 43, № 1. P. 44–49.
65. Blazhevskii N. E., Karpova S. P., Kabachyi V. I. Quantitative determination of penicillins by iodometry using potassium hydrogen peroxy monosulfate. *Antibiot Khimioter*. 2013. Vol. 58, № 11–12. P. 3–7.
66. Development of a method for the determination of amoxicillin in capsules by potentiometric titration / J. C. Cruz et al. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*. 2018. Vol. 4, № 2. P. 0234–0239.
67. Albert A., Rees C. W. Avidity of the Tetracyclines for the Cations of Metals. *Nature*. 1956. Vol. 177, № 4505. P. 433–434.
68. Miyazaki S., Inoue H., Nadai T. Effect of antacids on the dissolution behavior of tetracycline and methacycline. *Chem. Pharm. Bull.* 1979. Vol. 27, № 10. P. 2523–2527.
69. Neuvonen P. J. Interactions with the Absorption of Tetracyclines. *Drugs*. 1976. Vol. 11, № 1. P. 45–54.
70. Comparison of in vitro activity and clinical pharmacology of doxycycline with other tetracyclines / J. E. Rosenblatt et al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1966. № 6. P. 134–141.
71. Interference of iron preparations and milk with the absorption of tetracyclines / M. J. Mattila et al. *Excerpta Medica International Congress Series*. 1972. № 254. P. 128–133. (Toxicological Problems of Drug Combinations).
72. Brion M., Berthon G., Fourtillan J.–B. Metal ion tetracyclines interactions in biological fluids. Potentiometric study of calcium complexes with tetracycline, oxytetracycline, doxycycline and minocycline and simulation of their distributions under physiological conditions. *Inorganica Chimica Acta*. 1981. № 55. P. 47–56.
73. Metal-ion tetracycline interactions in biological fluids. Part 3 / L. Lambs et al. *Agents and Actions*. Vol. 1984. Vol. 14, № 5/6. P. 743–750.

74. Carlotti B., Cesaretti A., Elisei F. Complexes of tetracyclines with divalent metal cations investigated by stationary and femtosecond-pulsed techniques. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2012. Vol. 14, № 2. P. 823–834.

75. Ghandour M. A., Azab H. A., Hassan A., Ali A. M. Potentiometric studies on the complexes of tetracycline (TC) and oxytetracycline (OTC) with some metal ions. *Monatshefte Fur Chemie Chemical Monthly.* 1992. Vol. 123, № 1–2. P. 51–58.

76. Metal ion–tetracycline interactions in biological fluids. 10. Structural investigations on copper (II) complexes of tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline, 4–(dedimethylamino) tetracycline, and 6-desoxy-6-demethyltetracycline and discussion of their binding modes / M. Jezowska-Bojczuk et al. *Inorg. Chem.* 1993. Vol. 32, № 4. P. 428–437.

77. Fe(III)–doxycycline complexes with diimine ligands: Syntheses, characterization and biological properties. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering.* 2019. Vol. 38, № 1. P. 29–38.

78. Synthesis, spectral characterization and thermal behaviour of new metal(ii) complexes with schiff base derived from amoxicillin / A. Reiss et al. *Journal of the Chilean Chemical Society.* 2015. Vol. 60, № 3. P. 3074–3079.

79. Organometallic complexes with biological molecules / R. Di Stefano et al. *J. Inorg. Biochem.* 2002. Vol. 89, № 3–4. P. 279–292.

80. Synthesis, thermal and spectroscopic behaviors of metal-drug complexes: La (III), Ce (III), Sm (III) and Y (III) amoxicillin / S. Refat Moamen et al. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biochemical Spectroscopy.* 2014. Vol. 128. P. 427–446.

81. Coordination and redox interactions of β -lactam antibiotics with Cu^{2+} in physiological settings and the impact on antibacterial activity / B. Božić et al. *Free Radic. Biol. Med.* 2018. № 129. P. 279–285.

82. Zayed M. A., Abdallah S. M. Synthesis and structure investigation of the antibiotic amoxicillin complexes of d–block elements. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2005. Vol. 61, № 9. P. 2231–2238.

83. Eze F. I., Ajali U., Ukoha P. O. Synthesis, Physicochemical Properties, and Antimicrobial Studies of Iron (III) Complexes of Ciprofloxacin, Cloxacillin, and Amoxicillin. *International Journal of Medicinal Chemistry*. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/735602> (Date of access: 2.09.2021).

84. Synthesis, Characterization and in vitro Screening of Amoxicillin and its Complexes with Ag (I), Cu (II), Co (II), Zn (II) and Ni (II) / Imran Muhammad et al. *Journal of Biological Sciences*. 2006. № 6. P. 946–949.

85. Robertson S., Penzak S. R., Huang S. M. Chapter 15 – Drug Interactions. *Principles of Clinical Pharmacology*. 3rd ed. Cambridge : Academic Press, 2012. P. 239–257.

86. Job P. Formation and Stability of Inorganic Complexes in Solution. *Annales de Chimie*. 1928. № 9. P. 113–203.

87. Stability of Metal Complexes, Stability and Applications of Coordination Compounds, Abhay Nanda SrivastvaSenthilkumar Muthaiah / Anita Bhatia and Muthukumar Kannan. *IntechOpen* URL: <https://www.intechopen.com/chapters/71326> (Date of access: . 2.09.2021).

88. Spectrophotometric study of stability constants of cimetidine–Ni(II) complex at different temperatures / Syed Ahmad Tirmizi et al. *Arabian Journal of Chemistry*. 2012. Vol. 5, Iss. 3. P. 309–314.

89. In vitro Spectroscopic studies on drug interaction of cefpodoxime proxetil and H₂ receptor blockers / S. Iqbal et al. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2019. Vol. 32, № 2. P. 881–887.

90. Khammas Z. A. A., Rashid R. A. Visible spectrophotometric analysis for the mutual determination of doxycycline hydrochloride and iron in real samples after cloud point extraction. *International Journal of Chemical Science*. 2016. Vol. 14, № 2. P. 955–977.

91. In vitro study on the interaction of ketotifen fumarate with anhydrous theophylline / Mohammed Aktar Sayeed et al. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012. Vol. 48, № 2. P. 211–216.

92. Potentiometric, UV and ^1H NMR study on the interaction of Cu^{2+} with ampicillin and amoxicillin in aqueous solution / P. Cardiano et al. *Biophys. Chem.* 2017. № 224. P. 59–66.

93. Potentiometric, UV and ^1H NMR study on the interaction of penicillin derivatives with $\text{Zn}(\text{II})$ in aqueous solution / P. Cardiano et al. *Biophys. Chem.* 2017. № 223. P. 1–10.

94. Foti C., Giuffrè O. Interaction of Ampicillin and Amoxicillin with Mn^{2+} : A Speciation Study in Aqueous Solution. *Molecules*. 2020. Vol. 25, № 14. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25143110> (Date of access: 2.09.2021).

95. Mohamed M. Shoukry. Potentiometric studies of binary and ternary complexes of amoxycillin. *Talanta*. 1992. Vol. 39, Iss. 12. P. 1625–1628.

96. Javed J., Zahir E. Thermodynamic studies of iron chelation with doxycycline in acidic medium. *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2017. Vol. 91, № 6. P. 1045–1050.

97. Bagheri A. Thermodynamic Studies of Metal Complexes of Tetracycline and its Application in Drug Analysis. *Pharm. Chem. J.* 2015. № 48. P. 765–769.

98. Nadia E., El-Gamel A. Metal chelates of ampicillin versus amoxicillin: synthesis, structural investigation, and biological studies. *Journal of Coordination Chemistry*. 2010. Vol. 63, № 3. P. 534–543.

99. Complexation equilibria of ambroxol hydrochloride in solution by potentiometric and conductometric methods / A. Naggar et al. *Eur. J. Chem.* 2018. Vol. 9, № 1. P. 49–56.

100. Фармацевтичний аналіз : навч. посіб. для студентів вищ. фармацевт. навч. закл. III–IV рівнів акредитації / П. О. Безуглий та ін. ; за ред. проф. В. А. Георгіянц. Харків : НФаУ : Золоті сторінки, 2013. 552 с.

101. Спосіб кількісного визначення фамотидину, кальцію карбонату та магнію гідроксиду у суспензії аптечного виробництва : пат. 118408 Україна. № у 201701044 ; заявл. 06.02.2017 ; опубл. 10.08.2017, Бюл. № 15.

102. Лікарські засоби. Дослідження біоеквівалентності : Настанова СТ-Н МОЗУ 42.7.3:2020. URL: <https://www.dec.gov.ua/wp-content/uploads/2020/11/>

nastanova-bioekvivalentnosti-nakaz-06.11.2020-%E2%84%96-2538 (дата звернення: 2.09.2021).

103. Bard A. J., Faulkner L. R. *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. 2nd ed. Hoboken : John Wiley & Sons, 2001. 864 p.

104. Kozheshkurt V. Possibilities of Impedance Spectroscopy for the Study of Bioliquids. *Ultrawideband and Ultrashort Impulse Signals (UWBUSIS)*, 2018 : 9th International Conference. IEEE, 2018. P. 260–263.

105. Electrochemical Investigation of Tetrazolium Violet as a Novel Copper Corrosion Inhibitor in an Acid Environment / Zhihua Tao et al. *ACS Omega*. 2020. № 5. P. 4415–4423.

106. Dielectric properties and conductivity studies of some tetradentate cobalt(II), nickel(II), and copper(II) Schiff base complexes / R. S. Joseyphus et al. *Journal of King Saud University – Science*. 2012. № 24. P. 233–236.

107. Electrochemical studies of expired drug (Formoterol) as oilfield corrosion inhibitor for mild steel in H₂SO₄ media / X Ma et al. *International Journal of Electrochemical Science*. 2020. Vol. 15, № 3. P. 1964–1981.

108. New Electrochemical Methods / C. Batchelor-McAuley et al. *Anal. Chem*. 2012. № 84 (2). P. 669–684.

109. Lasia A. *Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications*. New York : Springer Science+Business Media, 2014. P. 368.

110. Wilson B., Gandhi J., Zhang C. Analysis of Inorganic Nitrogen and Related Anions in High Salinity Water Using Ion Chromatography with Tandem UV and Conductivity Detectors. *Journal of Chromatographic Science*. 2011. Vol. 49. P. 596–602.

111. Determination of inorganic cations and anions by ion-exchange chromatography with evaporative light-scattering detection / F. Mouche`re et al. *Journal of Chromatography A*. 2001. № 914. P. 167–173.

112. Risley D. S., Pack, B. W. Simultaneous Determination of Positive and Negative Counterions Using a Hydrophilic Interaction Chromatography Method. *LCGC Asia Pacific*. 2006. Vol. 9, № 3. P. 32–40.

113. Аналіз сучасних підходів до попередження антимікробної резистентності: роль і місце фізико–хімічних методів досліджень *in vitro* та оцінки біоеквівалентності / А. О. Доброва т ін. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*. 2019. № 3 (59). С. 16–24.

114. Myhal A., Golovchenko O., Georgiyants V. Research of interaction between metronidazole tablets and metal salts “in vitro”. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*. 2015. Vol. 2, № 2. P. 36–41.

115. Fleming I., Williams D. *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*. New York City : Springer International Publishing, 2019. 432 p.

116. Interactions of tetracycline with Cd (II), Cu (II) and Pb (II) and their cosorption behavior in soils / Y. Zhao et al. *Environ. Pollut.* 2013. Vol. 180, № 206. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.05.043> (Date of access: 2.09.2021).

117. Anacona J. R., Acosta F. Synthesis and antibacterial activity of cephradine metal complexes. *J. Coord. Chem.* 2006. Vol. 59, № 6. DOI: <https://doi.org/10.1080/00958970500393208> (Date of access: 2.09.2021).

118. Importance of metal-ion exchange for the biological activity of coordination complexes of the biomimetic ligand N4Py / A. Geersing et al. *Inorg. Chem.* 2018. Vol. 57, № 13. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b00714> (Date of access: 2.09.2021).

119. Dobrova A. O., Golovchenko O. S., Georgiyants V. A. Amoxycillin and metal salts interaction study by UV–spectrophotometry methods. *Topical issues of new medicines development* : матеріали XXVI Міжнар. наук.–практ. конф. молодих учених та студентів, м. Харків, 10–12 квіт. 2019 р. Харків : НФаУ, 2019. С. 66.

120. Dobrova A., Georgiyants V. Experimental study of rational drug use. *34th Congress and international scientific-practical conference of the Lithuanian pharmaceutical association* : Book of abstracts. Vilnius, 2019. P. 12.

121. Method of Continuous Variations: Applications of Job Plots to the Study of Molecular Associations in Organometallic Chemistry / J. S. Renny et al. *Angewandte Chemie International Edition*. 2013. Vol. 52, № 46. P. 11998–12013.

122. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1) : ICH harmonized tripartite guideline Q2(R1). *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*. URL: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf> (Date of access: 2.09.2021).

123. Гризодуб А. И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств. *Аналитическое обеспечение создания, стандартизации и контроля качества лекарственных средств* / под ред. В. П. Георгиевского. Харьков : НТМТ, 2011. Т. 1. С. 934–1063.

124. Гризодуб А. И. Стандартные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств. *Фармаком*. 2006. № 1–2. С. 35–44.

125. Біофармацевтичне дослідження взаємодії доксицикліну з мінеральними водами та напоями «in vitro» / А. О. Доброва та ін. *Клінічна фармація*. 2017. № 3. С. 55–62.

126. Гризодуб А. И. Валидация спектрофотометрических методик количественного анализа лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ. *Фармаком*. 2002. № 3. С. 42–50.

127. Dobrova A., Golovchenko O., Georgiyants V. Verification of dissolution test for doxycycline hyclate in capsules to implement into the pharmacopoeial monograph. «*ScienceRise: Pharmaceutical Science*». 2018. № 1 (11). P. 16–20.

128. Dobrova A., Golovchenko O., Georgiyants V. Study of doxycycline interaction with some mineral waters and drinks. «*ChemCYS 2018*» *Chemistry Conference for Young Scientists* : Book of Abstracts (February 21–23). Blankenberge, 2018. P. 87.

129. Dobrova A., Golovchenko O., Georgiyants V. Applying the comparative kinetics “Dissolution” test for studying possible doxycycline interaction. *The 8th International Conference on Pharmaceutical Sciences and Pharmacy Practice dedicated to the 80th anniversary of the Museum of History of Lithuanian Medicine and Pharmacy* : Book of Abstracts. Kaunas, 2017. P. 59–60.

130. Доброва А. О., Головченко О. С., Георгиянц В. А. Риск взаимодействия антибиотиков с компонентами минеральных вод. *Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике* : сб. материалов VI науч.–практ. конф. с междунар. участием. Алматы, 2017. С. 68–69.

131. Доброва А. О., Георгіянц В. А. Хімічне обґрунтування раціонального прийому препаратів амоксициліну. *Збірник матеріалів Буковинського міжнародного медико–фармацевтичного конгресу студентів і молодих учених, ВІМСО 2018 – БДМУ*. Чернівці, 2018. С. 420.

132. Проведення порівняльних досліджень in vitro для підтвердження еквівалентності лікарських засобів у твердій дозованій формі системної дії : метод. рек. / В. Т. Чумак та ін. Київ, 2007. 30 с.

133. Перспективы изучения взаимодействия амоксициллина и клавулановой кислоты с солями металлов для обеспечения качественной терапевтической помощи / А. О. Доброва и др. *Наука и инновация*. 2017. № 3. С. 39–40.

134. Modeling of dissolution kinetics of antibiotics with mineral waters / A. Yu. Bondareva et al. *Topical issues of new drugs development* : Abstracts of XXV International Scientific And Practical Conference of Young Scientists and Student (Kharkiv, April 18–20, 2018). Kharkiv : NUPh, 2018. P. 86–87.

135. Dobrova A. O., Golovchenko O. S., Georgiyants V. A. Modelling and investigation of amoxicillin chemical interaction with mineral waters containing a significant amount of calcium and magnesium salts. *Pharmacia*. 2021. Vol. 68, № 1. P. 101–107.

136. Three new complexes of platinum (II) with doxycycline, oxytetracycline and chlortetracycline and their antimicrobial activity / W. Guerra et al. *J. Braz. Chem. Soc.* 2006. Vol. 17, № 8. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532006000800021> (Date of access: 2.09.2021).

137. Christy F. A., Shrivastav P. S. Conductometric Studies on Cation–Crown Ether Complexes: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2011. Vol. 41, № 3. P. 236–269.

138. Development of the method for estimating complex formation using the electrochemical impedance spectroscopy on the example of the doxycycline and iron (III) interaction / A. Dobrova et al. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2021. Vol. 1, № 29. P. 31–38.

139. Доброва А. О., Антоненко Є. О., Георгіянц В. А. Перспективи використання імпедансної спектроскопії для дослідження взаємодії лікарських засобів із солями металів. *Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку* : матеріали наук.–практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 20–й річниці заснування Дня фармацевт. працівника України, м. Харків, 19–20 верес. 2019 р. : у 2 т. / редкол.: А. А. Котвіцька та ін. Харків : НФаУ, 2019. Т. 1. С. 361–362.

140. Conductometric, spectrophotometric and in vivo investigation of the interaction of Ca(II) ion with oxytetracycline hydrochloride / E. T. Helmy et al. *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences*. 2015. Vol. 4, № 3. P. 197–203.

141. Gupta A. Stability constant and thermodynamic parameters determination of a semi-synthetic penicillin derivative with various bivalent metal ions (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Sn^{2+} , Hg^{2+} and Pb^{2+}): A potentiometric study. *International Research Journal of Pure & Applied Chemistry*. 2013. Vol. 3, № 4. P. 441–418.

142. Kaur H., Puri J. K., Singla A. Metal ion interactions with drugs: Electrochemical study of complexation of various bivalent metal ions with nimesulide and ibuprofen. *Journal of Molecular Liquids*. 2013. № 182. P. 39–42.

143. Validation of tlc – densitometric method for quality control of amoxicillin in dosage drug products / V. Petkova et al. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014. № 3. P. 995–1008.

144. Indrayanto G., Sa T. K., Widjaja S. Simultaneous determination of amoxicillin trihydrate and clavulanate potassium in pharmaceutical preparations by thin-layer chromatography/densitometry. *J. AOAC Int.* 2000. Vol. 83. P. 1493–1496.

145. Reich E., Schibli A. Stationary Phases for Planar Separations – Plates for Modern TLC. *LC GC*. 2005. № 23. P. 58–69.

146. Доброва А. О., Головченко О. С., Георгіянц В. А. Перспективи методики ультра–високоєфективної рідинної хроматографії для кількісного визначення таблеток амоксициліну клавуланату. *Актуальні питання сучасної медицини і фармації* : зб. тез всеукр. наук.–практ. конф., 18–25 квіт., 30 трав. 2018 р. Запоріжжя, 2018. С. 150.

147. Daksh S., Goyal A., Pandiya C. K. Validation of analytical methods – strategies & significance. *International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences*. 2015. Vol. 4, № 3. P. 1489–1497.

148. Спосіб визначення калію клавуланату та амоксициліну в складі комбінованих лікарських форм : пат. 142575 Україна. № u202000686 ; заявл. 05.02.2020 ; опубл. 10.06.2020, Бюл. № 11.

149. Реалізація методики тонкошарової хроматографії в умовах високо–ефективної тонкошарової хроматографії для аналізу таблеток амоксициліну з клавуланатом / А. О. Доброва та ін. *Сучасні проблеми фармакології, косметології та ароматології* : матеріали наук.–практ. конф., м. Одеса, 4 жовт. 2019 р. Одеса, 2019. С. 71.

150. Analytical Eco–Scale for assessing the greenness of analytical procedures / A. Gałuszka et al. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2012. № 37. P. 61–72.

151. United Nations, Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS). 4th ed. New York ; Geneva : United Nations, 2011. 568 p.

152. Green Chemistry Metrics with Special Reference to Green Analytical Chemistry / M. Tobiszewski et al. *Molecules*. 2015. № 20. P. 10928–10946.

153. Raynie D., Driver J. L. Green assessment of chemical methods. *13th Green Chem. Eng. Conf.* Washigton, 2009.

154. Passing H., Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry. Part I. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1983. Vol. 21, № 11. P. 709–720.

155. Passing H., Bablok W. Comparison of several regression procedures for method comparison studies and determination of sample sizes. Application of linear regression procedures for method comparison studies in Clinical Chemistry. Part II. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1984. № 22. P. 431–445.

156. Bland J. M., Altman D. G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet.* 1986. P. 307–312.

157. Simultaneous determination of amoxicillin and potassium clavulanate in combined medicinal forms: procedure transfer from HPLC to UPLC / A. Dobrova et al. *Ceslov. Farm.* 2020. Vol. 69, № 4. P. 186–193.

158. Верифікація тесту розчинення таблеток амоксициліну та клавуланової кислоти / А. О. Доброва та ін. *Управління якістю в фармації* : матеріали XIV наук.–практ. конф., м. Харків, 22 трав. 2020 р. Харків : НФаУ, 2020. С. 43.

159. Maurya and C. P., Lokhande M. V. Impurity Profile and Validation of Pharmaceutical (API) Bulk Drug. *World Journal of Pharmaceutical Research.* 2017. Vol. 6, № 11. P. 878–887.

160. Churi and S. K., Lokhande M. V. Identification and Impurity Profiling of Process Related Impurities. *DTPEE European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences.* 2017. Vol. 4, № 9. P. 617–623.

161. Optimization of HPLC conditions for analysis of cations and anions in mineral waters for medicines interaction studies / A. O. Dobrova et al. *Управління якістю в фармації* : матеріали XIII наук.–практ. конф., м. Харків, 17 трав. 2019 р. Харків : НФаУ, 2019. С. 47.

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А

Кінетика вивільнення доксицикліну у 0,1 М розчині хлористоводневої кислоти із додаванням порції мінеральних вод та газованого напою «Спрайт»

Час, хв	Середовище розчинення											
	0,1 М НСІ		0,1 М НСІ із додаванням «Боржомі»		0,1 М НСІ із додаванням «Єсентуки № 17»		0,1 М НСІ із додаванням «Трускавецької»		0,1 М НСІ із додаванням «Карпатської джерельної»		0,1 М НСІ із додаванням «Спрайту»	
	Кількіс- ний вміст, %	RSD _{хг} , %	Кількіс- ний вміст, %	RSD _{хг} , %	Кількіс- ний вміст, %	RSD _{хг} , %	Кількіс- ний вміст, %	RSD _{хг} , %	Кількіс- ний вміст, %	RSD _{хг} , %	Кількіс- ний вміст, %	RSD _{хг} , %
0	0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00	0,00
5	33,68	11,82	78,16	15,72	64,44	16,62	98,74	9,13	103,54	5,21	21,60	13,10
10	52,20	8,08	97,58	4,30	89,15	9,23	113,02	6,55	116,02	3,53	37,21	4,75
15	68,30	6,40	106,56	2,59	97,82	7,59	118,91	2,11	120,40	1,95	52,60	3,62
30	99,20	4,06	109,84	2,00	100,58	2,44	123,27	0,72	118,44	1,41	83,15	2,52
45	101,46	2,14	106,06	2,41	99,64	2,63	121,36	1,07	115,91	1,74	99,34	1,98

ДОДАТОК Б

Результати вивільнення амоксициліну з таблеток у 0,1 М розчині хлористоводневої кислоти із додаванням порції мінеральних вод

Час, хв.	Середовище розчинення															
	0,1 М НСІ		0,1 М НСІ з додаванням «Боржомі»		0,1 М з додаванням «Єсентуки № 17»		0,1 М НСІ з додаванням «Трускавецької»		0,1 М НСІ з додаванням «Карпатської джерельної»		0,1 М НСІ з додаванням «Харківської-1»		0,1 М НСІ з додаванням «Харківської-2»		0,1 М НСІ з додаванням водопровідної води	
	Кількіс- ний вміст, %	RSD _{хг} , %	Кількіс- ний вміст, %	RSD _{хг} , %	Кількіс- ний вміст, %	RSD _{хг} , %	Кількіс- ний вміст, %	RSD _{хг} , %	Кількіс- ний вміст, %	RSD _{хг} , %	Кількіс- ний вміст, %	RSD _{хг} , %	Кількіс- ний вміст, %	RSD _{хг} , %	Кількіс- ний вміст, %	RSD _{хг} , %
0	0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00	
5	68,45	11,40	66,11	7,30	62,15	8,37	66,70	6,56	56,18	7,90	63,05	8,47	58,65	5,59	61,33	7,04
10	98,90	2,87	82,42	0,80	81,41	1,22	88,69	1,78	77,97	1,14	79,77	1,64	77,14	1,65	78,44	1,23
15	100,91	0,96	82,66	0,80	81,18	1,06	87,33	1,49	79,63	1,19	81,68	1,31	79,03	1,56	78,32	0,61
30	101,63	0,25	83,05	0,78	80,74	1,11	89,11	1,31	79,68	1,41	80,79	1,33	77,63	1,05	80,05	1,23
45	101,68	1,31	83,34	0,27	79,37	0,82	96,77	1,13	80,46	1,33	80,88	0,77	80,21	0,82	81,31	2,76

Додаток В

Параметри електрохімічного імпедансу розчинів доксицикліну хіклату та FeCl у різних співвідношеннях молярних концентрацій [Dox]:[Fe³⁺]

[Dox]:[Fe ³⁺]	R _Ω , Ом	Q1, 10 ⁻¹² Ф·с ^(a₁-1)	a ₁	C _d , 10 ⁻¹² Ф	R _{ct} , 10 ³ Ом	σ ₂ , Ом·с ^{-1/2}	Q2, 10 ⁻⁹ Ф·с ^(a₂-1)	a ₂	C ₃ , 10 ⁻⁹ Ф	R ₃ , Ом	σ ₃ , Ом·с ^{-1/2}
1:6	39,33	5,698	1	5,698	0,486	45925	1301,0	0,680	6,542	10,7	60563
1:5	35,11	5,158	1	5,158	0,550	49898	1061,0	0,689	6,317	19,7	68920
1:4	36,8	5,382	1	5,382	0,659	57248	987,7	0,684	5,66	22,4	74358
1:3	35,2	5,235	1	5,235	0,809	57760	504,6	0,732	6,87	29,5	85653
1:2	33,41	5,074	1	5,074	1,064	58678	169,4	0,807	8,654	78,4	112917
1:1	31,36	4,912	1	4,912	1,606	75640	75,16	0,845	8,182	450,4	5524
2:1	32,79	5,016	1	5,016	1,196	61743	71,64	0,863	13,45	378,1	13,94
3:1	33,28	5,079	1	5,079	1,081	61545	94,75	0,844	10,23	350,9	18,89
4:1	33,91	5,131	1	5,131	0,977	55162	98,67	0,839	11,44	329,0	21,84
5:1	34,65	5,170	1	5,170	0,882	53196	141,6	0,826	12,00	292,3	38,33
6:1	34,9	5,196	1	5,196	0,854	50668	161,5	0,821	12,65	274,7	108,9

Додаток Г

Параметри електрохімічного імпедансу розчинів доксицикліну хіклату із Mg^{2+} у різних співвідношеннях молярних концентрацій $[\text{Dox}]:[\text{Mg}^{2+}]$

$[\text{Dox}]:[\text{Mg}^{2+}]$	R_{Ω} , Ом	L_1 , 10^{-9} Гн	Q_1 , 10^{-12} $\Phi \cdot \text{с}^{(a_1-1)}$	a_1	C_d , $10^{-12}\Phi$	R_{ct} , 10^3 Ом	C_2 , Φ	L_2 , Гн
1:8	7,87	25,53	10,150	1	10,15	0,967	$11,27 \cdot 10^{-12}$	$66,39 \cdot 10^{-9}$
1:7	8,16	23,13	10,090	1	10,09	1,073	$0,80 \cdot 10^{-6}$	$16,33 \cdot 10^{-9}$
1:6	8,55	23,12	10,010	1	10,01	1,196	$0,58 \cdot 10^{-6}$	$4,57 \cdot 10^{-6}$
1:5	8,87	24,18	9,889	1	9,889	1,339	$1,45 \cdot 10^{-6}$	$1,78 \cdot 10^{-6}$
1:4	9,16	24,53	9,854	1	9,854	1,452	$3,07 \cdot 10^{-6}$	$34,30 \cdot 10^{-9}$
1:3	9,66	25,12	9,738	1	9,738	1,842	$8,83 \cdot 10^{-12}$	$17,53 \cdot 10^{-9}$
1:2	11,26	26,87	9,266	1	9,266	2,298	$0,31 \cdot 10^{-12}$	$11,72 \cdot 10^{-9}$
1:1	10,50	28,15	9,186	1	9,187	3,415	$22,22 \cdot 10^{-12}$	$7,09 \cdot 10^{-9}$
2:1	17,00	16,71	3,945	1	3,945	2,169	$1,49 \cdot 10^{-6}$	$5,95 \cdot 10^{-9}$
3:1	17,10	16,79	3,945	1	3,945	1,760	$4,96 \cdot 10^{-6}$	$6,43 \cdot 10^{-9}$
4:1	16,76	16,86	3,941	1	3,941	1,540	$0,45 \cdot 10^{-9}$	$10,485 \cdot 10^{-9}$
5:1	16,62	16,82	3,952	1	3,952	1,315	$2,81 \cdot 10^{-9}$	$9,02 \cdot 10^{-9}$
6:1	16,51	16,85	3,953	1	3,953	1,192	$0,60 \cdot 10^{-9}$	$1,72 \cdot 10^{-9}$

Додаток Д

Параметри електрохімічного імпедансу розчинів доксицикліну хіклату та Ca^{2+} у різних співвідношеннях молярних концентрацій $[\text{Dox}]:[\text{Ca}^{2+}]$

$[\text{Dox}]:[\text{Ca}^{2+}]$	R_{Ω} , Ом	Q_1 , 10^{-12} $\Phi \cdot \text{c}^{(a_1-1)}$	a_1	C_d , $10^{-12}\Phi$	R_{ct} , 10^3Ом	C_2 , Φ	L_2 , 10^{-6} Гн
1:8	19,77	6,634	1	6,634	1,307	$48,84 \cdot 10^{-6}$	$10,73 \cdot 10^{-9}$
1:7	19,20	6,605	1	6,605	1,483	$22,31 \cdot 10^{-6}$	$9,259 \cdot 10^{-9}$
1:6	18,82	6,566	1	6,566	1,647	$1,06 \cdot 10^{-6}$	$7,503 \cdot 10^{-9}$
1:4	17,97	6,484	1	6,484	2,208	$48,79 \cdot 10^{-9}$	$62,24 \cdot 10^{-6}$
1:3	17,65	6,394	1	6,394	2,675	$1,21 \cdot 10^{-9}$	$2,009 \cdot 10^{-6}$
1:2	17,15	6,357	1	6,357	3,340	$70,17 \cdot 10^{-12}$	$29,54 \cdot 10^{-9}$
1:1	16,78	6,258	1	6,258	4,501	$87,03 \cdot 10^{-12}$	$1,823 \cdot 10^{-9}$
2:1	19,39	5,605	1	5,605	3,787	$38,79 \cdot 10^{-9}$	$1,996 \cdot 10^{-9}$
3:1	19,57	5,659	1	5,659	3,098	$0,546 \cdot 10^{-9}$	$3,894 \cdot 10^{-9}$
4:1	19,65	5,916	1	5,916	2,597	$6,025 \cdot 10^{-12}$	$30,66 \cdot 10^{-9}$
5:1	19,94	5,976	1	5,976	2,146	$8,443 \cdot 10^{-12}$	$59,01 \cdot 10^{-9}$
6:1	20,19	6,067	1	6,067	1,754	$14,51 \cdot 10^{-6}$	$174,9 \cdot 10^{-9}$

Додаток Е

Параметри електрохімічного імпедансу розчинів доксицикліну хіклату та Al^{3+} у різних співвідношеннях молярних концентрацій $[Dox]:[Al^{3+}]$

$[Dox]:[Al^{3+}]$	R_{Ω} , Ом	Q_1 , $10^{-12} \Phi \cdot c^{(a_1-1)}$	a_1	C_d , $10^{-12} \Phi$	R_{ct} , 10^3Ом	C_s , $10^{-9} \Phi$	R_2 , Ом	C_2 , $10^{-9} \Phi$	L_2 , $10^{-6} \Gamma_H$
1:8	37,39	6,327	1	6,327	0,431	93,93	135,1	0,007	6,147
1:7	36,42	6,148	1	6,148	0,481	89,52	68,48	0,045	59,52
1:6	35,34	5,980	1	5,980	0,546	84,22	3811	0,002	23,84
1:5	34,1	5,789	1	5,789	0,642	74,69	558,6	0,002	6,893
1:4	33,15	5,667	1	5,667	0,728	68,32	2978	19,59	678,1
1:3	31,99	5,501	1	5,501	0,870	64,35	419,8	18390	12,94
1:2	21,45	6,254	1	6,254	1,111	63,39	3397	2,056	4,274
1:1	20,16	6,164	1	6,164	1,420	75,57	1926	7,312	89,57
2:1	21,49	6,258	1	6,258	1,072	106,7	332	0,100	$48,81 \cdot 10^{-6}$
3:1	22,01	6,301	1	6,301	0,973	112,4	185,1	0,038	$80,49 \cdot 10^{-6}$
4:1	23,09	6,407	1	6,407	0,815	139,1	224,2	0,005	$22,97 \cdot 10^{-6}$
5:1	24,25	6,425	1	6,425	0,730	146,7	82,19	0,009	$14,60 \cdot 10^{-6}$

Додаток Ж

Параметри електрохімічного імпедансу розчинів амоксициліну та Fe^{3+} у різних співвідношеннях молярних концентрацій $[\text{Амох}]:[\text{Fe}^{3+}]$

$[\text{Амох}]:[\text{Fe}^{3+}]$	$L_1, 10^{-9} \text{ Гн}$	$R_\Omega, \text{ Ом}$	$Q_1, 10^{-12} \text{ Ф} \cdot \text{с}^{(a_1-1)}$	a_1	$C_d, 10^{-12} \text{ Ф}$	$R_{ct}, 10^3 \text{ Ом}$	$C_2, \text{ Ф}$	$L_2, 10^{-9} \text{ Гн}$
1:6	18,06	19,16	3,994	1	3,994	0,435	$57,21 \cdot 10^{-9}$	1,226
1:5	17,83	19,21	3,982	1	3,982	0,490	$0,101 \cdot 10^{-9}$	0,694
1:4	17,56	18,96	3,969	1	3,969	0,586	$0,166 \cdot 10^{-9}$	0,422
1:3	17,41	18,84	3,947	1	3,947	0,714	$0,127 \cdot 10^{-9}$	0,553
1:2	17,15	18,37	3,941	1	3,941	0,952	$32,54 \cdot 10^{-12}$	2,159
1:1	16,48	17,56	3,917	1	3,917	1,707	$8,801 \cdot 10^{-12}$	7,975
2:1	16,69	16,30	3,936	1	3,936	1,813	$0,184 \cdot 10^{-9}$	7,727
3:1	16,62	15,92	3,937	1	3,937	1,991	$4,576 \cdot 10^{-6}$	0,213
4:1	16,61	16,05	3,943	1	3,943	2,117	$2,882 \cdot 10^{-9}$	2,41
5:1	16,55	16,20	3,946	1	3,946	2,164	$1,029 \cdot 10^{-9}$	2,057
6:1	16,5	16,25	3,958	1	3,958	2,463	$0,29 \cdot 10^{-6}$	1,054

Додаток И

Параметри електрохімічного імпедансу розчинів амоксициліну та Al^{3+} у різних співвідношеннях молярних концентрацій $[\text{Амох}]:[\text{Al}^{3+}]$

$[\text{Амох}]:[\text{Al}^{3+}]$	$L_1, 10^{-9} \text{ Гн}$	$R_\Omega, \text{ Ом}$	$Q_1, 10^{-12} \text{ Ф} \cdot \text{с}^{(a_1-1)}$	a_1	$C_d, 10^{-12} \text{ Ф}$	$R_{ct}, 10^3 \text{ Ом}$	$C_2, \text{ Ф}$	$L_2, 10^{-9} \text{ Гн}$
1:6	19,1	23,21	4,258	1	4,258	0,764	$0,054 \cdot 10^{-9}$	1,874
1:5	19,1	23,47	4,220	1	4,220	0,888	$69,46 \cdot 10^{-9}$	0,051
1:4	19,11	23,87	4,184	1	4,184	1,105	$7,014 \cdot 10^{-6}$	1,124
1:3	19,13	24,15	4,138	1	4,138	1,382	$0,779 \cdot 10^{-9}$	17,64
1:2	16,42	16,31	4,007	1	4,007	1,509	$0,070 \cdot 10^{-9}$	1,475
1:1	16,54	16,31	3,975	1	3,975	2,536	$0,189 \cdot 10^{-9}$	0,842
2:1	16,37	16,55	3,983	1	3,983	2,572	$4,326 \cdot 10^{-12}$	1,349
3:1	16,42	16,42	3,986	1	3,986	2,548	$77,77 \cdot 10^{-9}$	6,344
4:1	16,41	16,54	3,988	1	3,988	2,588	$99,58 \cdot 10^{-12}$	6,032
5:1	17,53	17,20	4,315	1	4,315	2,644	$3,590 \cdot 10^{-9}$	15,41
6:1	16,39	16,78	3,992	1	3,992	2,696	$0,116 \cdot 10^{-9}$	12,25

Додаток К

**Параметри електрохімічного імпедансу розчинів амоксициліну та Mg^{2+}
у різних співвідношеннях молярних концентрацій $[Amox]:[Mg^{2+}]$**

$[Amox]:[Mg^{2+}]$	$L_1, 10^{-9} \Gamma H$	R_Ω, Om	$Q_1, 10^{-12} \Phi \cdot c^{(a_1-1)}$	a_1	$C_d, 10^{-12} \Phi$	$R_{ct}, 10^3 \text{Om}$	$C_2, 10^{-9} \Phi$
1:6	18,32	37,11	4,083	1	4,083	1,288	35,12
1:5	18,11	37,30	4,065	1	4,065	1,482	33,25
1:4	17,99	37,31	4,045	1	4,045	1,770	28,24
1:3	16,72	37,31	4,060	1	4,060	2,206	30,79
1:2	17,73	37,64	3,989	1	3,989	3,016	17,83
1:1	17,58	37,78	3,980	1	3,980	4,730	12,38
2:1	16,39	16,46	3,946	1	3,946	4,260	51,57
3:1	16,45	16,21	3,963	1	3,963	4,020	50,16
4:1	16,45	16,13	3,951	1	3,951	3,847	35,99
5:1	16,37	16,17	3,990	1	3,990	3,176	62,00
6:1	16,64	17,55	3,946	1	3,946	2,603	22,25

Додаток Л

**Параметри електрохімічного імпедансу розчинів амоксициліну та Ca^{2+}
у різних співвідношеннях молярних концентрацій $[\text{Амох}]:[\text{Ca}^{2+}]$**

$[\text{Амох}]:[\text{Ca}^{2+}]$	$L_1, 10^{-9} \text{ Гн}$	$R_\Omega, \text{ Ом}$	$Q_1, 10^{-12} \text{ Ф} \cdot \text{с}^{(a_1-1)}$	a_1	$C_d, 10^{-12} \text{ Ф}$	$R_{ct}, 10^3 \text{ Ом}$	$C_2, 10^{-9} \text{ Ф}$
1:6	17,03	15,01	4,026	1	4,026	1,687	17,27
1:5	16,98	14,98	4,029	1	4,029	1,930	16,02
1:4	16,90	15,11	4,024	1	4,024	2,820	11,65
1:3	16,91	15,17	4,024	1	4,024	3,404	10,21
1:2	16,88	15,26	4,020	1	4,020	4,989	7,13
1:1	16,86	15,24	4,027	1	4,027	7,491	4,55
2:1	16,45	16,15	3,947	1	3,947	5,500	49,61
3:1	16,45	16,19	3,958	1	3,958	5,425	47,88
4:1	16,41	16,28	3,966	1	3,966	5,356	56,96
5:1	16,41	16,35	3,970	1	3,970	5,280	30,51
6:1	16,4	16,25	3,984	1	3,984	5,052	51,37

Додаток М

Розрахунок параметрів правильності ВЕРХ-методу для тесту «Розчинення»

амоксициліну тригідрату та калію клавуланату

Введено у % до концентрації розчину порівняння $(C_i/C_{st})*100\%$	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння $(S_i/S_{st})*100\%$, калію клавуланат	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння $(S_i/S_{st})*100\%$, амоксициліну тригідрат	Знайдено у % до введеного $Z_i = (S_i/S_{st})*100/(C_i/C_{st})$, калію клавуланат	Знайдено у % до введеного $Z_i = (S_i/S_{st})*100/(C_i/C_{st})$ амоксициліну тригідрат
55	55,19	55,51	100,34	100,92
65	65,17	65,03	100,27	100,04
75	75,20	75,00	100,26	100,00
85	85,30	85,04	100,36	100,04
95	95,06	95,02	100,07	100,02
105	104,56	104,63	99,58	99,65
115	115,30	115,10	100,26	100,09
125	124,92	125,10	99,93	100,08
135	134,91	135,07	99,94	100,06
$Z_{сер}$			100,11	100,10
Відносне стандартне відхилення, $s_z\%$			0,26	0,34
Відносний довірчий інтервал $\Delta Z = t(95\%, 8) * s_z = 1,8595 * s_z =$			0,48	0,63
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta as\% \leq$			3	3
Систематична похибка $\delta \% = Z_{сер} - 100 $			0,11	0,10
Критерій статистичної незначущості $\Delta Z/3 =$			0,48/3 = 0,16 (0,11 ≤ 0,16)	0,63/3 = 0,21 (0,10 ≤ 0,21)
Якщо не виконується, то критерій практичної незначущості, $\delta \% \leq 0,768$			(0,11 ≤ 0,96)	(0,10 ≤ 0,96)

Додаток Н

Розрахунок параметрів правильності УЕРХ-методу для кількісного визначення амоксициліну тригідрату та калію клавуланату

Введено у % до концентрації розчину порівняння $(C_i/C_{st}) \cdot 100\%$	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння $(S_i/S_{st}) \cdot 100\%$, калію клавуланат	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння $(S_i/S_{st}) \cdot 100\%$, амоксициліну тригідрат	Знайдено у % до введеного $Z_i = (S_i/S_{st}) \cdot 100 / (C_i/C_{st})$, калію клавуланат	Знайдено у % до введеного $Z_i = (S_i/S_{st}) \cdot 100 / (C_i/C_{st})$ амоксициліну тригідрат
80	80,06	79,99	100,07	99,99
85	85,15	85,12	100,18	100,15
90	89,74	89,94	99,71	99,93
95	95,05	95,10	100,05	100,11
100	100,13	99,87	100,13	99,87
105	105,15	104,63	100,14	99,64
110	109,92	110,09	99,93	100,08
115	114,87	115,02	99,88	100,02
120	119,86	119,96	99,88	99,97
$Z_{сер}$			100,07	99,97
Відносне стандартне відхилення, $s_z\%$			0,16	0,15
Відносний довірчий інтервал $\Delta Z = t(95\%, 8) \cdot s_z = 1,8595 \cdot s_z =$			0,29	0,28
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta as\% \leq$			2,4	2,4
Систематична похибка $\delta \% = Z_{сер} - 100 $			0,07	0,03
Критерій статистичної незначущості $\Delta Z/3 =$			0,29/3 = 0,10 (0,07 ≤ 0,10)	0,28/3 = 0,09 (0,03 ≤ 0,09)
Якщо не виконується, то критерій практичної незначущості, $\delta \% \leq 0,768$			(0,07 ≤ 0,768)	(0,03 ≤ 0,768)

Додаток П

Розрахунок параметрів правильності ВЕРХ-методу для кількісного визначення амоксициліну тригідрату та калію клавуланату

Введено у % до концентрації розчину порівняння $(C_i/C_{st}) \cdot 100\%$	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння $(S_i/S_{st}) \cdot 100\%$, калію клавуланат	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння $(S_i/S_{st}) \cdot 100\%$, амоксициліну тригідрат	Знайдено у % до введеного $Z_i = (S_i/S_{st}) \cdot 100 / (C_i/C_{st})$, калію клавуланат	Знайдено у % до введеного $Z_i =$ $(S_i/S_{st}) \cdot 100 / (C_i/C_{st})$ амоксициліну тригідрат
80	79,73	79,71	99,67	99,64
85	85,15	84,97	100,17	99,96
90	89,75	89,82	99,72	99,80
95	95,12	94,88	100,13	99,87
100	100,06	99,97	100,06	99,97
105	105,09	105,08	100,09	100,08
110	110,03	110,21	100,03	100,19
115	114,95	114,81	99,96	99,83
120	119,87	120,11	99,89	100,09
$Z_{сер}$			99,97	99,94
Відносне стандартне відхилення, $s_z\%$			0,18	0,17
Відносний довірчий інтервал $\Delta Z = t(95\%, 8) \cdot s_z = 1,8595 \cdot s_z =$			0,33	0,32
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta as\% \leq$			2,4	2,4
Систематична похибка $\delta\% = Z_{сер} - 100 $			0,03	0,06
Критерій статистичної незначущості $\Delta Z/3 =$			0,33/3 = 0,11 (0,03 ≤ 0,11)	0,32/3 = 0,11 (0,06 ≤ 0,11)
Якщо не виконується, то критерій практичної незначущості, $\delta\% \leq 0,768$			(0,03 ≤ 0,768)	(0,06 ≤ 0,768)

Додаток Р



«Затверджую»

Проректор з наукової роботи

Львівського національного медичного
університету імені Данила Галицького
д. мед. н., проф. Наконечний А.Й.

24 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** результати досліджень з розробки фізико-хімічних методів вивчення взаємодії лікарських засобів
 2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, кафедра фармацевтичної хімії, асп. Доброва А.О., д.фарм.н., професор Георгіянц В.А.
 3. **Джерела інформації:** Dobrova, A., Antonenko, Y., Golovchenko, O., Harna, N., Harna, S. & Georgiyants, V. (2021). Development of the method for estimating complex formation using the electrochemical impedance spectroscopy on the example of the doxycycline and iron (III) interaction. ScienceRise: Pharmaceutical Science, (1 (29), 31–38. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2021.225689>
 4. **Де впроваджено:** Кафедра фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії ЛНМУ імені Данила Галицького.
 5. **Форма впровадження:** навчальний процес (лекційний курс) та наукові дослідження кафедри фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії.
 6. **Ефективність впровадження:** поглиблення знань студентів та науковців з питань методів дослідження хімічної взаємодії лікарських засобів
- Термін впровадження:** 2021-2022 навчальний рік.

Завідувач кафедри фармацевтичної, органічної і
біоорганічної хімії Львівського національного
медичного університету імені Данила Галицького,
д. фарм. н., професор



Лесик Р.Б.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозицій для впровадження: УЕРХ методика одночасного визначення амоксициліну та клавуланової кислоти у комбінованих таблетках
2. Установа, автор: Національний фармацевтичний університет, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, кафедра фармацевтичної хімії, Доброва А.О., д.фарм.н., професор Георгіянци В.А.
3. Джерела інформації:
 - 3.1 Dobrova, A. Simultaneous determination of amoxicillin and potassium clavulanate in combined medicinal forms: procedure transfer from HPLC to UPLC / A. Dobrova, O. Golovchenko, I. Bezruk, L. Ivanauskas, V. Georgiyants // Ces.slov.Farm. 69 (4), 2020. 186 - 193.
 - 3.2 Доброва А. О. Безрук І. В., Георгіянци В. А., Іванаускас Л., Головченко О. С. Спосіб визначення калію клавуланату та амоксициліну в складі комбінованих лікарських форм: пат на корисну модель № 142575 Україна № u202000686; заявл 05.02.2020; опубл. 10.06.2020, Бюл. № 11.
4. Де впроваджено: Кафедра фармацевтичної хімії Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського
5. Форма впровадження: В навчальний процес та наукові дослідження кафедри фармацевтичної хімії ТНМУ ім. І.Я. Горбачевського
6. Ефективність впровадження: Результати наукових досліджень використовуються для поглиблення знань студентів з питань сучасних методів аналізу комбінованих таблеток амоксициліну та клавуланової кислоти
7. Термін впровадження: 2021-2022 навчальний рік.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри фармацевтичної хімії
 Тернопільського національного медичного
 університету ім. І.Я. Горбачевського
 д.фарм.н., професор

Л.С. Логойда

ЗАТВЕРДЖУЮ
Проректор з наукової роботи
Запорізького державного медичного
університету, проф. В. О. Туманський

«26» 01 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** результати досліджень взаємодії доксицикліну та амоксициліну з солями металів, що входять до складу інших лікарських засобів, харчових продуктів та напоїв за допомогою фізико-хімічних та фармако-технологічних випробувань
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, кафедра фармацевтичної хімії, асп. Доброва А.О., д.ф.н., професор Георгіянець В.А.
3. **Джерела інформації:**
Dobrova, A. Simultaneous determination of amoxicillin and potassium clavulanate in combined medicinal forms: procedure transfer from HPLC to UPLC / A. Dobrova, O. Golovchenko, I. Bezruk, L. Ivanauskas, V. Georgiyants // Ces.slov.Farm. 69 (4), 2020. 186-193.
3. **Де впроваджено:** Кафедра фармацевтичної хімії Запорізького державного медичного університету
4. **Термін впровадження:** вересень 2020 – квітень 2021.
5. **Форма впровадження:** В навчальний процес та наукові дослідження кафедри фармацевтичної хімії ЗДМУ
6. **Ефективність впровадження:** Результати наукових досліджень використовуються студентами та аспірантами для поглиблення знань з питань взаємодії лікарських засобів та їх раціонального прийому

Завідувач кафедри фармацевтичної хімії
Запорізького державного медичного університету
д.фарм.н., професор

Л.І. Кучеренко

«Затверджую»
 Проректор
 з науково-педагогічної (навчальної) роботи
 Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова
 проф. Ю.І. Гумінський
 «20» 02 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Пропозиція для впровадження: результати дослідження хімічної взаємодії та експериментальне обґрунтування раціонального прийому лікарських засобів з мінеральними водами.

Установа-розробник: Національний фармацевтичний університет, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, кафедра фармацевтичної хімії.

Розроблювач: асп. Доброва А.О., д.ф.н., професор Георгіянц В.А.

Джерела інформації:

Dobrova AO, Golovchenko OS, Georgiyants VA (2021) Modelling and investigation of amoxicillin chemical interaction with mineral waters containing a significant amount of calcium and magnesium salts. Pharmacia 68(1): 101-107. <https://doi.org/10.3897/pharmacia.68.e39573>

Доброва, А.О. Біофармацевтичне дослідження взаємодії доксицикліну з мінеральними водами та напоями «in vitro» / А. О. Доброва, А. С. Матерієнко, О. С. Головченко, В. А. Георгіянц // Клінічна фармація. - 2017. - № 3. - С. 55-62.

Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра фармацевтичної хімії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.

Форма впровадження: навчальний процес (лекційний курс) та наукові дослідження кафедри фармацевтичної хімії ВНМУ ім. М.І. Пирогова

Ефективність впровадження: поглиблення знань студентів та науковців з питань методів дослідження хімічної взаємодії лікарських засобів.

Термін впровадження: 2021-2022 навчальний рік.

Затверджено на засіданні кафедри фармацевтичної хімії (протокол № 8 від 25.03. 2021 р.).

Завідувач
 кафедри фармацевтичної хімії
 Вінницького національного
 медичного університету імені М.І. Пирогова
 канд. хім. наук, доцент

 Т.І. Ющенко



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Ректор

КЗВО «Рівненська медична академія»

Ростислав САБАДИШИН

» 03 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: результати досліджень взаємодії доксицикліну та амоксициліну з мінеральними водами та напоями «in vitro» за допомогою УФ-спектрофотометрії та тесту розчинення.

2. Ким запропоновано, адреса виконавця: Національний фармацевтичний університет, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53

3. Укладачі (автори): Доброва А.О., Георгіянц В.А., Головченко О.С.

4. Джерела інформації:

1. Доброва, А.О. Біофармацевтичне дослідження взаємодії доксицикліну з мінеральними водами та напоями «in vitro» / А. О. Доброва, А. С. Матерієнко, О. С. Головченко, В. А. Георгіянц // Клінічна фармація. - 2017. - № 3. - С. 55-62.

2. Dobrova, A. Verification of dissolution test for doxycycline hyclate in capsules to implement into the pharmacopoeial monograph / A. Dobrova, O. Golovchenko, V. Georgiyants // «ScienceRise: Pharmaceutical Science». – 2018. – № 1 (11). – P. 16–20.

3. Dobrova AO, Golovchenko OS, Georgiyants VA (2021) Modelling and investigation of amoxicillin chemical interaction with mineral waters containing a significant amount of calcium and magnesium salts. Pharmacia 68(1): 101-107.

5. Ким і коли впроваджено: кафедра хіміко-фармацевтичних дисциплін КЗВО «Рівненська медична академія», 2020 р.

6. Ефективність впровадження: запропоновані положення були впроваджені в навчальний процес кафедри хіміко-фармацевтичних дисциплін КЗВО «Рівненська медична академія».

7. Зауваження та пропозиції: зауважень немає.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри хіміко-фармацевтичних дисциплін,
кандидат фармацевтичних наук

Оксана ШТРИМАЙТИС

« 15 » 03 2021 р.