



DOI <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2023.2.14046>

УДК 543.422.3:[615.453.6:615.252.349.7].074

## СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ МЕТФОРМІНУ ГІДРОХЛОРИДУ В ТАБЛЕТКАХ ЗА РЕАКЦІЄЮ З БРОМКРЕЗОЛОВИМ ЗЕЛЕНИМ

Л. Г. Лелека, С. О. Васюк

Запорізький державний медико-фармацевтичний університет  
[demyanova0610@gmail.com](mailto:demyanova0610@gmail.com)

### ІНФОРМАЦІЯ

Надійшла до редакції / Received:  
22.02.2023

Після доопрацювання / Revised:  
31.03.2023

Прийнято до друку / Accepted:  
07.04.2023

#### Ключові слова:

метформіну гідрохлорид;  
спектрофотометрія;  
сульфоталеїнові барвники;  
валідація;  
кількісне визначення;  
Державна Фармакопея України.

### АНОТАЦІЯ

**Мета роботи.** Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення метформіну гідрохлориду в таблетках за реакцією з сульфоталеїновими барвниками.

**Матеріали і методи.** Для аналізу були використані:

- субстанція метформіну гідрохлориду фармакопейної чистоти;
- таблетки – «Метформін Астрафарм» 500 мг, «Метформін Тева» 1000 мг, «Метформін Сандоз» 850 мг, «Метформін Глюкофаж» 500 мг;
- реагенти – сульфоталеїнові барвники: бромкрезоловий зелений (Synex Pharma, Китай), бромкрезоловий пурпуровий (Шосткинський завод хімічних реактивів, Україна), бромтимоловий синій (Synex Pharma, Китай), тимоловий синій (Шосткинський завод хімічних реактивів, Україна). Всі реагенти кваліфікації «чда»;
- розчинник – ацетон кваліфікації «чда» та вода очищена;
- аналітичне обладнання – спектрофотометр «Specord-200» (Analytic Jena AG, Німеччина), ваги лабораторні електронні RADWAG XA 210. 4Y, мірний лабораторний посуд класу А.

**Результати й обговорення.** Розроблено нову, просту спектрофотометричну методику кількісного визначення метформіну гідрохлориду в таблетках за реакцією з бромкрезоловим зеленим (БКЗ) в 1 % водно-ацетоновому середовищі. Максимум поглинання знаходиться при 408 нм. Підпорядкування основному закону світлопоглинання перебуває в межах концентрацій 0,5–1,2 мг/100 мл. Значення межі виявлення складає  $0,433 \times 10^{-6}$  г/мл, що свідчить про високу чутливість реакції. Відповідно до вимог Державної Фармакопеї України (ДФУ) для розробленої методики були визначені деякі валідаційні характеристики, а саме, лінійність, точність, правильність та робастність. Також було проведено перевірку «зеленості» методики за допомогою інструменту AGREE (Analytical GREEnness) та аналітичної екошкали.

**Висновки.** За результатами проведеного дослідження було розроблено та валідовано спектрофотометричну методику кількісного визначення метформіну гідрохлориду. Методика є простою, доступною та відповідає вимогам ДФУ, тому може бути рекомендована для застосування в лабораторіях із контролю якості лікарських засобів.

**Вступ.** Сьогодні діабет 2 типу став не просто хворобою, а й способом життя багатьох людей. З моменту розробки перших методів лікування цукрового діабету 2 типу минуло більше століття. Однак ця хвороба не лише залишається однією з найбільших проблем у світі, але й епідемія набирає обертів. Кількість людей із діагнозом цукровий діабет у світі досягла 347 мільйонів. І за прогнозами до 2030 року діабет стане сьомою причиною смертності у світі (статистика ВООЗ) [1].

Для лікування цукрового діабету 2 типу широко використовують бігуаніди, до яких відносять метформіну гідрохлорид. Його використовують вже понад 60 років, і було доведено, що він безпечний навіть при тривалому застосуванні. Дослідження також показали, що метформіну гідрохлорид запобігає розвитку діабету 2 типу у людей з переддіабетом [2].

Широке використання в сучасній медицині гіпоглікемічних лікарських засобів зумовлює необхідність розробки нових селективних, чутливих та економічних методів кількісного визначення у лікарських формах.

Згідно з Державною фармакопеею України (ДФУ) кількісне визначення метформіну в субстанції проводять методом неводного титрування: наважку розчиняють у мурашиній кислоті, додають ацетонітрил і титрують розчином хлорної кислоти з потенціометричним визначенням точки еквівалентності [3]. Аналогічно визначають субстанцію метформіну гідрохлориду за Британською фармакопеею [4]. За ДФУ визначення метформіну гідрохлориду в таблетках проводять методом абсорбційної спектрофотометрії при 232 нм [3].

У літературі зустрічаються дані щодо кількісного аналізу метформіну переважно такими методами, як хроматографічні, спектрофотометричні та електрохімічні. Найчастіше метформін у таблетках визначають методом ВЕРХ і обернено-фазової ВЕРХ [5]. Доволі часто в методі ВЕРХ використовують УФ-спектрофотометричне детектування [6, 7]. Агтаган О. запропонував спектрофотометричне та ВЕРХ визначення за сумісної присутності метформіну гідрохлориду та розиглітазону малеату в субстанції і таблетках [8]. Автори описали зелені УФ-спектрофотометричні методики одночасного визначення метформіну і ремогліфозину в лікарських препаратах [9]. Описано метод спектрофотометричного визначення метформіну та умов його ізолювання в біологічних об'єктах [10]. Бугайова В. В. запропонувала спектрофотометричний метод визначення метформіну у видимій області спектра за реакцією з бромтимоловим синім [11]. У дослідженні Sabbagh B. A. та співавторів описано визначення метформіну в таблетках із фіксованою комбінацією за допомогою інфрачервоної Фур'є-спектроскопії з ослабленим повним відбиттям (ATR-FTIR) [12]. Castro R. зі співавторами розробили метод визначення

метформіну поєднавши поверхнево-розширену раманівську спектроскопію з хемометрією з використанням наночастинок золота як субстрату [13]. Rashbari S. зі співавторами запропонували флуориметричне визначення метформіну у зразках сироватки крові. Для аналізу метформіну використовували флуориметричну систему виявлення, яка заснована на реакції терефталевої кислоти з наночастинами оксидом марганцю та кальцію [14]. Відоме визначення метформіну в таблетованій формі індикаторним методом капілярного електрофорезу [15].

Отже, описано багато методик визначення метформіну гідрохлориду в лікарських формах і біологічних рідинах, проте хроматографічні, які є найбільш вибірковими, потребують вартісного обладнання і витратних матеріалів та недостатньо «зелені». Найбільш доступними є спектрофотометричні методики. Визначення за власним поглинанням в УФ-області характеризується простотою виконання, є «зеленим», проте не є селективним, оскільки не дає змоги визначати речовини в багатокомпонентних сумішах без попереднього розділення (або багатохвильовою спектрофотометрією, похідною тощо). Підвищити селективність визначення можна застосовуючи органічні реагенти. Отже, розширення арсеналу доступних кольорореагентів для визначення лікарських речовин не тільки в лікарських формах, а й в біологічних рідинах є актуальним.

Таким чином, метою нашої роботи стала розробка та валідація методу кількісного визначення метформіну гідрохлориду в лікарських препаратах за допомогою сульфоталеїнових барвників методом спектрофотометрії.

**Матеріали і методи.** Усі використовувані хімічні речовини та реагенти були аналітичного або фармацевтичного класу.

Для дослідження було використано: субстанцію метформіну гідрохлориду (Harman Finocem, Індія) серії МН/1314095; таблетки «Метформін Астрафарм» 500 мг (Астрафарм, Україна) серія 020622, «Метформін Тева» 1000 мг (Teva Pharmaceutical Industries Ltd, Ізраїль) серія 0016898, «Метформін Сандоз» 850 мг (Sandoz, Швейцарія) серія JW2453, «Метформін Глюкофаж» 500 мг (Acino, Швейцарія) серія 204394. Реагенти – сульфоталеїнові барвники: бромкрезоловий зелений (Synex Pharma, Китай), бромкрезоловий пурпурний (Шосткинський завод хімічних реактивів, Україна) серія, бромтимоловий синій (Synex Pharma, Китай), тимоловий синій (Шосткинський завод хімічних реактивів, Україна). Всі реагенти кваліфікації «чда». Як розчинник використовували ацетон кваліфікації «чда» і воду очищену.

Аналітичне обладнання: спектрофотометр «Specord-200» (Analytic Jena AG, Німеччина), ваги лабораторні електронні RADWAG XA 210. 4Y, мірний лабораторний посуд класу А.

Дослідження проводили на базі кафедри аналітичної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету.

#### Загальна методика визначення метформіну гідрохлориду

Приготування розчину порівняння метформіну гідрохлориду (РСЗ): 0,08500 г субстанції метформіну гідрохлориду розчиняють у мірній колбі на 100,00 мл у 1,00 мл води очищеної, доводять ацетоном до позначки та перемішують. Із розведення беруть 10,00 мл отриманого розчину і переносять у колбу на 100,00 мл і доводять ацетоном до позначки, 1,00 мл отриманого розчину метформіну гідрохлориду переносять до мірної колби на 10,00 мл, додають 1,00 мл 1,4 % розчину бромкрезолового зеленого в ацетоні і доводять ацетоном до позначки.

Приготування компенсаційного розчину: до мірної колби на 10,00 мл поміщають 1,00 мл 1,4 % розчину бромкрезолового зеленого в ацетоні, доводять ацетоном до позначки та перемішують.

#### Визначення метформіну гідрохлориду в таблетках

Зважують двадцять таблеток і розтирають у ступці. Точну наважку одержаної таблеткової маси (0,07214 – 0,10821) вміщують в колбу на 100,00 мл, додають 1,00 мл води очищеної і доводять до об'єму ацетоном. Отриманий розчин перемішують і фільтрують відкидаючи перші порції фільтрату. Беруть 10,00 мл отриманого фільтрату та переносять у колбу на 100,00 мл і доводять ацетоном до позначки. 1,00 мл отриманого розчину поміщають в колбу на 10,00 мл і аналізують згідно із запропонованою процедурою. Розраховують вміст метформіну гідрохлориду за загальноприйнятою формулою [16].

**Результати й обговорення.** Експериментально встановлено, що метформіну гідрохлорид реагує із сульфогталеїновими барвниками у водно-ацетоно-

вому середовищі з утворенням забарвлених продуктів реакції. За даними рисунка 1, найбільше значення оптичної густини спостерігається при використанні бромкрезолового зеленого (БКЗ) з максимумом поглинання при 408 нм, отже, для подальших досліджень було обрано реагент БКЗ.

У процесі розробки методики були встановлені оптимальні умови перебігу реакції між метформіну гідрохлоридом та БКЗ.

Вибір розчинника для цієї реакції базувався на даних про розчинність метформіну гідрохлориду та БКЗ. Метформін малорозчинний в ацетоні та в спиртах, але добре розчинний у воді. Для розробки більш «зеленої» методики досліджували реакцію у водно-етаноловому та водно-метаноловому середовищах. Однак у зазначених середовищах реакція майже не перебігала (оптична густина становила менше 0,03), тому більш оптимальним виявилось водно-ацетонове середовище.

Також було визначено, що зі збільшенням кількості води оптична густина збільшується (рис. 2). Однак при використанні 2 % та більше води продукт не такий стійкий, тому для приготування розчинів метформіну гідрохлориду слід використовувати водно-ацетонове середовище з вмістом води 1 %.

Концентрацію реагенту визначали експериментально за максимальним виходом продукту реакції, тобто за максимальною оптичною густиною (рис. 3). За даними рисунка 3, максимальне значення оптичної густини спостерігається при значенні концентрації реагенту 1,4 %, тож для подальшої роботи була обрана саме ця концентрація.

Експериментально було встановлено, що БКЗ взаємодіє з метформіном швидко, за кімнатної температури і не потребує корекції температурного та часового режиму.

Розраховані параметри (молярний показник поглинання ( $\epsilon$ ) –  $1,94 \times 10^4$ , питома поглинання ( $a$ ) – 0,12 та

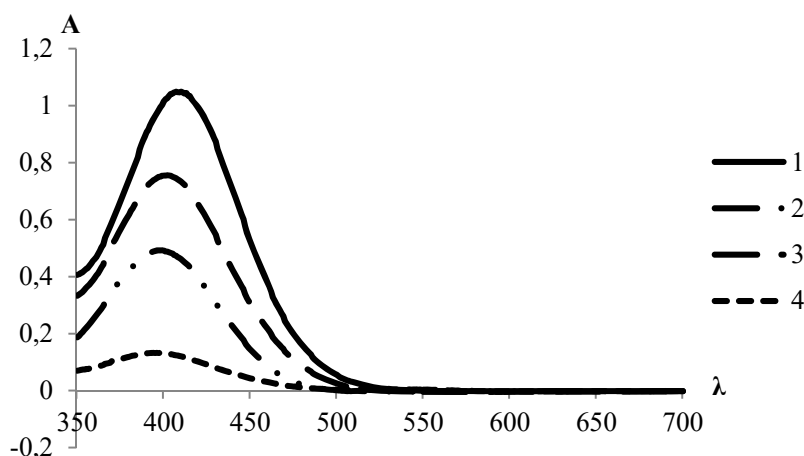


Рис. 1. Спектри поглинання продуктів реакції метформіну гідрохлориду з бромкрезоловим зеленим (БКЗ) – 1, бромкрезоловим пурпуровим (БКП) – 2, бромтимоловим синім (БТС) – 3, тимоловим синім (ТС) – 4 у водно-ацетоновому середовищі.

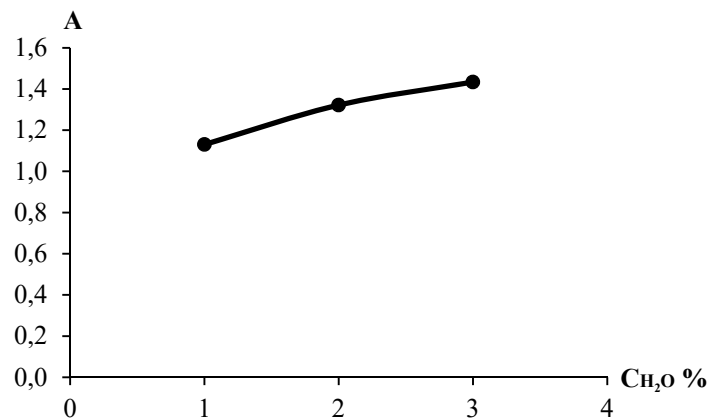


Рис. 2. Залежність абсорбції продукту реакції від кількості доданої води.

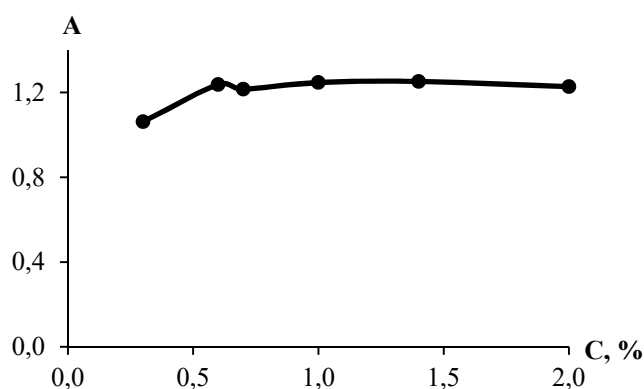


Рис. 3. Залежність абсорбції продукту реакції від концентрації реагенту.

коефіцієнт Сендела ( $W_s$ ) – 0,0087) свідчать про високу чутливість реакції метформіну гідрохлориду з БКЗ.

Стабільність досліджуваних розчинів визначали вимірюючи оптичну густину кожні 5 хв впродовж 30 хв. Було встановлено, що досліджувані розчини стабільні щонайменше 30 хв (рис. 4).

Для визначення стехіометричних коефіцієнтів між метформіну гідрохлоридом та БКЗ використовували метод безперервних змін (метод ізомолярних рядів) і метод молярних співвідношень (метод насичення). За даними рисунків 5 і 6, метформіну гідрохлорид взаємодіє з БКЗ у співвідношенні 1:1.

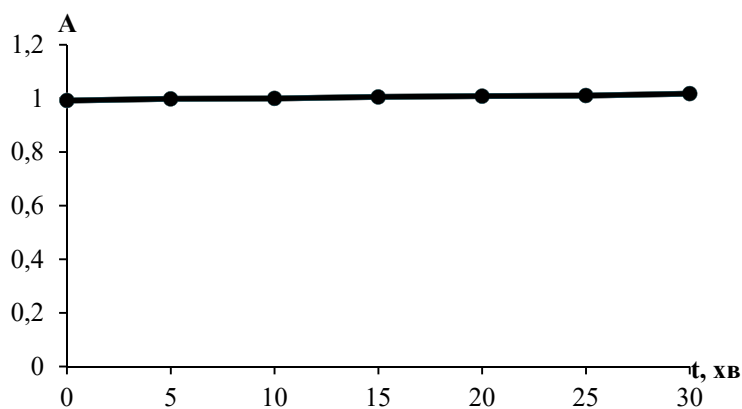


Рис. 4. Графік залежності продукту реакції метформіну гідрохлориду з БКЗ у водно-ацетоновому середовищі від часу.

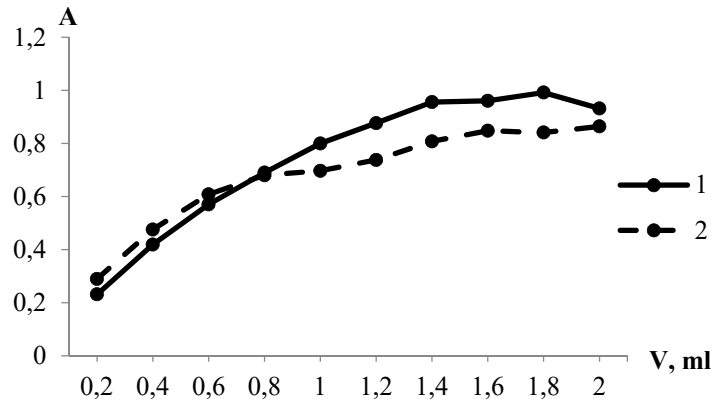


Рис. 5. Криві насичення: 1 – метформіну гідрохлориду при постійній концентрації реагенту (1,00 мл 0,001 М розчину); 2 – БКЗ при постійній концентрації метформіну гідрохлориду (1,00 мл 0,001 М розчину).



Рис. 6. Графік залежності абсорбції від співвідношення компонентів ізомолярного розчину (V1 – об'єм 0,002 М розчину БКЗ, V2 – об'єм 0,002 М розчину метформіну гідрохлориду).

**Перевірка запропонованого способу**

Усі валідаційні характеристики запропонованого методу визначені відповідно до вимог Державної фармакопеї України. Враховували такі параметри, як специфічність, робастність, лінійність, прецизійність та правильність.

**Специфічність**

Результати дослідження специфічності розробленої методики на прикладі таблеток «Метформін Глюкофаж» 500 мг наведено на рисунку 7. Внесок допоміжних речовин в оптичну густину незначний і складає 0,42 %.

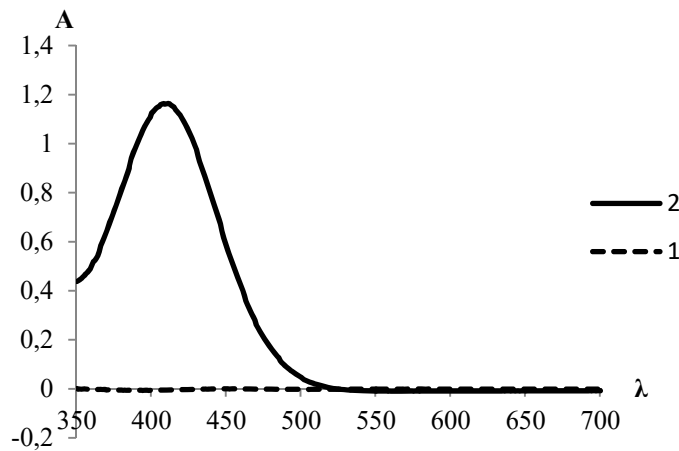


Рис. 7. Спектри поглинання продуктів реакції БКЗ з розчином «плацебо» (1) і модельної суміші таблеток «Глюкофаж» 500 мг (2).

**Робасність**

Оцінку робасності проводили на стадії розробки методики, а саме визначали стабільність приготованих розчинів у часі.

При вивченні стабільності вимірювали оптичну густину визначуваного розчину і розчину порівняння кожні 5 хв впродовж 30 хв. Отримані дані наведено в таблиці 1.

За даними таблиці 1, значення відносного стандартного відхилення ( $RSD_t$  %) та довірчий інтервал ( $\Delta_t$  %) не перевищують припустиму систематичну похибку ( $max\delta$ , %). Таким чином, досліджувані розчини стабільні впродовж 30 хв.

**Лінійність**

Для визначення лінійності було проведено 9 вимірювань абсорбції розчину порівняння метформіну гідрохлориду в діапазоні концентрацій, в яких спостерігається підпорядкованість закону Бера, а саме 0,5–1,2 мг/100 мл. Графік залежності абсорбції від концентрації метформіну гідрохлориду в нормалізованих координатах наведено на рисунку 8.

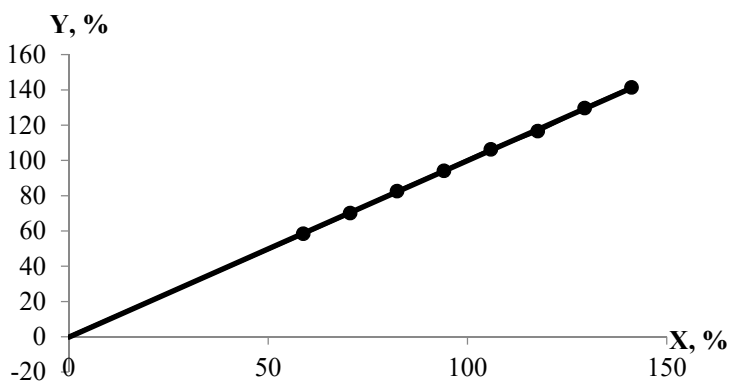
Лінійність запропонованої методики оцінювали за допомогою регресійного аналізу методом найменших квадратів. Отримані значення наведено в таблиці 2.

**Таблиця 1**

Стабільність розчинів метформіну гідрохлориду в часі

Оптична густина	t, хв							Середнє	RSD <sub>t</sub> %	Δ <sub>t</sub> %	maxδ, %
	0	5	10	15	20	25	30				
A <sub>0</sub>	0,9919	0,9925	0,9933	0,9942	0,9949	0,9962	0,9977	0,9944	0,160	0,31	0,32
A <sub>1</sub>	0,9895	0,9903	0,9914	0,9923	0,9932	0,9967	0,9982	0,9931	0,258	0,50	0,51
A <sub>2</sub>	0,9926	0,9931	0,9948	0,9962	0,9978	0,9981	0,9998	0,9961	0,234	0,45	
A <sub>3</sub>	0,9859	0,9863	0,9875	0,9889	0,9897	0,9916	0,9931	0,9890	0,220	0,43	
A <sub>4</sub>	0,9827	0,9833	0,9846	0,9858	0,9869	0,9884	0,9907	0,9861	0,221	0,43	

Примітки: A<sub>0</sub> – оптична густина розчину порівняння метформіну гідрохлориду; A<sub>1</sub> – оптична густина «Метформін Астрафарм» 500 мг; A<sub>2</sub> – оптична густина «Метформін Тева» 1000 мг; A<sub>3</sub> – оптична густина «Метформін Сандоз» 850 мг; A<sub>4</sub> – оптична густина «Метформін Глюкофаж» 500 мг.



**Рис. 8.** Графік залежності абсорбції від концентрації метформіну гідрохлориду (у нормалізованих координатах) при довжині хвилі 407 нм.

**Таблиця 2**

Числові показники лінійної залежності методики

Величина	Значення	Критерії	Висновок
Рівняння лінійної залежності	$Y_i = bX_i + a$		
Коефіцієнт кореляції, r	0,9999	$\geq 0,9962$	Відповідає
Залишкове стандартне відхилення, S <sub>x,0</sub>	0,4981	$\leq \Delta_{As} (\%) / t (95\%, 7) 1,689$	Відповідає
Вільний член регресійної прямої, a ± (Sa)	-0,552 ± (0,677)	$\leq t (95\%, 7) \cdot Sa 1,298$	Відповідає
Тангенс кута нахилу регресійної прямої, b ± (Sb)	1,004 ± (0,00653)	—	—



Діапазон застосування методики склав 59–141 %. Розраховані значення МВ і МКВ становлять 2,23 % і 6,77 % відповідно.

#### Прецизійність

Прецизійність запропонованої методики для кожної лікарської форми визначали на рівні збіжності. Було проведено 9 паралельних вимірювань. Із трьох наважок було підготовлено три розчини, кожен із трьох паралельними вимірюваннями в оптимальних умовах. Паралельно визначали поглинання розчину порівняння та розраховували вміст досліджуваної речовини. Отримані дані наведено в таблиці 3.

#### Правильність

Для встановлення правильності запропонованої методики використовували метод добавок. До трьох рівних проб лікарської речовини додавали різний об'єм РСЗ та визначали оптичну густину тричі. За даними таблиці 4, результати визначень є правильними, оскільки отримані результати входять у встановлений довірчий інтервал.

#### Прогноз повної невизначеності методики

Для підтвердження того, що розроблена методика буде коректно відтворюватись в інших лабораторіях проводили розрахунок повної невизначеності результатів методики. Згідно з ДФУ, прогнозована повна невизначеність методики не повинна перевищувати максимально допустимого значення  $\Delta_{As}$ .

Прогноз повної невизначеності розраховували за формулою:

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{Sp}^2 + \Delta_{FAO}^2},$$

де  $\Delta_{Sp}$  – невизначеність прободіготовки;

$\Delta_{FAO}$  – прогнозована невизначеність кінцевої аналітичної операції.

При прогнозуванні  $\Delta_{FAO}$  враховують, що для процедури спектрофотометричного вимірювання використовують два розчини (розчин порівняння та досліджуваний розчин). При здійснюванні трьох паралельних вимірювань з вийманням кювети, значення невизначеності кінцевої аналітичної операції ( $\Delta_{FAO}$ ) дорівнюватиме 0,70 % [20].

Для розрахунків невизначеності прободіготовки проводили за вимогами ДФУ до гранично припустимих похибок для мірного посуду, ваг та приладів. Розрахунок повної невизначеності методики наведено в таблиці 5. В розрахунках враховувалась мінімальна маса взяття наважки готового лікарського засобу.

Таким чином прогнозована повна невизначеність аналізу (1,54 %) не перевищує максимально допустиму невизначеність методики (1,60 %) і методика може бути відтворена в інших лабораторіях [16].

#### Оцінка впливу розробленої методики на навколишнє середовище

Для оцінки впливу розробленої методики на навколишнє середовище використовували два методи: метрика еко-масштабу та за допомогою інструменту AGREE (Analytical GREENness).

Метрика еко-масштабу базується на зарахуванні штрафних балів будь-якому параметру, що не відповідає ідеальній екологічній (зеленій) техніці. Шкала еко-масштабу має такий вигляд:

- 100 балів – ідеальний зелений аналіз;
- > 75 – відмінний зелений аналіз;
- > 50 – прийнятний зелений аналіз;
- < 50 – неадекватний зелений аналіз.

Розраховують штрафні бали за наступною схемою:

*сума штрафних балів × штрафні бали небезпеки*

Таблиця 3

Визначення збіжності результатів кількісного визначення метформіну в таблетках

Лікарська форма	$\bar{Z}$ % (n=9)	$S_z$ %	$\Delta_{As}$	$\Delta_{\%}$	$\delta \leq \Delta_{\%} / 3$
«Метформін Астрафарм» 500 мг	100,37	0,87	1,6	1,61	$0,37 \leq 0,54$
«Метформін Тева» 1000 мг	99,83	0,37	1,6	0,69	$0,17 \leq 0,23$
«Метформін Сандоз» 850 мг	99,75	0,47	1,6	0,87	$0,25 \leq 0,29$
«Метформін Глюкофаж» 500 мг	99,79	0,51	1,6	0,94	$0,21 \leq 0,31$

Таблиця 4

Визначення правильності результатів кількісного визначення метформіну в таблетках

Лікарська форма	$\bar{Z}$ %, n=9	$S_z$ %	$\Delta_{\%}$	$ 100 - \bar{Z} $	$\sigma \leq \Delta_{\%} / 3$
«Метформін Астрафарм» 500 мг	99,71	0,65	1,21	0,29	$0,29 \leq 0,40$
«Метформін Тева» 1000 мг	100,16	0,26	0,49	0,16	$0,16 \leq 0,16$
«Метформін Сандоз» 850 мг	100,04	0,35	0,64	0,04	$0,04 \leq 0,21$
«Метформін Глюкофаж» 500 мг	99,80	0,49	0,91	0,20	$0,20 \leq 0,30$

Таблиця 5

Розрахунок повної невизначеності методики кількісного визначення метформіну гідрохлориду

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
<i>Досліджуваний розчин</i>		
Взяття наважки готового лікарського засобу	$a_1$	$0,2 \text{ mg}/90,2 \text{ mg} * 100 \% = 0,22 \%$
Доведення об'єму до мітки в мірній колбі на 100,00 мл	100	0,12
Взяття аліквоти розведення готового лікарського засобу піпеткою на 10,00 мл	10	0,25
Доведення об'єму до мітки в мірній колбі на 100,00 мл	100	0,12
Взяття аліквоти розведення готового лікарського засобу піпеткою на 1,00 мл	1	0,74
Доведення об'єму до мітки в мірній колбі на 10,00 мл	10	0,50
<i>Розчин порівняння</i>		
Взяття наважки метформіну гідрохлориду	$a_0$	$0,2 \text{ mg}/85 \text{ mg} * 100 \% = 0,24 \%$
Доведення об'єму до мітки в мірній колбі на 100,00 мл	100	0,12
Взяття аліквоти розведення метформіну гідрохлориду піпеткою на 10,00 мл	10	0,25
Доведення об'єму до мітки в мірній колбі на 100,00 мл	100	0,12
Взяття аліквоти розведення метформіну гідрохлориду піпеткою на 1,00 мл	1	0,74
Доведення об'єму до мітки в мірній колбі на 10,00 мл	10	0,50
$\Delta_{sp} = \sqrt{0,22^2 + 0,12^2 + 0,25^2 + 0,12^2 + 0,74^2 + 0,50^2 + 0,24^2 + 0,12^2 + 0,25^2 + 0,12^2 + 0,74^2 + 0,50^2} = 1,37\%$		

Суму штрафних балів нараховують за таким порядком (< 10 мл = 1, 10-100 мл = 2, > 100 мл = 3). Штрафні бали небезпеки – це кількість піктограм у матеріальному паспорті безпеки хімічної речовини × оцінку за сигнальне слово (безпечно – 1, небезпечно – 2) [17].

Так, для ацетону (2 піктограми × 2 (сигнальне слово – небезпека) × 3 (сума > 100 мл)) = 12 штрафних очок. БКЗ є безпечною речовиною і не має штрафних очок. На зарахування штрафних балів також впливає інструментальне споживання енергії (<0,1 кВт-год = 0; 0,1-1,5 кВт-год = 1; >1,5 кВт-год = 2). Спектрофотометрії дають 0 балів. Наступний етап підрахунок штрафних балів за відходи, які розраховують так (немає = 0, <1 мл (r) = 1; 1-10 мл (r) = 3, > 10 мл (r) = 5), далі додають бали обробки (переробка 0, деградація 1, без обробки 3). Для розробленого методу бали відходів розраховували так – (5 (>10 мл (r)) + 3 (без обробки)) = 8. Згідно з аналітичною еко-масштабністю розроблена методика склала 80 %.

Проведена оцінка «зеленості» даної методики за допомогою інструменту AGREE (Analytical GREENness) та аналітичною еко-шкалою (табл. 6) дає змогу стверджувати, що розроблена методика спектрофотометричного визначення метформіну гідрохлориду за реакцією з БКЗ є достатньо екологічною і відповідає за розрахунками як «відмінний зелений аналіз».

рохлориду за реакцією з БКЗ є достатньо екологічною і відповідає за розрахунками як «відмінний зелений аналіз».

**Висновки.** У результаті проведеного дослідження було розроблено та валідовано спектрофотометричну методику кількісного визначення метформіну гідрохлориду за реакцією із сульфоталеїновим барвником бромкрезоловим зеленим. Встановлено, що при проведенні реакції метформіну з бромкрезоловим зеленим з концентрацією 1,4 % у водно-ацетоновому середовищі (співвідношення 1:100) утворюється забарвлений продукт із максимумом поглинання при 408 нм. Методами безперервних змін і молярних співвідношень визначені стехіометричні коефіцієнти реагуючих компонентів, які становлять 1:1. Розроблену методику було валідовано відповідно до вимог Державної Фармакопеї України, що підтверджує можливість її використання у фармацевтичному аналізі. Проведено оцінку екологічності запропонованої методики за аналітичною еко-шкалою та програмою AGREE яка за розрахунками відповідає як «відмінний зелений аналіз».

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

**Conflicts of interest:** authors have no conflict of interest to declare.



Таблиця 6

Оцінка зеленості за аналітичною еко-шкалою та піктограма запропонованого методу

Небезпека	Штрафні бали
Ацетон	12
БКЗ	0
Енергія приладів	0
Відходи	8
Загальна кількість штрафних балів	20
Загальний бал за аналітичною еко-шкалою	80



## SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF METFORMIN HYDROCHLORIDE IN TABLETS BY REACTION WITH BROMCRESOL GREEN

L. H. Leleka, S. O. Vasiuk

Zaporizhzhya State Medical and Pharmaceutical University  
 demyanova0610@gmail.com

**The aim of the work.** Development and validation of a spectrophotometric method for the quantitative determination of metformin hydrochloride in tablets by reaction with sulfophthalein dyes

**Materials and methods.** The following were used for the analysis:

- metformin hydrochloride substance of pharmacopoeial purity.
- tablets – "Metformin Astrapharm" 500 mg, "Metformin Teva" 1000 mg, "Metformin Sandoz" 850 mg, "Metformin Glucophage" 500 mg.
- reagents – sulfophthalein dyes: bromocresol green (Synex Pharma, China), bromocresol purple (Shostkin Chemical Reagent Plant, Ukraine), bromothymol blue (Synex Pharma, China), thymol blue (Shostkin Chemical Reagent Plant, Ukraine). All reagents of analytical grade.
- solvent – acetone of analytical grade and purified water.
- analytical equipment – spectrophotometer "Specord-200" (Analytic Jena AG, Germany), electronic laboratory scales RADWAG XA 210. 4Y, measuring laboratory vessels of class A.

**Results and Discussion.** A new, simple spectrophotometric method was developed for the quantitative determination of metformin hydrochloride in tablets by reaction with bromocresol green (BCG) in 1 % water-acetone medium. The maximum absorption is at 408 nm. Compliance with the basic law of light absorption is within concentrations of 0.5–1.2 mg/100 ml. The detection limit value is  $0,433 \cdot 10^{-6}$  g/ml, which indicates a high sensitivity of the reaction. In accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPU), some validation characteristics were determined for the developed methodology, namely, linearity, accuracy, correctness and robustness. The "greenness" of the method was also checked using the AGREE tool (Analytical GREENness) and an analytical eco-scale.

**Conclusions.** As a result of the study, a spectrophotometric method for the quantitative determination of metformin hydrochloride was developed and validated. This technique is simple, accessible and meets the requirements of SPU, so it can be recommended for use in laboratories for quality control of medicines.

**Key words:** metformin hydrochloride; spectrophotometry; sulfophthalein dyes; validation; quantitative determination; State Pharmacopoeia of Ukraine.

## Список бібліографічних посилань

1. International Diabetes Federation. (2021). IDF Diabetes Atlas 10th Edition [Internet]. Brussels, Belgium: 2021. [cited 2023 Aug.22]; Available from: <https://diabetesatlas.org>
2. Sokolova L., Pushkarev V., Kovzun O. The mechanisms of metformin action in diabetes and diabetes-related pathologies. *Endokr.* 2020. Vol. 25 (2). P. 143–157. Available from: <https://endokrynologia.com.ua/index.php/journal/article/view/340>
3. Державна Фармакопея України. 2-е вид. Т. 1. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів. 2015. 1128 с.
4. British Pharmacopoeia. Vol. 2, British Pharmacopoeia Commission Office (London): Medicines and Healthcare products Regulatory Agency; 2022. 249 p.
5. Validation of a rapid and economical RP-HPLC method for simultaneous determination of metformin hydrochloride and sitagliptin phosphate monohydrate: Greenness evaluation using AGREE score. A. Raza, S. H. Murtaza, S. Hanif et al. *J. Pharm. Sci.* 2022. Vol. 35 (1). P. 15–21. Available from: <https://www.scribd.com/document/660117802/2022-Validation-of-a-Rapid-and-Economical-RP-HPLC-Method-for-Simultaneous-Determination-of-Metformin-Hydrochloride-and-Sitagliptin-Phosphate-Monohydrate> DOI: 10.36721/PJPS.2022.35.1.REG.015-021.1
6. Umapathi P., Ayyappan J., Quine S. D. Quantitative determination of metformin hydrochloride in tablet formulation containing croscarmellose sodium as disintegrant by HPLC and UV spectrophotometry, *Tropical Journal of Pharmaceutical.* 2012. Vol. 11 (1). P. 107–116. Available from: <https://www.ajol.info/index.php/tjpr/article/view/74676> DOI: 10.4314/tjpr.v11i1.14
7. Chhetri H. P., Thapa P., Schepdael A. V. Simple HPLC-UV method for the quantification of metformin in human plasma with one step protein precipitation, *Saudi Pharmaceutical Journal.* 2014. Vol. 22 (5). P. 483–487. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.12.011>.
8. Armagan O. Spectrophotometric and HPLC determinations of anti-diabetic drugs, rosiglitazone maleate and metformin hydrochloride, in pure form and in pharmaceutical preparations, *European Journal of Medicinal Chemistry* [Internet]. 2009. Vol. 44 (12). P. 4998-4905. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.09.003>.
9. Development and Validation of Green UV Derivative Spectrophotometric Methods for Simultaneous Determination Metformin and Remogliflozin from Formulation: Evaluation of Greenness. M. Attimarad, A. B. Nair, N. Sreeharsha et al. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2021. Vol. 18 (2). P. 448. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijerph18020448>.
10. Москаленко В. Ю., Мерзлікін С. І. Розробка умов ізолювання та спектрофотометричного визначення метформіну в біологічних об'єктах. *Фармацевтичний часопис.* 2016. 2. 22-5. Режим доступу : <https://ojs.tdmu.edu.ua/index.php/pharmchas/article/view/6645/6059>
11. Бугайова В. В., Васюк С. О. Розробка та валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення метформіну гідрохлориду у складі препарату “Метформін сандоз”. *Всеукр. наук.-практ. конференції з між нар. участю, присвяченої 80-річчю з дня народж. д-ра фарм. наук, проф. О. М. Гайдукевича.* Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій. 2018 квіт 12-13; Харків. Харків : НФаУ. 2023. 320 с. Режим доступу : <http://dspace.zsmu.edu.ua/handle/123456789/10276>
12. Sabbagh BA, Kumar PV, Chew YL, Chin JH, Akowuah GA. Determination of metformin in fixed-dose combination tablets by ATR-FTIR spectroscopy, *Chemical Data Collections* [Internet]. 2022 Jun [cited 2023Aug.20]; 39, 100868. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2022.100868>
13. Castro RC, Ribeiro DSM, Santos JLM, Nunes C, Reis M, Páscoa RNMJ. Chemometric-assisted surface-enhanced Raman spectroscopy for metformin determination using gold nanoparticles as substrate, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [Internet]. 2023 Feb 15 [cited 2023Aug.20]; 287 (2) 122118. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.122118>.
14. Dual enzymes-mimic activity of nanolayered manganese-calcium oxide for fluorometric determination of metformin. *Chemosphere.* S. Rashtbari, G. Dehghan, S. Khataee et al. 2022. Vol. 291 (1). P. 133063. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133063>.
15. Hamdan I. I., Bani Jaber A. K., Abushoffa AM. Development and validation of a stability indicating capillary electrophoresis method for the determination of metformin hydrochloride in tablets, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2010. Vol. 53 (5). P. 1254–1257. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.03.017>.
16. Гризодуб А. И. Стандартизация процедуры валідації методик контролю качества лекарственных средств. Харьков: Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств». 2016. 396 с.
17. Miedviedieva K., Vasyuk S., Portna O. Development and validation of a new spectrophotometric method for the determination of gabapentin in capsules. *SR: PS.* 2023. Vol. 3 (43). P. 50–57. Available from: [https://journals.urau.ua/sr\\_pharm/article/view/283270](https://journals.urau.ua/sr_pharm/article/view/283270).

## References

1. International Diabetes Federation. (2021). IDF Diabetes Atlas 10th Edition [Internet]. Brussels, Belgium: 2021. [cited 2023 Aug.22]; Available from: <https://diabetesatlas.org>.
2. Sokolova L, Pushkarev V, Kovzun O. The mechanisms of metformin action in diabetes and diabetes-related pathologies. *Endokr.* [Internet]. 2020 Jun.20 [cited 2023 Aug.22]; 25(2): 143-57. Available from: <https://endokrynologia.com.ua/index.php/journal/article/view/340>
3. State Pharmacopoeia of Ukraine. 2nd edition T. 1. Kharkiv: SE "Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for the Quality of Medicines."; 2015. 1128 p.
4. British Pharmacopoeia. Vol. 2, British Pharmacopoeia Commission Office (London): Medicines and Healthcare products Regulatory Agency; 2022. 249 p.
5. Raza A, Murtaza SH, Hanif S, Iqbal J, Ali I, Aftab T, et al. Validation of a rapid and economical RP-HPLC method for simultaneous determination of metformin hydrochloride and sitagliptin phosphate monohydrate: Greenness evaluation using AGREE score. *Pak J Pharm Sci* [Internet]. 2022 Jan [cited 2023Aug.20];35(1):15-21. Available from: <https://www.scribd.com/document/660117802/2022-Validation-of-a-Rapid-and-Economical-RP-HPLC-Method-for-Simultaneous-Determination-of-Metformin-Hydrochloride-and-Sitagliptin-Phosphate-Monohydrate> DOI: 10.36721/PJPS.2022.35.1.REG.015-021.1
6. Umaphathi P, Ayyappan J, Quine SD. Quantitative Determination of Metformin Hydrochloride in Tablet Formulation Containing Croscarmellose Sodium as Disintegrant by HPLC and UV Spectrophotometry, *Tropical Journal of Pharmaceutical* [Internet]. 2012 Feb [cited 2023Aug.20];11(1): 107-16. Available from: <https://www.ajol.info/index.php/tjpr/article/view/74676> DOI: 10.4314/tjpr.v11i1.14
7. Chhetri H P, Thapa P, Schepdael A V. Simple HPLC-UV method for the quantification of metformin in human plasma with one step protein precipitation, *Saudi Pharmaceutical Journal* [Internet]. 2014 Nov [cited 2023Aug.20]; 22 (5): 483-7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.12.011>.
8. Armagan O. Spectrophotometric and HPLC determinations of anti-diabetic drugs, rosiglitazone maleate and metformin hydrochloride, in pure form and in pharmaceutical preparations, *European Journal of Medicinal Chemistry* [Internet]. 2009 Dec [cited 2023Aug.20]; 44,(12): 4998-05. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.09.003>.
9. Attimarad M, Nair A B, Sreeharsha N, Al-Dhubiab B E, Venugopala K N, Shinu P. Development and Validation of Green UV Derivative Spectrophotometric Methods for Simultaneous Determination Metformin and Remogliflozin from Formulation: Evaluation of Greenness. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [Internet]. 2021 Jan [cited 2023Aug.20]; 18(2), 448. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijerph18020448>
10. Moskalenko VYu, Merzlikin SI. Rozrobka umov izoliuvannia ta spektrofotometrychnoho vyznachennia metforminu v biolohichnykh ob'ekтах [Development of conditions for isolation and spectrophotometric determination of metformin in biological objects]. *Farmatsevychnyi chasopys* [Internet]. 2016 [cited 2023 Aug 22];2: 22-5. Available from: <https://ojs.tdmu.edu.ua/index.php/pharm-chas/article/view/6645/6059>
11. Buhaiova VV, Vasiuk SO. Development and validation of a spectrophotometric method for the quantitative determination of metformin hydrochloride in the composition of the drug "Metformin sandoz". All-Ukrainian science and practice conference with inter participation dedicated to the 80th anniversary of the birth of Dr. Pharm. Sciences, Prof. O. M. Haydukevych. Synthesis and analysis of biologically active substances and medicinal substances [Internet]; 2018 April 12-13; Kharkiv. Kharkiv: NFaU; [cited 2023 Aug 22]; 320 p. Available from: <http://dspace.zsmu.edu.ua/handle/123456789/10276>. Ukrainian.
12. Sabbagh BA, Kumar PV, Chew YL, Chin JH, Akowuah GA. Determination of metformin in fixed-dose combination tablets by ATR-FTIR spectroscopy, *Chemical Data Collections* [Internet]. 2022 Jun [cited 2023Aug.20]; 39, 100868. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2022.100868>
13. Castro RC, Ribeiro DSM, Santos JLM, Nunes C, Reis M, Páscoa RNMJ. Chemometric-assisted surface-enhanced Raman spectroscopy for metformin determination using gold nanoparticles as substrate, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [Internet]. 2023 Feb 15 [cited 2023Aug.20]; 287(2): 122118. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.122118>.
14. Rashtbari S, Dehghan G, Khataee S, Amini M, Khataee A. Dual enzymes-mimic activity of nanolayered manganese-calcium oxide for fluorometric determination of metformin, *Chemosphere* [Internet]. 2022; Mar [cited 2023Aug.20]; 291 (1) 133063. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133063>.
15. Hamdan II, Bani Jaber AK, Abushoffa AM. Development and validation of a stability indicating capillary electrophoresis method for the determination of metformin hydrochloride in tablets, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [Internet]. 2010 Dec [cited 2023Aug.20];53(5), 1254-7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.03.017>.
16. Grizodub AI. Standartizatsiya protseduryi validatsii metodik kontrolya kachestva lekarstvennyih sredstv [Standardization of the validation procedure for drug quality control methods]. Harkov; 2016. 396 p. Ukrainian.
17. Miedviedieva K, Vasyuk S, Portna O. Development and validation of a new spectrophotometric method for the determination of gabapentin in capsules. *SR: PS* [Internet]. 2023 Jun.30 [cited 2023Aug.20]; (3(43):50-7. Available from: [https://journals.uran.ua/sr\\_pharm/article/view/283270](https://journals.uran.ua/sr_pharm/article/view/283270)

**Відомості про авторів**

**Лелека Л. Г.** – аспірант кафедри аналітичної хімії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Запоріжжя, Україна. E-mail: demyanova0610@gmail.com, ORCID 0000-0002-3957-6264.

**Васюк С. О.** – д. фармац. наук, професор, завідувач кафедри аналітичної хімії, Запорізький державний медичний університет, Запоріжжя, Україна. E-mail: vasjuk@zsmu.zp.ua, ORCID 0000-0002-1569-9374.

**Information about the authors**

**Leleka L. H.** – Post-Graduate Student of the Department of Analytical Chemistry Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Zaporizhzhia, Ukraine. E-mail: demyanova0610@gmail.com, ORCID 0000-0002-3957-6264.

**Vasyuk S. O.** – DSs (Pharmacy), Professor, Head of Analytical Chemistry Department, Zaporizhzhia State Medical University, Zaporizhzhia, Ukraine. E-mail: vasjuk@zsmu.zp.ua, ORCID 0000-0002-1569-9374.