3351606125
3351606125
Підпис
Лелека Лідія Геннадіївна



Міністерство охорони здоров'я України
Запорізький державний медико-фармацевтичний університет

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЛЕЛЕКА ЛІДІЯ ГЕННАДІЇВНА

УДК 543.42: 615.252.349.7.074

**ДИСЕРТАЦІЯ**

# РОЗРОБКА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИХ МЕТОДИК ВИЗНАЧЕННЯ ГІПОГЛІКЕМІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

22 – Охорона здоров'я
226 – Фармація, промислова фармація

Подається на здобуття ступеня доктора філософії з фармації

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

Науковий керівник: Васюк Світлана Олександрівна, доктор фармацевтичних наук, професор

Запоріжжя – 2023

# АНОТАЦІЯ

*Лелека Л. Г.* Розробка спектрофотометричних методик визначення гіпоглікемічних препаратів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація» (22 Охорона здоров'я). – Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Запоріжжя, 2023.

Дисертаційна робота присвячена розробленню чутливих, простих у виконанні та економічних спектрофотометричних методик кількісного визначення АФІ, а саме: метформіну гідрохлориду, гліклазиду та глібенкламіду в гіпоглікемічних лікарських засобах промислового виробництва на основі їхніх реакцій з кольорореагентами та валідації запропонованих методик.

В ході дослідження було проаналізовано методи кількісного визначення досліджуваних гіпоглікемічних лікарських засобів і застосування кольорореагентів (сульфофталеїнових барвників і похідних хінонів) у фармацевтичному аналізі та встановлено, що розробка спектрофотометричних методик кількісного визначення гіпоглікемічних лікарських речовин з використанням зазначених кольорореагентів у препаратах є актуальною.

Експериментально було встановлено оптимальні умови перебігу реакцій метформіну гідрохлорибу з бромкрезоловим зеленим, гліклазиду з бромкрезоловим зеленим та глібенкламіду з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном. Для цього було досліджено чинники, які впливають на швидкість і повноту перебігу цих реакцій, а саме, розчинник, кількість доданого реагенту, час перебігу реакції, температура та час нагрівання, стабільність досліджуваних розчинів у часі.

Визначено, що найбільш оптимальними умовами для проведення реакції метформіну гідрохлориду з бромкрезоловим зеленим є взаємодія 1,00 мл

0,001 М водно-ацетонового розчину метформіну гідрохлориду, де вміст води очищеної становить 1%, та 1,00 мл 1,4 % розчину бромкрезолового зеленого в ацетоні. Реакція перебігає за кімнатної температури, аналітичною довжиною хвилі, при якій спостерігається максимум світлопоглинання, є 408 нм. Продукт реакції досліджуваного АФІ з БКЗ стабільний щонайменше 30 хв.

Для реакції гліклазиду і бромкрезоловим зеленим оптимальними умовами є додавання до 1,00 мл 0,002 М ацетонового розчину гліклазиду 1,50 мл 0,04 М розчину бромкрезолового зеленого в ацетоні. Реакція перебігає за кімнатної температури, аналітичною довжиною хвилі, при якій спостерігається максимум світлопоглинання, є 411 нм. Продукт реакції досліджуваного АФІ стабільний щонайменше 30 хв.

Оптимальними умовами для проведення реакції глібенкламіду з 2,3-дихлор-1,4-нафтахіноном є додавання до 1,00 мл 0,004 М розчину глібенкламіду в середовищі ДМФА 1,00 мл 0,5% розчину 2,3-дихлор-1,4-нафтахінону в середовищі ДМФА. Реакція перебігає при нагріванні реакційної суміші протягом 25 хв при 95 $^{o}$C, з аналітичною довжиною хвилі, при якій спостерігається максимум світлопоглинання, при 411 нм. Продукт реакції досліджуваного АФІ стабільний щонайменше 1 год.

Також були встановлені показники чутливості реакції досліджуваних гіпоглікемічних лікарських речовин з бромкрезоловим зеленим та 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном. Для встановлення чутливості досліджуваних реакцій розраховували такі характеристики: молярний показник поглинання, питоме поглинання, коефіцієнт Сендела та гранична концентрація. Високі значення молярних коефіцієнтів світлопоглинання $0{,}23\cdot10^4$–$1{,}94\cdot10^4$ та малі значення граничних концентрацій 0,43–11,0 мкг/мл свідчать про високу чутливість реакцій між досліджуваними лікарськими речовинами та відповідними реагентами.

Стехіометричні коефіцієнти реагуючих компонентів були встановлені за допомогою методів ізомолярних серій (неперервних змін), молярних

співвідношень (метод насичення) та методу Старика-Барбанеля (відносного виходу). Стехіометричні співвідношення для усіх випадків склали 1:1.

Згідно з експериментально встановленими оптимальними умовами перебігу реакцій досліджуваних лікарських речовин з відповідними реагентами були розроблені методики кількісного визначення зазначених АФІ в лікарських препаратах промислового виробництва. Кількісне визначення проводили в межах концентрації лікарських речовин, у яких спостерігається підпорядкування основному закону світлопоглинання. Для визначення вмісту досліджуваних лікарських речовин спектрофотометричним методом використовували метод стандарту, який ґрунтується на порівнянні оптичної густини розчину аналізованого зразка з оптичною густиною РСЗ лікарської речовини, виміряних в однакових умовах.

Наступним етапом роботи було проведення валідації для розроблених методик кількісного визначення метформіну гідрохлориду і гліклазиду за реакцією з БКЗ та глібенкламіду за реакцією з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном. Згідно з Державною Фармакопеєю України запропоновані методики були валідовані за такими такими характеристиками як специфічність, лінійність, межа виявлення і межа кількісного визначення, діапазон застосування, прецизійність, правильність та робасність.

Специфічність досліджуваних методик визначали використовуючи прямий підхід. Для визначення специфічності за допомогою прямого методу виготовляли модельні суміші з допоміжних речовин, до яких згодом додавали відповідну кількість аналізованої речовини. Далі проводили всі етапи пробопідготовки, відповідно до розроблених методик, та вимірювали оптичну густину розчинів «плацебо» та розчинів порівняння, які містили аналізований АФІ. Згідно з результатами у кожному випадку вклад «плацебо» в сумарну величину фонового поглинання був незначимим (0,04–0,32%), отже розроблені методики є специфічними.

Для підтвердження того, що пропоновані методики будуть давати коректні результати в інших лабораторіях проводили прогноз повної

невизначеності результатів аналізу кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин. Для цього розрахували повну невизначеність пробопідготовки та повної невизначеності аналізу для кожного лікарського препарату. Отримані результати аналізу свідчать, що прогнозована повна невизначеність результатів аналізу в кожному випадку не перевищує критичного значення.

Лінійну залежність розроблених методик встановлювали в межах діапазону застосування запропонованих методик. Для цього вимірювали оптичну густину розчинів стандартних зразків досліджуваних АФІ у діапазоні застосування методик (використовуючи не менше 9-8 концентрацій для кожної лікарської речовини). Згідно з вимогами ДФУ будували графік лінійної залежності оптичної густини від концентрації досліджуваних лікарських речовин та проводили оцінку параметрів лінійної залежності. Отримані дані розрахунку параметрів лінійності свідчать, що лінійна залежність розроблених методик підтверджується в обраних діапазонах концентрації досліджуваних речовин.

Для розрахунку «запасу міцності» методики, тобто наскільки діапазон застосування методики перевищує її граничні можливості, були розраховані межі виявлення та межі кількісного визначення. Згідно з результатами величини МВ і МКВ значно менші нижньої границі діапазону концентрацій, а тому не можуть впливати на точність аналізу.

Прецизійність розроблених методик визначали на рівні збіжності та внутрішньолабораторної прецизійності.

Для вивчення збіжності проводили дев’ять паралельних визначень для кожного лікарського препарату в діапазоні застосування розроблених методик (три концентрації/три повтори). Паралельно вимірювали оптичну густину розчинів порівняння досліджуваних лікарських речовин. Для оцінки збіжності враховували наступні метрологічні характеристики: середнє ($\bar{Z}$), стандартне відхилення ($S_Z$ %), відносне стандартне відхилення ($\Delta_{\%}$), максимально припустима невизначеність $\Delta_{As}$ та критерій незначимості систематичної

похибки ($\delta \leq \Delta_{\%}/3$). Розраховані дані показують, що критерій незначимості систематичної похибки у кожному випадку не перевищує максимально припустиму невизначеність аналізу, що свідчить про те, що методики є точними на рівні збіжності.

Для оцінки внутрішньолабораторної прецизійності використовували довірчий інтервал результатів. Отримані результати в різних умовах, не перевищували максимально припустиму невизначеність методики аналізу $\Delta_{Ас}$.

Правильність розроблених методик встановлювали методом добавок стандарту та методом модельних сумішей. Отримані і статистично розраховані результати свідчать про правильність результатів аналізу для розроблених методик кількісного спектрофотометричного визначення досліджуваних лікарських речовин у складі лікарських форм промислового виробництва.

Оцінку робасності проводили на етапі розробки методик. Для цього вивчали фактори, які можуть впливати на величину оптичної густини та стабільність отриманих розчинів. Так для метформіну і гліклазиду з БКЗ вивчали коливання кількісті доданого реагенту, стабільність досліджуваних розчинів у часі. Для глібенкламіду з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном вивчали вплив температури та часу нагрівання реакційної суміші, кількість доданих реагентів та стабільність отриманих розчинів у часі. Отримані результати свідчать, що досліджувані розчини стабільні протягом 30 хв у випадку гліклазиду і метформіну гідрохлориду, та 1 год у випадку глібенкламіду. Було встановлено, що незначні коливання концентрації реагенту (у межах ±10%) суттєво не впливає на значення величин оптичної густини.

Отже, згідно з ДФУ валідаційні характеристики, такі як лінійність, прецизійність та правильність були визначені в інтервалах робочих концентрацій, які входили в мінімально допустимі межі діапазону застосування методик кількісного визначення досліджуваних лікарських форм.

Для оцінки впливу розроблених методик на навколишнє середовище використовували два методи: метрику еко-масштабу та інструмент AGREE (Analytical GREEnness). За результатами даної оцінки розроблені методики кількісного спектрофотометричного визначення метформіну гідрохлориду та гліклазиду за реакцією з БКЗ є достатньо екологічними і відповідають за розрахунками як «відмінний зелений аналіз».

Отже в роботі показано експериментальне вирішення наукової задачі, що полягає у розробленні та валідації спектрофотометричних методик кількісного визначення гіпоглікемічних лікарських речовин таких як метформіну гідрохлорид, гліклазид та глібенкламід на основі їх реакцій з кольорореагентами (сульфофталеїновими барвниками та похідними хінонів) у складі лікарських препаратів промислового виробництва.

*Ключові слова:* АФІ, метформіну гідрохлорид, гліклазид, глібенкламід, сульфофталеїнові барвники, бромкрезоловий зелений, 2,3-дихлор-1,4-нафтохінон, спектрофотометрія, аналіз, кількісне визначення, таблетки, валідація, AGREE, аналітична еко-шкала, лікарські препарати.

## ANNOTATION

*Leleka L. H.* Development of spectrophotometric methods for the determination of hypoglycemic medications. – Qualifying scientific work as a manuscript.

Dissertation for obtaining the degree of Doctor of Philosophy in specialty 226 “Pharmacy, industrial pharmacy” (22 Health care). – Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Zaporizhzhia, 2023.

The dissertation is devoted to the development of sensitive, easy-to-implement and economical spectrophotometric methods for the quantitative determination of APIs, namely: metformin hydrochloride, gliclazide and

glibenclamide in hypoglycemic medicinal products of industrial production based on their reactions with color reagents and validation of the proposed methods.

In the course of the study, the methods of quantitative determination of the studied hypoglycemic medications and the use of color reagents (sulfophthalein dyes and quinone derivatives) in pharmaceutical analysis were analyzed, and it was established that the development of spectrophotometric methods for the quantitative determination of hypoglycemic medicinal substances using the specified color reagents in preparations is relevant.

Optimal conditions for the reaction of metformin hydrochloride with bromocresol green, gliclazide with bromocresol green, and glibenclamide with 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone were experimentally determined. To do this, the factors that affect the speed and completeness of these reactions were investigated, namely, the solvent, the amount of added reagent, the reaction time, temperature and heating time, and the stability of the studied solutions over time.

It was determined that the most optimal conditions for the reaction of metformin hydrochloride with bromocresol green are the interaction of 1.00 ml of a 0.001 M water-acetone solution of metformin hydrochloride, where the content of purified water is 1%, and 1.00 ml of a 1.4% solution of bromocresol green in acetone The reaction takes place at room temperature, the analytical wavelength at which the maximum light absorption is observed is 408 nm. The reaction product of the studied API with bromocresol green is stable for at least 30 min.

For the reaction of gliclazide and bromocresol green, the optimal conditions are the addition of 1.50 ml of a 0.04 M solution of bromocresol green in acetone to 1.00 ml of a 0.002 M acetone solution of gliclazide. The reaction takes place at room temperature, the analytical wavelength at which the maximum light absorption is observed is 411 nm. The reaction product of the studied API is stable for at least 30 min.

The optimal conditions for the reaction of glibenclamide with 2,3-dichloro-1,4-naphthaquinone are the addition of 1.00 ml of a 0.5% solution of 2,3-dichloro-1,4-naphthaquinone in DMF to 1.00 ml of a 0.004 M solution of glibenclamide in

DMF medium. The reaction proceeds when the reaction mixture is heated for 25 min at 95 °C, with the analytical wavelength at which the maximum light absorption is observed, at 411 nm. The reaction product of the studied API is stable for at least 1 hour.

The sensitivity indicators of the reaction of the studied hypoglycemic medicinal substances with bromocresol green and 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone were also established. To establish the sensitivity of the studied reactions, the following characteristics were calculated: molar absorption index, specific absorption, Sendel coefficient, and limiting concentration. High values of molar light absorption coefficients of $0.23 \cdot 10^4$–$1.94 \cdot 10^4$ and low values of limit concentrations of 0.43–11.0 μg/ml testify to the high sensitivity of the reactions between the studied medicinal substances and the corresponding reagents.

The stoichiometric coefficients of the reacting components were determined using the methods of isomolar series (continuous changes), molar ratios (saturation method), and the Starik-Barbanel method (relative yield). The stoichiometric ratios for all cases were 1:1.

According to the experimentally established optimal conditions for the course of the reactions of the investigated medicinal substances with the corresponding reagents, methods for the quantitative determination of the specified APIs in medicinal preparations of industrial production were developed. Quantitative determination was carried out within the limits of the concentration of medicinal substances in which subordination to the basic law of light absorption is observed. To determine the content of the investigated medicinal substances by spectrophotometric method, the standard method was used, which is based on the comparison of the optical density of the solution of the analyzed sample with the optical density of the working standard sample of the medicinal substance measured under the same conditions.

The next stage of the work was the validation of the developed methods for the quantitative determination of metformin hydrochloride and gliclazide by reaction with bromocresol green and glibenclamide by reaction with 2,3-dichloro-1,4-

naphthoquinone. According to the State Pharmacopoeia of Ukraine, the proposed methods were validated by such characteristics as specificity, linearity, limit of detection and limit of quantification, range of application, precision, correctness, and robustness.

The specificity of the investigated methods was determined using a direct approach. To determine the specificity using the direct method, model mixtures were made from auxiliary substances, to which the appropriate amount of the analyzed substance was subsequently added. Next, all stages of sample preparation were carried out in accordance with the developed methods, and the optical density of «placebo» solutions and comparison solutions containing the analyzed API was measured. According to the results in each case, the contribution of «placebo» to the total amount of background absorption was insignificant (0.04–0.32%), so the developed methods are specific.

To confirm that the proposed methods will give correct results in other laboratories, a forecast of complete uncertainty of the results of the analysis of the quantitative determination of the investigated medicinal substances was made. For this, the total uncertainty of the sample preparation and the total uncertainty of the analysis were calculated for each medicinal product. The obtained results of the analysis show that the predicted total uncertainty of the analysis results in each case does not exceed the critical value.

The linear dependence of the developed methods was established within the range of application of the proposed methods. To do this, the optical density of solutions of standard samples of the studied APIs was measured in the range of application of the methods (using at least 9-8 concentrations for each medicinal substance). According to the requirements of the SPhU, a graph of the linear dependence of the optical density on the concentration of the investigated medicinal substances was constructed and the parameters of the linear dependence were evaluated. The obtained data for the calculation of linearity parameters indicate that the linear dependence of the developed methods is confirmed in the selected concentration ranges of the studied substances.

In order to calculate the «safety margin» of the technique, i.e., to what extent the range of application of the technique exceeds its limit capabilities, detection limits and quantification limits were calculated. According to the results, the values of LOD and LOQ are significantly smaller than the lower limit of the concentration range, and therefore cannot affect the accuracy of the analysis.

The precision of the developed methods was established at the level of convergence and intra-laboratory precision.

To study convergence, nine parallel determinations were carried out for each drug in the range of application of the developed methods (three concentrations/three repetitions). In parallel, the optical density of the comparison solutions of the studied medicinal substances was measured. To evaluate the convergence, the following metrological characteristics were taken into account: average ($\bar{Z}$), standard deviation ($S_Z$ %), relative standard deviation ($\Delta_{\%}$), maximum permissible uncertainty $\Delta_{As}$ and criterion of the insignificance of systematic error ($\delta \leq \Delta_{\%}/3$). The calculated data show that the criterion of insignificance of the systematic error in each case does not exceed the maximum allowable uncertainty of the analysis, which indicates that the methods are accurate at the level of convergence.

The confidence interval of the results was used to assess intra-laboratory precision. The results obtained in different conditions did not exceed the maximum allowable uncertainty of the analysis method $\Delta_{As}$.

The correctness of the developed methods was established by the method of standard additives and model mixtures. The obtained and statistically calculated results testify to the correctness of the analysis results for the developed methods of quantitative spectrophotometric determination of the studied medicinal substances in the composition of medicinal forms of industrial production.

Robustness assessment was carried out at the stage of development of methods. To do this, we studied the factors that can affect the value of the optical density and the stability of the obtained solutions. Thus, for metformin and gliclazide with bromocresol green, fluctuations in the quantity of the added reagent, and stability of the studied solutions over time were studied. For glibenclamide with 2,3-

dichloro-1,4-naphthoquinone, the influence of the temperature and time of heating the reaction mixture, the amount of added reagents, and the stability of the obtained solutions over time were studied. The obtained results indicate that the tested solutions are stable for 30 minutes in the case of gliclazide and metformin hydrochloride, and 1 hour in the case of glibenclamide. It was established that minor fluctuations in the concentration of the reagent (within ±10%) do not significantly affect the value of the optical density values.

Therefore, according to the DPhU, the validation characteristics, such as linearity, precision, and correctness, were determined in the intervals of working concentrations, which were included in the minimum permissible limits of the range of application of methods of quantitative determination of the studied dosage forms.

To assess the impact of the developed methods on the environment, two methods were used: the eco-scale metric and the AGREE (Analytical GREEnness) tool. Based on the results of this assessment, the developed methods of quantitative spectrophotometric determination of metformin hydrochloride and gliclazide by reaction with bromocresol green are sufficiently ecological and meet the calculations as «excellent green analysis».

Therefore, the work shows an experimental solution to the scientific problem, which consists of the development and validation of spectrophotometric methods for the quantitative determination of hypoglycemic medicinal substances such as metformin hydrochloride, gliclazide, and glibenclamide based on their reactions with color reagents (sulfophthalein dyes and quinone derivatives) in the composition of industrially produced medicinal products.

*Key words:* API, metformin hydrochloride, gliclazide, glibenclamide, sulfophthalein dyes, bromocresol green, 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone, spectrophotometry, analysis, quantification, tablets, validation, AGREE, analytical eco-scale, medications.

*Список публікацій здобувача*

1. Leleka, L., Vasyuk, S. Spectrophotometric Method Development and Validation for Gliclazide Quantitation in Tablets. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*. 2022. Vol. 46, № 3. P 920-930. (Дисертант самостійно виконав експериментальну частину дослідження, підготовив статтю до друку).

2. Leleka, L. Vasyuk, S. Development of a Method for the Quantitative Determination of Glibenclamide in tablets. *Journal of Current issues in pharmacy and medicine: science and practice.* 2023. Vol. 16, № 2. P. 135-140. (Дисертант самостійно виконав експериментальну частину дослідження, підготовив статтю до друку).

3. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О. Спектрофотометричне визначення метформіну гідрохлориду в таблетках за реакцією з бромкрезоловим зеленим. *Фармацевтичний часопис.* 2023. № 2. С. 19–30. (Дисертант самостійно виконав експериментальну частину дослідження, підготовив статтю до друку).

4. Дем’янова, Л. Г., Бугайова В.В. Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення метформіну гідрохлориду в препараті «Метформін-Тева» *International scientific conference of young scientists and students "Perspectives for the development of biology, medicine and pharmacy"*, Shymkent, Republic of Kazakhstan, 10-11 Nov. 2020. Shymkent, 2020. Vol. 4. P. 135. (Дисертант провів експериментальну частину дослідження, підготовив та оформив тези).

5. Дем’янова, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення метформін гідрохлорид в препараті «Метформін Глюкофаж» *Міжнародна науково-практичноа конференція «PLANTA+*: Наука, практика та освіта», м. Київ. 19 лют. 2021 р. Київ, 2021. С. 74-75 (Дисертант провів експериментальну частину дослідження, підготовив та оформив тези).

6. Дем’янова, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення гліклазиду в лікарському препараті «Діаглізид» Фармак. *«Сучасні аспекти медицини та фармації – 2021»*: матеріали 81 Всеукраїнської наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю, м. Запоріжжя, 15-16 квіт. 2021 р. Запоріжжя, 2021. С. 141-142. (Дисертант провів експериментальну частину дослідження, підготовив та оформив тези).

7. Дем’янова, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення метформін гідрохлориду в лікарському препараті «Метформін Сандоз». *«Сучасні аспекти створення лікарських засобів»*: матеріали Міжнар. наук.-практ. дистанційної конф. присвяченої 100-річчю кафедри аналітичної хімії НФаУ, м. Харків, 16 квіт. 2021 р. Харків, 2021 С. 92. (Дисертант провів експериментальну частину дослідження, підготовив та оформив тези).

8. Дем’янова, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення гліклазиду в лікарському препараті «Діабетон». *LXIV підсумкова науково-практична конференція,* м. Тернопіль, 11 черв. 2021 р. Тернопіль, 2021. С. 145-146. (Дисертант провів експериментальну частину дослідження, підготовив та оформив тези).

9. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О. Спектрофотометричне визначення гліклазиду в лікарському препараті «Гліклада». *Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю*, м. Запоріжжя, 25-26 лист. 2021 р. Запоріжжя, 2021. С. 62. (Дисертант провів експериментальну частину дослідження, підготовив та оформив тези).

10. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення глібенкламіду в лікарському препараті «Глібенкламід Здоровья». *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів*: матеріали IX Наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Тернопіль, 22-23 вер.

2022 р. Тернопіль, 2022. С. 89-90. (Дисертант провів експериментальну частину дослідження, підготовив та оформив тези).

11. Спосіб кількісного спектрофотометричного визначення гліклазиду в таблетках: патент на корисну модель 150394 Україна. № 202105447; заявл. 27.09.2021; опубл. 09.02.2022, Бюл. № 6. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину, аналіз отриманих даних, оформив патент).

12. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення глібенкламіду в лікарському препараті «Манініл». *X Науково-практична конференція Школи молодих науковців АТ «Фармак»*., м. Київ, 27-28 жовт. 2022 р. Київ, 2022. С. 45-46. (Дисертант провів експериментальну частину дослідження, підготовив та оформив тези).

13. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення глібенкламіду в таблетках. *«Запорізький фармацевтичний форум - 2022»*: матеріали Всеукраїнської наук.-практ. конф., м. Запоріжжя, 17-18 лист. 2022 р. Запоріжжя, 2022. С. 57-58. (Дисертант провів експериментальну частину дослідження, підготовив та оформив тези).

14. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О., Дочинець Д. І. Розробка і валідація спектрофотометричнх методик кількісного визначення цукрознижувальних речовин в лікарських препаратах за реакцією з хінонами. *Безперервний професійний розвиток фармацевтичних працівників: сучасний стан, проблеми та перспективи*: матер. наук.-практ. конференції з міжнар. участю, присвяченої 30-річчю заснування Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету, м. Харків 1-2 лист. 2023 р. Харків, 2023. С. 232. (Дисертант провів експериментальну частину дослідження, підготовив та оформив тези).

15. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричних методик кількісного визначення цукрознижувальних

речовин в лікарських препаратах за реакцією із сульфофталеїнами. *«Запорізький фармацевтичний форум - 2023»*: матеріали Всеукраїнської наук.-практ. конф., м. Запоріжжя, 23-24 лист. 2023 р. Запоріжжя, 2023. С. 57-58. (Дисертант провів експериментальну частину дослідження, підготовив та оформив тези).

**ЗМІСТ**

АНОТАЦІЯ……... 2

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ……. 19

ВСТУП……... 20

РОЗДІЛ 1 МЕТОДИ КІЛЬКІСНОГО АНАЛІЗУ ГІПОГЛІКЕМІЧНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)……... 27

1.1 Загальна характеристика гіпоглікемічних лікарських засобів похідних бігуанідів та сульфонілсечовини ……. 27

1.2 Методи кількісного аналізу гіпоглікемічних лікарських засобів…….. 29

1.3 Застосування похідних сульфофталеїнових барвників та нафтохінонів у спектрофотометричному аналізі …….. 39

РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ, РЕАГЕНТИ, РОЗЧИННИКИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ …….. 44

2.1 Характеристика об'єктів дослідження …… 44

2.2 Розчинники, реагенти та обладнання …….. 48

2.3 Методи дослідження ……. 52

РОЗДІЛ 3 СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ГІПОГЛІКЕМІЧНИХ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ ……... 54

3.1 Вивчення оптимальних умов реакції взаємодії сульфофталеїнових барвників з метформіну гідрохлоридом… 54

3.2 Вивчення оптимальних умов реакції взаємодії сульфофталеїнових барвників з гліклазидом…….. 59

3.3 Визначення оптимальних умов реакції глібенкламіду з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном..…… 64

3.4 Встановлення показників чутливості реакцій……. 69

3.5 Визначення стехіометричних співвідношень реагуючих компонентів реакцій досліджуваних речовин з реагентами…. 71

Висновки до розділу 3…….. 79

РОЗДІЛ 4 РОЗРОБКА МЕТОДИК КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ГІПОГЛІКЕМІЧНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ЗА ЇХ РЕАКЦІЯМИ З КОЛЬОРОРЕАГЕНТАМИ……... 81

4.1 Визначення питомого показника поглинання продуктів реакції досліджуваних АФІ з реагентами …….. 81

4.2 Методики кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин у складі лікарських форм ……. 84

Висновки до розділу 4…….. 90

РОЗДІЛ 5 ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ГІПОГЛІКЕМІЧНИХ ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН …… 91

5.1 Специфічність……. 91

5.2 Прогноз повної невизначеності методики …….. 95

5.3 Лінійність…… 99

5.4 Діапазон застосування……... 103

5.5 Межа виявлення межакількісного виявлення…….. 103

5.6 Прецизійність……..…… 104

5.6.1 Збіжність……... 105

5.6.2 Внутрішньолабораторна прецизійність…… 106

5.7 Правильність……... 108

5.8 Робасність…… 111

5.9 Оцінка впливу розроблених методик на навколишнє середовище……. 114

Висновки до розділу 5…….. 118

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ…….. 119

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ……. 121

ДОДАТКИ……. 140

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт;

БКЗ – бромкрезоловий зелений;

БКП – бромкрезоловий пурпурний;

БТС – бромтимоловий синій;

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія;

ВЕТШХ – високоефективна тонкошарова хроматографія;

ДМСО – диметилсульфоксид;

ДМФА – диметилформамід;

ДФУ – Державна Фармакопея України;

ІЧ – інфрачервоний;

МВ – межа виявлення;

МКВ – межа кількісного визначення;

РСЗ – робочій стандартний зразок;

РХ-МС/МС – рідинна хромасографія-мас-мас-спектрометрія;

ТС – тимоловий синій;

ТШХ – тонкошарова хроматографія;

УФ – ультрафіолетовий;

ЦД – цукровий діабет;

ЯМР – ядерний магнітний резонанс.

# ВСТУП

## Обґрунтування вибору теми дослідження

В наш час спостерігається збільшення асортименту лікарських засобів, які використовуються практичною медициною для профілактики та лікування різноманітних захворювань. Для ефективного та безпечного застосування препаратів необхідно підвищувати вимоги до якості лікарських засобів шляхом розробки нових, а також удосконалення та уніфікації існуючих методів фармацевтичного аналізу. Одними з найбільш доступних та надійних є методи фотометричного аналізу. Серед методів спектрофотометричного аналізу високою вибірковістю, доступністю та простотою виконання характеризується спектрофотометрія у видимій області спектра. Загальною проблемою розвитку цього аналізу є пошук доступних, дешевих, достатньо селективних, високочутливих реагентів, оскільки існуючий асортимент кольорореагентів не завжди може використовуватись у кількісному спектрофотометричному аналізі лікарських засобів. У цьому зв’язку розширення існуючого асортименту органічних реагентів фотометричного аналізу та розробка простих у виконанні способів якісного та кількісного визначення лікарських речовин спектрофотометричними методами є актуальною проблемою фармацевтичної науки і практики.

Широке використання в сучасній медицині гіпоглікемічних препаратів обумовлює необхідність розробки нових селективних, чутливих та економічних методів кількісного визначення даних груп препаратів у лікарських формах та біологічних рідинах.

В літературі зустрічаються дані щодо аналізу гіпоглікемічних лікарських речовин такими методами як електрохімічні, хроматографічні: обернено-фазова високоефективна рідина хроматографія (Raza, A., 2022), спектрофотометричні: УФ-спектрофотометрія (Attimarad, M., 2021), методи капілярного електрофорезу (D. Patel, 2017) та інші. Автори звертають увагу на високу чутливість та селективність повідомлених методів, які не впливають на

навколишнє середовище. Але більшість розроблених методик потребують досить вартісного обладнання і матеріалів, вимагають роботи висококваліфікованих кадрів та забирають багато часу. Тому актуальним залишається створення ефективних, економічних і доступних для більшості лабораторій контролю якості методик аналізу лікарських засобів.

Таким чином, застосування в спектрофотометричному аналізі похідних хінону та сульфофталеїнових барвників ще більше розширить межі використання цього методу, дозволить проводити аналіз зазначених сполук експресно, економічно та з достатньою точністю.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами**

Дисертаційна робота виконана у відповідності до плану наукових досліджень Запорізького державного медико-фармацевтичного університету і є фрагментом тем «Застосування фізико-хімічних методів в аналізі лікарських речовин, похідних амінів, азолів та інших» (№ державної реєстрації 0116U005350) та «Застосування фізико-хімічних методів для визначення активних фармацевтичних інгридієнтів, що містять аміногрупу, фенольний гідроксил тощо» (№ державної реєстрації 0121U109395). Дисертантом особисто розроблені спектрофотометричні методики кількісного визначення таких АФІ як метформіну гідрохлорид, гліклазид і глібенкламід.

**Мета і завдання дослідження**

Метою роботи було розроблення чутливих, простих у виконанні та екологічних спектрофотометричних методик кількісного визначення гіпоглікемічних лікарських речовин в препаратах промислового виробництва на основі реакцій з кольорореагентами та валідація запропонованих методик.

Для досягнення поставленої мети вирішувались наступні задачі:

- провести огляд літературних та патентних джерел щодо кількісного визначення гіпоглікемічних лікарських засобів, а також використання сульфофталеїнових барвників і похідних хінону як кольорореагентів для кількісного визначення лікарських засобів;

- встановити оптимальні умови перебігу реакцій досліджуваних АФІ (метформіну гідрохлориду, гліклазиду, глібенкламіду) з сульфофталеїновими барвниками і похідними хінону та розрахувати аналітичні показники чутливості реакцій;
- встановити стехіометричні коефіцієнти співвідношень досліджуваних реакцій «лікарська речовина - реагент»
- розробити спектрофотометричні методики кількісного визначення досліджуваних гіпоглікемічних лікарських речовин у складі готових лікарських форм;
- визначити валідаційні характеристики розроблених спектрофотометричних методик кількісного визначення гіпоглікемічних лікарських речовин;
- оцінити вплив розроблених методик на навколишнє середовище;
- впровадити розроблені методики в науково-педагогічних процес закладів вищої освіти України та роботу Державної служби з лікарських засобів та контролю за наркотиками.

*Об'єкт дослідження:* розроблення та валідація спектрофотометричних методик кількісного аналізу АФІ гіпоглікемічної дії в лікарських препаратах промислового виробництва.

*Предмет дослідження:* АФІ (метформіну гідрохлориду, гліклазиду, глібенкламіду), лікарські препарати промислового виробництва, кольорорегенти.

**Методи дослідження**

Кількісне визначення гіпоглікемічних лікарських засобів проводили методом абсорбційної спектрофотометрії у видимій області спектра, враховуючи вимоги статті ДФУ «Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій і видимій областях». Для спектрофотометричного аналізу використовували прилад «Specord-200». Для обробки одержаних спектрів застосовували програмний пакет WinASPECT 2.2.1.0. Стехіометричні співвідношення компонентів реакційної суміші визначали такими методами як

метод неперервних змін (метод ізомолярних серій), метод насичення (метод молярних співвідношень) та метод відносного виходу (метод Старіка-Барбанеля). Одержані результати кількісного визначення досліджуваних АФІ у складі лікарських форм статистично обробляли відповідно до вимог загальної статті ДФУ, 5.3.N.1 «Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту». Для обрахунку результатів використовували програмне забезпечення Microsoft Excel 2019. Для оцінки придатності розроблених методик була проведена валідація відповідно до вимог ДФУ, 5.3.N.2 «Валідація аналітичних методик і випробувань». Для оцінки екологічності аналітичних процедур використовували аналітичний калькулятор AGREE (Analytical GREEnness) та аналітичну еко-шкалу.

**Наукова новизна отриманих результатів**

Вперше експериментально доведено та науково обґрунтовано можливість застосування бромкрезолового зеленого і 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону в практиці фармацевтичного аналізу для кількісного визначення гіпоглікемічних лікарських речовин: метформіну гідрохлориду, гліклазиду і глібенкламіду.

Вперше встановлено оптимальні умови перебігу реакцій взаємодії вказаних вище кольорореагентів з гіпоглікемічними лікарськими засобами, а саме БКЗ з метформіну гідрохлоридом та гліклазидом, 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону з глібенкламідом.

Визначено коефіцієнти стехіометричних співвідношень досліджуваних реакцій «АФІ – реагент».

Розроблено оригінальні методики кількісного спектрофотометричного визначення метформіну гідрохлориду, гліклазиду та глібенкламіду у складі 10 лікарських засобів промислового виробництва, визначено валідаційні характеристики, що доводять правильність запропонованих методик.

Наукова новизна дисертаційної роботи підтверджена 1 патентом України на корисну модель (№ 150394) (дод. Ж).

**Практичне значення отриманих результатів**

Розширено можливості кількісного спектрофотометричного аналізу лікарських речовин. Розроблено та валідовано нові, високочутливі, швидкі та прості у виконані методики кількісного визначення 3 досліджуваних лікарських речовин групи гіпоглікемічних засобів у складі 10 лікарських форм промислового виробництва.

Використовуючи аналітичний калькулятор AGREE (Analytical GREEnness) та аналітичну еко-шкалу оцінено вплив розроблених спектрофотометричних методик кількісного визначення досліджуваних АФІ на навколишнє середовище. Встановлено, що розроблені методики відповідають за еко-шкалою, як «відмінний зелений аналіз»

Розроблені методики кількісного визначення метформіну і глібенкламіду в таблетках впроваджено в роботу Державної служби з лікарських засобів та контролю за наркотиками Запорізької області (акти впровадження від 9.11.2023) (дод. В.1, В.2),

Результати досліджень знайшли застосування в науково-педагогічному процесі на кафедрах фармацевтичних факультетів Запорізького державного медико-фармацевтичного університету (дод. Д.1, Д.2, Д.3, Д.4), Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (дод. Д.5), Національного фармацевтичного університету (м. Харків) (дод. Д.6), Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського (дод. Д.7).

**Особистий внесок здобувача**

Здобувачем особисто вивчено, проаналізовано та узагальнено дані літератури з питань, що стосуються теми дисертації. Виконано експериментальну частину дисертаційної роботи на базі Науково-навчального медико-лабораторного центру Запорізького державного медико-фармацевтичного університету, проведено графічну та статистичну обробку одержаних результатів, написано всі розділи дисертаційної роботи, сформульовано висновки та запропоновано практичні рекомендації.

Постановку мети і завдань, обговорення результатів дослідження проведено з науковим керівником.

**Апробація матеріалів дисертації**

Основні результати досліджень доповідалися та обговорювалися на International scientific conference of young scientists and students «Perspectives for the development of biology, medicine and pharmacy» (Shymkent, Republic of Kazakhstan, 2020), Міжнародній науково-практичній конференції «PLANTA+. Наука, практика та освіта», (Київ, 2021), 81 Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини та фармації – 2021» (Запоріжжя, 2021), Міжнародній науково-практичній дистанційній конференції "Сучасні аспекти створення лікарських засобів", присвячена 100-річчю кафедри аналітичної хімії НФаУ (Харків, 2021), LXIV підсумковій науково-практичній конференції (Тернопіль, 2021), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю (Запоріжжя, 2021), IX Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 2022), X Науково-практичній конференції Школи молодих науковців АТ «Фармак» (Київ, 2022), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Запорізький фармацевтичний форум – 2022» (Запоріжжя, 2022), Науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченої 30-річчю заснування Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету (Харків, 2023), Всеукраїнській науково-практичній конференції. «Запорізький фармацевтичний форум - 2023» (Запоріжжя, 2023).

Апробацію роботи проведено 1 грудня 2023 року на спільному засіданні професорсько-викладацького складу кафедр фармацевтичного профілю Запорізького державного медико-фармацевтичного університету.

**Публікації**

За матеріалами дисертації опубліковано 15 наукові праці, у тому числі – 3 статті у наукових фахових виданнях, серед яких – 1 стаття у виданні, включеному до міжнародної наукометричної бази Scopus, 1 патент України на корисну модель, 11 тез доповідей.

**Структура та обсяг дисертації**

Дисертаційна робота викладена на 154 сторінках машинописного тексту, складається з анотації, вступу, огляду літератури, п’яти розділів, висновків, списку використаних джерел та 8 додатків. Обсяг основного тексту складає 118 сторінок, робота проілюстрована 20 таблицями, 28 рисунками. Список використаних джерел містить 141 найменувань, в тому числі 110 – латиною.

# РОЗДІЛ 1
# МЕТОДИ КІЛЬКІСНОГО АНАЛІЗУ ГІПОГЛІКЕМІЧНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ
## (огляд літератури)

### 1.1 Загальна характеристика гіпоглікемічних лікарських засобів, похідних бігуанідів та сульфонілсечовини

Цукровий діабет – це група метаболічних захворювань, які характеризуються гіперглікемією, що виникає внаслідок дефекту секреції або дії інсуліну. Розрізняють такі види цукрового діабету, як ЦД 1-го типу, ЦД 2-го типу, ЦД-відомої етіології та гестаційний діабет або діабет вагітних.

Найпоширенішими типом є ЦД 2-го типу, який зумовлений поступовим порушенням секреції інсуліну в умовах інсулінорезистентності. ЦД може бути генетично обумовленим (полігенне успадкування), однак ключову роль відіграють фактори середовища (ожиріння та низька фізична активність)[1].

Сьогодні діабет 2 типу став не просто хворобою, а й способом життя багатьох людей. З моменту розробки перших методів лікування ЦД 2-го 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) [2].

Для лікування ЦД 2-го типу дуже широко використовують похідні бігуанідів та сульфонілсечовини.

Метформін (metformin) є похідним бігуаніном і діє як інсуліносенсибілізуючий агент, ймовірно, шляхом активації аденозинмонофосфатзалежної кінази в печінці та м’язовій тканині [3]. Його широко використовують вже понад 60 років, і було доведено, що він безпечний навіть при тривалому застосуванні та має низьку вартість. Його

використовують для лікування ЦД 2-го типу на ранніх стадіях завдяки його здатності знижувати рівень глюкози в плазмі. Дослідження також показали, що метформіну гідрохлорид може бути корисним при різних захворюваннях (рак, ожиріння, захворювання печінки, серцево-судинні захворювання та захворювання нирок) і навіть старінні [4,5].

Сульфонілсечовини є заміщеними арилсульфонілсечовинами, їх відмінності полягають у типах заміщень на двох кінцях молекули. Похідні сульфонілсечовини знижують рівень глюкози в крові за рахунок збільшення секреції інсуліну бета-клітинами підшлункової залози. Вони також можуть проявляти інші позапанкреатичні гіпоглікемічні дії, важливі під час тривалої терапії.

Похідні сульфонілсечовини другого покоління (глібенкламід, гліклазид, гліпізид і глімепірид) значною мірою замінили препарати першого покоління в рутинному застосуванні, оскільки вони є сильнішими, їх можна вводити в менших дозах і давати один раз на день [6].

Гліклазид знижує рівень глюкози в крові шляхом коригування як неповноцінної секреції інсуліну, так і периферичної інсулінорезистентності, підвищуючи чутливість β-клітин до глюкози, знижуючи вироблення глюкози печінкою і збільшуючи кліренс глюкози. Він також має антитромбоцитарну адгезивну активність і знижує рівень вільних радикалів, тим самим запобігаючи судинним ускладненням. Також повідомлялося про зниження рівня холестерину та тригліцеридів у плазмі крові після багаторазового уведення [6].

Глібенкламід чинить гіпоглікемізуючу дію як у хворих на цукровий діабет II типу, так і у здорових людей, оскільки він підвищує секрецію інсуліну β-клітинами підшлункової залози за рахунок їх стимуляції. Ця дія залежить від концентрації глюкози в середовищі, що оточує β-клітини [6].

## 1.2 Методи кількісного аналізу гіпоглікемічних лікарських засобів

Згідно з Державною фармакопеєю України [9] кількісне визначення метформіну в субстанції проводять методом неводного титрування. Для цього наважку лікарської речовини розчиняють у мурашиній кислоті, додають ацетонітрил і титрують розчином хлорної кислоти з потенціометричним визначенням точки еквівалентності. Аналогічно визначають субстанцію метформіну гідрохлориду за Британською фармакопеєю [10]. Для визначення метформіну гідрохлориду в таблетках ДФУ рекомендує метод абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій області при довжині хвилі 232 нм [11].

Згідно з Європейською фармакопеєю [12] і фармакопеєю США [13] визначення гліклазиду проводять також методом неводного титрування з потенціометричним фіксуванням точки еквівалентності. Для цього розчиняють 0,250 г гліклазиду в 50 мл безводної оцтової кислоти і титрують 0,1 М перхлоратною кислотою.

Для кількісного визначення субстанції глібенкламіду ДФУ пропонує алкаліметричне титрування. 0,400 г субстанції розчиняють при нагріванні у 1,00 мл 96% спирту і титрують 0,1 М розчином натрію гідроксиду до рожевого забарвлення, використовуючи як індикатор 1,0 мл розчину фенолфталеїну [9].

В літературі дуже часто для кількісного визначення гіпоглікемічних лікарських речовин в лікарських препаратах та біологічних рідинах пропонуються методи хроматографії, абсорбційної спектрофотометрії в УФ і видимій областях спектра.

Найчастіше гіпоглікемічні лікарські речовини у таблетках і біологічних рідинах визначають методом тонкошарової хроматографії з денситометрією, високоефективної тонкошарової хроматографії, рідинної хроматографіїї, рідинної хроматографії з оберненою фазою, тандемної рідинної хроматографії з мас-спектрометрією, комбіновані методи ВЕРХ зі спектрофотометрією, спектрофотометричні методи [14–27].

Наприклад Бугайова В. В. запропонувала спектрофотометричний метод визначення метформіну в таблетках у видимій області спектра за реакцією з бромтимоловим синім [28]. Аліквоту водно-ацетонового (1:50) розчину порошка розтертих таблеток метформіну обробляють ацетоновим розчином бромтимолового синього і вимірюють оптичну густину забарвленого продукту при 404 нм.

У дослідженні Sabbagh В. А. та співавторів описано визначення метформіну в таблетках з фіксованою комбінацією за допомогою інфрачервоної Фур'є-спектроскопії з ослабленим повним відбиттям (ATR-FTIR) [29].

Castro R. зі співавторами розробили методику визначення метформіну, поєднавши поверхнево-розширену раманівську спектроскопію з хемометрією з використанням наночастинок золота як субстрату [30].

Rashtbari S. et al. [31] запропонували флуорометричне визначення метформіну у зразках сироватки крові. Для аналізу метформіну використовували флуорометричну систему виявлення, яка заснована на реакції терефталевої кислоти з наношаровим оксидом марганцю та кальцію.

Відоме визначення метформіну в таблетованій формі індикаторним методом капілярного електрофорезу [32].

У роботі Hegazy M. A одночасно описано дві спектрофотометричні методики для визначення метформіну гідрохлориду, піоглітазону гідрохлориду і продукту розпаду піоглітазонової кислоти. Авторами були розроблені похідні відношення, ізобестичні та хемометричні спектрофотометричні методи [33].

Shankar M. B. зі співавторами запропонували дві прості і точні методики для визначення піоглітазону гідрохлориду і метформіну гідрохлориду у комбінованих лікарських формах із застосуванням спектрофотометрії за другою похідною та обернено-фазової рідинної хроматографії. Піоглітазону гідрохлориду та метформіну гідрохлориду у комбінованих препаратах (таблетки) кількісно визначали за відповідними довжинами хвилі при 227,55

нм для піоглітазону гідрохлориду та 257,25 нм для метформіну гідрохлориду у спектрах їх розчинів у суміші метанолу та ацетонітрилу (30 + 70) [34].

Для кількісного визначення глібуриду (глібенкламіду), його п’яти метаболітів і метформіну в плазмі та сечі вагітних пацієнтів, які отримують комбінацію двох препаратів, була розроблена та валідована методика із застосуванням рідинної хроматографії/мас-спектрометрії [35]. Поєднання рідинноїї хроматографії з мас-спектрометрією було застосоване для визначення метформіну і ситагліптину в зразках сухої плями крові, що проводилось для моніторингу пацієнтів [36].

Науковці [37] описали просту, швидку і надійну високопродуктивну методику для одночасного аналізу метформіну та ситагліптину з висушених зразків крові миші та людини з використанням термічної десорбції на лазерному діоді в поєднанні з тандемною мас-спектрометрією з хімічною іонізацією при атмосферному тиску, яка була розроблена для використання у фармацевтичному середовищі як альтернатива традиційному аналізу плазми.

Автори [38] розробили спеціальну методику ВЕРХ для кількісного визначення канагліфлозину та метформіну з їх домішками. Розділення було досягнуто за допомогою ацетону:етилацетату:оцтової кислоти (8:2:0,2 за об'ємом) як скануючих елюованих смуг при 205 нм. В роботі також зроблена оцінка впливу аналізу на навколишнє середовище трьома підходами оцінки зеленості: аналітична екологічна шкала, індекс зелених аналітичних процедур і підхід до метрики зеленості.

Чутливий і селективний метод рідинної хроматографії-мас-спектрометрії було застосовано для визначення гліклазиду в плазмі людини. Метод був успішно апробований для оцінки фармакокінетичних профілів таблеток пролонгованого вивільнення гліклазиду у 18 здорових добровольців [39].

Відомим є метод обернено-фазової ВЕРХ, який був розроблений і валідований для швидкого аналізу гліклазиду у фармацевтичній лікарській формі [40].

За допомогою високоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою автори розробили просту, ефективну і відтворювану методику одночасного визначення метформіну та гліклазиду в таблетках [41].

Krzek J. зі співавторами створили умови для ідентифікації та кількісного визначення гліклазиду у фармацевтичних препаратах за допомогою капілярної газової хроматографії з полум'яно-іонізаційним детектуванням та холодним уведенням у колонку [42].

Для кількісного визначення гліклазиду та його трьох потенційних домішок науковці застосували точний, простий і швидкий метод ультраефективної рідинної хроматографії [43].

Wang, X. створив експериментальну методику визначення вмісту гліклазиду методом $^{1}$H-ЯМР з диметилтерефталатом, як внутрішньою стандартною речовиною, та дейтерованим хлороформом, як розчинником. Параметри проведення дослідження були встановлені за допомогою стандартної речовини гліклазиду та диметилтерефталату на спектрометрі ядерного магнітного резонансу [44].

Для одночасного визначення гліклазиду і моногідрату фосфату ситагліптину у лікарській формі [45] запропоновано УФ-спектрофотометричний метод. Також спектрофотометричний метод застосовувся для визначення вмісту гліклазиду in bulk і лікарських формах [46].

Samina A. J. et al. розробили УФ-спектрофотометричну методику для одночасної оцінки вмісту гліклазиду і моногідрату фосфату ситагліптину в модельній суміші та лікарській формі. Як розчинник застосвувався метанол, а максимуми поглинання для гліклазиду і моногідрату фосфату ситагліптину становили 226 нм і 267 нм відповідно [47].

Jeha B. зі співавторами описав спектрофотометричне визначення гліклазиду in bulk та фармацевтичній формі з використанням натрієвої солі 1,2-нафтохінон-4-сульфонової кислоти [48].

Науковці [49] розробили методику із застосуванням міцелярної електрокінетичної хроматографії, яка характеризується відтворюваністю, для визначення гліклазиду та його двох домішок (гліклазиду B та F) у модельних сумішах та таблетках.

Для одночасного кількісного визначення гліклазиду та ципрофлоксацину в зразку плазми [50] було розроблено та валідовано просту та надійну ВЕРХ методику. Визначення гліклазиду в плазмі людини [51] також було проведено методом ізократичної обернено-фазової ВЕРХ з УФ-детектором з використанням монолітної колонки. Дана методика була валідована і характеризувалась високою чутливістю.

Park J. Y. з командою запропонували ВЕРХ методику кількісного визначення гліклазиду в зразках плазми [52], яка використовувалась для вивчення фармакокінетики АФІ.

У роботі [53] одночасно визначено два добре відомі пероральні гіпоглікемічні препарати, які призначають у комбінації хворим на цукровий діабет II типу. Для визначення метформіну гідрохлориду, піоглітазону гідрохлориду і розпаду піоглітазонової кислоти було розроблено та перевірено декілька спектрофотометричних методів. Були запропоновані похідні відношення, ізобестичні та хемометричні спектрофотометричні методи.

Rouini M. R. описав простий, швидкий і специфічний метод аналізу гліклазиду в сироватці за допомогою чутливого ВЕРХ методу. Для цього використовували процедуру екстракції толуолом з наступним випаровуванням насухо під потоком повітря та розчиненням висушеного залишку в мобільному пристрої [54].

У дослідженні [55] високофлуоресцентні вуглецеві квантові точки (S,N-CQD), доповані сіркою та азотом, використовувалися як флуоресцентні наносенсори для прямої спектрофлуориметричної оцінки гліклазиду і саксагліптину без будь-яких етапів попередньої дериватизації. S,N-CQD були синтезовані за допомогою простої гідротермальної техніки з використанням лимонної кислоти та тіосемікарбазиду. Вироблені S,N-CQD були

охарактеризовані за допомогою різних методів, включаючи флуоресцентну емісійну спектроскопію, УФ-спектрофотометрію, трансмісійну електронну мікроскопію високої роздільної здатності та ІЧ-Фур'є спектроскопію.

Автори [56] повідомляють про одночасне визначення метформіну гідрохлориду і гліклазиду у фармацевтичних препаратах хемометричними методами з використанням УФ-спектрофотометрії. Спектри метформіну гідрохлориду і гліклазиду були записані при кількох концентраціях в їх лінійних діапазонах між довжинами хвиль від 200 нм до 400 нм у фосфатному буфері з pH 6,8.

В літературі описаний ефективний і простий метод ВЕРХ для одночасного визначення гліклазиду та метформіну гідрохлориду в модельній суміші та лікарських препаратів метформіну та гліклазиду [57].

Методика обернено-фазової рідинної хроматографії була застосована для одночасного визначення перорального протидіабетичного засобу метформіну гідрохлориду з деякими пероральними протидіабетичними препаратами різних фармакологічних класів, що зазвичай застосовуються одночасно: гліпізид, піоглітазону гідрохлорид, глімепірид і репаглінід – у субстанції, виготовлених в лабораторії сумішах та фармацевтичних препаратах в присутності домішок, зареєстрованих метформіном [1-ціаногуанідин]. УФ-детектування проводили при 220 нм [58].

Метод міцелярної електрокінетичної хроматографії також використовують для визначення гліклазиду та його визначених домішок (домішок гліклазиду B та F) у субстанції та таблетках [59].

Описаний метод кількісного визначення 11 протидіабетичних препаратів (натеглінід, піоглітазону гідрохлорид, гліквідон, гліклазид, гліпізид, глібенкламід, метформіну гідрохлорид, репаглінід, фенформіну гідрохлорид, розиглітазону гідрохлорид, глімепірид) за допомогою ультраефективної рідинної хроматографії з мас-спектрометрією [60].

Також застосовують капілярно-зонний електрофоретичний метод із детектуванням фотодіодної матриці для аналізів загальнопризначених

протидіабетичних препаратів (метформіну, глібенкламіду та гліклазиду) у 13 зразках, включаючи субстанцію, монопрепарати та комбіновані таблетки [61].

Авторами [62] досліджено ТШХ-денситометрію для визначення сумішей метформіну гідрохлориду та глібенкламіду в таблетованих лікарських формах.

Для кількісного визначення глібенкламіду, розиглітазону малеату і метформіну гідрохлориду в комбінованій лікарській формі автори пропонують метод на основі ВЕТШХ з УФ-детектором [63].

Науковцями розроблено метод обеонено-фазової рідинної хроматографії для одночасного визначення метформіну гідрохлориду з деякими пероральними протидіабетичними засобами, а саме; ситагліптину фосфат, піоглітазону гідрохлорид, гліклазид, глібенкламід і репаглінід. Хроматографічне розділення автори проводили в режимі градієнтного елюювання ацетонітрилом: 0,05 М дигідрофосфат калію і 0,01 М октансульфонат натрію (pH 3,55) при швидкості потоку 0,85 мл/хв на Kromasil 100-C18, (30 × 0,4). см, 10 мкм) при 40°C. УФ-детектування проводили при 220 нм [64].

У статті [65] описано розробку методів твердофазної екстракції та ВЕРХ для одночасного визначення метформіну та гліпізиду, гліклазиду, глібенкламіду або глімепіриду в плазмі.

Havele S. розробив методику ВЕРХ для одночасного визначення вмісту метформіну гідрохлориду, розиглітазону малеату та глібенкламіду в багатокомпонентних лікарських формах [66].

В літературі описаний метод ВЕРХ з тандемною мас-спектрометрією для визначення глібенкламіду в зразках плазми [67].

Одночасне визначення глібенкламіду та ліпоєвої кислоти проведено методом ВЕРХ [68].

Методику ВЕРХ з оберненою фазою розроблено для одночасного визначення метформіну, піоглітазону та глібенкламіду в таблетках з використанням гліклазиду як внутрішнього стандарту [69].

Tengli A. зі співавторами було розроблено обернено-фазову ВЕРХ методику для швидкого аналізу глібенкламіду в субстанції та таблетках [70]. Доведена безпечність зазначеної методики для навколишнього середовища

Метою дослідження [71] була розробка простих та експресних методик визначення метформіну та глібенкламіду у фармацевтичній лікарській формі. Авторами використовувались методи ВЕРХ, першої та другої похідної спектрофотометрії.

Для одночасної оцінки комбінації, яку часто призначають при діабеті (метформін плюс глібенкламід) була розроблена і валідована методика ВЕРХ. Методика застосовувалась для визначення зазначених компонентів у плазмі крові людини [72].

У роботі [73] описане одночасне спектрофотометричне визначення метформіну гідрохлориду та глібенкламіду у бінарних сумішах без попередньої хімічної обробки.

Antakli S. запропонував спектрофотометричну методику для визначення глібенкламіду при λmax = 300 нм та застосував спектрофотометрію методом першої похідної для визначення глібенкламіду у присутності метформіну гідрохлориду [74].

Розроблено спектрофотометричну методику для одночасного визначення глібенкламіду та метформіну гідрохлориду у комбінованій лікарській формі при довжинах хвиль 229,5 нм і 237 нм в середовищі метанолу [75].

Спектрофлуорометричне визначення метформіну гідрохлориду та глібенкламіду проведене в їхній бінарній суміші без попереднього розділення. Запропонована методика заснована на вимірюванні інтенсивності нативної флуоресценції глібенкламіду при $\lambda_{емісії}$ = 348 нм, після збудження при $\lambda_{збудження}$ = 226 нм і вимірюванні інтенсивності флуоресценції флуоресцентного продукту, отриманого в результаті дериватізації метформіну гідрохлориду з використанням 9,10-фенантрахінону в лужному середовищі при $\lambda_{емісії}$ = 416 нм після збудження при $\lambda_{збудження}$ = 240 нм [76].

Для визначення сульфонілсечовин застосовувався імуноферментний аналіз [77-79]; межі виявлення коливалися від 0,02 до 1,0 нг/мл.

У роботі [80] пропонується простий метод одночасного визначення двох антидіабетичних сполук, метформіну та глімепіриду, за допомогою надвисокопродуктивної рідинної хроматографії з використанням квадрупольної часпрольотної мас-спектрометрії з іонізацією електророзпиленням.

Метод обернено-фазової ВЕРХ був розроблений групою вчених для одночасного визначення метформіну гідрохлориду, піоглітазону і глімепіриду у їхніх комбінованих лікарських формах та плазмі людини [81].

Відомий метод ВЕРХ з оберненою фазою для одночасного визначення метформіну гідрохлориду, піоглітазону гідрохлориду і глімепіриду, присутніх у багатокомпонентних лікарських формах [82].

Автори [83] розробили дві методики аналізу для визначення піоглітазону гідрохлориду і метформіну гідрохлориду в комбінованих лікарських формах за допомогою спектрофотометрії з другою похідною та обернено-фазової рідинної хроматографії.

Ahmed R. розробив метод обернено-фазової ВЕРХ з УФ-детектором для одночасного визначення метформіну гідрохлориду і глімепіриду в таблетованій лікарській формі різних фармацевтичних компаній [84].

Для визначення суміші глімепіриду та метформіну гідрохлориду у чистому вигляді та в таблетках була розроблена проста методика селективного висолювання та визначення стабільності тонкошарової хроматографії [85].

Для одночасного визначення двох пероральних гіпоглікемічних препаратів, дапагліфлозину і метформіну у субстанції, таблетках і зразках людської плазми запропонована ТШХ [86].

Чотирі пероральні антидіабетичні препарати, а саме, метформін, лінагліптин, емпагліфлозин і дапагліфлозин оцінювали методом ТШХ-спектроденситометрії [87].

Ayoub B. M. застосував метод РХ-МС/МС для визначення емпагліфлозину та метформіну [88] та однофакторний спектрофотометричний метод і багатофакторний хемометричний підхід для одночасного визначення емпагліфлозину та метформіну у фармацевтичному препараті [89].

В літературі описані різні методи (нормований УФ-спектрофотометричний метод та хемометричний спектрофотометричний метод) для визначення нових комбінованих гіпоглікемічних препаратів у їхніх лікарських формах [90].

Vankalapati K. R. була застосована УВЕРХ з оберненою фазою для оцінки комбінації метформіну, лінагліптину та емпагліфлозину в модельних сумішах та таблетках [91]. Цим же автором для оцінки комбінації метформіну, дапагліфлозину і саксагліптину в таблетованих лікарських формах була розроблена і валідована методика ВЕРХ із зворотною фазою [92].

Для одночасного визначення метформіну гідрохлориду і вілдагліптину у лікарських формах розроблено просту, точну ВЕРХ методику [93]. Описане одночасне визначення вмісту тенеліглiптину та метформіну в таблетованій лікарській формі методом обернено-фазової ВЕРХ [94].

Описаний багатоцільовий метод ВЕРХ із зворотною фазою для синхронної оцінки кількох комбінованих фармацевтичних лікарських форм метформіну гідрохлориду [95].

Автори [96] провели удосконалення широко використованного методу рідинної хроматографії-тандемної мас-спектрометрії для визначення метформіну і глібуриду (глібенкламіду).

Ma J. зі співавторами розробили та перевірили метод рідинної хроматографії та тандемної мас-спектрометрії для виявлення та кількісного визначення 14 препаратів проти діабету, 2 препаратів проти ожиріння та 3 препаратів для зниження рівня холестерину в рослинних дієтичних добавках, які продаються для контролю рівня цукру в крові [97].

Дослідження [98] було проведено для валідації ВЕРХ методики для визначення споріднених речовин гліклазиду.

Attimarad M. зі співавторами розробили три екологічні маніпуляційні УФ-спектроскопічні методики для одночасного кількісного визначення таблеток ремогліфлозину етабонату і метформіну з використанням води як розчинника [99].

Не дивлячись на досить високу чутливість та селективність заявлених методів, більшість із них потребує дуже вартісного обладнання та матеріалів.

## 1.3 Застосування похідних сульфофталеїнових барвників та нафтохінонів у спектрофотометричному аналізі

Похідні сульфофталеїнових барвників та нафтохінонів дуже широко використовуються в спектрофотометричному аналізі як кольорореагенти.

Жук Ю. М. для визначення атенололу використовувала сульфофталеїновий барвник бромтимоловий синій. Реакція перебігала в середовищі ацетону з утворенням жовтого продукту реакції з максимумом поглинання при 402 нм [100].

Для спектрофотометеричного визначення метопрололу в таблетках автори застосовують бромфеноловий синій в ацетоновому середовищі. Вимірювання оптичної густини забарвленого продукту проводилось при довжині хвилі 624 нм [101].

Загородній С. Л. [102] розробив нову спектрофотометричну методику кількісного визначення мебгідроліну на основі його взаємодії з бромтимоловим синім у середовищі хлороформу з утворенням іон-парного комплексу з максимумом поглинання за довжини хвилі 412 нм.

У статті [103] описано спектрофотометричну методику кількісного визначення адемололу. Були вивчені оптимальні умови перебігу реакції «адемол-бромкрезоловий зелений». Оптичну густину досліджуваного розчину вимірювали при 410 нм.

Nguyen T. було створено спектрофотометричну методику визначення німодипіну у фармацевтичних препаратах. Методика заснована на утворенні

жовтого іонно-парного комплексу між відновленим німодипіном і бромтимоловим синім в кислому середовищі. Довжина хвилі, при якій вимірювали оптичну густину, становила 414,5 нм [104].

Donchenko A. зі співавторами розробили та валідували спектрофотометричну методику без екстракції для кількісного визначення мелоксикаму на основі реакції з бромтимоловим синім. Розроблений метод базувався на утворенні забарвленого продукту реакції між мелоксикамом і бромтимоловим синім в ацетоновому середовищі з максимумом поглинання при 348 нм [105].

Наступна робота [106] описує розроблену спектрофотометричну методику кількісного визначення бісопрололу фумарату з тимоловим синім у середовищі хлороформу з утворенням забарвленого продукту реакції з максимумом світлопоглинання при 420 нм. Також науковцями були виділені і досліджені продукти реакції. Було доведено, що продуктом реакції між зазначеною лікарською речовиною та відповідним сульфофталеїновим барвником є іонний асоціат.

Автори [107] експериментальним шляхом встановили, що БКЗ реагує з тербінафіном у середовищі ацетону при кімнатній температурі з утворенням забарвленого продукту жовтого кольору з максимумом світлопоглинання при 410 нм.

Сулимою М. зі співавторами було виділено та ідентифіковано продукт взаємодії верапамілу гідрохлориду з бромкрезоловим зеленим методами ІЧ-спектрофотометрії та $H^1$ ЯМР спектроскопії і встановлено, що верапамілу гідрохлорид взаємодіє з бромкрезоловим зеленим у середовищі ацетону з утворенням йонного асоціату (рис. 1.1) [108].

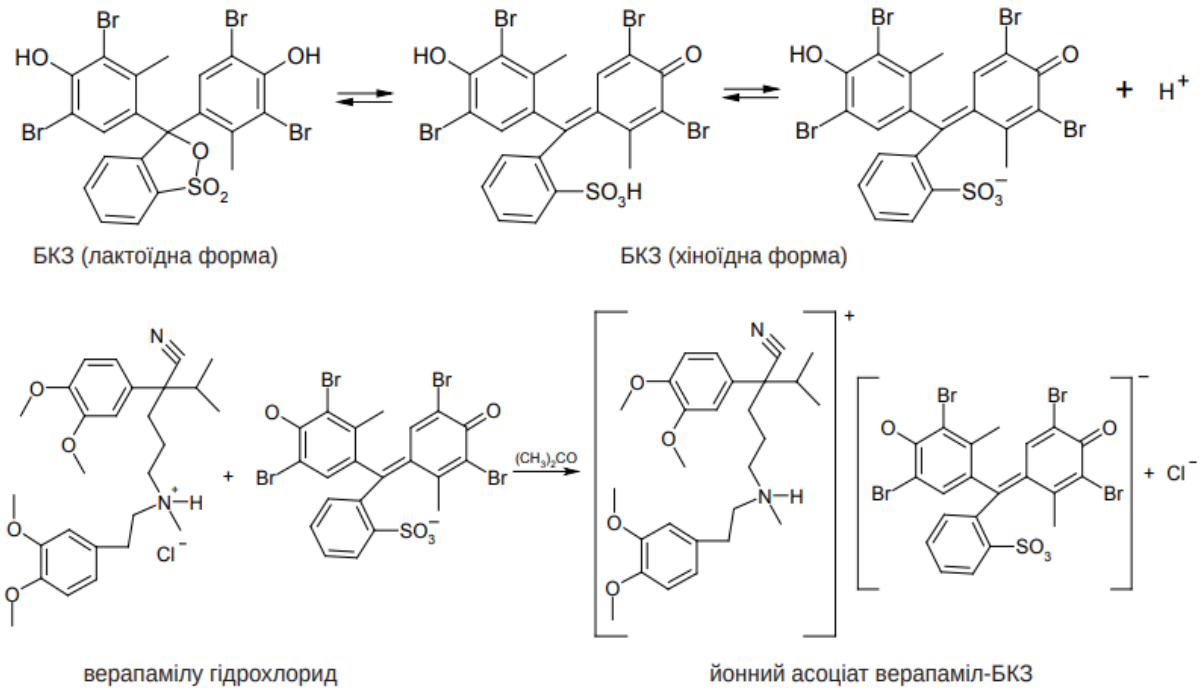



Рис. 1.1. Схема взаємодії верапамілу гідрохлориду з БКЗ

Описана методика кількісного визначення гліцину методом абсорбційної спектрофотометрії в видимій області спектра, за реакцією з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном в середовищі ДМФА. Дослідження проводили на 4 лікарських препаратах. Аналітична довжина хвилі, при якій спостерігалось максимальне значення оптичної густини, дорівнювала 470 нм [109].

Науковці у стінах Запорізького державного медичного університету розробили спектрофотометричну методику визначення атенололу із застосуванням 2.3-дихлор-1,4-нафтохінону в середовищі ДМФА з утворенням забарвленого продукту реакції з максимумом поглинання при 493 нм [110].

Мєдвєдєва К. зі співавторами розробили спектрофотометричні методики аналізу ацетилцистеїну та стрептоміцину сульфату за реакцією з похідними хінону: натрій 1,2-нафтохіноном-4-сульфонатом та 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном. Реакція стрептоміцину з 1,2-нафтохіноном-4-сульфонатом перебігала в лужному середовищі з утворенням забарвленого продукту з максимумом абсорбції при 560 нм. Реакція 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону з

ацетилцистеїном перебігала в середовищі ДМФА з максимумом абсорбції при 425 нм [111].

Описаний чутливий, швидкий і економічний спектрофотометричний метод, заснований на їх взаємодії клотримазолу і фенілефрину гідрохлориду з натрієвою соллю 1,2-нафтохінон-4-сульфонової кислоти, як хромогенним реагентом в лужному середовищі, з утворенням комплексів оранжевого кольору. Максимальне поглинання для комплексів клотримазолу і фенілефрину гідрохлориду становить 455 і 484 нм відповідно [112].

Була описана реакція 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону з кризотинібом в метанольному середовищі. Автори встановили, що у результаті реакції утворюється продукт червоного кольору з максимумом світлопоглинання при 490 нм. Спектрофотометричні дослідження підтвердили, що реакція перебігає через утворення комплексу з переносом заряду кризотинібом [113].

У статті [114] показано, що 4-ацетамідофенол (парацетамол) утворює комплекс з переносом заряду з 2,3-дихлоро-1,4-нафтохіноном у водно-етанольному середовищі з максимумом світлопоглинання при 452 нм.

Автори [115] виділили забарвлений продукт взаємодії ацетилцистеїну з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном та за допомогою $H^1$ ЯМР-спектроскопії ідентифікували продукт як N-ацетил-S-(3-хлор-1,4-діоксо-1,4-дигідронафталін-2-іл) цистеїн. Зазначається, що відбулося нуклеофільне заміщення галогену в 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноні на меркаптогрупу ацетилцистеїну (рис.1.2).

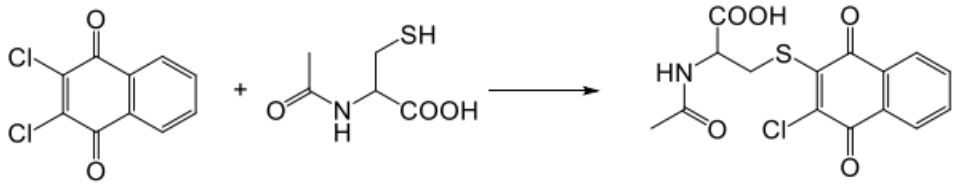



Рис. 1.2. Реакція ацетилцистеїну з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном

Таким чином, огляд літератури показує, що найчвстіше для визначення метформіну гідрохлориду, гліклазиду і глібенкламіду застосовуються спектрофотометричні і хроматографічні методики визначення. Проте, наявні методики не завжди є доступними, економічними і екологічними. Органічні аналітичні регенти, а саме сульфофталеїнові барвники і похідні нафтохінону досить широко використовуються в спектрофотометричному аналізі для різних лікарських засобів. Слід зазначити, що описані методики швидкі, точні, селективні та екологічні, а самі реагенти доступні. Тому використання сульфофталеїнових барвників та похідних нафтохінону для розроблення спектрофотометричних методик визначення гіпоглікемічних препаратів є актуальним.

# РОЗДІЛ ІІ
# ОБ'ЄКТИ, РЕАГЕНТИ, РОЗЧИННИКИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

На сьогодні для розробки спектрофотометричних методів кількісного аналізу ЛЗ необхідно дотримуватись таких етапів, а саме:

– Вивчення монографій ДФУ та аналіз статей у науковій літературі.

– Підбір умов проведення реакцій:

- вибір реагенту;
- вибір розчинника;
- визначення кількості доданих реагентів;
- визначення показників чутливості;
- визначення стехіометричних коефіцієнтів;
- розробка методики кількісного визначення.

– Кількісне визначення АФІ в таблетковій масі.

– Валідація розробленої методики кількісного визначення АФІ:

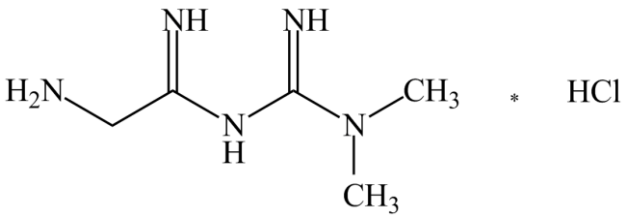
- специфічність;
- прогноз повної невизначеності методики;
- лінійність;
- межа виявлення і межа кількісного визначення;
- прецизійність;
- правильність;
- робасність;
- діапазон застосування.

## 2.1 Характеристика об'єктів дослідження

Для розробки методик кількісного спектрофотометричного аналізу як об'єкти дослідження використовували СЗ субстанції лікарських речовин, які

мали сертифікати якості виробника і лікарські засоби промислового виробництва, що містили досліджувані лікарські речовини.

**Метформіну гідрохлорид** (N,N-диметилімідодікарбонімід діамід, $C_4H_{11}N_5$, HCl), М.м. = 165,63 г/моль, номер CAS 1115-70-4

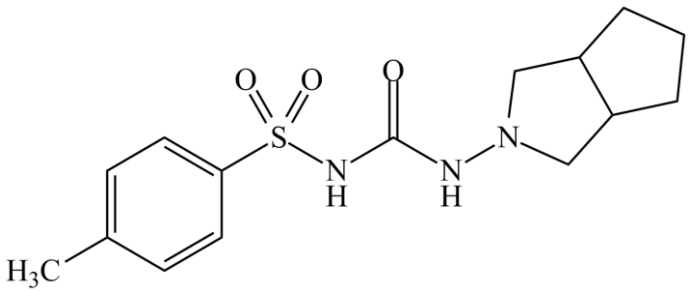


(2.1)

Кристалічний порошок білого або майже білого кольору. Метформіну гідрохлорид добре розчинний у воді, мало розчинний в етанолі (96%) і практично нерозчинний в ацетоні і метиленхлориді. Температура плавлення від 222 °С до 226 °С. pKa метформіну становить 12,4 [9].

У роботі використовували метформіну гідрохлорид виробництва компанії Harman Finochem Ltd, Індія, серія MH/1314095.

**Гліклазид** (*N*-(гексагідроциклопентал[c]пірол-2(1H)-ілкарбамоіл)-4-метилбензенсульфонамід, $C_{15}H_{21}N_3O_3S$), М.м. = 323,412 г/моль, номер CAS 21187-98-4



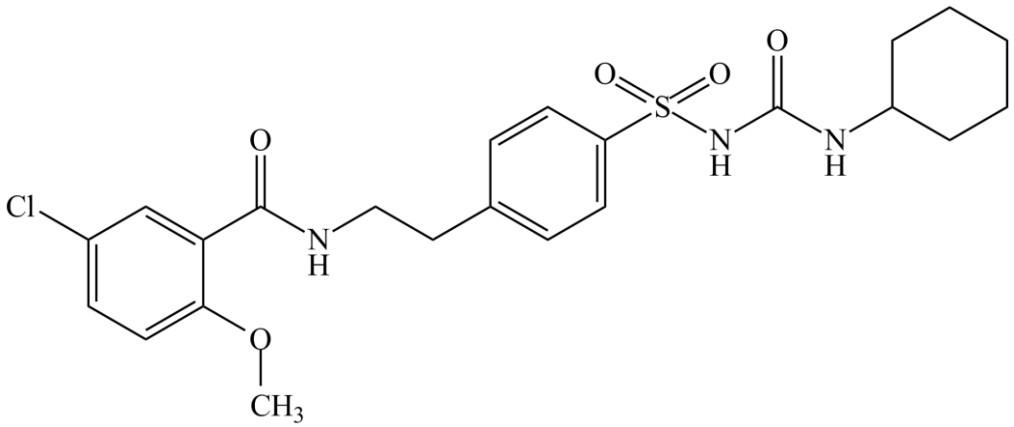
(2.2)

Білий або майже білий кристалічний порошок, помірно розчиняється в ацетоні, мало розчиняється в етанолі, розчинний в дихлорметані та

хлороформі. Температура плавлення від 180 °С до 182 °С. pKa гліклазиду становить 5,8 [10].

У роботі використовували гліклазид виробництва компанії Jinzhou JIUTAI Pharmaceutical Co., Ltd., Китай, серія 14W18030303.

**Глібенкламід** (5-хлоро- *N*-(4-[ *N*-(циклогексилкарбомоіл)сульфамоіл] феніл)-2-метоксибензамід, $C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$), М.м. = 494,004 г/моль, номер CAS 10238-21-8.



(2.3)

Кристалічний порошок білого або майже білого кольору, практично нерозчинний у воді, помірно розчинний у метиленхлориді, мало розчинний у метанолі і етанолі. pKa глібенкламіду складає 5,3. Температура плавлення 169-174 °С [9].

У роботі використовували глібенкламід виробництва компанії Sri Krishna Pharmaceuticals Ltd., Індія, серія G-06190112(MI).

В дослідженні також використовуються лікарські засоби промислового виробництва:

- таблетки «Глюкофаж» 1000 мг метформіну гідрохлориду, допоміжні речовини: повідон К 30, магнію стеарат, опадрай кліа, гіпромелоза, макрогол 400, макрогол 8000 (ТОВ Фарма Старт, компанія Acino Group, Швейцарія) серія 204394;

- таблетки «Метформін Астрафарм» 500 мг метформіну гідрохлориду, допоміжні речовини: повідон, магнію стеарат, гіпромелоза, ПЕГ 6000, титану діоксид (ТОВ «Астрафарм», Україна) серія 020622;
- таблетки «Метформін Тева» 1000 мг метформіну гідрохлориду, допоміжні речовини: повідон К 30, кремнію діоксид колоїдний безводний, магнію стеарат, гіпромелоза, титану діоксид, макрогол (Teva Pharmaceutical Industries Ltd, Ізраїль) серія 0016898;
- таблетки «Метформін Сандоз» 850 мг метформіну гідрохлориду, допоміжні речовини: повідон К 90, магнію стеарат, гіпромелоза, титану діоксид, макрогол 4000 (ООО «Сандоз Україна») серія JW2453;
- таблетки «Діабетон MR» 60 мг гліклазиду допоміжні, речовини: лактози моногідрат, гіпромелоза, магнію стеарат, мальтодекстрин, кремнію діоксид колоїдний безводний (ПАТ «Фармак», Україна) серія 6019126;
- таблетки «Діаглізид MR» 30 мг гліклазиду, допоміжні речовини: гіпромелоза, лактози моногідрат, коповідон, кремнію діоксид колоїдний безводний, магнію стеарат (ПАТ «Фармак», Україна) серія 240519;
- таблетки «Діаглізид» 80 мг гліклазиду, допоміжні речовини: лактози моногідрат, целюлоза мікрокристалічна, повідон, кальцію стеарат, тальк (ПАТ «Фармак», Україна) серія 111021;
- таблетки «Гліклада» 60 мг гліклазиду, допоміжні речовини: гіпромелоза, лактози моногідрат, кремнію діоксид колоїдний безводний, магнію стеарат (KRKA, Словенія) серія D96697;
- таблетки «Манініл» 5 мг глібенкламіду, допоміжні речовини: лактози моногідрат, крохмаль картопляний, желатин, магнію стеарат, тальк, понсо 4R (BERLIN-CHEMIE MENARINI, Німеччина) серія 18001;
- таблетки «Глібенкламід-Здоров’я» 5 мг глібенкламіду, допоміжні речовини: маніт, повідон, кальцію стеарат, целюлоза мікрокристалічна, натрію кроскармелоза, натрію лаурилсульфат (Фармацевтична компанія «Здоров’я», Україна) серія 51121.

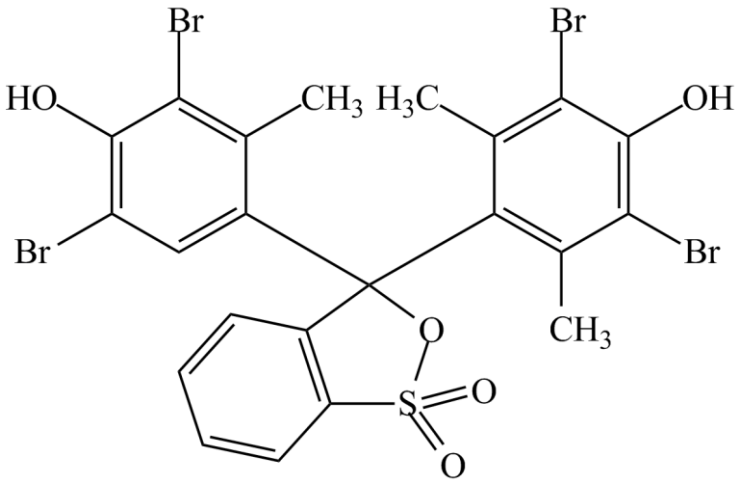
## 2.2 Розчинники, реагенти та обладнання

Розробку спектрофотометричної методики кількісного визначення гіпоглікемічних препаратів (ГП) проводили на обладнанні Навчально-наукового медико-лабораторного центру і кафедри аналітичної хімії ЗДМФУ. Всі прилади атестовано і мають відповідні свідоцтва про повірку.

**Розчинники.** В роботі використовували такі розчинники, як вода очищена, ацетон, диметилформамід (ДМФА) тощо. Всі розчинники класу «хч» і «чда».

Використовувані в роботі органічні аналітичні реагенти мали сертифікати якості виробників.

**Бромкрезоловий зелений** (3',3",5',5"-тетрабром-м-крезолсульфонфталеїн, $C_{21}H_{14}Br_4O_5S$), М.м. = 698 г/моль, номер CAS 76-60-8.

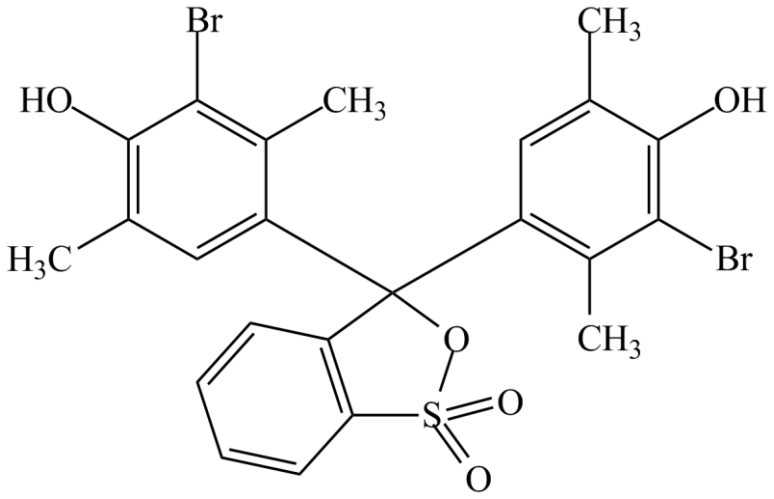



(2.4)

Порошок білого з коричнюватим відтінком кольору. Мало розчинний у воді, розчинний в етанолі (96%) й розведених розчинах гідроксидів лужних металів [9].

У роботі використовували БКЗ виробництва компанії Synex Pharma, Китай.

**Бромкрезоловий пурпурний** (3',3''-дибром-о-крезолсульфонфталеїн, $C_{21}H_{16}Br_2O_5S$), М.м. = 540,2 г/моль, номер CAS 115-40-2.

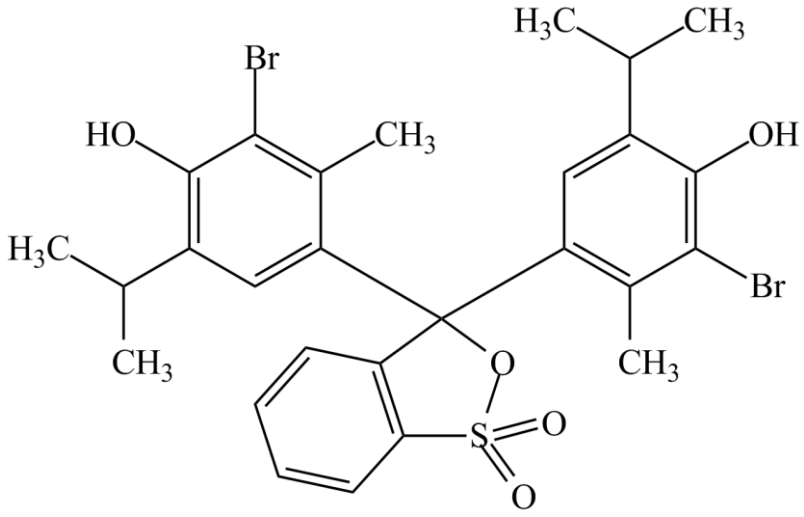



(2.5)

Порошок світло-рожевого кольору. Практично не розчинний у воді, розчинний в етанолі (96%) й розведених розчинах гідроксидів лужних металів [9].

У роботі використовували БКП виробництва Шосткинського заводу хімічних реактивів, Україна.

**Бромтимоловий синій** (3',3''-дибромтимолсульфонфталеїн, $C_{27}H_{28}Br_2O_5S$), М.м. = 624 г/моль, номер CAS 76-59-5.

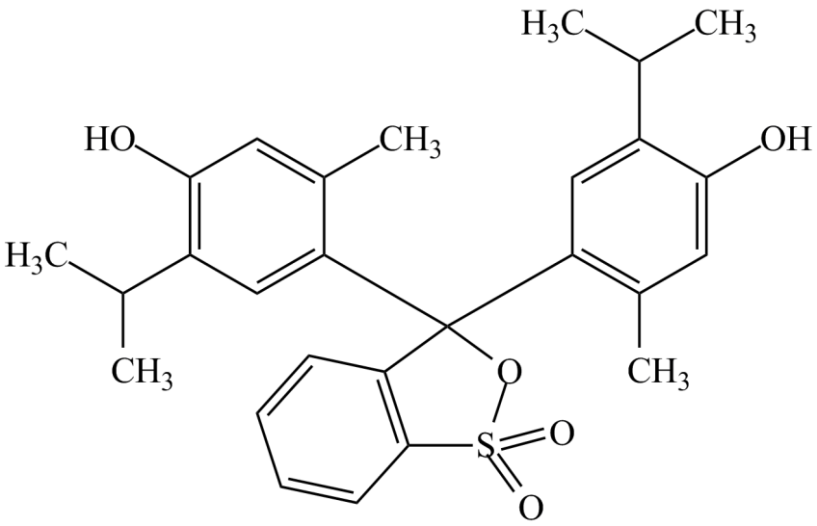



(2.6)

Порошок від червонувато-рожевого до коричнюватого кольору. Практично не розчинний у воді, розчинний в етанолі (96%) й розведених розчинах гідроксидів лужних металів [9].

У роботі використовували БТС виробництва компанії Synex Pharma, Китай.

**Тимоловий синій** (тимолсульфонфталеїн, $C_{27}H_{30}O_5S$), М.м. = 466,6 г/моль, номер CAS 76-61-9.

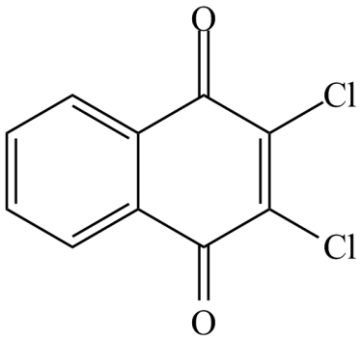


(2.7)

Кристалічний порошок від коричнювато-зеленого до зеленувато-синього кольору. Мало розчинний у воді, розчинний в етанолі (96%) й розведених розчинах гідроксидів лужних металів [9].

У роботі використовували ТС виробництва Шосткинського заводу хімічних реактивів, Україна

**2,3-Дихлор-1,4-нафтохінон** ($C_{10}H_4Cl_2O_2$), М.м. = 227,04 г/моль, номер CAS 117-80-6.

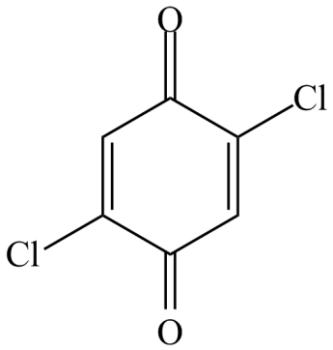



(2.8)

Жовтий кристалічний порошок, розчинний в етанолі, важко розчинний у воді та бензолі.

У роботі використовували 2,3-Дихлор-1,4-нафтохінон виробництва компанії Sigma-Aldrich, Японія.

**2,5-Дихлор-1,4-бензохінон** ($C_6H_2Cl_2O_2$), М.м. = 176,98 г/моль, номер CAS 615-93-0.

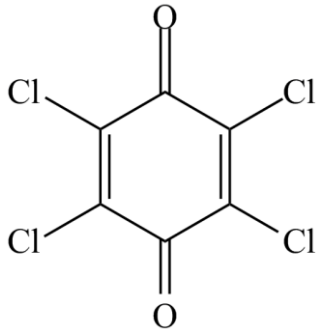



(2.9)

Жовтий кристалічний порошок, розчинний в етанолі, важко розчинний у воді та бензолі.

У роботі використовували 2,5-Дихлор-1,4-бензохінон виробництва компанії Sigma-Aldrich, Польща.

***п*-Хлораніл** (2,3,5,6-тетрахлоро-1,4-бензохінон,$C_6Cl_4O_2$), М.м. = 245,88 г/моль, номер CAS 118-75-2



(2.10)

Жовтий кристалічний порошок, важко розчинний в хлороформі та етанолі, не розчинний у воді.

У роботі використовували п-Хлораніл виробництва компанії MERCK-Schuchardt, Німеччина.

**Аналітичне обладнання:** спектрофотометр «Specord-200» (Analytic Jena AG, Німеччина), водяна баня «MEMMERT WNB7», ваги лабораторні електронні RADWAG XA 210. 4Y ваги лабораторні електронні RADWAG XA 210. 4Y, мірний лабораторний посуд класу А.

## 2.3 Методи дослідження

Для розробки спектрофотометричної методики використовували прилад «Specord-200». За допомогою нього вимірювали спектри поглинання аналітичних реагентів і забарвлених продуктів реакції з досліджуваними речовинами у видимій області спектра. За допомогою кварцових кювет товщиною 1 см вимірювали величину оптичної густини на фоні компенсаційного розчину, який не містив у своєму складі досліджуваної речовини. Для обробки одержаних спектрів застосовували програмний пакет WinASPECT 2.2.1.0.

Стехіометричні співвідношення компонентів реакційної суміші визначали такими методами як метод неперервних змін (метод ізомолярних серій), метод насичення (метод молярних співвідношень) та метод відносного

виходу (метод Старіка-Барбанеля). Вказані методи виконували в оптимальних умовах проведення реакцій за загальноприйнятими методиками.

Одержані результати кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин у складі лікарських форм статистично обробляли відповідно до вимог загальної статті ДФУ, 5.3.N.1 «Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту». Використовували такі метрологічні характеристики середнього результату: середнє значення вибірки ($\overline{X}$), стандартне відхилення ($S$), стандартне відхилення середнього результату ($S_{\overline{X}}$), відносний довірчий інтервал одиничного визначення ($\Delta_x$), відносний довірчий інтервал середнього результату ($\Delta_{\overline{x}}$), відносна невизначеність середнього результату ($\bar{\varepsilon}$). Для обрахунку результатів використовували програмне забезпечення Microsoft Excel 2019.

З метою проведення контролю якості розроблених методик була проведена валідація відповідно до вимог ДФУ, 5.3.N.2 «Валідація аналітичних методик і випробувань». В дисертаційній роботі використовували такі метрологічні характеристики: середнє значення вибірки ($\bar{Z}$), відносне стандартне відхилення ($S_z$), однобічний довірчий інтервал ($\Delta_z$), максимально припустима невизначеність аналізу ($\Delta_{AS}$). Параметри лінійної залежності розраховували за такими статистичними параметрами: точка перетину з віссю ординат ($a$), кутовий коефіцієнт ($b$), коефіцієнт кореляції ($r$), залишкова сума квадратів відхилень ($S_y$).

Для оцінки екологічності аналітичних процедур використовували аналітичний калькулятор AGREE (Analytical GREEnness) та аналітичну еко-шкалу. За допомогою калькулятора оцінили розроблені методики аналізу за критеріями дванадцяти принципів «зеленої хімії», яка представлена у вигляді шкали 0-1. У підсумку методика отримує розрахований бал на основі принципів важливості і піктограму, що демонструє ефективність аналітичної процедури за кожним критерієм.

# РОЗДІЛ ІІІ
# СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ГІПОГЛІКЕМІЧНИХ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ

## 3.1 Вивчення оптимальних умов реакції взаємодії сульфофталеїнових барвників з метформіну гідрохлоридом

На етапі розробки методики дуже важливим є вивчення оптимальних умов проведення реакції кількісного визначення. На повноту і швидкість перебігу реакції можуть впливати такі фактори, як розчинник, кількість доданих реагентів, час перебігу реакції, pH середовища, температура та час нагрівання, стабільність отриманих продуктів реакції у часі.

Вивчення оптимальних умов перебігу реакції на прикладі взаємодії між метформіну гідрохлоридом та сульфофталеїновими барвниками проводили за наступним алгоритмом.

Вибір розчинника для цієї реакцій базувався на даних про розчинність метформіну гідрохлориду та сульфофталеїнових барвників, а також на максимальній величині оптичної густини. Метформін малорозчинний в ацетоні та в спиртах, але добре розчинний у воді. Тому було обрано для подальшої розробки методик кількісного визначення метформіну такі середовища, як водно-ацетонове, водно-метанолове, водно-етанолове. На стадії розробки спектрофотометричної методики визначення метформіну гідрохлориду використовували 0,3% розчини сульфофталеїнових барвників (БКЗ, БКП, БТС, ТС) та 0,01% розчин досліджуваної лікарської речовин в середовищах зазначених вище.

При проведенні експерименту по 1,00 мл водно-ацетонового, водно-метанолового, водно-етанолового розчинів метформіну гідрохлориду, які містили 1% води, переносили до мірних колб на 10,00 мл, додавали по 1,00 мл розчинів обраних реагентів, доводили відповідним розчинником до позначки, перемішували. Паралельно готували компенсаційні розчини: у мірні колби на

10,00 мл вміщували по 1,00 мл розчинів вищезазначених реагентів та доводили до позначки відповідним розчинником. Абсорбцію досліджуваних розчинів вимірювали на фоні компенсаційних розчинів, що не містили метформіну гідрохлориду. У результаті дослідження було встановлено, що у зазначених середовищах, окрім водно-ацетонового, реакція майже не перебігала (оптична густина становила менше 0,03), тому більш оптимальним виявилось водно-ацетонове середовище для визначення метформіну гідрохлориду.

При виборі оптимального реагенту для розробки методик кількісного спектрофотометричного визначення метформіну гідрохлориду було порівняно спектри поглинання забарвлених продуктів реакцій з БКП, БТС, ТС та БКЗ. Критерієм вибору реагенту було максимальне значення величини оптичної густини забарвленого продукту реакції. Для цього готували 0,001 М розчин метформіну гідрохлориду і 0,002 М розчини сульфофталеїнових барвників (БКП, БТС, ТС та БКЗ) у ацетоні. Далі по 1,00 мл досліджуваних розчинів вміщували в мірні колби ємністю 10,00 мл, додавали по 1,00 мл відповідного реагенту та доводили ацетоном до позначки. Абсорбцію отриманих розчинів вимірювали на фоні компенсаційного розчину, що не містить досліджуваного АФІ. У результаті проведеного дослідження було отримано спектри поглинання продуктів реакцій, що наведені на рис. 3.1.

Як видно з одержаних спектрів поглинання (рис. 3.1), у випадку застосування БКЗ спостерігається максимальне значення величини оптичної густини, тому саме цей реагент було обрано для подальшої розробки методики кількісного визначення метформіну гідрохлориду.

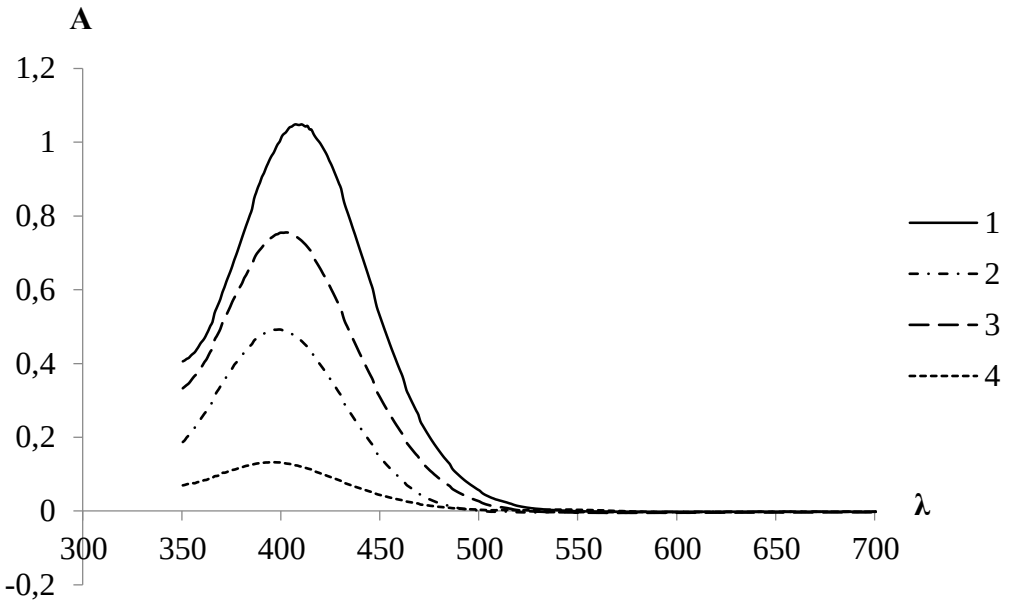



Рис. 3.1. Спектри поглинання продуктів реакції метформіну гідрохлориду з бромкрезоловим зеленим (БКЗ) – 1, бромкрезоловим пурпурним (БКП) – 2, бромтимоловим синім (БТС) – 3, тимоловим синім (ТС) – 4 у водно-ацетоновому середовищі

Ще одним важливим чинником, що впливає на величину максимального виходу забарвленого продукту реакції, є кількість доданої води і реагенту. Було експериментально встановлено, що зі збільшенням кількості води оптична густина збільшується (рис. 3.2.). 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%.

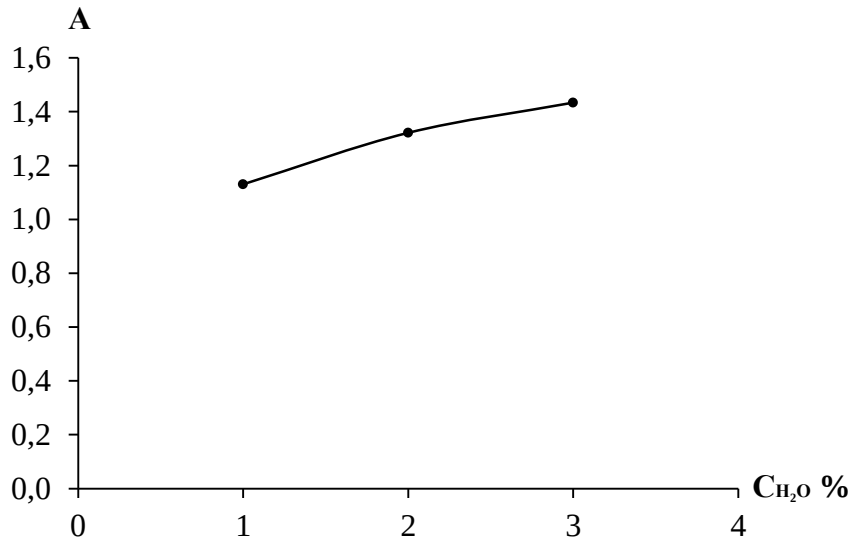



Рис. 3.2. Графік залежності абсорбції продукту реакції метформіну гідрохлориду з БКЗ від кількості доданої води

На наступному етапі дослідження експериментальним шляхом, враховуючи максимальний вихід продукту реакції, встановлювали необхідну кількість реагенту. Для цього до серії мірних колб ємністю 10,00 мл додавали по 1,00 мл 0,001 М розчину досліджуваної лікарської речовини та по 1,00 мл 0,30%; 0,60%; 0,70%; 1,00%; 1,40% та 2,00% розчинів БКЗ. Абсорбцію досліджуваних розчинів вимірювали на фоні компенсаційних розчинів при аналітичній довжині хвилі 409 нм для метформіну гідрохлориду. За отриманими даними будували графіки залежності величини оптичної густини від кількості доданого реагенту (рис. 3.3).

Як видно з рис. 3.3, при збільшення концентрації доданого реагенту від 0,30% до 2,00% мл максимум величини оптичної густини отриманих розчинів спостерігався при 1,4%. Тому для подальшої розробки методики кількісного визначення метформіну гідрохлориду з БКЗ обрано оптимальну концентрацію реагенту – 1,4% розчин БКЗ в ацетоні, що приблизно відповідає концентрації 0,02 М.

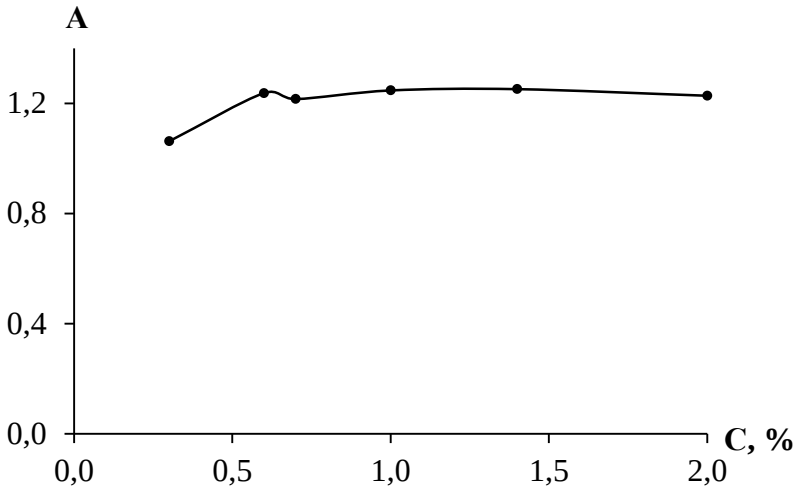



Рис. 3.3. Графік залежності абсорбції продукту реакції метформіну гідрохлориду з БКЗ від концентрації реагенту

Було встановлено, що БКЗ взаємодіє з метформіну гідрохлоридом швидко, за кімнатної температури і не потребує корекції температурного та часового режиму. Тож наступним етапом дослідження стало вивчення стабільності забарвлених розчинів у часі. Для цього вимірювали оптичну густину отриманого забарвленого розчину впродовж 30 хв з інтервалом у 5 хв. Як видно з рис. 3.4 досліджуваний розчин стабільний щонайменше впродовж 30 хв.

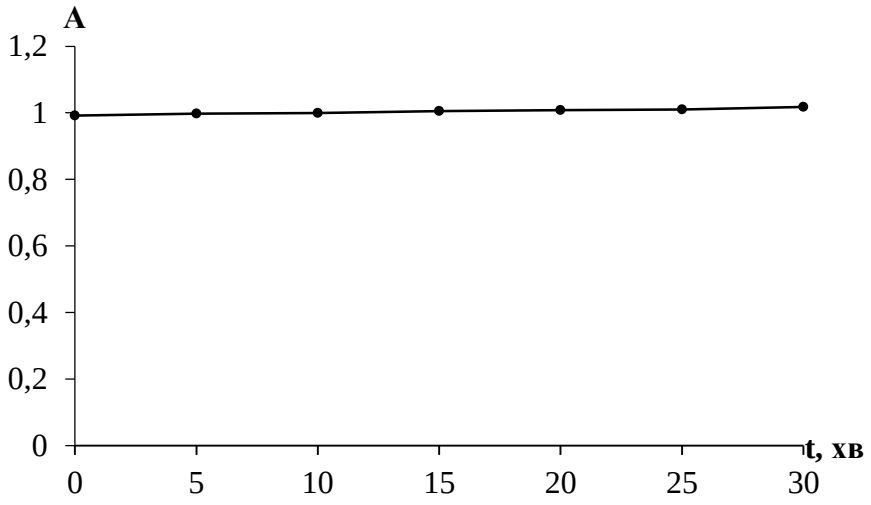



Рис. 3.4. Графік залежності оптичної густини продукту реакції метформіну гідрохлориду з БКЗ у водно-ацетоновому середовищі від часу

Отже, у результаті проведених досліджень було встановлено, що на величину оптичної густини продуктів реакції метформіну гідрохлориду з сульфофталеїновими барвниками впливають наступні фактори: розчинник, природа та кількість реагенту, час.

*Оптимальні умови проведення реакції «метформіну гідрохлорид – БКЗ»:*

− використання 0,01% розчину метформіну гідрохлориду у водно-ацетоновому середовищі з вмістом води 1%;

− додавання 1,00 мл 1,4 % БКЗ в ацетоні;

− вимірювання оптичної густини аналізованого розчину за аналітичною довжиною хвилі 408 нм. Виходячи з отриманих даних, було розроблено загальну методику кількісного визначення метформіну гідрохлориду на основі реакції з БКЗ.

*Загальна методика кількісного визначення метформіну гідрохлориду:* точну наважку метформіну гідрохлориду (0,0170 г) переносять до мірної колби ємністю 200,00 мл, розчиняють в 2 мл води очищеної і доводять ацетоном до позначки та перемішують. 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 та перемішують. Вимірюють абсорбцію отриманого розчину на спектрофотометрі за аналітичної довжини хвилі 409 нм у кварцовій кюветі з товщиною поглинаючого шару 1 см на фоні компенсаційного розчину, що не містить досліджуваної речовини.

## 3.2 Вивчення оптимальних умов реакції взаємодії сульфофталеїнових барвників з гліклазидом

Для встановлення оптимальних умов проведення реакції взаємодії гліклазиду з сульфофталеїновими барвниками вивчали вплив таких чинників, як реагент, розчинник, концентрація реагенту, стабільність продуктів реакції в часі.

Вибір розчинника базувався на даних з наукових джерел про розчинність гліклазиду. Гліклазид добре розчинний в ацетоні, мало розчинний в етанолі, розчинний дихлорметані і хлороформі.

Для встановлення найбільш оптимального розчинника використовували ацетон, метанол та хлороформ. Для цього 1,00 мл 0,002 М розчину гліклазиду у ацетоні, метанолі та хлороформі переносили до мірної колби на 10,00 мл, додавали по 1,00 мл розчинів сульфлталеїнових барвників, а саме, БКЗ, БКП, БТС, ТС, доводили відповідним розчинником до позначки та перемішували. Паралельно готували компенсаційні розчини: у мірні колби на 10,00 мл вміщували по 1,00 мл 0,04 М розчинів відповідних реагентів та доводили до позначки відповідним розчинником. Абсорбцію досліджуваних розчинів вимірювали на фоні компенсаційних розчинів, що не містять аналізованої речовини. Експериментально було встановлено, що ацетон є найбільш оптимальним розчинником для даного дослідження.

Для подальшої розробки даної методики необхідно було обрати оптимальний реагент. Було обрано такі сульфофталеїнові реагенти, як БКЗ, БКП, БТС та ТС. Критерієм вибору реагенту було максимальне значення величини оптичної густини забарвленого продукту реакції. Для цього готували 0,002 М розчин гліклазиду в ацетоні і 0,04 М розчини сульфофталеїнових барвників (БКП, БТС, ТС та БКЗ) в ацетоні. Далі 1,00 мл досліджуваного розчину вміщували в мірні колби ємністю 10,00 мл, додавали по 1,00 мл відповідного реагенту та доводили ацетоном до позначки. Абсорбцію отриманих розчинів вимірювали на фоні компенсаційних розчинів, що не містять досліджуваних речовин. У результаті проведеного дослідження було отримано спектри поглинання продуктів реакцій, що наведені на рис. 3.5.

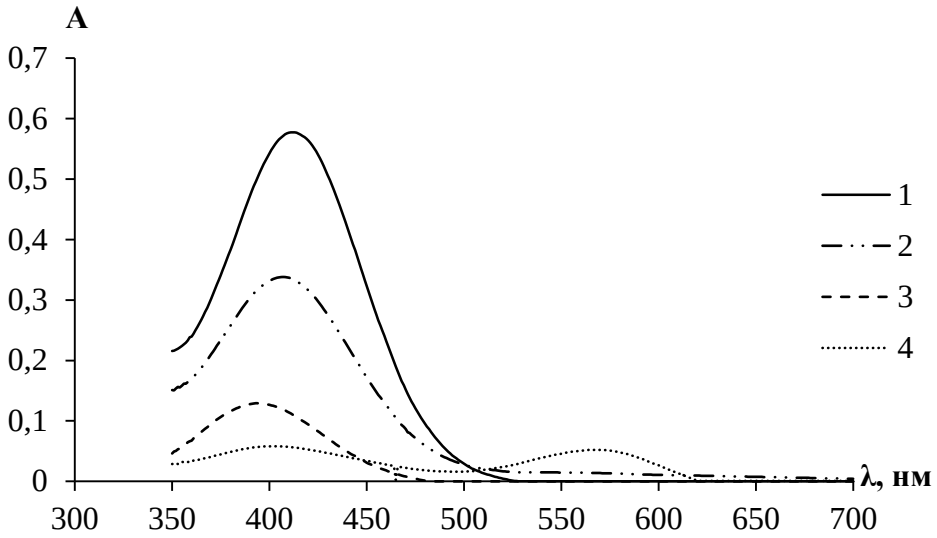



Рис. 3.5. Спектри поглинання продуктів реакції гліклазиду з бромкрезоловим зеленим (1), бромтимоловим синім (2), бромкрезоловим пурпурним (3), тимоловим синім (4) в ацетоні

Як видно з одержаних спектрів поглинання (рис. 3.5), у випадку застосування БКЗ спостерігається максимальне значення величини оптичної густини, тому саме цей реагент було обрано для подальшої розробки методики кількісного визначення гліклазиду.

Ще одним важливим чинником, що впливає на величину максимального виходу забарвленого продукту реакції, є кількість доданого реагенту. Тому на наступному етапі дослідження експериментальним шляхом, враховуючи максимальний вихід продукту реакції, встановлювали необхідну кількість реагенту. Для цього до серії мірних колб ємністю 10,00 мл додавали по 1,00 мл 0,002 М розчину гліклазиду в ацетоні та по 0,50; 1,00; 1,50 та 2,00 мл 0,040 М розчину БКЗ. Абсорбцію досліджуваних розчинів вимірювали на фоні компенсаційних розчинів при аналітичній довжині хвилі 411 нм. За отриманими даними будували графіки залежності величини оптичної густини від кількості доданого реагенту (рис. 3.6).

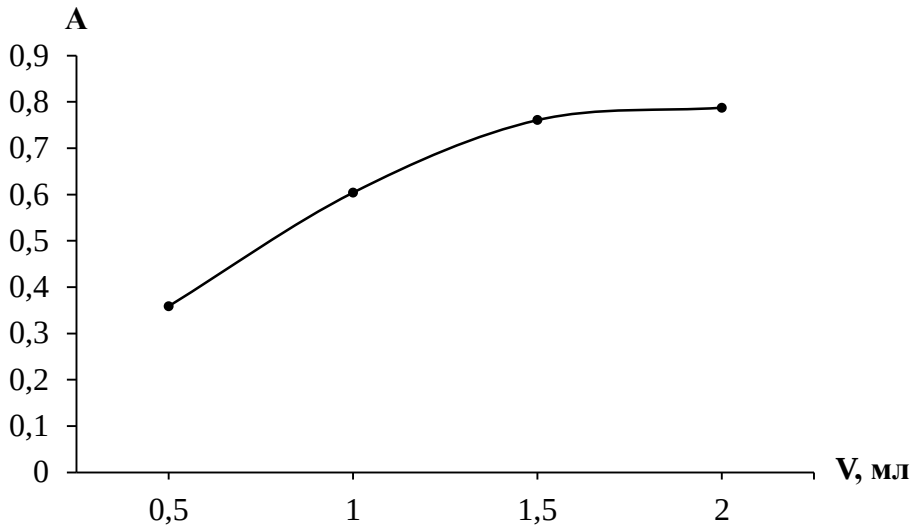



Рис. 3.6. Графік залежності абсорбції продукту реакції від концентрації реагенту

Як видно з рис. 3.6, для гліклазиду спочатку спостерігається значне збільшення оптичної густини при збільшенні об’єму доданого реагенту від 0,50 до 1,50 мл, після цього збільшення об’єму від 1,50 до 2,00 мл не впливає на збільшення величини оптичної густини отриманих розчинів. Тому для подальшої розробки методики кількісного визначення гліклазиду з БКЗ обрано оптимальний об’єм реагенту – 1,50 мл 0,04 М розчину в ацетоні.

Наступним етапом дослідження стало вивчення стабільності забарвлених розчинів у часі. Для цього вимірювали оптичну густину отриманих забарвлених розчинів впродовж 30 хв з інтервалом у 5 хв. Реакція гліклазиду з БКЗ відбувається швидко та за кімнатної температури, а одержані забарвлені розчини залишаються стабільними впродовж щонайменше 30 хв (рис. 3.7).

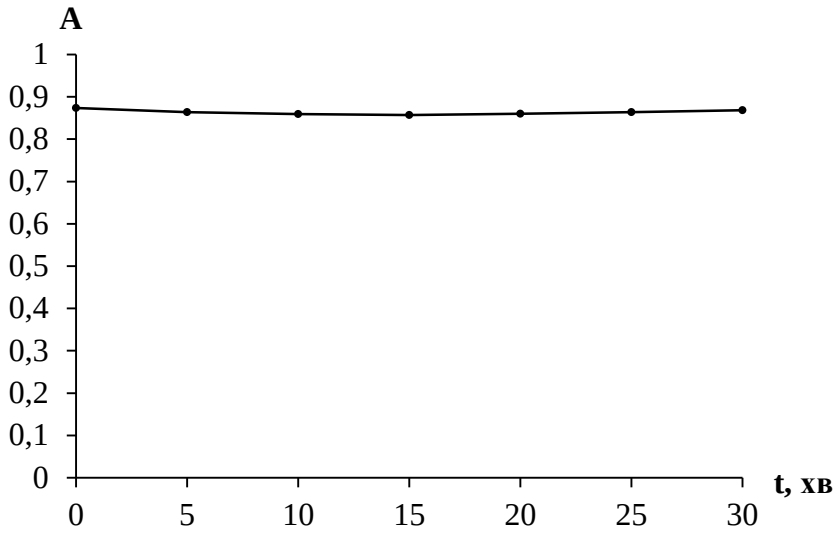



Рис. 3.7. Графік залежності абсорбції продукту реакції гліклазиду з БКЗ від часу

Отже, у результаті проведених досліджень було встановлено, що на величину оптичної густини продуктів реакції гліклазиду з сульфофталеїновими барвниками впливають наступні фактори: розчинник, природа та кількість реагенту.

*Оптимальні умови проведення реакції «гліклазид – БКЗ»:*

− використання 0,02% розчину гліклазиду в ацетоні;

− додавання 1,50 мл 4,2% БКЗ в ацетоні;

− вимірювання оптичної густини аналізованого розчину за аналітичної довжини хвилі 411 нм. Виходячи з отриманих даних, було розроблено загальну методику кількісного визначення гліклазиду на основі реакції з БКЗ.

*Загальна методика кількісного визначення гліклазиду:* точну наважку гліклазиду (0,01950 г) переносять до мірної колби ємністю 25,00 мл, розчиняють в ацетоні і доводять цим же розчинником до позначки та перемішують. 1,00 мл отриманого розчину гліклазиду переносять до мірної колби на 10,00 мл, додають 1,50 мл 4,2% розчину бромкрезолового зеленого в ацетоні, доводять ацетоном до позначки та перемішують. Вимірюють абсорбцію отриманого розчину на спектрофотометрі за аналітичної довжини

хвилі 411 нм в кюветі з товщиною поглинаючого шару 1 см на фоні компенсаційного розчину, що не містить досліджуваної речовини.

### 3.3 Визначення оптимальних умов реакції глібенкламіду з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном

Для розробки методики кількісного визначення глібенкламіду за реакцією з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном використовували підхід, описаний вище, тобто вивчали вплив розчинника, природи та кількості доданих реагентів, температури та часу нагрівання, а також стабільність одержаних забарвлених продуктів у часі.

Обираючи розчинник керувались даними літературних джерел про розчинність глібенкламіду і реагентів та оптичною густиною продукту реакції. Як можливі розчинники було обрано ДМСО, ДМФА і ацетонітрил. Для цього 1,00 мл 0,004 М розчину глібенкламіду в таких розчинниках, як ДМСО, ДМФА і ацетонітрил, вміщували в мірну колбу на 10,00 мл, додавали по 1,00 мл розчинів обраних реагентів (2,3-дихлор-1,4-нафтохінон, 2,5-дихлор-1,4-бензохінон, *п*-хлораніл). Оскільки візуально не спостерігалась зміна забарвлення отриманих розчинів проводили нагрівання на водяній бані при 95°С протягом 10 хв. Отримані розчини охолоджували, доводили відповідним розчинником до позначки та перемішували. Паралельно готували компенсаційні розчини: у мірні колби на 10,00 мл вміщували по 1,00 мл 0,05 М розчинів вищезазначених реагентів та доводили до позначки відповідним розчинником. Абсорбцію досліджуваних розчинів вимірювали на фоні компенсаційних розчинів, що не містили глібенкламіду. Експериментально було встановлено, що ДМФА є оптимальним розчинником для даного дослідження, оскільки найбільша оптична густина продукту реакції спостерігалася саме у середовищі ДМФА.

Експериментальним шляхом обрали оптимальний реагент серед таких реагентів, як 2,3-дихлор-1,4-нафтохінон, 2,5-дихлор-1,4-бензохінон та

*n*-хлораніл. Критерієм вибору реагенту було максимальне значення величини оптичної густини забарвленого продукту реакції. Для цього готували 0,004 М розчин глібенкламіду в ДМФА і 0,05 М розчини реагентів в ДМФА. Далі по 1,00 мл досліджуваного розчину глібенкламіду вміщували в мірні колби ємністю 10,00 мл, додавали по 1,00 мл відповідного реагенту, нагрівали 10 хв при 95°С, охолоджували та доводили ДМФА до позначки. Абсорбцію отриманих розчинів вимірювали на фоні компенсаційних розчинів, що не містять глібенкламіду. У результаті проведеного дослідження були отримані спектри поглинання продуктів реакцій (рис. 3.8), з яких видно, що найбільша оптична густина спостерігається при використанні як реагенту 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону.

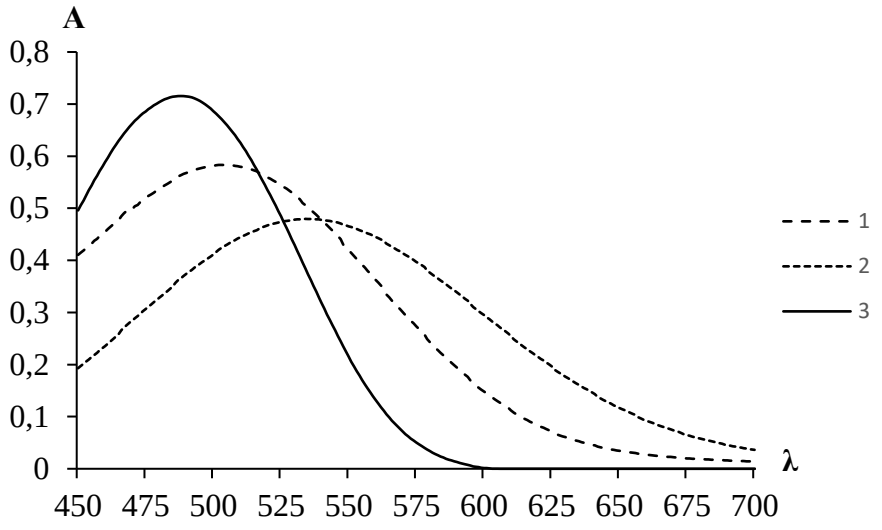



Рис. 3.8. Спектри поглинання продуктів реакції глібенкламіду з: 2,5-дихлор-1,4-бензохіноном (1), п-хлоранілом (2), 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном (3) в ДМФА

Наступним етапом експерименту було встановлення температури і часу нагрівання. Для цього готували розчин глібенкламіду і 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону. Далі в колбу на 10,00 мл вносили по 1,00 мл отриманих розчинів, паралельно готуючи компенсаційний розчин (без досліджуваної речовини) та

нагрівали реакційну суміш при 65, 75, 85 і 95°С впродовж 10 хв. Після охолодження отриманих сумішей доводили до позначки ДМФА і перемішували. За отриманими результатами (рис. 3.9) максимальна оптична густина спостерігалась при 95°С.

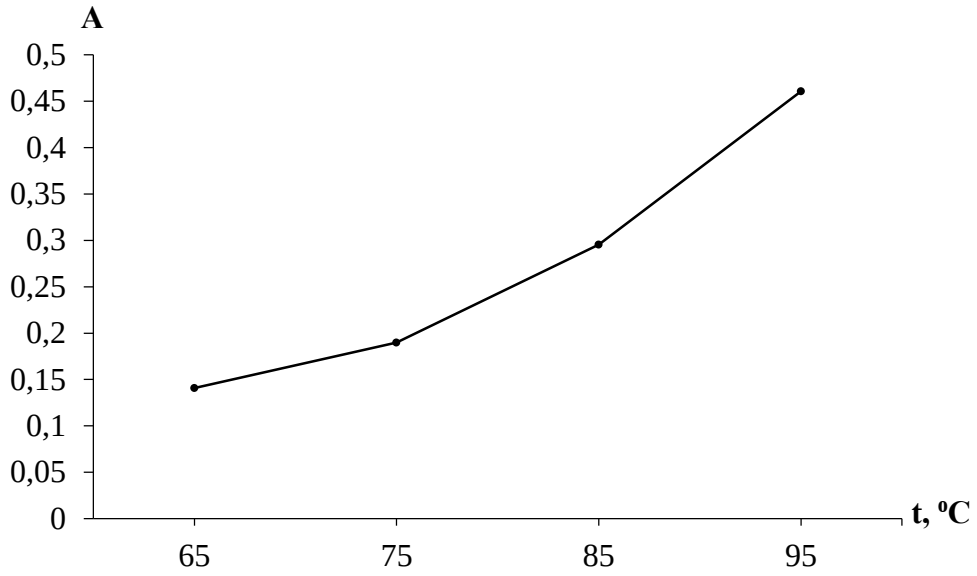



Рис. 3.9. Графік залежності абсорбції продукту реакції глібенкламіду з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном від температури нагрівання

Отже, у результаті проведених досліджень було встановлено, що 2,3-дихлор-1,4-нафтохінон швидше взаємодіє з глібенкламідом при 95°С.

Для вивчення впливу часу на стабільність утвореного забарвленого продукту реакції, реакційну суміш 1,00 мл розчину глібенкламіду з 1,00 мл 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном нагрівали на водяній бані при 95 °С впродовж 5, 10, 15, 20, 25 та 30 хв. Після охолодження доводили ДМФА до позначки в колбі ємністю 10,00 мл і вимірювали оптичну густину при аналітичній довжині хвилі $\lambda_{max}$ = 489 нм на фоні компенсаційного розчину, який не містив глібенкламіду. (рис. 3.10)

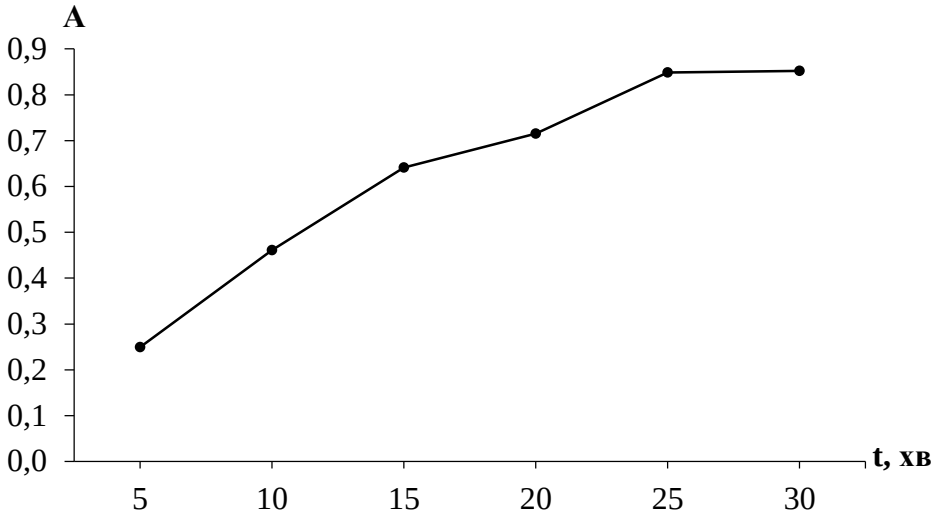



Рис. 3.10. Графік залежності абсорбції продукту реакції глібенкламіду з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном від часу нагрівання

Таким чином, експериментально було встановлено, що для оптимального перебігу реакції глібенкламіду з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном необхідно нагрівати реакційну суміш до 95 °С впродовж 25 хв, бо подальше нагрівання практично не збільшує оптичну густину.

Наступний етап дослідження полягав у встановленні оптимальної концентрації реагенту, яку визначали експериментально за максимальним виходом продукту реакції, тобто за максимальною оптичною густиною. Для цього до 1,00 мл 0,04% розчину глібенкламіду додавали 0,20; 0,50; 1,00; 1,50 та 2,00 мл 0,5% та 1% розчину 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону в ДМФА, нагрівали протягом 25 хв при 95 °С, охолоджували, доводили до позначки ДМФА, ретельно переміщували і вимірювали оптичну густину за аналітичної довжини хвилі (рис.3.11).

Як видно з рис. 3.11, максимальне значення оптичної густини спостерігається при значенні концентрації реагенту 0,5% в об’ємі 1,00 мл, тож для подальшої роботи була обрана саме ця концентрація.

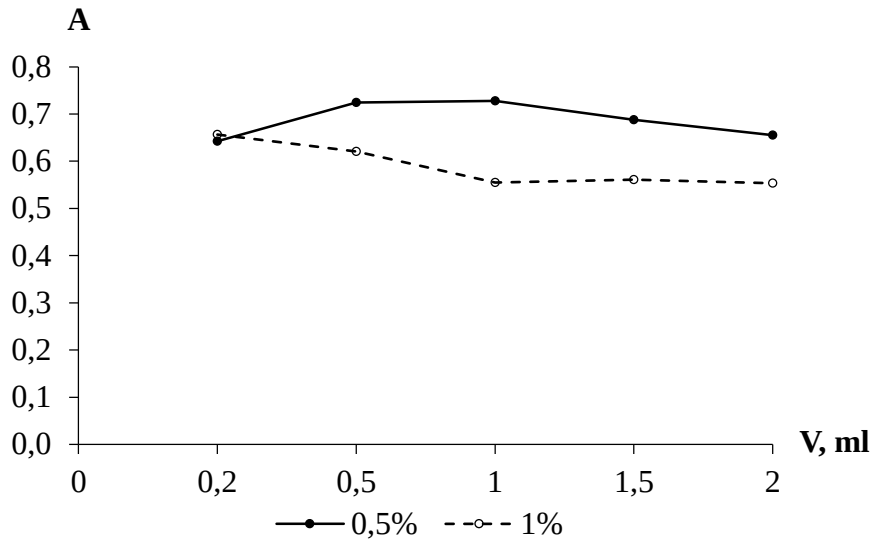



Рис. 3.11. Графік залежності абсорбції продукту реакції глібенкламіду з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном від кількості доданого реагенту

Стабільність досліджуваних розчинів у часі досліджували, вимірюючи оптичну густину кожні 15 хв впродовж 1 год. Було встановлено, що досліджувані розчини стабільні щонайменше 1 год (рис. 3.12).

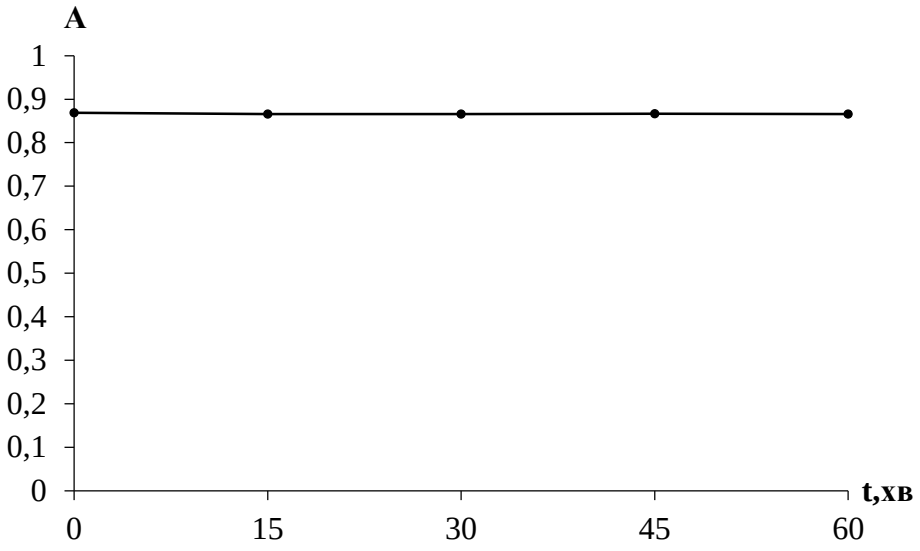



Рис. 3.12 Графік залежності абсорбції продукту реакції глібенкламіду з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном в середовищі ДМФА від часу

У результаті проведених досліджень були встановлені оптимальні умови перебігу реакції глібенкламіду з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном.

*Оптимальні умови проведення реакції «глібенкламід – 2,3-дихлор-1,4-нафтохінон»:*

− використання 0,04% розчину глібенкламіду в ДМФА;

− додавання 1,00 мл 0,5 % розчину2,3-дихлор-1,4-нафтохінону в ДМФА;

− нагрівання реакційної суміші при температурі 95 °С впродовж 25 хв;

− вимірювання оптичної густини аналізованого розчину за аналітичної довжини хвилі 489 нм.

Виходячи з отриманих даних, була розроблена загальна методика кількісного визначення глібенкламіду на основі реакції з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном.

*Загальна методика кількісного визначення глібенкламіду:* точну наважку глібенкламіду (0,01950 г) вміщують до мірної колби ємністю 25,00 мл, розчиняють в ДМФА і доводять цим же розчинником до позначки та перемішують. 1,00 мл отриманого розчину глібенкламіду переносять до мірної колби на 10,00 мл, додають 1,00 мл 0,5% розчину 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону в ДМФА і нагрівають на водяній бані при температурі 95 °С впродовж 25 хв, охолоджують та доводять ДМФА до позначки та перемішують. Вимірюють абсорбцію отриманого розчину на спектрофотометрі за аналітичної довжини хвилі 489 нм в кюветі з товщиною поглинаючого шару 1 см на фоні компенсаційного розчину, що не містить глібенкламіду.

## 3.4 Встановлення показників чутливості реакцій

За експериментально встановлених оптимальних умов проведення реакцій (див. розд. 3.1–3.3) між досліджуваними лікарськими речовинами та обраними реагентами були виміряні спектри поглинання продуктів реакцій, визначені максимуми довжин хвилі та розраховані показники чутливості даних реакцій (табл. 3.1.). Для розрахунку чутливості досліджуваних реакцій використовували наступні величини:

- молярний показник поглинання (ε):

$$\varepsilon = \frac{\text{A}}{C_{\text{мол/л}} \cdot l}$$

де *A* – оптична густина забарвленого розчину;

*C* – молярна концентрація розчину, моль/дм$^3$;

*l* – товщина поглинаючого шару розчину, см.

- питоме поглинання (*a*):

$$a = \frac{\varepsilon}{\text{М. м} \cdot 1000}$$

де *М.м* – молярна маса досліджуваної речовини.

- коефіцієнт Сендела ($W_S$):

$$W_S = \frac{\text{М. м}}{\varepsilon}$$

- гранична концентрація ($C_{min}$, мкг/мл):

$$\text{C}_{min} = \frac{0{,}05 \cdot \text{М. м}}{\varepsilon \cdot 1000} \qquad (3.4)$$

*Таблиця 3.1*

**Аналітичні показники чутливості досліджуваних реакцій «лікарська речовина – реагент»**

| Лікарська речовина | $\lambda_{max}$, нм | ε | *a* | $W_S$ | $C_{min}$, мкг/мл |
|---|---|---|---|---|---|
| Метформін гідрохлорид | 409 | $1{,}94 \cdot 10^4$ | 0,12 | 0,0087 | 0,43 |
| Гліклазид | 411 | $0{,}40 \cdot 10^4$ | 0,012 | 0,0805 | 4,02 |
| Глібенкламід | 489 | $0{,}23 \cdot 10^4$ | 0,005 | 0,219 | 11,0 |

Результати, які наведені в табл. 3.1, показують високі значення молярних коефіцієнтів, малі значення меж виявлення і свідчать про високу чутливість

реакцій між досліджуваними лікарськими речовинами та відповідними реагентами.

3.5 Визначення стехіометричних співвідношень реагуючих компонентів реакцій досліджуваних речовин з реагентами

Для більш повного дослідження фотометричної реакції було проведено вивчення складу забарвлених продуктів реакції для чого визначались стехіометричні співвідношення компонентів реакцій.

Для встановлення стехіометричних коефіцієнтів реагуючих компонентів у реакції між досліджуваними лікарськими речовинами та відповідними реагентами використовували метод ізомолярних серій (неперервних змін), метод молярних співвідношень (насичення) та метод відносного виходу (Старіка-Барбанеля). Спільною рисою цих методів є використання закону діючих мас та основного закону світлопоглинання [119].

В основі методу ізомолярних серій лежить визначення співвідношень ізомолярних концентрацій реагуючих речовин, що відповідає максимальному виходу утвореного продукту $M_mR_n$. А крива залежності виходу продукту реакції від складу розчину характеризується екстремальною точкою. Ця точка відповідає максимально можливій концентрації продукту реакції $M_mR_n$, а її положення пов’язане зі стехіометричними коефіцієнтами $m$ і $n$ [9].

Для проведення аналізу готували розчини досліджуваних лікарських речовин та реагентів однакової молярної концентрації та змішували їх в антибатних співвідношеннях (від 1:9 до 9:1). Залишаючи незмінними загальний об’єм розчину та сумарну кількість молей обох компонентів у загальному об’ємі.

Розчини досліджуваних лікарських речовин та відповідних реагентів готували (однакова концентрація але різний об`єм) в оптимальних умовах згідно розроблених методик. Вимірювання оптичної густини проводили за відповідної аналітичної довжини хвилі на фоні компенсаційних розчинів, які не містили досліджуваної АФІ. За отриманими даними будували графіки

залежності абсорбції від співвідношення компонентів ізомолярних серій (рис. 3.13–3.15).

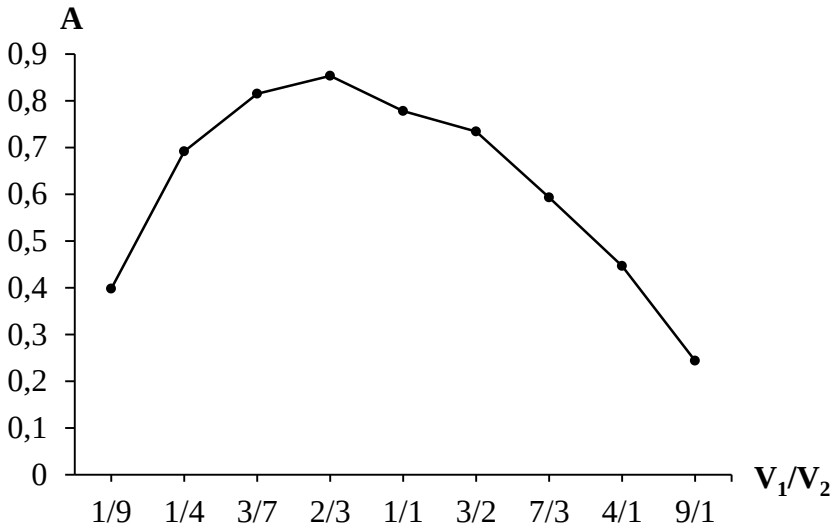



Рис. 3.13. Графік залежності абсорбції від співвідношення компонентів ізомолярного розчину ($V_1$ – об'єм 0,002 М розчину БКЗ, $V_2$ – об'єм 0,002 М розчину метформіну гідрохлориду)

Максимум на графіку ізомолярної кривої відповідав стехіометричному співвідношенню реагуючих компонентів. Якщо максимальне значення світлопоглинання на кривій спостерігається не чітко, тоді його положення визначали за допомогою екстраполяційного методу. Для цього проводили прямі лінії на початкових точках з обох боків кривої до взаємного перетину двох прямих. Отримана таким шляхом екстраполяційна точка перетину двох прямих відповідає екстремальній точці на ізомолярній кривій. Таким чином методом неперервних змін було встановлені стехіометричні коефіцієнти всіх досліджуваних реакцій.

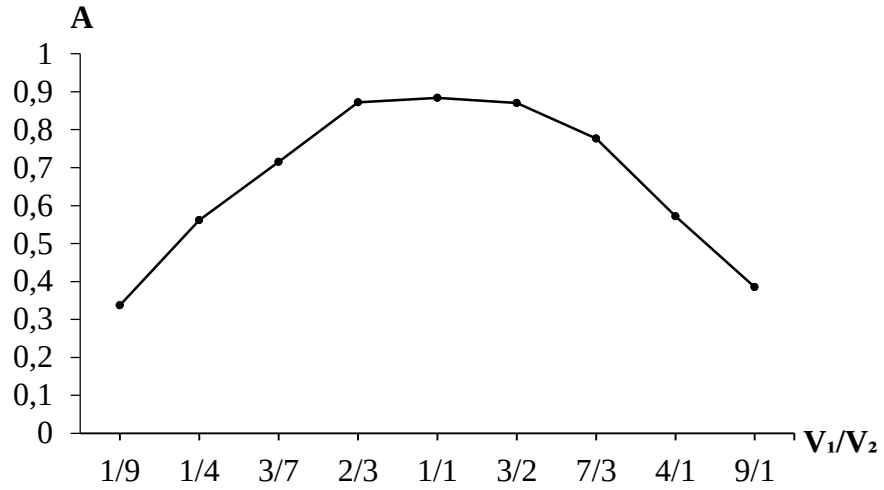



Рис. 3.14. Графік залежності абсорбції від співвідношення компонентів ізомолярного розчину ($V_1$ – об'єм 0,01 М розчину БКЗ, $V_2$ – об'єм 0,01 М розчину гліклазиду)

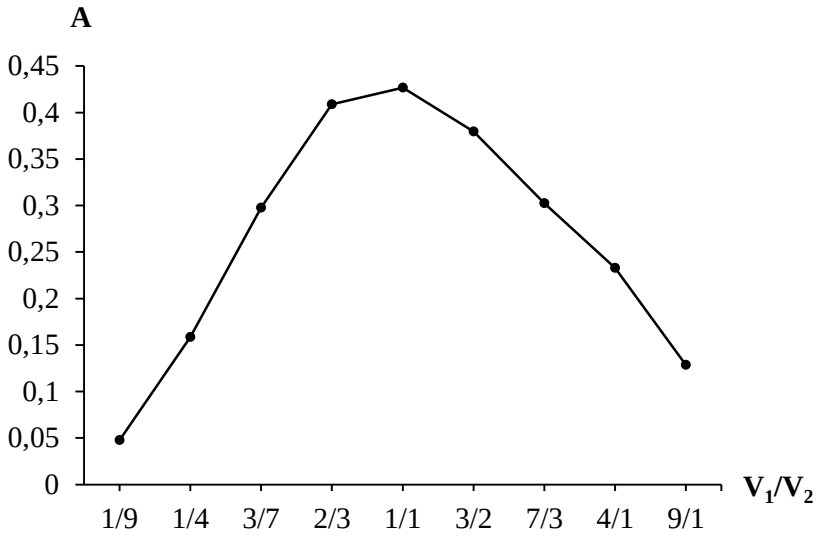



Рис. 3.15. Графік залежності абсорбції від співвідношення компонентів ізомолярного розчину ($V_1$ – об'єм 0,005 М розчину 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону, $V_2$ – об'єм 0,005 М розчину глібенкламіду)

Для уточнення і порівняння результатів стехіометричного співвідношення компонентів ізомолярного розчину, застосовують більш загальний метод, метод насичення (метод молярних співвідношень). В основі цього методу лежить встановлення залежності оптичної густини від

концентрації одного з компонентів реакційної суміші при постійній концентрації другого компонента та навпаки. Точка перегину на кривій насичення відповідає молярному співвідношенню реагуючих сполук та дорівнює стехіометричному коефіцієнту компонента, концентрація якого змінювалася. Якщо точка перегину на кривій насичення спостерігалась не чітко, її визначали екстраполяцією прямолінійних ділянок кривої до взаємного перетину [119].

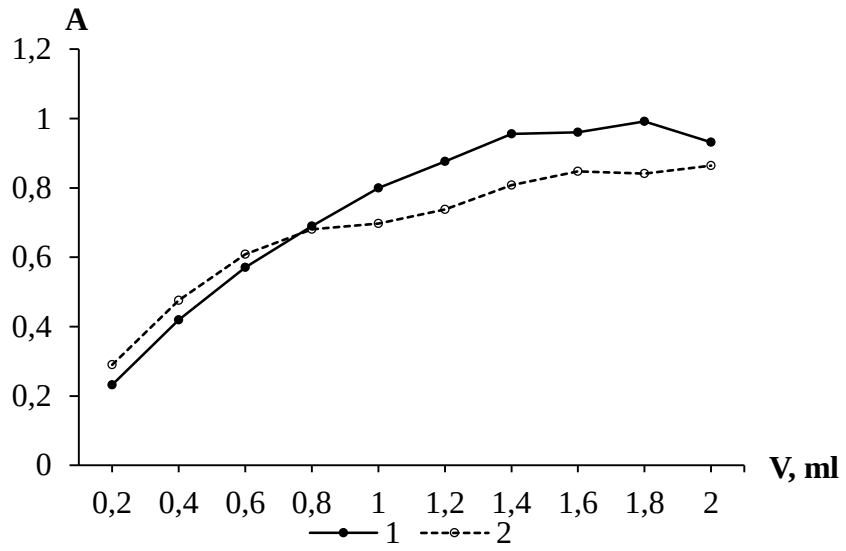



Рис. 3.16. Криві насичення: 1 – метформіну гідрохлориду при постійній концентрації БКЗ (1,00 мл 0,001 М розчину); 2 – БКЗ при постійній концентрації метформіну гідрохлориду (1,00 мл 0,001 М розчину)

Проводили дане дослідження у два етапи. Для цього готували розчини досліджуваних лікарських речовин та відповідних реагентів з однаковою молярною концентрацією. Далі досліджували дві серії розчинів. Наприклад, для встановлення стехіометричних співвідношень між метформіном гідрохлоридом та БКЗ у першій серії досліду в мірні колби ємністю 10,00 мл додавали 0,20; 0,40; 0,60; 0,80; 1,00; 1,20; 1,40; 1,60; 1,80 та 2,00 мл 0,001 М розчину метформіну гідрохлориду. До кожної проби додавали по 1,00 мл 0,001 М розчину БКЗ та аналізували згідно розробленої методики. Дослідження другої серії проводили аналогічно, але тепер кількість доданого розчину

метформіну гідрохлориду (1,00 мл) була постійною, а кількість доданого розчину БКЗ змінювалась від 0,2 до 2,00 мл. Абсорбцію вимірювали на фоні компенсаційних розчинів з відповідними об’ємами БКЗ, та які не містили розчину метформіну гідрохлориду. Згідно отриманих даних будували криві насичення (рис. 3.16.). Таке ж дослідження було проведено для гліклазиду з БКЗ та глібенкламіду з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном. Результати наведено на рис. 3.15–3.17.

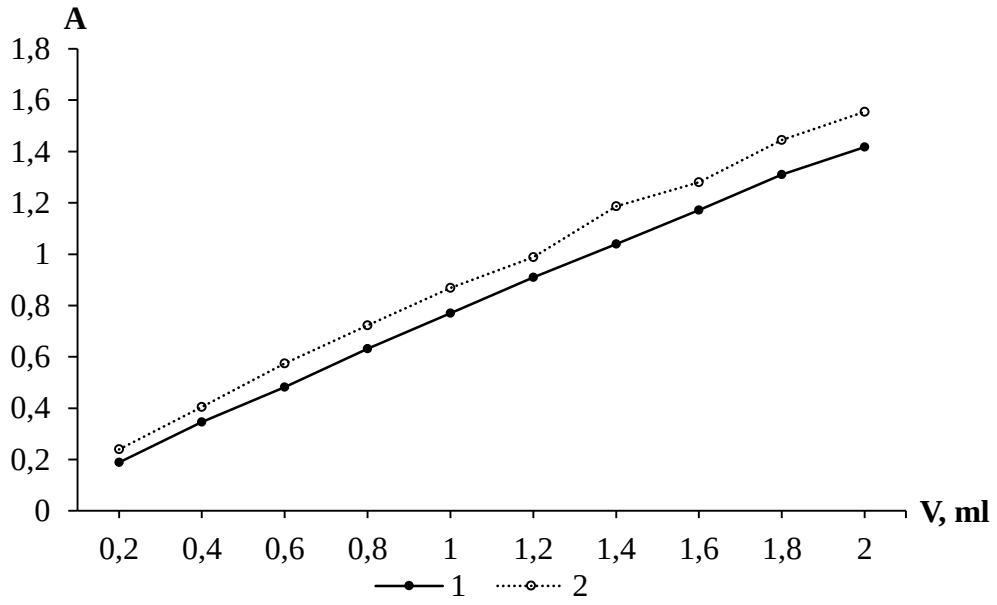



Рис. 3.17. Криві насичення: 1 – гліклазиду при постійній концентрації БКЗ (1,00 мл 0,01 М розчину); 2 – БКЗ при постійній концентрації гліклазиду (1,00 мл 0,01 М розчину)

Аналізуючи криві насичення (рис. 3.16–3.18) можна зробити висновок, що перегин кривих спостерігається при співвідношенні реагуючих компонентів «лікарська речовина - реагент» 1:1.

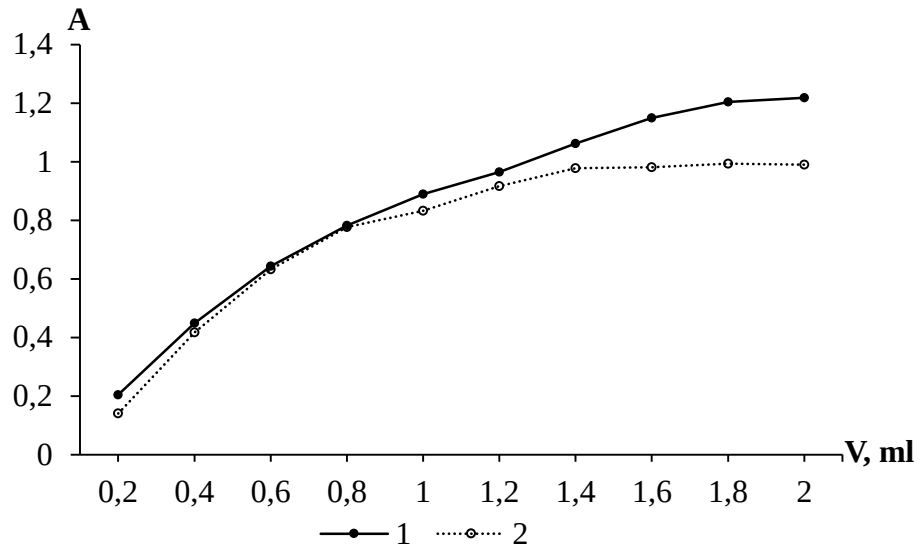



Рис. 3.18 Криві насичення: 1 – глібенкламіду при постійній концентрації 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону (1,00 мл 0,005 М розчину); 2 – 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону при постійній концентрації глібенкламіду (1,00 мл 0,005 М розчину)

Метод відносного виходу (метод Старика-Барбанеля) заснований на використанні рівняння алгебраїчної суми стехіометричних коефіцієнтів реакції, яке характеризує склад рівноважної суміші в точці максимального відносного виходу (максимального відношення концентрації продукту реакції до змінної початкової концентрації одного з реагуючих компонентів). Головною перевагою даного методу є те, що не має обмежень при виборі інтервалу концентрацій та можливість встановлювати склад сполук, що утворюються за будь-яким стехіометричним рівнянням, оскільки метод дозволяє визначати абсолютні значення, а не співвідношення стехіометричних коефіцієнтів [119].

В ході аналізу будували графічну криву відносного виходу в координатах $A/C_1$ – $A/A_{max}$ при постійному значенні $C_2$ та навпаки у координатах $A/C_2$ – $A/A_{max}$ при постійному значенні $C_1$. Для цього брали дані, отримані у попередньому експерименті (рис. 3.19, 3.20).

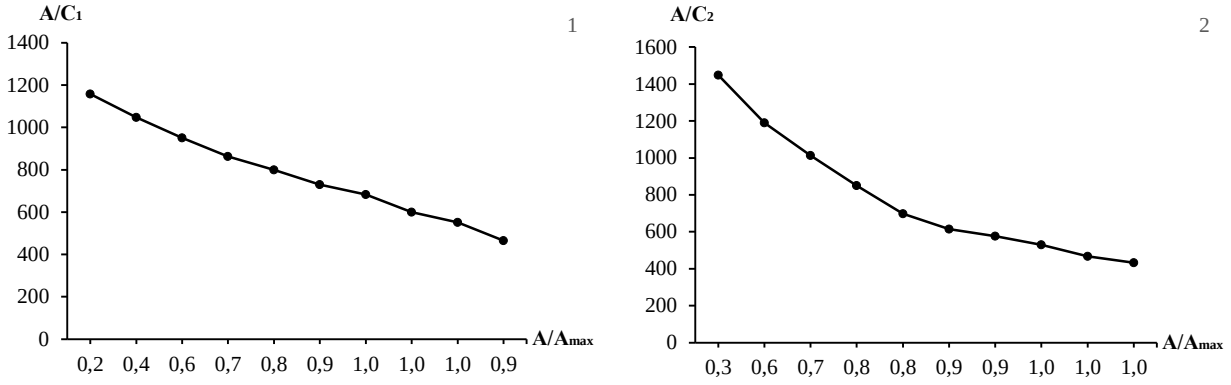



Рис. 3.19. Криві відносного виходу: 1 – метформіну гідрохлориду при постійній концентрації БКЗ (1,00 мл 0,001 М розчину); 2 – БКЗ при постійній концентрації метформіну гідрохлориду (1,00 мл 0,001 М розчину)

Якщо на побудованих кривих відносного виходу відсутні максимуми, то це свідчить, що стехіометричний коефіцієнт компоненту змінної концентрації дорівнює одиниці. Але якщо на графіках відносного виходу спостерігається максимум, то тоді визначають їх абсциси та розраховують за формулами.

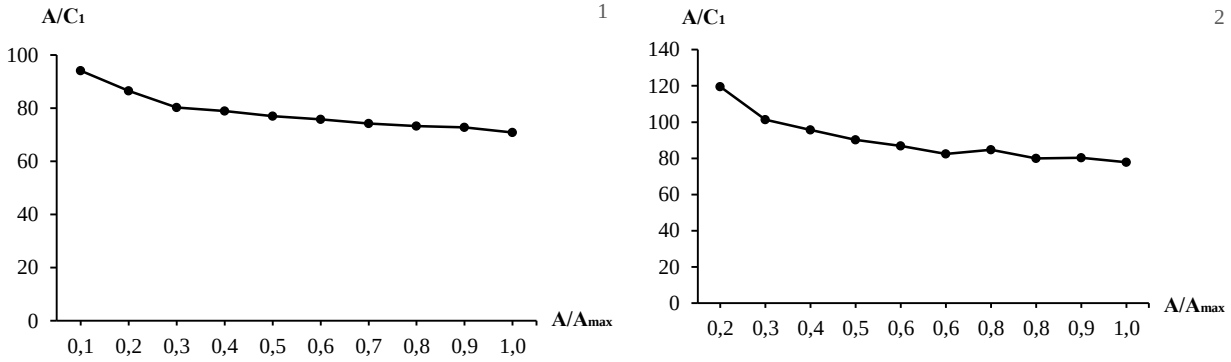



Рис. 3.20. Криві відносного виходу: 1 – гліклазиду при постійній концентрації БКЗ (1,00 мл 0,01 М розчину); 2 – БКЗ при постійній концентрації гліклазиду (1,00 мл 0,01 М розчину)

За результатами проведених досліджень були встановлені стехіометричні співвідношення реагуючих компонентів «лікарська речовина -

реагент» за допомогою методів ізомолярних серій, насичення та відносного виходу. Отримані результати узгоджуються між собою і наведені в табл. 3.2.

*Таблиця 3.2*

**Стехіометричні співвідношення компонентів реакції «лікарська речовини - реагент»**

| Лікарська речовина/реагент | Метод визначення | | |
|---|---|---|---|
| | Метод непрервних змін | Метод відносного виходу | Метод насичення |
| Метформіну гідрохлорид/БКЗ | 1:1 | 1:1 | 1:1 |
| Гліклазид/БКЗ | 1:1 | 1:1 | 1:1 |
| Глібенкламід/2,3-дихлор-1,4-нафтохінон | 1:1 | 1:1 | 1:1 |

Матеріали розділу викладені в роботах [116-118]:

1. Leleka, L., Vasyuk, S. Spectrophotometric Method Development and Validation for Gliclazide Quantitation in Tablets. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*. 2022. Vol. 46, № 3. P 920-930.

2. Дем'янова, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення гліклазиду в лікарському препараті «Діаглізид» Фармак. *«Сучасні аспекти медицини та фармації – 2021»*: матеріали 81 Всеукраїнської наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю, м. Запоріжжя, 15-16 квіт. 2021 р. Запоріжжя, 2021. С. 141-142.

3. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення глібенкламіду в

лікарському препараті «Глібенкламід Здоровья». *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів*: матеріали IX Наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Тернопіль, 22-23 вер. 2022 р. Тернопіль, 2022. С. 89-90.

## Висновки до розділу 3

1. Вивчені оптимальні умови проведення реакцій метформіну гідрохлориду та гліклазиду з сульфофталеїновими барвниками:
   - встановлено, що як оптимальне середовище для проведення реакції між досліджуваними лікарськими речовинами та сульфофталеїновими барвниками найбільш придатними є водно-ацетонове для метформіну гідрохлориду і ацетонове середовище для гліклазиду;
   - визначено, що оптимальним реагентом для зазначених АФІ є БКЗ, експериментально встановлено концентрацію і об'єм БКЗ, необхідні для максимальної повноти перебігу реакції у випадку метформіну гідрохлориду та гліклазиду;
   - доведено, що реакції перебігають швидко, за кімнатної температури та не потребують додаткових умов;
   - встановлено, що продукти взаємодії досліджуваних лікарських речовин з БКЗ стабільні протягом 30 хв.
2. Вивчені оптимальні умови проведення реакцій глібенкламіду з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном:
   - Встановлено, що як розчинник для проведення реакції між глібенкламідом та 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном найбільш оптимальним є ДМФА;
   - доведено, що реакція між досліджуваною лікарською речовиною та реагентом перебігає при нагріванні реакційної суміші на водяній бані при 95 °С впродовж 25 хв;

- встановлено, що продукт взаємодії глібенкламіду з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном залишається стабільним впродовж щонайменше 1 год.

3. Розраховано аналітичні показники чутливості досліджуваних реакцій для метформіну гідрохлориду та гліклазиду за їх реакціями з БКЗ. Низькі значення граничних концентрацій (0,43 мкг/мл, 4,02 мкг/мл), а також високі значення молярних коефіцієнтів світлопоглинання ($1{,}94 \cdot 10^4$, $0{,}40 \cdot 10^4$) свідчать про високу чутливість даних реакцій.

4. Розраховано аналітичні показники чутливості досліджуваної реакції для глібенкламіду з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном. Низьке значення граничної концентрації 11 мкг/мл, а також високе значення молярного коефіцієнту світлопоглинання $0{,}23 \cdot 10^4$ свідчать про високу чутливість даної реакції.

5. Встановлено методами насичення, ізомолярних серій та відносного виходу стехіометричні коефіцієнти реагуючих компонентів в досліджуваних реакціях і становлять 1:1 у кожному випадку.

# РОЗДІЛ IV
# РОЗРОБКА МЕТОДИК КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ГІПОГЛІКЕМІЧНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ЗА ЇХ РЕАКЦІЯМИ З КОЛЬОРОРЕАГЕНТАМИ

## 4.1 Визначення питомого показника поглинання продуктів реакції досліджуваних АФІ з реагентами

Наступним етапом даної роботи було розроблення методик кількісного визначення досліджуваних АФІ у лікарських препаратах на основі експериментальних даних, висвітлених у розділі 3. Оскільки кількісне визначення досліджуваних лікарських речовин слід проводити в межах їх концентрацій, які підпорядковуються основному закону світлопоглинання, попередньо були встановлені значення питомих показників поглинання за наступними методиками.

*Методика визначення метформіну гідрохлориду.* Приготування досліджуваних розчинів: точну наважку субстанції метформіну гідрохлориду (0,01700 г) вміщують у мірну колбу ємністю 200,00 мл, розчиняють у 2,00 мл води очищеної, доводять ацетоном до позначки та перемішують. Із розведення беруть від 0,40 до 1,30 мл (крок 0,10 мл) водно-ацетонового розчину метформіну гідрохлориду в колби ємністю 10,00 мл, додають 1,00 мл 1,4 % розчину БКЗ та доводять ацетоном до позначки. Приготування компенсаційного розчину: до мірної колби на 10,00 мл поміщають 1,00 мл 1,4 % розчину БКЗ в ацетоні, доводять ацетоном до позначки та перемішують. Оптичну густину досліджуваних зразків вимірюють на фоні компенсаційного розчину, за аналітичної довжини хвилі 408 нм.

*Методика визначення гліклазиду.* Приготування досліджуваних розчинів: точну наважку субстанції гліклазиду (0,01950 г) вміщують у мірну колбу ємністю 25,00 мл, розчиняють в ацетоні, доводять тим же розчинником до позначки та перемішують. Із розведення беруть від 0,80 до 1,70 мл (крок

0,10 мл) ацетонового розчину гліклазиду в колби ємністю 10,00 мл, додають 1,50 мл 4,2 % розчину БКЗ, доводять ацетоном до позначки та перемішують. Приготування компенсаційного розчину: до мірної колби на 10,00 мл поміщають 1,50 мл 4,2 % розчину БКЗ в ацетоні, доводять ацетоном до позначки та перемішують. Оптичну густину досліджуваних зразків вимірюють на фоні компенсаційного розчину, за аналітичної довжини хвилі 411 нм.

*Методика визначення глібенкламіду.* Приготування досліджуваних розчинів: точну наважку субстанції глібенкламіду (0,05150 г) вміщують у мірну колбу ємністю 25,00 мл, розчиняють в ДМФА, доводять тим же розчинником до позначки та перемішують. Із розведення беруть від 0,60 до 1,50 мл (крок 0,10 мл) приготовленого розчину глібенкламіду в колби ємністю 10,00 мл, додають 1,00 мл 0,5 % розчину 2,3-дихлоро-1,4-нафтохінону, нагрівають на водяній бані 25 хв при 95°С, суміш охолоджують, доводять ДМФА до позначки та перемішують. Приготування компенсаційного розчину: до мірної колби на 10,00 мл поміщають 1,00 мл 0,5 % розчину 2,3-хихлоро-1,4-нафтохінону в ДМФА, нагрівають на водяній бані 25 хв при 95°С, охолоджують, доводять ДМФА до позначки та перемішують Оптичну густину досліджуваних зразків вимірюють на фоні компенсаційного розчину, за аналітичної довжини хвилі 491 нм.

Значення питомих показників поглинання (табл. 4.1) розраховували за загальноприйнятою формулою:

$$A_{1см}^{1\%} = \frac{A}{C \cdot l}, \qquad (4.1)$$

де $A$ – оптична густина досліджуваного розчину;

$C$ – концентрація розчину в г/100 мл;

$l$ – товщина шару, см

*Таблиця 4.1*

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

| Лікарська речовина | $\lambda_{max}$, нм | Обраний інтервал концентрацій, мг/100 мл | $A_{1см}^{1\%}$ |
|---|---|---|---|
| Метформіну гідрохлорид | 408 | 0,50 – 1,20 | 1151±15 |
| Гліклазид | 411 | 5,20 – 10,40 | 123±1 |
| Глібенкламід | 491 | 13,70 – 27,40 | 46±1 |

Для визначення вмісту досліджуваних лікарських речовин спектрофотометричним методом використовували метод стандарту, який ґрунтується на порівнянні оптичної густини розчину аналізованого зразка з оптичною густиною РСЗ лікарської речовини, виміряних в однакових умовах. Даний метод дозволяє отримати більш точні результати і врахувати вплив таких чинників, як температура, довжина хвилі, похибка розведення, систематична похибка тощо.

Тому для кількісного визначення застосовували робочі стандартні розчини (розчини порівняння), які готували із субстанцій досліджуваних лікарських речовин, що відповідали вимогам нормативної документації. Концентрації вихідних стандартних розчинів та розчинів, які спектрофотометрували, наведені в табл. 4.2.

*Таблиця 4.2*

**Значення концентрації стандартних розчинів**

| Лікарська речовина | Концентрація | |
|---|---|---|
| | вихідного розчину, % | розчину, який спектрофотометрують, г/100 мл |
| Метформін гідрохлорид | 0,0085 | 0,00085 |
| Гліклазид | 0,078 | 0,0078 |
| Глібенкламід | 0,206 | 0,0206 |

4.2 Методики кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин у складі лікарських форм

*Приготування розчинів порівняння:* точну наважку РСЗ відповідної лікарської речовини, згідно концентрацій початкових розчинів, які наведені у табл. 4.2, вміщують у мірну колбу ємністю 25,00 мл, розчиняють та доводять відповідним розчинником до позначки, переміщують.

*Методика кількісного визначення метформіну гідрохлориду в таблетках.* Точну наважку ретельно розтертої таблеткової маси (табл. 4.3) переносять до мірної колби на 100,00 мл, додають 1,00 мл води очищеної, доводять ацетоном до позначки, ретельно перемішують та фільтрують крізь знезолений паперовий фільтр «синя стрічка», відкидаючи перші порції фільтрату. 1,00 мл отриманого розчину переносять у мірну колбу на 10,00 мл, додають 1,00 мл 1,4% розчину БКЗ, доводять ацетоном до позначки та перемішують. Вимірюють оптичну густину на фоні компенсаційного розчину, який не містить досліджуваної лікарської речовини. Паралельно проводять вимірювання розчину порівняння метформіну гідрохлориду. Розрахунок кількісного вмісту діючої речовини проводять за формулою 4.2.

*Методика кількісного визначення гліклазиду в таблетках.* Точну наважку ретельно розтертої таблеткової маси (табл. 4.3) переносять до мірної колби на 25,00 мл, розчиняють і доводять ацетоном до позначки, ретельно перемішують та фільтрують крізь беззольний паперовий фільтр «синя стрічка», відкидаючи перші порції фільтрату. 1,00 мл отриманого розчину переносять у мірну колбу на 10,00 мл, додають 1,50 мл 4,2% розчину БКЗ, доводять ацетоном до позначки та перемішують. Вимірюють оптичну густину на фоні компенсаційного розчину, який не містить досліджуваної лікарської речовини. Паралельно проводять вимірювання розчину порівняння гліклазиду. Розрахунок кількісного вмісту діючої речовини проводять за формулою 4.2.

*Методика кількісного визначення глібенкламіду в таблетках.* Точну наважку ретельно розтертої таблетованої маси (табл. 4.3) переносять у мірну колбу на 25,00 мл, розчиняють і доводять ДМФА до позначки, ретельно перемішують та фільтрують крізь беззольний паперовий фільтр «синя стрічка», відкидаючи перші порції фільтрату. 1,00 мл отриманого розчину переносять у мірну колбу на 10,00 мл, додають 1,00 мл 0,5% розчину 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону, отриману суміш нагрівають на водяній бані при 95°С впродовж 25 хв, потім охолоджують та доводять ацетоном до позначки, перемішують. Вимірюють оптичну густину на фоні компенсаційного розчину, який не містить досліджуваної лікарської речовини. Паралельно проводять вимірювання розчину порівняння глібенкламіду. Розрахунок кількісного вмісту діючої речовини проводять за формулою 4.2.

*Таблиця 4.3*

**Діапазон наважок лікарських препаратів, що використовуються для аналізу**

| Лікарський препарат (кількісний вміст лікарської речовини в 1 таблетці/середня маса таблетки) | Наважки, г | Ємність мірної колби для розчинення, мл |
|---|---|---|
| Таблетки «Глюкофаж» 500 мг (0,5 г/0,53043) | 0,00725 – 0,01086 | 100,00 |
| Таблетки «Метформін Астрафарм» 500 мг (0,5 г/0,53027) | 0,00721 – 0,01082 | 100,00 |
| Таблетки «Метформін Тева» 1000 мг (1 г/1,08921) | 0,00753 – 0,01116 | 100,00 |
| Таблетки «Метформін Сандоз» 850 мг (0,85 г/0,89292) | 0,00738 – 0,01081 | 100,00 |
| Таблетки «Діабетон MR» 60 мг (0,06 г/0,32216) | 0,08323 – 0,12609 | 25,00 |
| Таблетки «Діаглізид MR» 30 мг (0,03 г/0,14875) | 0,07688 – 0,11641 | 25,00 |
| Таблетки «Діаглізид» 80 мг (0,08 г/0,14730) | 0,02860 – 0,04321 | 25,00 |
| Таблетки «Гліклада» 60 мг (0,06 г/0,31935) | 0,08255 – 0,12505 | 25,00 |
| Таблетки «Манініл» 5 мг (0,005 г/0,14936) | 1,23222 – 1,84459 | 25,00 |
| Таблетки «Глібенкламід-Здоров’я» 5 мг (0,005 г/0,12194) | 1,20356 – 1,80522 | 25,00 |

Розрахунок вмісту досліджуваних речовин у лікарських препаратах у грамах проводять за формулою:

$$x = \frac{A \cdot p_{\text{заг}}}{A_0 \cdot p \cdot l \cdot 100} \cdot k, \quad (4.2)$$

де $A$ – оптична густина досліджуваного розчину;

$p_{заг}$ – середня маса лікарської форми;

$A_0$ – оптична густина розчину порівняння;

$p$ – наважка лікарської форми, г або мл;

$l$ – товщина шару, см;

$k$ – розрахунковий коефіцієнт з урахуванням розведень та концентрації розчину порівняння.

Одержані результати кількісного аналізу досліджуваних лікарських речовин у складі лікарських засобів наведено в табл. 4.4.

*Таблиця 4.4*

**Результати кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин у складі таблеток (n=6, p=0,95)**

| Лікарський препарат | Наважка, г (мл) | Знайдено, г | Метрологічні характеристики |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| Таблетки «Глюкофаж» 500 мг (0,5 г/0,53043) | 0,00541<br>0,00721<br>0,00806<br>0,00902<br>0,01082<br>0,01262 | 0,499<br>0,501<br>0,499<br>0,500<br>0,503<br>0,497 | $\overline{X}$ = 0,500<br>$S$ = 1,88·10$^{-3}$<br>$S_{\bar{X}}$ = 7,68·10$^{-4}$<br>$\Delta_X$ = 3,79·10$^{-3}$<br>$\Delta_{\bar{X}}$ = 1,55·10$^{-3}$<br>$\bar{\varepsilon}$ = 0,309 |
| Таблетки «Метформін Астрафарм» 500 мг (0,5 г/0,53027) | 0,00541<br>0,00721<br>0,00806<br>0,00901<br>0,01082<br>0,01262 | 0,500<br>0,503<br>0,500<br>0,504<br>0,499<br>0,499 | $\overline{X}$ = 0,501<br>$S$ = 2,07·10$^{-3}$<br>$S_{\bar{X}}$ = 8,44·10$^{-4}$<br>$\Delta_X$ = 4,17·10$^{-3}$<br>$\Delta_{\bar{X}}$ = 1,70·10$^{-3}$<br>$\bar{\varepsilon}$ = 0,340 |

*Продовж. табл. 4.4*

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|
| Таблетки «Метформін Тева» 1000 мг (1 г/1,08921) | 0,00555<br>0,00741<br>0,00828<br>0,00926<br>0,01111<br>0,01296 | 0,999<br>1,000<br>0,996<br>1,000<br>1,002<br>0,999 | $\overline{X}$ = 0,999<br>$S = 1{,}89 \cdot 10^{-3}$<br>$S_{\bar{X}} = 7{,}70 \cdot 10^{-4}$<br>$\Delta_X = 3{,}81 \cdot 10^{-3}$<br>$\Delta_{\bar{X}} = 1{,}55 \cdot 10^{-3}$<br>$\bar{\varepsilon}$ = 0,156 |
| Таблетки «Метформін Сандоз» 850 мг (0,85 г/0,89292) | 0,00536<br>0,00717<br>0,00798<br>0,00893<br>0,01072<br>0,01250 | 0,850<br>0,849<br>0,852<br>0,845<br>0,851<br>0,851 | $\overline{X}$ = 0,849<br>$S = 2{,}44 \cdot 10^{-3}$<br>$S_{\bar{X}} = 9{,}97 \cdot 10^{-4}$<br>$\Delta_X = 4{,}92 \cdot 10^{-3}$<br>$\Delta_{\bar{X}} = 2{,}01 \cdot 10^{-3}$<br>$\bar{\varepsilon}$ = 0,236 |
| Таблетки «Діабетон MR» 60 мг (0,06 г/0,32216) | 0,07410<br>0,08322<br>0,09396<br>0,10470<br>0,12618<br>0,13584 | 0,0604<br>0,0600<br>0,0601<br>0,0599<br>0,0595<br>0,0596 | $\overline{X}$ = 0,0599<br>$S = 3{,}31 \cdot 10^{-4}$<br>$S_{\bar{X}} = 1{,}35 \cdot 10^{-4}$<br>$\Delta_X = 6{,}67 \cdot 10^{-4}$<br>$\Delta_{\bar{X}} = 2{,}72 \cdot 10^{-4}$<br>$\bar{\varepsilon}$ = 0,454 |
| Таблетки «Діаглізид MR» 30 мг (0,03 г/0,14875) | 0,06843<br>0,07685<br>0,08677<br>0,09669<br>0,11652<br>0,12545 | 0,0303<br>0,0301<br>0,0301<br>0,0297<br>0,0297<br>0,0299 | $\overline{X}$ = 0,0300<br>$S = 2{,}42 \cdot 10^{-4}$<br>$S_{\bar{X}} = 9{,}89 \cdot 10^{-5}$<br>$\Delta_X = 4{,}88 \cdot 10^{-4}$<br>$\Delta_{\bar{X}} = 1{,}99 \cdot 10^{-4}$<br>$\bar{\varepsilon}$ = 0,664 |
| Таблетки «Діаглізид» 80 мг (0,08 г/0,14730) | 0,02541<br>0,02854<br>0,03222<br>0,03590<br>0,04327<br>0,04658 | 0,0796<br>0,0800<br>0,0801<br>0,0798<br>0,0800<br>0,0803 | $\overline{X}$ = 0,0800<br>$S = 2{,}42 \cdot 10^{-4}$<br>$S_{\bar{X}} = 9{,}89 \cdot 10^{-5}$<br>$\Delta_X = 4{,}88 \cdot 10^{-4}$<br>$\Delta_{\bar{X}} = 1{,}99 \cdot 10^{-4}$<br>$\bar{\varepsilon}$ = 0,249 |
| Таблетки «Гліклада» 60 мг (0,06 г/0,31935) | 0,07345<br>0,08250<br>0,09314<br>0,10379<br>0,12508<br>0,13466 | 0,0597<br>0,0602<br>0,0602<br>0,0600<br>0,0599<br>0,0601 | $\overline{X}$ = 0,0600<br>$S = 1{,}94 \cdot 10^{-4}$<br>$S_{\bar{X}} = 7{,}92 \cdot 10^{-5}$<br>$\Delta_X = 3{,}91 \cdot 10^{-4}$<br>$\Delta_{\bar{X}} = 1{,}60 \cdot 10^{-4}$<br>$\bar{\varepsilon}$ = 0,266 |

*Продовж. табл. 4.4*

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|
| Таблетки «Манініл» 5 мг (0,005 г/0,14936) | 1,07539<br>1,23371<br>1,38307<br>1,53841<br>1,84609<br>2,00142 | 0,00499<br>0,00497<br>0,00501<br>0,00499<br>0,00500<br>0,00502 | $\overline{X}$ = 0,0050<br>$S = 1{,}75 \cdot 10^{-5}$<br>$S_{\bar{X}} = 7{,}15 \cdot 10^{-6}$<br>$\Delta_X = 3{,}53 \cdot 10^{-5}$<br>$\Delta_{\bar{X}} = 1{,}44 \cdot 10^{-5}$<br>$\bar{\varepsilon}$ = 0,288 |
| Таблетки «Глібенкламід-Здоров'я» 5 мг (0,005 г/0,12194) | 0,87797<br>1,00722<br>1,12916<br>1,25598<br>1,50718<br>1,63400 | 0,00497<br>0,00495<br>0,00499<br>0,00503<br>0,00501<br>0,00499 | $\overline{X}$ = 0,0050<br>$S = 2{,}82 \cdot 10^{-5}$<br>$S_{\bar{X}} = 1{,}15 \cdot 10^{-5}$<br>$\Delta_X = 5{,}68 \cdot 10^{-5}$<br>$\Delta_{\bar{X}} = 2{,}32 \cdot 10^{-5}$<br>$\bar{\varepsilon}$ = 0,465 |

Згідно з експериментальними даними, які наведені в табл. 4.4., можна зробити висновок, що отримані результати кількісного визначення досліджуваних лікарських препаратів є достатньо точними та статистично достовірними.

Матеріали розділу викладені в роботах [120-124]:

1. Leleka, L. Vasyuk, S. Development of a Method for the Quantitative Determination of Glibenclamide in tablets. *Journal of Current issues in pharmacy and medicine: science and practice.* 2023. Vol. 16, № 2. P. 135-140.

2. Дем'янова, Л. Г., Бугайова В.В. Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення метформіну гідрохлориду в препараті «Метформін-Тева» *International scientific conference of young scientists and students "Perspectives for the development of biology, medicine and pharmacy"*, Shymkent, Republic of Kazakhstan, 10-11 Nov. 2020. Shymkent, 2020. Vol. 4. P. 135.

3. Дем'янова, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення гліклазиду в

лікарському препараті «Діабетон». *LXIV підсумкова науково-практична конференція*, м. Тернопіль, 11 черв. 2021 р. Тернопіль, 2021. С. 145-146.

4. Дем'янова, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення метформін гідрохлорид в препараті «Метформін Глюкофаж» *Міжнародна науково-практичноа конференція «PLANTA+*: Наука, практика та освіта», м. Київ. 19 лют. 2021 р. Київ, 2021. С. 74-75

5. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О. Спектрофотометричне визначення гліклазиду в лікарському препараті «Гліклада». *Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю*, м. Запоріжжя, 25-26 лист. 2021 р. Запоріжжя, 2021. С. 62.

Висновки до розділу 4

1. Встановлено межі концентрацій, в яких спостерігається підпорядкування основному закону світлопоглинання, а також розраховано значення питомих показників поглинання для продуктів реакцій досліджуваних гіпоглікемічних АФІ з відповідними реагентами.

2. Розроблено спектрофотометричні методики кількісного визначення досліджуваних гіпоглікемічних лікарських речовин у складі промислових лікарських форм різних виробників. Розроблені методики є простими, доступними та експресними у виконанні.

3. Проведено статистичну обробку результатів кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин у складі лікарських форм за розробленими методиками. Отримані показники відносної невизначеності середнього результату свідчать, що розроблені методики мають високу відтворюваність.

# РОЗДІЛ V
# ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ГІПОГЛІКЕМІЧНИХ ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН

Головною вимогою ДФУ до розробки методів кількісного аналізу лікарських речовин є валідація методик. Валідація дає гарантію якості та надійності отриманих результатів. За її допомогою можна вчасно спрогнозувати та виявити недоліки методик і вдосконалити їх, що дозволяє знизити похибки при наступному виконанні валідованих методик. Згідно з ДФУ усі аналітичні методики, що включаються в нормативні документи, повинні бути валідованими. Для валідації розроблених методик кількісного визначення гіпоглікемічних лікарських речовин визначались наступні характеристики: специфічність, діапазон застосування, правильність, прецизійність та робасність [125, 126].

## 5.1 Специфічність

Як зазначається в ДФУ [125], специфічність – здатність методики однозначно оцінювати аналізовану речовину за присутності інших компонентів, що можуть бути присутніми в зразку (допоміжні речовини, домішки, продукти розкладу тощо). При кількісному визначенні специфічність методики дає змогу довести, що методика дає точно та правильно встановити вміст або активність саме аналізованої речовини в зразку. При валідації методики обов’язковим є визначення специфічності досліджуваної реакції – це контроль домішок, ідентифікація і кількісне визначення [127].

Визначення специфічності проводять на початкових етапах розробки методики. Адже при відсутності достатньої специфічності інші характеристики методики вже не мають значення. Для визначення специфічності використовують прямий і непрямий підходи [128].

При використанні прямого підходу підтверджують відсутність (або припустимість) впливу інших речовин. А непрямий підхід аналітичної методики доказує прийнятну правильність отриманих результатів. Також використовують альтернативний варіант оцінки специфічності, який полягає у порівнянні результатів аналізу зразків, що містять домішки пропонованою методикою з іншою арбітражною методикою (фармакопейна або інша валідована методика) [125].

Для підтвердження специфічності спектрофотометричних визначень потрібно довести, що відносна систематична похибка ($\delta_{noise}$,%), яка вноситься допоміжними речовинами та продуктами розкладу у визначення аналізованої речовини, є незначимою у порівнянні з максимально припустимою невизначеністю аналізу ($\Delta_{As}$, %).

Величину $\delta_{noise}$ представляють у вигляді суми вкладів, пов'язаних з допоміжними речовинами ($\delta_{exc}$) та домішками ($\delta_{imp}$). Відносна систематична похибка ($\delta_{noise}$) не повинна перевищувати максимально припустиму систематичну похибку ($max\ \delta$) [129]:

$$\delta_{noise} = \delta_{\text{exc}} + \delta_{imp} \leq 0{,}32 \cdot max\Delta_{As} = max\delta \qquad (5.1)$$

Для оцінки специфічності досліджуваних методик кількісного визначення гіпоглікемічних лікарських речовин у складі лікарських форм промислового виробництва, зокрема метформіну гідрохлориду (таблетки «Глюкофаж» 0,5 г, таблетки «Метформін Астрафарм» 0,5 г, таблетки «Метформін Тева» 1 г, таблетки «Метформін Сандоз» 0,85 г), гліклазиду (таблетки «Діаглізид MR» 0,03 г, таблетки «Діабетон MR» 0,06 г, таблетки «Діаглізид» 0,08 г, таблетки «Гліклада» 0,06 мг ) та глібенкламіду (таблетки «Манініл» 0,005 г, таблетки «Глібенкламід-Здоров'я» 0,005 г) проводили випробування розчинів «плацебо». Для цього готували модельні суміші допоміжних речовин. До кожної модельної суміші додавали відповідну

лікарську речовину в концентрації, що міститься у досліджуваному препараті. Далі проводили усі етапи пробопідготовки та вимірювали оптичну густину розчину «плацебо» та розчину порівняння, що містив досліджувану речовину (рис.5.1-5.2).

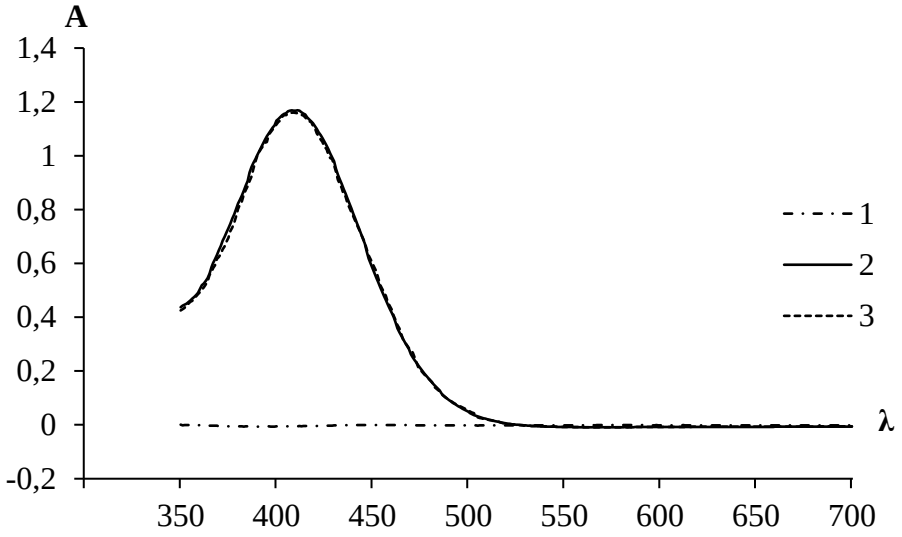



Рис. 5.1. Спектри поглинання розчину «плацебо» таблеток «Глюкофаж» 500 мг (1), розчину порівняння метформіну гідрохлориду (2) та розчину таблеток «Глюкофаж» 500 мг (3) з БКЗ

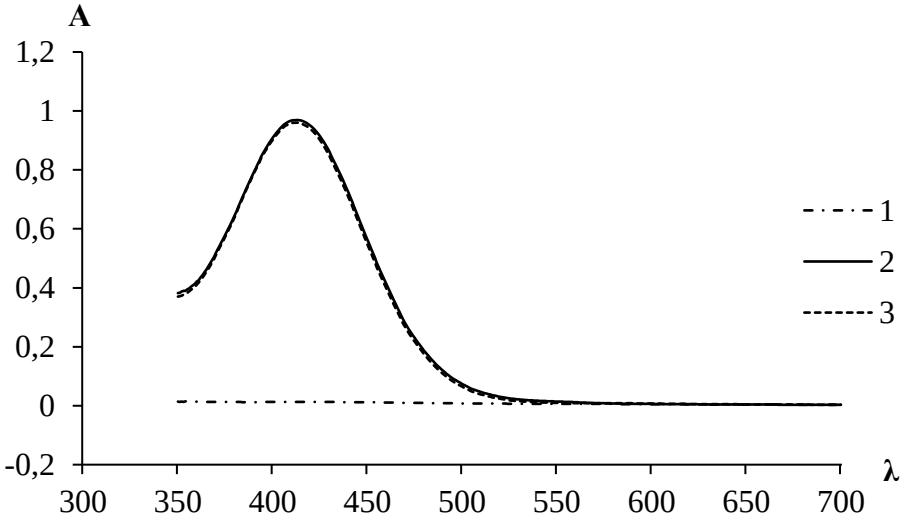



Рис. 5.2. Спектри поглинання розчину «плацебо» таблеток «Діабетон MR» 60 мг (1), розчину порівняння гліклазиду (2) та розчину таблеток «Діабетон MR» 60 мг (3) з БКЗ

Далі розраховували вплив плацебо ($\delta_{exc}$) у сумарну величину фонового поглинання ($\delta_{noise}$), який повинен бути незначимим і виконувати співвідношення:

$$\delta_{\text{exc}} \leq 0{,}32 \cdot max\Delta_{As} = 0{,}32 \cdot 0{,}32 \cdot max\Delta_{As} = 0{,}033 \cdot B \qquad (5.2)$$

де $B$ – допуски вмісту аналізованої речовини.

*Таблиця 5.1*

**Вклад «плацебо» у результати кількісних визначень досліджуваних лікарських препаратів**

| Лікарський препарат | $A_{blank}$ | $A_{st}$ | $\delta_{exc}$ % | 0,033·B |
|---|---|---|---|---|
| Таблетки «Глюкофаж» 500 мг | 0,0004 | 0,9836 | 0,04 | 0,165 |
| Таблетки «Метформін Астрафарм» 500 мг | 0,0008 | 0,9931 | 0,08 | 0,165 |
| Таблетки «Метформін Тева» 1000 мг | 0,0006 | 0,9829 | 0,06 | 0,165 |
| Таблетки «Метформін Сандоз» 850 мг | 0,0011 | 1,0107 | 0,11 | 0,165 |
| Таблетки «Діабетон MR» 60 мг | 0,0012 | 0,9599 | 0,13 | 0,248 |
| Таблетки «Діаглізид MR» 30 мг | 0,0013 | 0,9914 | 0,13 | 0,248 |
| Таблетки «Діаглізид» 80 мг | 0,0019 | 0,9508 | 0,18 | 0,248 |
| Таблетки «Гліклада» 60 мг | 0,0009 | 0,9739 | 0,09 | 0,248 |
| Таблетки «Манініл» 5 мг | 0,0026 | 0,8235 | 0,32 | 0,330 |
| Таблетки «Глібенкламід-Здоров’я» 5 мг | 0,0016 | 0,6159 | 0,26 | 0,330 |

В результаті проведених досліджень, які наведені в табл. 5.1, видно, що вклад «плацебо» в сумарну величину фонового поглинання є незначимим, а розроблені методики є специфічними.

Вплив домішок та продуктів розкладу на результати визначення не досліджувалися, оскільки в роботі використовувалися лікарські препарати промислового виробництва, які не містили неприпустимої кількості домішок та продуктів розкладу, про що свідчили сертифікати якості виробників.

Отже, розроблені методики кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин у складі зазначених лікарських форм промислового виробництва характеризуються достатньою специфічністю, щоб визначати досліджувані сполуки за присутності допоміжних речовин.

## 5.2 Прогноз повної невизначеності методики

Для підтвердження того, що розроблена методика буде коректно відтворюватись в інших лабораторіях, проводять розрахунок повної невизначеності результатів методики. Згідно з ДФУ [125, 130], прогнозована повна невизначеність методики не повинна перевищувати максимально допустимого значення $max\Delta_{As}$.

Прогноз повної невизначеності розраховують за формулою:

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{sp}^2 + \Delta_{FAO}^2} \qquad (5.3)$$

де $\Delta_{sp}$ – невизначеність пробопідготовки;

$\Delta_{FAO}$ – 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%.

Невизначеність пробопідготовки $\Delta_{sp}$ розраховують за формулою:

$$\Delta_{sp} = \sqrt{\Sigma_i^n \Delta_{V,i}^2} \quad (5.4)$$

де $\Delta_{V,i}^2$ – складова невизначеності, пов'язана з конкретною операцією пробопідготовки (взяття наважки, аліквоти малого об'єму, доведення до об'єму в мірній колбі тощо), виражена як однобічний довірчий інтервал для рівня надійності 95%.

При проведенні розрахунків невизначеності пробопідготовки враховували вимоги ДФУ до гранично припустимих похибок для мірного посуду, ваг та приладів.

Як приклад в табл. 5.2 наводиться розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення таблеток «Глібенкламід-Здоров'я» 5 мг.

*Таблиця 5.2*

**Розрахунок повної невизначеності методики кількісного визначення таблеток «Глібенкламід-Здоров'я» 5 мг**

| Операція пробопідготовки | Параметр розрахункової формули | Невизначеність, % |
|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 |
| *Досліджуваний розчин* | | |
| 1. Взяття наважки готового лікарського засобу | $a_1$ | 0.2 мг/994,4 мг · 100 % = 0,02 % |
| 2. Доведення об'єму до позначки в мірній колбі на 50,00 мл | 25 | 0,23 |

*Продовж. табл. 5.2*

| 1 | 2 | 3 |
|---|---|---|
| 3. Взяття аліквоти розведення готового лікарського засобу піпеткою на 1,00 мл | 1 | 0,74 |
| 4. Доведення об'єму до позначки в мірній колбі на 10,00 мл | 10 | 0,50 |
| *Розчин порівняння* | | |
| 5. Взяття наважки глібенкламіду | $a_0$ | 0,2 mg/51,5 mg · 100 % = 0,39 % |
| 6. Доведення об'єму до позначки в мірній колбі на 25,00 мл | 25 | 0,23 |
| 7. Взяття аліквоти розведення гліклазиду піпеткою на 1,00 мл | 1 | 0,74 |
| 8. Доведення об'єму до позначки в мірній колбі на 10,00 мл | 10 | 0,50 |

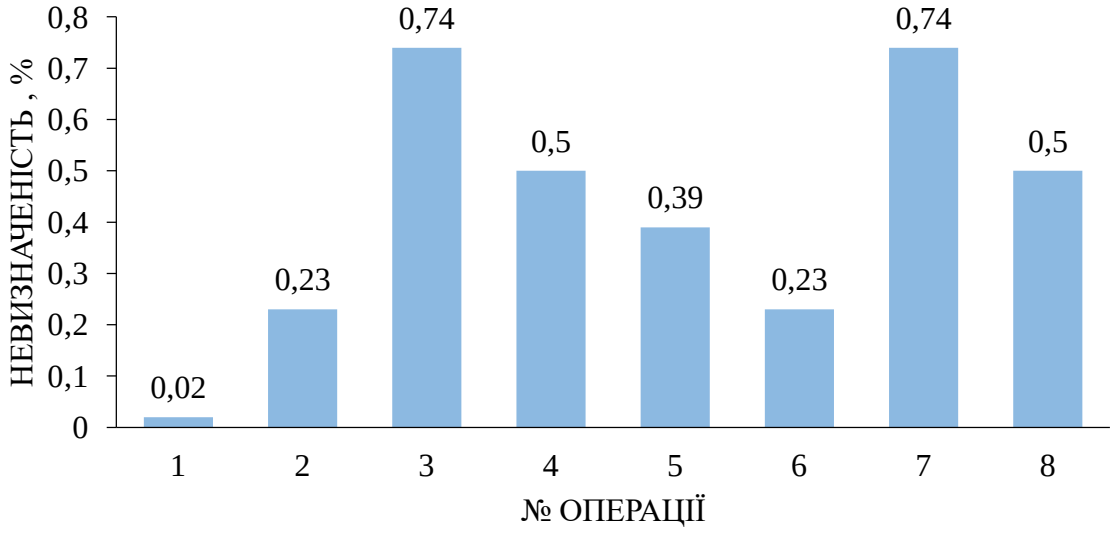



Рис. 5.3. Розподіл невизначеності пробопідготовки за операціями для кількісного визначення таблеток «Глібенкламід-Здоров'я» 5 мг

Як видно з табл. 5.2 і рис. 5.3 можна зробити висновок, що основний внесок у невизначеність вносить піпетка малого об'єму (0,74%).

Невизначеність пробопідготовки аналітичної методики:

$$\Delta_{sp} = \sqrt{0{,}02^2 + 0{,}23^2 + 0{,}74^2 + 0{,}50^2 + 0{,}39^2 + 0{,}23^2 + 0{,}74^2 + 0{,}50^2} = \\ = 1{,}36\%$$

Повну невизначеність аналітичної методики дорівнює:

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{sp}^2 + \Delta_{FAO}^2} = \sqrt{1{,}36^2 + 0{,}70^2} = 1{,}53\%$$

Прогноз повної невизначеності аналізу для інших лікарських препаратів наведено у табл. 5.3.

*Таблиця 5.3*

**Повна невизначеність результатів аналізу**

| Лікарський препарат | $\Delta_{sp}$ | $\Delta_{As}$ | $max\Delta_{As}$ |
|---|---|---|---|
| Таблетки «Глюкофаж» 500 мг | 1,37 | 1,54 | 1,60 |
| Таблетки «Метформін Астрафарм» 500 мг | 1,37 | 1,54 | 1,60 |
| Таблетки «Метформін Тева» 1000 мг | 1,37 | 1,54 | 1,60 |
| Таблетки «Метформін Сандоз» 850 мг | 1,37 | 1,54 | 1,60 |
| Таблетки «Діабетон MR» 60 мг | 1,68 | 1,82 | 2,40 |
| Таблетки «Діаглізид MR» 30 мг | 1,68 | 1,82 | 2,40 |
| Таблетки «Діаглізид» 80 мг | 1,80 | 1,93 | 2,40 |
| Таблетки «Гліклада» 60 мг | 1,68 | 1,82 | 2,40 |
| Таблетки «Манініл» 5 мг | 1,36 | 1,53 | 3,20 |
| Таблетки «Глібенкламід-Здоров’я» 5 мг | 1,36 | 1,53 | 3,20 |

Наведені в табл. 5.3 результати свідчать, що прогнозована невизначеність результатів аналізу не перевищують максимальне значення

($max\Delta_{As}$). Отже методики будуть давати коректні результати і в інших лабораторіях.

## 5.3 Лінійність

Згідно з ДФУ [125], лінійність – це здатність методики (у межах діапазону використання) давати величини, прямопропорційні концентрації аналізованої речовини у досліджуваному зразку.

Досліджували лінійну залежність у межах діапазону застосування аналітичної методики (8-9 концентрацій для кожної досліджуваної лікарської речовини). За отриманими результатами будували графік залежності оптичної густини від концентрації для кожної досліджуваної лікарської речовини оцінюючи візуально його лінійність (рис. 5.4–5.6).

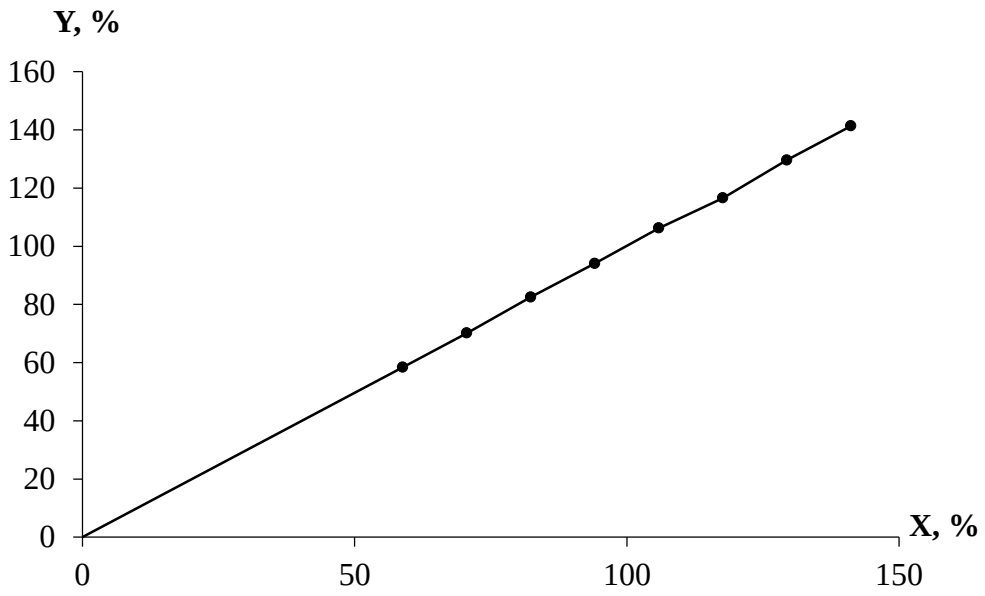



Рис. 5.4. Графік залежності абсорбції від концентрації метформіну гідрохлориду (у нормалізованих координатах) при довжині хвилі 407 нм

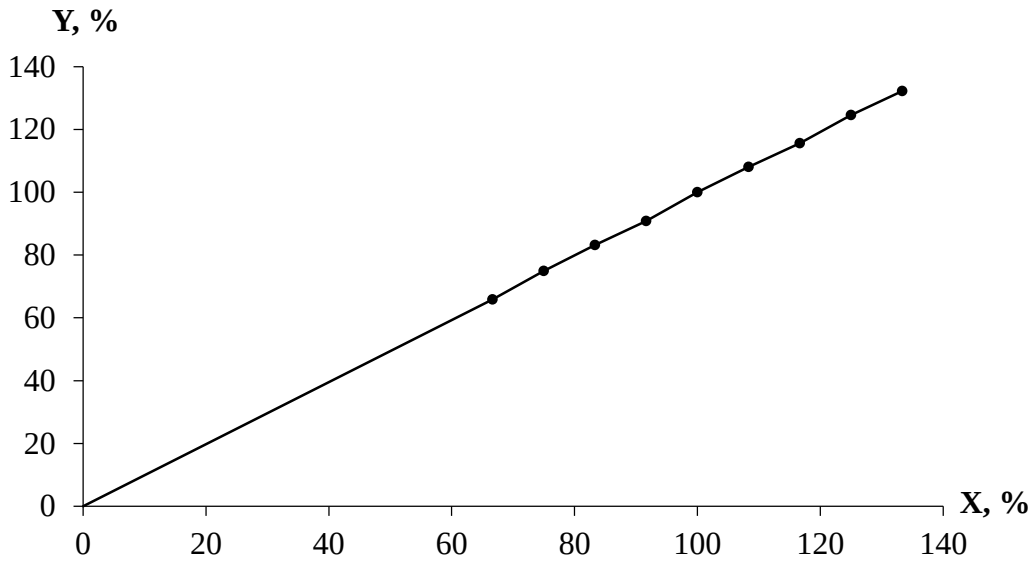



Рис. 5.5. Графік залежності абсорбції від концентрації гліклазиду (у нормалізованих координатах) при довжині хвилі 411 нм

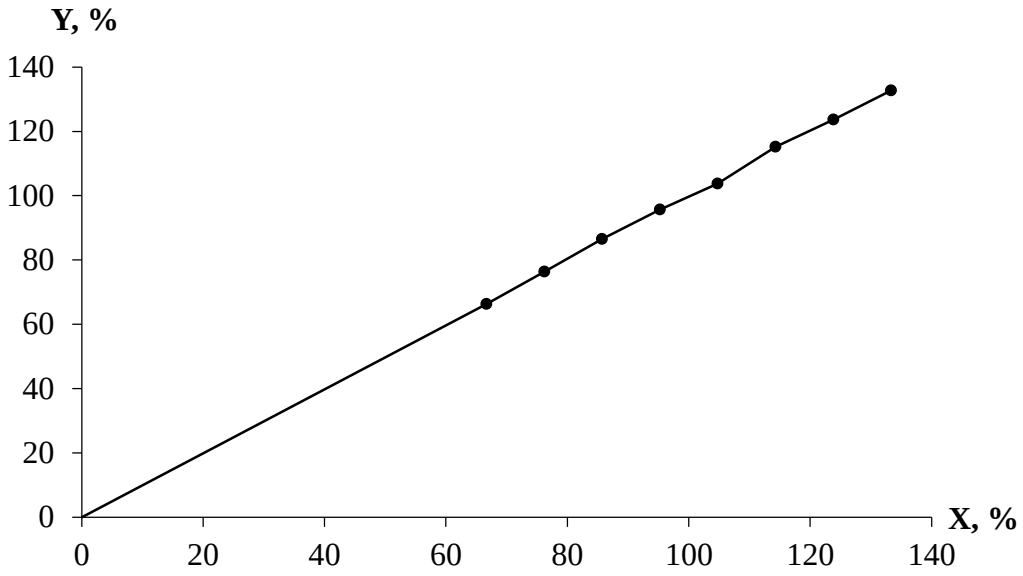



Рис. 5.6. Графік залежності абсорбції від концентрації глібенкламіду (у нормалізованих координатах) при довжині хвилі 491 нм

Далі результати переводили в нормалізовані координати, обробляли методом найменших квадратів та розраховували рівняння лінійної регресії, що мали загальний вигляд:

$$Y=a+b\cdot\bar{X}, \qquad (5.5)$$

де $Y$ – вимірювана речовина (оптична густина);

$\bar{X}$ – концентрація досліджуваної лікарської речовини;

$a$ – відрізок, що відсікається на осі ординат (вільний член лінійної залежності для розрахункової регресійної прямої), який характеризує систематичну похибку при використанні аналізу методом стандарту;

$b$ – кутовий коефіцієнт для розрахункової регресійної прямої.

Згідно з ДФУ [125] для підтвердження лінійності необхідно було визначити та розрахувати наступні показники: коефіцієнт кореляції, точка перетину з віссю ординат, тангенс кута нахилу прямої та залишкова сума квадратів відхилень. Розраховані параметри наведені в табл. 5.4.

При калібруванні величину $X$ розглядають як аргумент, а величину $Y$ – як функцію. Оскільки лінійна залежність між цими величинами не завжди є очевидною, то експериментальні дані, одержані при калібруванні, насамперед використовують для оцінки жорсткості, тобто ступеня не випадковості лінійного зв'язку між $X$ і $Y$. Наступним етапом визначають константи $a$ і $b$ та їх довірчі інтервали. При таких умовах судити про жорсткість лінійного зв'язку між змінними $X$ і $Y$ можна за величиною лінійного коефіцієнта кореляції $r$.

Лінійний коефіцієнт кореляції може змінюватися від –1 до +1. Тоді як відповідно позитивні і негативні значення свідчать про збільшення або зменшення $Y$ зі збільшенням $X$.

Кутовий коефіцієнт $b$ є коефіцієнтом чутливості регресії є і методики, що валідується.

Вільний член лінійної залежності $a$ характеризує систематичну похибку при проведенні аналізу методом стандарту. Згідно з ДФУ вільний член $a$ повинен статистично незначуще відрізнятися від нуля, тобто не перевищувати

свій довірчий інтервал ($\Delta_a$). Якщо даний критерій не виконується, використовують критерій практичної незначущості для вільного члена. Внесок вільного члена в невизначеність результату аналізу має бути незначущим у порівнянні з максимально припустимою невизначеністю аналізу.

*Таблиця 5.4*

**Числові показники лінійної залежності**

| Величина | Значення | Критерії | Висновок |
|---|---|---|---|
| Метформіну гідрохлорид | | | |
| r | 0,9999 | ≥ 0,9981 | відповідає |
| $S_{x,0}$ | 0,4981 | ≤ $\Delta_{As}$ (%) /t (95%, 7) = 1,689 | відповідає |
| a ± (S*a*) | -0,552 ± (0,677) | ≤ t (95%, 7) · S*a* = 1,298 | відповідає |
| b ± (S*b* ) | 1,004 ± (0,00653) | — | — |
| Гліклазид | | | |
| r | 0,9998 | ≥ 0,9957 | відповідає |
| $S_{x,0}$ | 0,4355 | ≤ $\Delta_{As}$ (%) /t (95%, 7) = 1,689 | відповідає |
| a ± (S*a*) | 0,217 ± (0,685) | ≤ t (95%, 7) · S*a* = 1,298 | відповідає |
| b ± (S*b* ) | 0,993 ± (0,00670) | — | — |
| Глібенкламід | | | |
| r | 0,99961 | ≥ 0,9924 | відповідає |
| $S_{x,0}$ | 0,7032 | ≤ $\Delta_{As}$ (%) /t (95%, 6) = 0,8247 | відповідає |
| a ± (S*a*) | 0,608 ± (1,160) | ≤ t (95%, 6) · S*a* = 2,245 | відповідає |
| b ± (S*b* ) | 0,994 ± (0,0113) | — | — |

Залишкове стандартне відхилення $S_0$ показує відхилення отриманих експериментальних значень від лінії регресії та є показником точності регресійної моделі. Довірчий інтервал розкиду точок навколо прямої дорівнює добутку критерію Стьюдента на залишкове стандартне відхилення за віссю

абсцис $(S_{x,0})$ і не має перевищувати гранично припустиму невизначеність аналізу $\Delta_{As}$.

Отримані параметри лінійної залежності показують, що лінійність методик підтверджується в обраних діапазонах концентрацій.

## 5.4 Діапазон застосування

Діапазон застосування аналітичної методики – це інтервал між мінімальною та максимальною концентраціями досліджуваних речовин у зразку, для якого показано, що аналітична методика має потрібну прецизійність, правильність та лінійність.

За вимогами ДФУ [125] мінімально допустимий діапазон застосування методики для кількісного визначення лікарських субстанцій або лікарських форм складає від 80% до 120% від номінального вмісту. Згідно з результатами проведених досліджень, які наведені в табл. 5.5, були встановлені діапазони застосування методик, які в кожному випадку є не меншими за мінімально допустимі.

*Таблиця 5.5*

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

| Лікарська речовина | Діапазон застосування |
|---|---|
| Метформіну гідрохлорид | 59% – 141% |
| Гліклазид | 67% – 133% |
| Глібенкламід | 67% – 133% |

## 5.5 Межа виявлення і межа кількісного визначення

Як зазначається в ДФУ дані величини не потрібно визначати при валідації методик кількісного визначення, однак вони корисні як інформація

про те, наскільки діапазон застосування методики перевершує її граничні можливості («запас міцності» методики) [125]. Згідно з ДФУ, МВ і МКВ розраховують із стандартного відхилення вільного члена лінійної залежності *Sa* і її кута нахилу *b* і, враховуючи близькість в нормалізованих координатах величини *b* до одиниці, маємо:

$$МВ = 3{,}3 \times Sa / b \approx 3{,}3 \times Sa \quad (5.6)$$

$$МКВ = 10 \times Sa / b \approx 10 \times Sa \quad (5.7)$$

Розрахунок величин МВ і МКВ проводили з врахуванням даних показників лінійності (табл. 5.4). Отримані результати наведені в табл. 5.6.

*Таблиця 5.6*

**Межа виявлення та межа кількісного визначення**

| Лікарська речовина | МВ | МКВ |
|---|---|---|
| Метформіну гідрохлорид | 2,23% | 6,77% |
| Гліклазид | 2,26% | 6,85% |
| Глібенкламід | 3,83% | 11,60% |

Як видно з табл. 5.6, дані величини значно менші нижньої границі діапазону концентрацій: метформіну гідрохлориду (59%), гліклазиду (67%) та глібенкламіду (67%). Тому дані величини МВ і МКВ не можуть впливати на точність аналізу.

## 5.6 Прецизійність

Прецизійність аналітичної методики показує ступінь близькості (або ступінь розкиду) результатів для серії вимірів, виконаних за даною методикою на різних пробах одного і того ж однорідного зразка в умовах, які можна

передбачити. За допомогою цієї валідаційної характеристики можна визначити наступні екстремальні показники: збіжність, внутрішньо лабораторна прецизійність та відтворюваність (міжлабораторна прецизійність) [125].

За допомогою збіжності можна дослідити аналітичну варіабельність методики в одних і тих самих умовах впродовж невеликого проміжку часу (у межах одного аналізу та при порівнянні даних різних аналізів). Для визначення прецизійності на рівні збіжності проводять щонайменше 9 визначень, які охоплюють діапазон застосування методики [128].

Внутрішньолабораторна прецизійність показує вплив на результати аналізу додаткових випадкових внутрішньолабораторних варіацій у відношенні передбаченого застосування методики. До них можна віднести, різні дні, різні аналітики, різне обладнання тощо.

Відтворюваність – це характеристика прецизійності у міжлабораторному експерименті. Вона оцінюється шляхом отримання додаткових вимірюваних показників (параметрів) з різних лабораторій.

Для оцінки прецизійності розроблених методик кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин у складі лікарських форм промислового виробництва вивчали показники збіжності та внутрішньо лабораторної прецизійності.

5.6.1 Збіжність. Для вивчення збіжності проводили дев’ять паралельних визначень для кожного лікарського препарату в діапазоні застосування розроблених методик (три концентрації/три повтори). Паралельно вимірювали оптичну густину розчинів порівняння досліджуваних лікарських речовин. Вміст АФІ у грамах розраховували за загальноприйнятими формулами 4.2-4.3.

Враховуючи вимоги ДФУ [125] щодо представлення результатів, було розраховано наступні метрологічні характеристики: середнє ($\bar{Z}$), стандартне відхилення ($S_Z$ %), відносне стандартне відхилення ($\Delta_{\%}$), максимально

припустима невизначеність $\Delta_{As}$ та критерій незначимості систематичної похибки ($\delta \leq \Delta_{\%}/3$) (табл. 5.6).

Розраховані дані, які наведені в табл. 5.7 показують, що критерій незначимості систематичної похибки ($\delta \leq \Delta_{\%}/3$) у кожному випадку не перевищує максимально припустиму невизначеність аналізу $\Delta_{As}$, що свідчить про те, що методики є точними на рівні збіжності.

*Таблиця 5.7*

**Визначення збіжності результатів кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин в лікарських засобах (n=9, p=0,95)**

| Лікарський препарат | Метрологічні характеристики | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | $\bar{Z}$ % | $S_Z$ % | $\Delta_{\%}$ | $\Delta_{As}$ | $\delta \leq \Delta_{\%}/3$ |
| Таблетки «Глюкофаж» 0,5 г | 99,79 | 0,51 | 0,94 | 1,6 | 0,21≤0,31 |
| Таблетки «Метформін Астрафарм» 0,5 г | 100,37 | 0,87 | 1,61 | 1,6 | 0,37≤0,54 |
| Таблетки «Метформін Тева» 1 г | 99,83 | 0,37 | 0,69 | 1,6 | 0,17≤0,23 |
| Таблетки «Метформін Сандоз» 0,85 г | 99,73 | 0,47 | 0,87 | 1,6 | 0,25≤0,29 |
| Таблетки «Діабетон MR» 0,06 г | 99,54 | 1,25 | 2,32 | 2,4 | 0,46≤0,77 |
| Таблетки «Діаглізид MR» 0,03 г | 100,23 | 0,95 | 1,78 | 2,4 | 0,23≤0,59 |
| Таблетки «Діаглізид» 0,08 г | 99,70 | 1,06 | 1,97 | 2,4 | 0,30≤0,66 |
| Таблетки «Гліклада» 0,06 г | 98,86 | 0,77 | 1,44 | 2,4 | 0,14≤0,48 |
| Таблетки «Манініл» 0,005 г | 100,44 | 0,95 | 1,78 | 3,2 | 0,44≤0,59 |
| Таблетки «Глібенкламід-Здоров'я» 0,005 г | 99,76 | 0,45 | 0,85 | 3,2 | 0,24≤0,28 |

5.6.2 Внутрішньолабораторна прецизійність. Для оцінки внутрішньолабораторної прецизійності використовували довірчий інтервал результатів. Отримані результати в різних умовах, не повинні перевищувати максимально припустиму невизначеність методики аналізу $\Delta_{As}$.

Для дослідження в три різні дні брали 5 наважок однієї й тієї ж серії досліджуваного лікарського препарату промислового виробництва за

розробленою методикою. Далі розраховували об'єднане середнє значення ($Z_{intro}$), середнє відхилення ($SD_{Z-intra}$) та відносний довірчий інтервал ($\Delta_{intro}$) [131]. Головною вимогою внутрішньолабораторної прецизійності є величина відносного довірчого інтервалу ($\Delta_{intro}$), що не повинна перевищувати максимально допустиму невизначеність ($\Delta_{As}$).

$$\Delta_{intro} = t\,[95\%, (n * m - 1)] * SD_{Z-intra} \leq max\Delta_{As} \qquad (5.8)$$

де $m$ – кількість днів;

$n$ – кількість наважок.

Для прикладу наводимо експериментальні дані визначення внутрішньолабораторної точності для таблеток «Глюкофаж» 500 мг (табл. 5.8).

*Таблиця 5.8*

**Результати перевірки внутрішньолабораторної прецезійності для таблеток Глюкофаж 500 мг**

| № розчину | Величина $Z_i$ | | |
|---|---|---|---|
| | 1 день | 2 день | 3 день |
| 1 | 100,56 | 100,68 | 98,09 |
| 2 | 99,71 | 99,08 | 99,57 |
| 3 | 100,36 | 98,45 | 100,25 |
| 4 | 100,19 | 99,41 | 101,10 |
| 5 | 98,22 | 100,19 | 100,46 |
| Середнє | 100,01 | 99,56 | 99,89 |
| Об'єднане середнє значення ($Z_{intra}$) | 99,82 | | |
| $S_Z$ | 1,28 | 0,78 | 1,32 |
| $SD_{Z\text{-}intra}$ | 1,13 | | |
| $\Delta_{intra}$ | 0,89 ≤ 1,6 | | |

Як видно з даних табл. 5.8, співвідношення 5.8 виконується, тому можна зробити висновок, що внутрішньолабораторна прецизійність підтверджується.

Розрахунок результатів перевірки внутрішньолабораторної точності для інших лікарських форм наведено в табл. 5.9.

*Таблиця 5.9*

**Визначення внутрішньолабораторної точності результатів кількісного визначення досліджуваних лікарських засобах**

| Лікарський препарат | Середнє | $Z_{intra}$ | $S_Z$ | $SD_{Z\text{-}intra}$ | $\Delta_{intra}$ | $max\Delta_{As}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Таблетки «Метформін Тева» 1 г | 100,46 | 99,83 | 0,85 | 1,10 | 0,87 | 1,6 |
| | 100,01 | | 1,10 | | | |
| | 99,03 | | 1,36 | | | |
| Таблетки «Діаглізид MR» 0,03 г | 100,51 | 100,18 | 0,90 | 0,93 | 0,73 | 2,4 |
| | 99,96 | | 0,81 | | | |
| | 100,08 | | 1,09 | | | |
| Таблетки «Глібенкламід-Здоров'я» 0,005 г | 100,20 | 99,88 | 1,34 | 1,37 | 1,07 | 3,2 |
| | 99,71 | | 1,44 | | | |
| | 99,74 | | 1,34 | | | |

## 5.7 Правильність

Правильність аналітичної методики показує ступінь відповідності між відомим істинним значенням або довідковою величиною та значеннями, які одержані за даною методикою.

Правильність для готових лікарських засобів, згідно з ДФУ [125], може бути визначена за допомогою наступних підходів:

- методом «модельних сумішей», до яких додають відомі кількості аналізованих речовин;

- методом добавок або арбітражною методикою, їх застосовують у разі коли неможливо одержати зразки усіх компонентів лікарського засобу;
- висновок про правильність можна зробити після того, як установлені прецизійність, лінійність і специфічність.

При дослідженні правильності необхідно зробити не менше дев'яти визначень (три визначення для кожної з трьох концентрацій), які охоплюють діапазон застосування методики [128].

Оцінку правильності роблять за двома критеріями: критерій статистичної незначущості і критерій практичної незначущості. Головною характеристикою систематичної похибки ($\delta$) є значення, що статистично не відрізняється від нуля, при цьому відхилення середнього значення для відношення «знайдено/введено» ($\bar{z}$) від 100% не повинно перевищувати довірчий інтервал:

$$\delta\% = |\bar{Z} - 100| \leq \frac{\Delta_z}{\sqrt{n}} \tag{5.9}$$

де $\Delta_z$ – довірчий інтервал

n – обсяг вибірки (число точок прямої)

Якщо наведене вище співвідношення не виконується, використовують критерій незначущості цієї систематичної похибки в порівнянні з максимально припустимою невизначеністю аналізу:

$$\delta\% = |\bar{Z} - 100| \leq 0{,}32 \times \Delta_{As} \tag{5.10}$$

Для визначення правильності розроблених методик методом добавок стандарту робили порівняння оптичної густини досліджуваних розчинів лікарської речовини та тих самих розчинів з додаванням робочого

стандартного розчину лікарської речовини. Отримані і розраховані результати наведені в табл. 5.10.

*Таблиця 5.10*

**Результати визначення правильності розроблених спектрофотометричних методик кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин методом добавок**

| Лікарська форма | $Z$ $(n=9)$ | $S_z$ % | $\Delta_Z$ | $\delta$% | $\frac{\Delta_z}{\sqrt{n}}$ | $0,32\times\Delta_{As}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Таблетки «Глюкофаж» 0,5 г | 99,80 | 0,49 | 0,91 | 0,20 | 0,30 | 0,51 |
| Таблетки «Метформін Астрафарм» 0,5 г | 99,71 | 0,65 | 1,21 | 0,29 | 0,40 | 0,51 |
| Таблетки «Метформін Тева» 1 г | 100,16 | 0,26 | 0,49 | 0,16 | 0,16 | 0,51 |
| Таблетки «Метформін Сандоз» 0,85 г | 100,04 | 0,35 | 0,64 | 0,04 | 0,21 | 0,51 |
| Таблетки «Діабетон MR» 0,06 г | 99,89 | 0,37 | 0,68 | 0,11 | 0,23 | 0,77 |
| Таблетки «Діаглізид MR» 0,03 г | 99,94 | 0,93 | 1,72 | 0,06 | 0,57 | 0,77 |
| Таблетки «Гліклада» 0,06 г | 99,65 | 0,65 | 1,15 | 0,35 | 0,38 | 0,77 |
| Таблетки «Глібенкламід-Здоров'я» 0,005 г | 99,79 | 0,69 | 1,29 | 0,21 | 0,43 | 1,024 |

Правильність таких таблеток як «Діаглізид» 0,08 г і «Мананал» 0,005 г було встановлено методом модельних сумішей. Для цього готували модельні суміші АФІ і допоміжних речовин для кожної лікарської форми. Оскільки неможливо відтворити усі заводські етапи виготовлення таблетки (подрібнення, гранулювання тощо), АФІ додавали до модельної суміші допоміжних речовин у кількості 80%, 100% і 120% від номінального вмісту у таблетці, охоплюючи таким чином весь діапазон застосування методики. Після цього відтворювали всі етапи розробленої методики: зважування, розчинення, фільтрування тощо. Проводили аналіз кожної модельної суміші тричі (три концентрації, три повтори) усього дев'ять визначень. Розраховані

дані визначення правильності за методом модельних сумішей наведені в табл. 5.11.

*Таблиця 5.11*

**Результати визначення правильності розроблених спектрофотометричних методик кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин методом модельних сумішей**

| Лікарська форма | $\overline{Z}$ $(n=9)$ | $S_z$ % | $\Delta_Z$ | $\delta$% | $\frac{\Delta_z}{\sqrt{n}}$ | $0{,}32\times\Delta_{As}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Таблетки «Діаглізид» 0,08 г | 99,55 | 0,85 | 1,57 | 0,45 | 0,52 | 0,77 |
| Таблетки «Манініл» 0,005 г | 100,23 | 0.57 | 1,06 | 0,23 | 0,35 | 1,024 |

Дані, які наведені в табл. 5.10 і 5.11, свідчать про правильність результатів аналізу для розроблених методик кількісного спектрофотометричного визначення досліджуваних лікарських речовин у складі лікарських форм промислового виробництва.

## 5.8 Робасність

Робасність – це здатність аналітичної методики не зазнавати впливу малих заданих (контрольованих) аналітиком змін в умовах виконання методики [125]. Дана валідаційна характеристика є показником надійності методики при її використанні у зазначених умовах.

Оцінку робасності проводили на етапі розробки методики [132]. Для цього у випадку спектрофотометричної методики кількісного визначення метформіну гідрохлориду та гліклазиду вивчали вплив кількості доданих реагентів та стабільність аналізованих розчинів у часі (розд. 3.1 і 3.2).

Для оцінки робасності спектрофотометричної методики кількісного визначення глібенкламіду вивчали кількість доданих реагентів, температуру та час нагрівання, а також стабільність аналізованих розчинів у часі (розд. 3.3).

Головним елементом оцінки робасності методики є вивчення стабільності досліджуваних розчинів, яка має проводитися на початку розробки методики. Для вивчення стабільності необхідно вимірювати оптичну густину досліджуваних розчинів лікарських препаратів та розчину порівняння кожні 15 хв протягом 1 год або кожні 5 хв протягом 30 хв. Далі робили розрахунки відносного стандартного відхилення ($RSD_t$ %) та довірчого інтервалу ($\Delta_t$ %). Отримані результати розрахунків не повинні перевищувати припустиму систематичну похибку ($max\delta$, %).

$$\Delta_t\% = 2{,}13 \times RSD_t \leq 0{,}32 \times max\Delta_{As} = max\delta \qquad (5.11)$$

В табл. 5.12 наведено приклад отриманих результатів вивчення стабільності досліджуваних розчинів лікарських форм метформіну гідрохлориду.

*Таблиця 5.12*

**Стабільність досліджуваних розчинів метформіну гідрохлориду* у часі**

| t, хв | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | сер. | $RSD_t$ % | $\Delta_t$ % | $max\delta$, % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $A_0$ | 0,9919 | 0,9925 | 0,9933 | 0,9942 | 0,9949 | 0,9962 | 0,9977 | 0,9944 | 0,160 | 0,31 | 0,32 |
| $A_1$ | 0,9895 | 0,9903 | 0,9914 | 0,9923 | 0,9932 | 0,9967 | 0,9982 | 0,9931 | 0,258 | 0,50 | 0,51 |
| $A_2$ | 0,9926 | 0,9931 | 0,9948 | 0,9962 | 0,9978 | 0,9981 | 0,9998 | 0,9961 | 0,234 | 0,45 | |
| $A_3$ | 0,9859 | 0,9863 | 0,9875 | 0,9889 | 0,9897 | 0,9916 | 0,9931 | 0,9890 | 0,220 | 0,43 | |
| $A_4$ | 0,9827 | 0,9833 | 0,9846 | 0,9858 | 0,9869 | 0,9884 | 0,9907 | 0,9861 | 0,221 | 0,43 | |

де: *$A_0$ – оптична густина робочого стандартного розчину метформіну гідрохлориду; $A_1$ – оптична густина досліджуваного розчину лікарської форми (таблеток «Метформін Астрафарм» 500 мг); $A_2$ – оптична густина

досліджуваного розчину лікарської форми (таблеток «Метформін Сандоз» 850 мг); $A_3$ – оптична густина досліджуваного розчину лікарської форми (таблеток «Метформін Тева» 1000 мг); $A_4$ – оптична густина досліджуваного розчину лікарської форми (таблеток «Глюкофаж» 500 мг).

Одержані розрахунки підтверджують виконання співвідношення 5.12, тобто аналізовані розчини є стабільними впродовж досліджуваного інтервалу часу.

Наступним етапом дослідження робасності розроблених методик було вивчення залежності оптичної густини досліджуваних розчинів від задаваних змін умов кількісного визначення.

На прикладі взаємодії метформіну гідрохлориду з БКЗ наводимо залежність значень оптичної густини досліджуваних розчинів від коливань умов кількісного визначення (табл. 5.13). В даному випадку було досліджено вплив на величину абсорбціїї коливання кількості доданих реагентів в межах ±10% (розчину БКЗ), а також часу утворення забарвленого продукту реакції.

*Таблиця 5.13*

**Залежність оптичної густини продукту реакції «метформіну гідрохлориду – реагент» від коливань кількості доданих реагенту і розчинника (±10% від оптимального)**

| Змінюваний об’єм | V реагенту, мл | % від А оптим. | А |
|---|---|---|---|
| Об’єм реагенту | 0,90 | 90 | 0,9450 |
| | 1,00 | 100 | 0,9485 |
| | 1,10 | 110 | 0,9587 |
| Об’єм води очищенної | 0,90 | 90 | 0,9382 |
| | 1,00 | 100 | 0,9458 |
| | 1,10 | 110 | 0,9571 |

Згідно даних, які показані в табл. 5.13, коливання кількості доданого реагенту в межах ±10% від оптимального, суттєво не впливає на результати кількісного визначення.

Для деяких методик необхідною умовою було розчинення лікарської речовини у воді очищеній, тому було досліджено вплив кількості доданого розчинника на значення оптичної густини. В результаті встановили, що розчинник у кількості ±10% від передбаченого методикою не впливає на перебіг реакції.

Аналогічні визначення проводили і для кожної запропонованої методики кількісного визначення. За результатами було встановлено, що у випадку визначення гліклазиду розчини є стабільними не менше 30 хв, а при визначенні глібенкламіду розчини стабільні не менше 1 год, а невеликі зміни параметрів методик не суттєво впливають на значення оптичної густини.

## 5.9 Оцінка впливу розробленої методики на навколишнє середовище

Для оцінки впливу розроблених методик на навколишнє середовище використовували два методи: метрику еко-масштабу та інструмент AGREE (Analytical GREEnness) [133].

Метрика еко-масштабу базується на зарахуванні штрафних балів будь-якому параметру, шо не відповідає ідеальній екологічній (зеленій) техніці. Шкала еко-масштабу має такий вигляд [134]:

- 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*

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) [135].

Розрахунок штрафних балів небезпеки проводили на прикладі розроблених методик для метформіну гідрохлориду та гліклазиду.

Так, для ацетону розрахунки були наступні:

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 очок.

Наступний етап – підрахунок штрафних балів за відходи, які розраховують наступним чином (Немає = 0, <1 мл (г) = 1; 1-10 мл (г) = 3, > 10 мл (г) = 5).

Далі додають бали обробки (переробка 0, деградація 1, без обробки 3). Для розроблених методів бали відходів розраховували так – (5 (>10 мл (г)) + 3 (без обробки)) = 8. Згідно з аналітичною еко-масштабністю загальні бали розроблених методик для метформіну гідрохлориду та гліклазиду склала 80.

*Таблиця 5.14*

**Оцінка зеленості за аналітичною еко-шкалою та піктограми методів кількісного визначення метформіну гідрохлориду та гліклазиду**

| Небезпека | Штрафні бали |
|---|---|
| 1 | 2 |
| Ацетон | 12 |
| БКЗ | 0 |
| Енергія приладів | 0 |
| Відходи | 8 |

*Продовж. табл. 5.14*

| 1 | 2 |
|---|---|
| Загальна кількість штрафних балів | 20 |
| Загальний бал за аналітичною еко-шкалою | 80 |
| *Метформін гідрохлорид* | *Гліклазид* |

В табл. 5.14 наведені результати розрахунку штрафних балів небезпеки і візуалізовані піктограми за допомогою інструменту AGREE (Analytical GREEnness).

Проведена оцінка «зеленості» даних методів за допомогою інструменту AGREE (Analytical GREEnness) та аналітичною еко-шкалою (табл. 5.14) дає змогу стверджувати, що розроблені методики кількісного спектрофотометричного визначення метформіну гідрохлориду та гліклазиду за реакцією з БКЗ є достатньо екологічними і відповідають за розрахунками як «відмінний зелений аналіз».

Матеріали розділу викладені в роботах [136-141]:

1. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О. Спектрофотометричне визначення метформіну гідрохлориду в таблетках за реакцією з бромкрезоловим зеленим. *Фармацевтичний часопис.* 2023. № 2. С. 19–30.

2. Дем’янова, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення метформін гідрохлориду в лікарському препараті «Метформін Сандоз». *«Сучасні*

*аспекти створення лікарських засобів»*: матеріали Міжнар. наук.-практ. дистанційної конф. присвяченої 100-річчю кафедри аналітичної хімії НФаУ, м. Харків, 16 квіт. 2021 р. Харків, 2021 С. 92.

3. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення глібенкламіду в лікарському препараті «Манініл». *X Науково-практична конференція Школи молодих науковців АТ «Фармак»*., м. Київ, 27-28 жовт. 2022 р. Київ, 2022. С. 45-46.

4. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення глібенкламіду в таблетках. *«Запорізький фармацевтичний форум - 2022»*: матеріали Всеукраїнської наук.-практ. конф., м. Запоріжжя, 17-18 лист. 2022 р. Запоріжжя, 2022. С. 57-58.

5. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О., Дочинець Д. І. Розробка і валідація спектрофотометричнх методик кількісного визначення цукрознижувальних речовин в лікарських препаратах за реакцією з хінонами. *Безперервний професійний розвиток фармацевтичних працівників: сучасний стан, проблеми та перспективи*: матер. наук.-практ. конференції з міжнар. участю, присвяченої 30-річчю заснування Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету, м. Харків 1-2 лист. 2023 р. Харків, 2023. С. 232.

6. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричних методик кількісного визначення цукрознижувальних речовин в лікарських препаратах за реакцією із сульфофталеїнами. *«Запорізький фармацевтичний форум - 2023»*: матеріали Всеукраїнської наук.-практ. конф., м. Запоріжжя, 23-24 лист. 2023 р. Запоріжжя, 2023. С.

Висновки до розділу 5

1. Встановлено, що запропоновані методики кількісного визначення характеризуються достатньою специфічністю відносно допоміжних речовин досліджуваних лікарських форм, що дає можливість визначати досліджувані АФІ в складі лікарських препаратів промислового виробництва.

2. Доведено, що розроблені методики будуть давати коректні результати й в інших лабораторіях, оскільки прогнозована повна невизначенність результатів аналізу в кожному випадку не перевищує критичного значення.

3. Доведено, що розраховані показники лінійності розроблених методик підтверджують лінійну залежність в обраних діапазонах концентрацій досліджуваних речовин.

4. Встановлено прецизійність розроблених методик на рівні збіжності та внутрішньолабораторну прецизійность. Результати показали, що методики є точними, оскільки однобічний довірчий інтервал не перевищує максимально допустиму невизначеність аналізу.

5. Встановлено правильність запропонованих методик методами добавок та модельних сумішей. Розраховані критерії статистичної та практичної незначущості систематичної похибки свідчать, що методики є правильними.

6. Показано, що такі валідаційні характеристики досліджуваних методик кількісного аналізу, як лінійність, прецизійність та правильність знаходяться в інтервалах робочих концентрацій, які входять у межі мінімально допустимого діапазону застосування методики для кількісного визначення готових лікарських форм, згідно з вимогами ДФУ.

7. Проведено екологічну оцінку розроблених методик кількісного аналізу досліджуваних лікарських речовин за допомогою інструментів AGREE (Analytical GREEnness) та аналітичною еко-шкалою. Даний тест показав, що розроблені методики є достатньо екологічними і відповідають за розрахунками як «відмінний зелений аналіз».

# ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведене експериментальне вирішення наукової задачі, що полягає у розробці та валідації спектрофотометричних методик кількісного визначення лікарських гіпоглікемічних речовин, а саме: метформіну гідрохлориду, гліклазиду та глібенкламіду на основі їх реакцій з кольорореагентами (БКЗ та 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном) у складі промислових лікарських форм.

1. На основі аналізу даних літературних джерел обґрунтовано доцільність розробки нових методик спектрофотометричного кількісного визначення гіпоглікемічних лікарських засобів, за реакціями з сульфофталеїновими барвниками та 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном.

2. Експериментально встановлені оптимальні умови перебігу реакції досліджуваних АФІ з кольорореагентами: метформіну гідрохлорид реагує з БКЗ у водно-ацетоновому середовищі (1% води), гліклазид з БКЗ – в ацетоні за кімнатної температури з утворенням забарвленим продуктів з максимумом поглинання при 408 і 411 нм відповідно, стабільних щонайменше 30 хв. Глібенкламід реагує з 2,3-дихлор-1,4-нафтохінономв середовищі ДМФА при нагріванні реакційної суміші на водяній бані за 95°С впродовж 25 хв з утворенням продукту з максимумом поглинання при 489 нм стабільного протягом щонайменше 60 хв.

3. Розраховані аналітичні показники чутливості реакцій метформіну гідрохлориду і гліклазиду з БКЗ та глібенкламіду з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном свідчать про високу чутливість запропонованих реакцій (гранична концентрація становить 0,43 мкг/мл для метформіну, 4,02 мкг/мл для гліклазиду і 11 мкг/мл для глібенкламіду).

4. Методами ізомолярних серій, насичення, відносного виходу встановлені стехіометричні співвідношення для досліджуваних реакцій, які складають 1:1 для кожного випадку.

5. Розраховано значення питомих показників поглинання та встановлено межі концентрацій, в яких спостерігається підпорядкування основному закону світлопоглинання для досліджуваних гіпоглікемічних лікарських речовин, на основі їх реакції з відповідними реагентами.

6. Розроблено оригінальні спектрофотометричні методики кількісного визначення досліджуваних АФІ у складі таблеток різних виробників. Розроблені методики є простими, відтворюваними (значення систематичної похибки дорівнює 0,04–0,45).

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

8. Оцінено вплив розроблених спектрофотометричних методик кількісного визначення досліджуваних АФІ на навколишнє середовище. Встановлено, що розроблені методики відповідають по еко-шкалі, як «відмінний зелений аналіз».

# СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. IDF Diabetes Atlas 10th Edition: International Diabetes Federation. URL: https://diabetesatlas.org

2. Соколова Л. К., Пушкарьов В. М., Ковзун О. І. Механізми дії метформіну за діабету та пов'язаних із діабетом патологій. *Ендокринологія*. 2020. Т. 25, № 2. С. 143-157.

3. Яремчук-Качмарчик А., Свінціцький А. М., Гаєвські П. Внутрішні хвороби: підручник заснований на принципах доказової медицини 2018/19. Краків: Практ. медицина, 2018. – 1632 с.

4. Bailey C. J. Metformin: historical overview. *Diabetologia*. 2017. Vol. 60, №9. P. 1566–1576.

5. Foretz M., Guigas B., Viollet B. Metformin: update on mechanisms of action and repurposing potential. *Nature reviews. Endocrinology*. 2023. Vol. 19, № 8. P. 460–476.

6. Mu W., Jiang Y., Liang G., Feng Y., Qu, F. Metformin: A Promising Antidiabetic Medication for Cancer Treatment. *Current drug targets*. 2023. Vol. 24, № 1. P. 41–54.

7. Lv Z., Guo Y. Metformin and Its Benefits for Various Diseases. *Frontiers in endocrinology*. 2020. № 11. P. 191.

8. Sulfonylureas, Second Generation. In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. 2018. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548133/

9. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків: 170 Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2014. Т.2. 724 с.

10. British Pharmacopeia. British Pharmacopoeia Commission Office: Medicines and Healthcare products Regulatory Agency. London. 2022, Vol. II. 249 p.

11. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр як ості лікарських засобів», 2016. Доповнення 1. 360 с.

12. European Pharmacopoeia. 8th ed. Strasbourg, France: Council of Europe, 2013.

13. United States Pharmacopeia. Rockville: USP Convention Inc., 2008. 2905 p.

14. Aburuz S., Millership J., McElnay J. The development and validation of liquid chromatography method for the simultaneous determination of metformin and glipizide, gliclazide, glibenclamide or glimperide in plasma. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2005. Vol. 817, № 2. P. 277–286.

15. Venkatesh P., Harisudhan T., Choudhury H., Mullangi R., Srinivas N. R. Simultaneous estimation of six anti-diabetic drugs--glibenclamide, gliclazide, glipizide, pioglitazone, repaglinide and rosiglitazone: development of a novel HPLC method for use in the analysis of pharmaceutical formulations and its application to human plasma assay. *Biomedical chromatography: BMC*. 2006. Vol. 20, №10. P. 1043–1048.

16. Binz T. M., Villani N., Neels H., Schneider S. Rapid extraction, identification and quantification of oral hypoglycaemic drugs in serum and hair using LC-MS/MS. *Forensic science international*. 2012. Vol. 223, № 1-3. P. 119–124.

17. Yao J., Shi Y. Q., Li Z. R., Jin S. H. Development of a RP-HPLC method for screening potentially counterfeit anti-diabetic drugs. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2007. Vol. 853, № 1-2. P. 254–259.

18. Shaodong J., Lee W. J., Ee J. W., Park J. H., Kwon S. W., Lee J. Comparison of ultraviolet detection, evaporative light scattering detection and charged aerosol detection methods for liquid-chromatographic determination of anti-diabetic drugs. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2010. Vol. 51, № 4. P. 973–978.

19. Raza A., Murtaza S. H., Hanif S., Iqbal J., Ali I., Aftab T., Shakir R., Bedar R., Syed M. A. Validation of a Rapid and Economical RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Metformin Hydrochloride and Sitagliptin Phosphate Monohydrate: Greenness Evaluation Using AGREE Score. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022. Vol. 35, № 1. P. 15-21.

20. 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.

21. Chhetri, H. P., Thapa, P., Schepdael, A. V. (2014). 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.

22. Wang Y., Tang Y., Gu J., Fawcett J.P., Bai X. Rapid and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the quantitation of metformin in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2004. Vol. 808, № 2. P. 215-219.

23. Chen X., Gu Q., Qiu F., Zhong D. Rapid determination of metformin in human plasma by liquid chromatography−tandem mass spectrometry method. *Journal of Chromatography B*. 2004. Vol. 802, № 2. P. 377-381.

24. 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*. 2009. Vol. 44, № 12. P. 4998-5005.

25. 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*. 2021. Vol. 18, № 2. P. 448.

26. Arayne M. S, Sultana N, Zuberi M. H, Siddiqui F. A. Spectrophotometric Quantitation of Metformin in Bulk Drug and Pharmaceutical Formulations using Multivariate Technique. *Indian J Pharm Sci*. 2009. Vol. 71, № 3. P. 331-335.

27. Москаленко В. Ю., Мерзлікін С. І. Розробка умов ізолювання та спектрофотометричного визначення метформіну в біологічних об'єктах. *Фармацевтичний часопис*. 2016. № 2. С. 22-25.

28. Бугайова, В. В., Васюк, С. О. Розробка та валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення метформіну гідрохлориду у складі препарату "Метформін сандоз". *Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій*: матеріали Всеукр. наук.-практ. конференції з між нар. участю, присвяченої 80-річчю з дня народж. д-ра фарм. наук, проф. О. М. Гайдукевича, м. Харків: НФаУ, 12-13 квіт. 2018 р. Харків, 2018. С. 320.

29. Sabbagh B. A., Kumar P. V., Chew Y.L., Chin J. H., Akowuah G.A. Determination of metformin in fixed-dose combination tablets by ATR-FTIR spectroscopy. *Chemical Data Collections*. 2022. P. 39.

30. Castro R. C., Ribeiro D. S. M., Santos J. L.M., Nunes C., Reis M., Páscoa R. N. M. J. Chemometric-assisted surface-enhanced Raman spectroscopy for metformin determination using gold nanoparticles as substrate, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2023. Vol. 287, № 2. P. 122118.

31. 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*. 2022. Vol. 291 № 1. P. 133063.

32. Hamdan I.I., Bani Jaber A.K., Abushoffa A.M. 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.

33. Hegazy M. A., El-Ghobashy M. R., Yehia A. M., Mostafa A. A. Simultaneous determination of metformin hydrochloride and pioglitazone hydrochloride in binary mixture and in their ternary mixture with pioglitazone acid degradate using spectrophotometric and chemometric methods. *Drug testing and analysis*. 2009. Vol. 1, № 7. P. 339–349.

34. Shankar M. B., Modi V. D., Shah D. A., Bhatt K. K., Mehta R. S., Geetha M., Patel, B. J. Estimation of pioglitazone hydrochloride and metformin hydrochloride in tablets by derivative spectrophotometry and liquid chromatographic methods. *Journal of AOAC International*. 2005. Vol. 88, № 4. P. 1167–1172.

35. Zhang X., Wang X., Vernikovskaya D. I., Fokina V. M., Nanovskaya T. N., Hankins G. D., Ahmed M. S. Quantitative determination of metformin, glyburide and its metabolites in plasma and urine of pregnant patients by LC-MS/MS. *Biomedical chromatography: BMC*. 2015. Vol. 29, № 4. P. 560–569.

36. ALquadeib B. T., Aloudah N. M., Almurshedi A. S., ALfagih I. M., ALdosari B. N., ALmeleky A. S., Almubyedh N. M. (2021). Development and Validation of a Simple and Sensitive LC-MS/MS Method for Quantification of Metformin in Dried Blood Spot Its Application as an Indicator for Medication Adherence. *International journal of general medicine*. 2021. Vol. 14. P. 3225–3233.

37. Swales J. G., Gallagher R. T., Denn M., Peter R. M. Simultaneous quantitation of metformin and sitagliptin from mouse and human dried blood spots using laser diode thermal desorption tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2011. Vol. 55, № 3. P. 544–551.

38. Emam R. A., Emam A. A. Ecofriendly appraisal of stability-indicating high-performance chromatographic assay of canagliflozin and metformin with their toxic impurities; in silico toxicity prediction. *Journal of separation science*. 2023. Vol. 46, № 4. P. 2200754.

39. Wang C. Y., Zhang W., Xiang B. R., Yu L. Y., Ma P. C. Liquid chromatography–mass spectrometry method for the determination of gliclazide in human plasma and application to a pharmacokinetic study of gliclazide sustained release tablets. *Arzneimittel Forschung*. 2008. Vol. 58, № 12. P. 653-658.

40. Kumar B. V. V., Patnaik A. K., Raul S. K., Rao N. N. (2013). A RP-HPLC method development and validation for the estimation of gliclazide in bulk and pharmaceutical dosage forms. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2013. Vol. 3, № 4. P. 59-62.

41. Gandhimathi M., Anandakumar K., Cheriyan A., Ravi T. K. Simultaneous estimation of Metformin and gliclazide in tablet using reverse phase high performance liquid chromatography. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2003. Vol. 65. P. 530-531.

42. Krzek J., Czekaj J., Moniczewska M., Rzeszutko W. Determination of Gliclazide in Pharmaceutical Preparations by Capillary Gas Chromatography with Cool On-Column Injection and Elimination of the Matrix Effect. *Journal of AOAC Internatıonal*. 2001. Vol. 84, № 6. P. 1695-1702.

43. Bhattacharya K., Mathew J. Development and validation of stability-indicating UPLC method for the determination of gliclazide and its impurities in pharmaceutical dosage forms. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021. Vol. 7**.** P. 95.

44. Wang X., Zhang C. Determination of Gliclazide in Dameikang Tablets by Internal Standard Method of Nuclear Magnetic Resonance[J]. *Experiment Science and Technology*. 2022. Vol. 20, № 3. P. 7-10.

45. Reichal C.R., Rao M.G. Development and validation of spectrophotometric method for simultaneous estimation of gliclazide and sitagliptin phosphate monohydrate in bulk and pharmaceutical dosage form. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2015. № 7. P. 372-376.

46. Samina A. J., Snehal P. M., Poonam S. K., Yogesh V. P., Kishor B. B. Development and validation of UV spectrophotometric method for the

determination of Gliclazide in tablet dosage form. *Der Pharma Chemica*. 2011. Vol. 3, № 4. P. 338-343.

47. Saroj R., Bukkuru S., Patibandla S., Vegiraju V. UV Spectrophotometric Method Development and Validation for the Estimation of Gliclazide in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form. *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016. Vol. 6, № 3. P. 143-146.

48. Jeha B., Salami M. Spectrophotometric Determination of Gliclazide in Bulk and Pharmaceutical Formulation using 1, 2-naphthoquinone-4-sulfonic acid Sodium salt. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2019. Vol. 12, № 11. P. 5310-5314.

49. Doomkaew A., Prutthiwanasan B., Suntornsuk L. Stability indicating MEKC method for the determination of gliclazide and its specified impurities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015. Vol. 102. P. 119-128.

50. Sasongko L., Pratiwi G. K., Leo M., Adiwidjaja J. Simultaneous HPLC Assay of Gliclazide and Ciprofloxacin in Plasma and its Implementation for Pharmacokinetic Study in Rats. *Journal of chromatographic science*. 2021. Vol. 59, № 4. P. 338–346.

51. Foroutan S. M., Zarghi A., Shafaati A., Khoddam A. Application of monolithic column in quantification of gliclazide in human plasma by liquid chromatography. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2006. Vol. 42, № 4. P. 513–516.

52. Park J. Y., Kim K. A., Kim S. L., Park P. W. Quantification of gliclazide by semi-micro high-performance liquid chromatography: application to a bioequivalence study of two formulations in healthy subjects. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2004. Vol. 35, № 4. P. 943–949.

53. Kuo C. Y., Wu S. M. High-performance liquid chromatography with electrochemical detection for analysis of gliclazide in plasma. *Journal of chromatography. A*. 2005. Vol. 1088, № 1-2. P. 131–135.

54. Rouini M. R., Mohajer A., Tahami M. H. A simple and sensitive HPLC method for determination of gliclazide in human serum. *Journal of chromatography.*

*B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2003. Vol. 785, № 2. P. 383–386.

55. Magdy G., Al-Enna A. A., Belal F., El-Domany R. A., Abdel-Megied A. M. Application of sulfur and nitrogen doped carbon quantum dots as sensitive fluorescent nanosensors for the determination of saxagliptin and gliclazide. *Royal Society open science*. 2022. Vol. 9, № 6. P. 220285.

56. Hassib S. T., Taha E. A., Elkady E. F., Barakat G. H. Development and Validation of Spectrophotometric Methods for the Determination of Canagliflozin or Gliclazide and Metformin in the Presence of Metformin Impurity (1-Cyanoguanidine). *Journal of AOAC International*. 2019. Vol. 102, № 4. P. 1112–1124.

57. Gedawy A., Al-Salami H., Dass C. R. Development and validation of a new analytical HPLC method for simultaneous determination of the antidiabetic drugs, metformin and gliclazide. *Journal of food and drug analysis*. 2019. Vol. 27, № 1. P. 315–322.

58. El-Zaher A. A., Elkady E. F., Elwy H. M., Saleh M. A. Simultaneous Determination of Metformin, Glipizide, Repaglinide, and Glimepiride or Metformin and Pioglitazone by a Validated LC Method: Application in the Presence of Metformin Impurity (1-Cyanoguanidine). *Journal of AOAC International*. 2016. Vol. 99, № 4. P. 957–963.

59. Doomkaew A., Prutthiwanasan B., Suntornsuk L. Stability indicating MEKC method for the determination of gliclazide and its specified impurities. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2015. Vol. 102. P. 119–128.

60. Du Y., Li Q., Wu C., Zhang Y. Ultra-high Performance Liquid Chromatography-Quadrupole/electrostatic Field Orbitrap High-Resolution Mass Spectrometry for Rapid Screening and Quantitative Analysis of 11 Illegally Added Hypoglycemic Drugs in Health Products. *Se pu = Chinese journal of chromatography*. 2015. Vol. 33, № 4. P. 371–376.

61. Doomkaew A., Prapatpong P., Buranphalin S., Vander Heyden Y., Suntornsuk L. Fast and Simultaneous Analysis of Combined Anti-Diabetic Drugs by Capillary Zone Electrophoresis. *Journal of chromatographic science*. 2015. Vol. 53, № 6. P. 993–999.

62. Andayani R., Pitasari F., Rusdi. Development and validation of TLC densitometry method for simultaneous determination of metformin HCl and glibenclamide in tablets dosage form. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2015. Vol. 7. P. 159-164.

63. Bhende S. D., Varanasi M. B., Abbulu K. A Sensitive HPTLC Method for the Estimation of Glibenclamide, Rosiglitazone Maleate and Metformin Hydrochloride from a Multicomponent Dosage Form. *Journal of chromatographic science*. 2020. Vol. 58, № 5. P. 418–426.

64. Elkady E.F., El-Zaher A.A., Elwy M.H., Saleh M.A. Validated Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Metformin, Pioglitazone, Sitagliptin, Repaglinide, Glibenclamide and Gliclazide - Application for Counterfeit Drug Analysis. *J Anal Bioanal Tech*. 2015.

65. AbuRuz S., Millership J., McElnay J. The development and validation of liquid chromatography method for the simultaneous determination of metformin and glipizide, gliclazide, glibenclamide or glimperide in plasma. *Journal of Chromatography B*. 2005. Vol. 817, № 2. P. 277-286.

66. Havele S., Dhaneshwar S. Determination of glibenclamide, metformin hydrochloride and rosiglitazone maleate by reversed phase liquid chromatographic technique in tablet dosage form. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*. 2014. Vol. 20. P. 39-47.

67. Alam M. A., AL-Jenoobi F. I., Al-Mohizea A. M. Rapid, Validated UPLC-MS/MS Method for Determination of Glibenclamide in Rat Plasma. *Internation Journal of Analytical Chemistry*. 2018. Vol. 8. P. 2018.

68. Confederat Luminita. Development and Validation of a High Performance Liquid Chromatography Method for Simultaneous Determination of Glibenclamide and Lipoic Acid. *Farmacia*. 2021. Vol. 69. P. 246-252.

69. Tengli A., Gurupadayya B.M., Soni N., Balasubramanyam V. Method Development and Validation of Metformine, Pioglitazone and Glibenclamide in Tablet Dosage Form by using RP-HPLC. *Biochemistry, analytical biochemistry*. 2013. Vol. 2. P. 2-5.

70. Haq N., Alanazi F. K., Alsarra I. A., Shakeel F. Rapid Analysis of Glibenclamide Using an Environmentally Benign Stability-Indicating RP-HPLC Method. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*. 2014. Vol. 13 № 3. P. 863–872.

71. Alhemiarya N. A. F. Derivative Spectrophotometric and HPLC Validated Methods for Simultaneous Determination of Metformin and Glibenclamide in Combined Dosage Form. *Orient J Chem*. 2014. Vol. 30, № 4.

72. Pawan K. P., Gokul S. Talele, Development of validated HPLC-UV method for simultaneous determination of Metformin, Amlodipine, Glibenclamide and Atorvastatin in human plasma and application to protein binding studies. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*. 2017. Vol. 55, № 1. P. 129-139.

73. Sohrabi M.R., Kamali N., Khakpour M. Simultaneous Spectrophotometric Determination of Metformin Hydrochloride and Glibenclamide in Binary Mixtures Using Combined Discrete and Continuous Wavelet Transforms. *Anal. Sci*. 2011. Vol. 27. P. 1037-1041.

74. Antakli S., Nejem L., Alraii M. Determination of Glibenclamide ву Analytical Spectrophotometry. *Journal of Advances*. 2021. Vol. 18. P. 40–48.

75. Patil S.S., Bonde C.G. Development and validation of analytical method for simultaneous estimation of glibenclamide and metformin HCl in bulk and tablets using UV - Visible spectroscopy. *International Journal of ChemTech Research*. 2009. Vol. 1. P. 905-909.

76. Abdelrahman M. M., Emam R. A., Ali N. W., Abdelaleem E. A. Validated spectrofluorometric determination of hypoglycemic combination, in pure form and pharmaceutical formulation using 9,10-phenanthraquinone reagent. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*. 2021. Vol. 247. P. 119078.

77. Li Z., Xie H., Fu T., Li Y., Shen X., Li X., Lei Y., Yao X., Koidis A., Liu Y., Huang X., Lei H. Complementary Strategy Enhancing Broad-Specificity for Multiplexed Immunoassay of Adulterant Sulfonylureas in Functional Food. *Biosensors*. 2022. Vol. 12, № 8. P. 591.

78. Xie H., Li Y., Wang J., Lei Y., Koidis A., Li X., Shen X., Xu Z., Lei H. Broad-specific immunochromatography for simultaneous detection of various sulfonylureas in adulterated multi-herbal tea. *Food chemistry*. 2022. Vol. 370. P. 131055.

79. He Z., Liu Z., Xie H., Luo P., Li X. An Ultrasensitive Lateral Flow Immunoassay Based on Metal-Organic Framework-Decorated Polydopamine for Multiple Sulfonylureas Adulteration in Functional Foods. *Foods (Basel, Switzerland)*. 2023. Vol. 12 № 3. P. 539.

80. Strugaru A. M., Kazakova J., Butnaru E., Caba I. C., Bello-López M. Á., Fernández-Torres R. Simultaneous determination of metformin and glimepiride in human serum by ultra high performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry detection. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2019. Vol. 165. P. 276–283.

81. Marie A. A., Hammad S. F., Salim M. M., Elkhodary M. M., Kamal A. H. Deduction of the operable design space of RP-HPLC technique for the simultaneous estimation of metformin, pioglitazone, and glimepiride. *Scientific reports*. 2023. Vol. 13, № 1. P. 4334.

82. Jain D., Jain S., Jain D., Amin M. Simultaneous estimation of metformin hydrochloride, pioglitazone hydrochloride, and glimepiride by RP-HPLC in tablet formulation. *Journal of chromatographic science*. 2008. Vol. 46, № 6. P. 501–504.

83. Shankar M. B., Modi V. D., Shah D. A., Bhatt K. K., Mehta R. S., Geetha M., Patel B. J. Estimation of pioglitazone hydrochloride and metformin hydrochloride in tablets by derivative spectrophotometry and liquid chromatographic methods. *Journal of AOAC International*. 2005. Vol. 88, № 4. P. 1167–1172.

84. Ahmed R. A simple and convenient method for the simultaneous in vitro study of metformin and glimepiride tablets. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 2014. Vol. 27, № 6. P. 1939–1943.

85. Mohamed Y. A., Mohamed A. M., Mohamed F. A., Ahmed, S. A. New Salting Out Stability-Indicating and Kinetic Thin Layer Chromatographic Method for Determination of Glimepiride and Metformin HCl Binary Mixture. *Journal of chromatographic science*. 2015. Vol. 53, № 9. P. 1603–1610.

86. Abbas N. S., Mohamed Y. A. S., Derayea S. M., Omar M. A., Saleh G. A. Simple TLC-spectrodensitometric method for studying lipophilicity and quantitative analysis of hypoglycemic drugs in their binary mixture. *Biomedical chromatography: BMC*. 2021. Vol. 35, № 11. P. 5154.

87. Hosny N. M. Insights into the lipophilicity of four commonly prescribed antidiabetic drugs and their simultaneous analysis using a simple TLC-spectrodensitometric method: Application to fixed-dose combination tablets and human plasma. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences, 1206*. 2022. P. 123341.

88. Ayoub B. M., Mowaka S. LC-MS/MS Determination of Empagliflozin and Metformin. *Journal of chromatographic science*. 2017. Vol. 55, № 7. P. 742–747.

89. Ayoub B. M. Development and validation of simple spectrophotometric and chemometric methods for simultaneous determination of empagliflozin and metformin: Applied to recently approved pharmaceutical formulation. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*. 2016. Vol. 168. P. 118–122.

90. Moussa B. A., Mahrouse M. A., Fawzy M. G. Smart spectrophotometric methods for the simultaneous determination of newly co-formulated hypoglycemic drugs in binary mixtures. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*. 2021. Vol. 257. P. 119763.

91. Vankalapati K. R., Alegete P., Boodida S. Stability-indicating ultra performance liquid chromatography method development and validation for

simultaneous estimation of metformin, linagliptin, and empagliflozin in bulk and pharmaceutical dosage form. *Biomedical chromatography: BMC*. 2021. Vol. 35, № 4. P. 5019.

92. Vankalapati K. R., Alegete P., Boodida S. Stability-indicating HPLC method development and validation for simultaneous estimation of metformin, dapagliflozin, and saxagliptin in bulk drug and pharmaceutical dosage form. *Biomedical chromatography: BMC*. 2022. Vol. 36, № 7. P. 5384.

93. Satheeshkumar N., Pradeepkumar M., Shanthikumar S., Rao V. J. Development of validated stability indicating assay method for simultaneous estimation of metformin hydrochloride and vildagliptin by RP-HPLC. *Drug research*. 2014. Vol. 64, № 3. P. 124–129.

94. Vetapalem R., Yejella R. P., Atmakuri L. R. Development and Validation of a Stability Indicating RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Teneligliptin and Metformin. *Turkish journal of pharmaceutical sciences*. 2020. Vol. 17, № 2. P. 141–147.

95. Prajapati P. B., Mistry K. Y., Shah S. A. DoE-Based Analytical Failure Modes Critical Effect Analysis (AFMCEA) to a Multipurpose-RP-HPLC Method for the Estimation of Multiple FDC Products of Metformin Hydrochloride Using an Analytical Quality by Design Approach. *Journal of AOAC International*. 2022. Vol. 105, № 4. P. 986–998.

96. Liu J., Jiang F., Lu Z., Zhang C., Liu P., Huang M., Zhong G. Signal Suppression in LC-ESI-MS/MS from Concomitant Medications and Its Impact on Quantitative Studies: An Example Using Metformin and Glyburide. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2023. Vol. 28, № 2. P. 746.

97. Ma J., Pawar R. S., Grundel E. Validation of an LC-MS/MS method for analysis of anti-diabetic drugs in botanical dietary supplements labeled for blood sugar management. *Drug testing and analysis*. 2018. Vol. 10 № 3. P. 609–617.

98. Sabhyatha T.S., Narayana Babu. Analitical Method Validation of Gliclazide Related Substances by High Performabce Liquid Chromatography

Method. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. 2022. Vol. 14, № 4.

99. Attimarad M., Nair A., Sreeharsha N., Al-Dhubiab B., Venugopala K., Pottathil S. 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*. 2021. Vol. 18. P. 448.

100. Zhuk Y. N., Vasyuk S. O. Quantitative determination of Atenolol in tablets. *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry*. 2016. Vol. 5, № 3. P. 350-354.

101. Horyn M., Kucher T., Kryskiw L., Poliak O., Zarivna N., Peleshok K., Logoyda L. Development of the spectrophotometric method for the determination of metoprolol tartrate in tablets by using bromocresol green. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. P. 55-63.

102. Загородній С. Л., Васюк С. О. Розробка спектрофотометричної методики визначення мебгідроліну в лікарських формах *ScienceRise*. 2015. Т. 12, № 4. С. 33-38.

103. Semenenko S., Miedviedieva K., Vasiuk S., Burlaka B. Development of a spectrophotometric technique for the quantitative determination of ademol. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*. 2023. Vol. 16. P. 28-32.

104. Nguyen T. Extractive spectrophotometric determination of nimodipine through ion-pair complex formation with bromothymol blue. *Journal of Science and Technique*. 2022. Vol. 17.

105. Donchenko A., Svitlana V., Nahorna N. Extraction-free Spectrophotometric Determination of Meloxicam Using Bromothymol Blue. *Ankara Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi*. 2023. Vol. 47. P. 752-760.

106. Жук Ю. М., Васюк С. О., Антипенко Л. М. Вивчення будови продукту взаємодії бісопрололу з тимоловим синім. *Фармаком*. 2018. № 1. С. 82-87.

107. Бурлака Ю. В., Тарханова О. О., Коржова А. С., Васюк С. О., Кейтлін І. М. Спектрофотометричне визначення тербінафіну в таблетках за реакцією з бромкрезоловим зеленим. *Фармацевтичний журнал*. 2011. № 2. С. 66-69.

108. Суліма М. І., Огурцов В. В., Жук Ю. М., Васюк С. О., Хом'як С. В. Ідентифікація будови продукту взаємодії верапамілу гідрохлориду з бромкрезоловим зеленим. *Фармацевтичний часопис*. 2020. № 1. С. 51–58.

109. Portna K., Vasiuk S. Quantitative determination of glycine in pharmaceutical formulations by reaction with 2,3-dichlor-1,4-naphthoquinone reagent. *Farmatsevtychnyi zhurnal*. 2018. P. 78-83.

110. Донченко А. О., Васюк С. О. Спектрофотометричне визначення атенололу в лікарських формах із використанням 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону. *Фармацевтичний часопис*. 2017. № 4. С. 63-68.

111. Мєдвєдєва К. П., Донченко А. О., Васюк С. О. Застосування похідних хінону для спектрофотометричного визначення лікарських засобів. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2019. Т. 12, №3(31). С. 250-255.

112. Huda A. I., Mahmood A. H., Hadar M. A., Mohammed Y. K. Spectrophotometric determination of clotrimazole and Phenylephrine-HCl in pharmaceutical formulation using 1,2-naphthoquinone-4-Sulphonic acid sodium salt (NQS) as a chromogenic reagent. *Journal of the Indian Chemical Society*. 2022. Vol. 99, № 3. P. 100373.

113. Nourah Z. A., Jamilah M. A., Ibrahim A. D., Nasr Y. K., Hamdy M. Ab.-R. Charge–transfer reaction of 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone with crizotinib: Spectrophotometric study, computational molecular modeling and use in development of microwell assay for crizotinib. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2015. Vol. 23, № 1. P. 75-84.

114. Avijit S., Amit S. T., Asok K. M., Charge transfer interaction of 4-acetamidophenol (paracetamol) with 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone: A study in aqueous ethanol medium by UV–vis spectroscopic and DFT methods.

*Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2008. Vol. 71, № 3. P. 835-840,

115. Donchenko A., Miedviedieva K., Voskoboınık O., Vasyuk S. Kovalenko S. Study of the Structure of Products of Interaction Between Some Naphthoquinone Derivatives and Pharmaceutical Substances. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*. 2021. Vol. 45, №2. P. 321-331.

116. Leleka, L., Vasyuk, S. Spectrophotometric Method Development and Validation for Gliclazide Quantitation in Tablets. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*. 2022. Vol. 46, № 3. P 920-930.

117. Дем'янова, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення гліклазиду в лікарському препараті «Діаглізид» Фармак. *«Сучасні аспекти медицини та фармації – 2021»*: матеріали 81 Всеукраїнської наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю, м. Запоріжжя, 15-16 квіт. 2021 р. Запоріжжя, 2021. С. 141-142.

118. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення глібенкламіду в лікарському препараті «Глібенкламід Здоровья». *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів*: матеріали IX Наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Тернопіль, 22-23 вер. 2022 р. Тернопіль, 2022. С. 89-90.

119. Донченко А. О. Застосування похідних хінону для розробки спектрофотометричних методик кількісного визначення лікарських засобів: дис… канд. фарм. наук. Запоріжжя, 2019. 170 с.

120. Leleka, L. Vasyuk, S. Development of a Method for the Quantitative Determination of Glibenclamide in tablets. *Journal of Current issues in pharmacy and medicine: science and practice.* 2023. Vol. 16, № 2. P. 135-140.

121. Дем'янова, Л. Г., Бугайова В.В. Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення метформіну гідрохлориду в препараті «Метформін-Тева» *International scientific conference*

*of young scientists and students "Perspectives for the development of biology, medicine and pharmacy"*, Shymkent, Republic of Kazakhstan, 10-11 Nov. 2020. Shymkent, 2020. Vol. 4. P. 135.

122. Дем'янова, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення гліклазиду в лікарському препараті «Діабетон». *LXIV підсумкова науково-практична конференція*, м. Тернопіль, 11 черв. 2021 р. Тернопіль, 2021. С. 145-146.

123. Дем'янова, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення метформін гідрохлорид в препараті «Метформін Глюкофаж» *Міжнародна науково-практичноа конференція «PLANTA+*: Наука, практика та освіта», м. Київ. 19 лют. 2021 р. Київ, 2021. С. 74-75

124. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О. Спектрофотометричне визначення гліклазиду в лікарському препараті «Гліклада». *Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю*, м. Запоріжжя, 25-26 лист. 2021 р. Запоріжжя, 2021. С. 62.

125. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. Т. 1. 1128 с.

126. Георгіянц В. А., Євтіфєєва О. А. Валідація аналітичних методик у фармації: теорія, нормативні аспекти, проблеми практики. *Фармацевтичний часопис*. 2007. № 2. С. 13-18.

127. Yevtifieieva O. A., Georgiyants V. A. Medicines manufactured in pharmacies: features of validation of analytical methods and tests (Prior to the introduction of the monograph section of the SPU). *Farmatsevtychnyi zhurnal*. 2021. № 6. P. 80-93.

128. Эрмер Й., Миллер Джон Х. МакБ. Валидация методик в фармацевтическом анализе. Примеры наилучших практик, 1-е изд.: пер. с англ. М.: Группа компаний ВИАЛЕК. 2013. 512 с.

129. Гризодуб О. И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств. Х.: Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств», 2016. 396 с.

130. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр як ості лікарських засобів», 2023. Доповнення 6. 423 с.

131. Belouafa S. et al. Statistical tools and approaches to validate analytical methods: methodology and practical examples. *Int. J. Metrol. Qual. Eng*. 2017. Vol. 8, is. 9. P. 12-22.

132. Гризодуб А.И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества ЛС. *Фармация Казахстана*. 2014. № 12. С. 18-25.

133. Pena-Pereira F., Wojnowski W., Tobiszewski M. AGREE – Analytical GREEnness Metric Approach and Software. *Analytical Chemistry*. 2020. Vol. 92, № 14. P. 10076–10082.

134. Gałuszka A., Migaszewski Z., Konieczka P., Namieśnik J. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2012. Vol. 37. P. 61–72.

135. Miedviedieva K., Vasyuk S., Portna O. Development and validation of a new spectrophotometric method for the determination of gabapentin in capsules. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2023. № 3. P. 50-57.

136. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О. Спектрофотометричне визначення метформіну гідрохлориду в таблетках за реакцією з бромкрезоловим зеленим. *Фармацевтичний часопис.* 2023. № 2. С. 19–30.

137. Дем’янова, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення метформін гідрохлориду в лікарському препараті «Метформін Сандоз». *«Сучасні аспекти створення лікарських засобів»*: матеріали Міжнар. наук.-практ.

дистанційної конф. присвяченої 100-річчю кафедри аналітичної хімії НФаУ, м. Харків, 16 квіт. 2021 р. Харків, 2021 С. 92.

138. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення глібенкламіду в лікарському препараті «Манініл». *X Науково-практична конференція Школи молодих науковців АТ «Фармак»*., м. Київ, 27-28 жовт. 2022 р. Київ, 2022. С. 45-46.

139. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення глібенкламіду в таблетках. *«Запорізький фармацевтичний форум - 2022»*: матеріали Всеукраїнської наук.-практ. конф., м. Запоріжжя, 17-18 лист. 2022 р. Запоріжжя, 2022. С. 57-58.

140. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О., Дочинець Д. І. Розробка і валідація спектрофотометричнх методик кількісного визначення цукрознижувальних речовин в лікарських препаратах за реакцією з хінонами. *Безперервний професійний розвиток фармацевтичних працівників: сучасний стан, проблеми та перспективи*: матер. наук.-практ. конференції з міжнар. участю, присвяченої 30-річчю заснування Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету, м. Харків 1-2 лист. 2023 р. Харків, 2023. С. 232.

141. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричних методик кількісного визначення цукрознижувальних речовин в лікарських препаратах за реакцією із сульфофталеїнами. *«Запорізький фармацевтичний форум - 2023»*: матеріали Всеукраїнської наук.-практ. конф., м. Запоріжжя, 23-24 лист. 2023 р. Запоріжжя, 2023. С.

## Додаток А

## Список публікацій здобувача

1. Leleka, L., Vasyuk, S. Spectrophotometric Method Development and Validation for Gliclazide Quantitation in Tablets. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*. 2022. Vol. 46, № 3. P 920-930.

2. Leleka, L. Vasyuk, S. Development of a Method for the Quantitative Determination of Glibenclamide in tablets. *Journal of Current issues in pharmacy and medicine: science and practice.* 2023. Vol. 16, № 2. P. 135-140.

3. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О. Спектрофотометричне визначення метформіну гідрохлориду в таблетках за реакцією з бромкрезоловим зеленим. *Фармацевтичний часопис.* 2023. № 2. С. 19–30.

4. Дем’янова, Л. Г., Бугайова В.В. Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення метформіну гідрохлориду в препараті «Метформін-Тева» *International scientific conference of young scientists and students "Perspectives for the development of biology, medicine and pharmacy"*, Shymkent, Republic of Kazakhstan, 10-11 Nov. 2020. Shymkent, 2020. Vol. 4. P. 135.

5. Дем’янова, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення метформін гідрохлорид в препараті «Метформін Глюкофаж» *Міжнародна науково-практичноа конференція «PLANTA+*: Наука, практика та освіта», м. Київ. 19 лют. 2021 р. Київ, 2021. С. 74-75.

6. Дем’янова, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення гліклазиду в лікарському препараті «Діаглізид» Фармак. *«Сучасні аспекти медицини та фармації – 2021»*: матеріали 81 Всеукраїнської наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю, м. Запоріжжя, 15-16 квіт. 2021 р. Запоріжжя, 2021. С. 141-142.

**Продовж. дод. А**

7. Дем’янова, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення метформін гідрохлориду в лікарському препараті «Метформін Сандоз». *«Сучасні аспекти створення лікарських засобів»*: матеріали Міжнар. наук.-практ. дистанційної конф. присвяченої 100-річчю кафедри аналітичної хімії НФаУ, м. Харків, 16 квіт. 2021 р. Харків, 2021 С. 92.

8. Дем’янова, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення гліклазиду в лікарському препараті «Діабетон». *LXIV підсумкова науково-практична конференція*, м. Тернопіль, 11 черв. 2021 р. Тернопіль, 2021. С. 145-146.

9. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О. Спектрофотометричне визначення гліклазиду в лікарському препараті «Гліклада». *Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю*, м. Запоріжжя, 25-26 лист. 2021 р. Запоріжжя, 2021. С. 62.

10. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення глібенкламіду в лікарському препараті «Глібенкламід Здоровья». *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів*: матеріали IX Наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Тернопіль, 22-23 вер. 2022 р. Тернопіль, 2022. С. 89-90.

11. Спосіб кількісного спектрофотометричного визначення гліклазиду в таблетках: патент на корисну модель 150394 Україна. № 202105447; заявл. 27.09.2021; опубл. 09.02.2022, Бюл. № 6.

12. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення глібенкламіду в лікарському препараті «Манініл». *X Науково-практична конференція Школи молодих науковців АТ «Фармак»*., м. Київ, 27-28 жовт. 2022 р. Київ, 2022. С. 45-46.

**Продовж. дод. А**

13. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення глібенкламіду в таблетках. *«Запорізький фармацевтичний форум - 2022»*: матеріали Всеукраїнської наук.-практ. конф., м. Запоріжжя, 17-18 лист. 2022 р. Запоріжжя, 2022. С. 57-58.

14. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О., Дочинець Д. І. Розробка і валідація спектрофотометричнх методик кількісного визначення цукрознижувальних речовин в лікарських препаратах за реакцією з хінонами. *Безперервний професійний розвиток фармацевтичних працівників: сучасний стан, проблеми та перспективи*: матер. наук.-практ. конференції з міжнар. участю, присвяченої 30-річчю заснування Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету, м. Харків 1-2 лист. 2023 р. Харків, 2023. С. 232.

15. Лелека, Л. Г., Васюк, С. О. Розробка і валідація спектрофотометричних методик кількісного визначення цукрознижувальних речовин в лікарських препаратах за реакцією із сульфофталеїнами. *«Запорізький фармацевтичний форум - 2023»*: матеріали Всеукраїнської наук.-практ. конф., м. Запоріжжя, 23-24 лист. 2023 р. Запоріжжя, 2023. С.

## Додаток Б

## Апробація результатів дисертації

1. Международн ая научная конференция молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации», (Шымкент, Республика Казахстан, 2020, форма участі – публікація тез).
2. Міжнародна науково-практичноа конференція «PLANTA+. Наука, практика та освіта» (Київ, 2021, форма участі – публікація тез).
3. 81 Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини та фармації – 2021» (Запоріжжя, 2021, форма участі – доповідь та публікація тез).
4. Міжнародна науково-практична дистанційна конференція “Сучасні аспекти створення лікарських засобів”, присвячена 100-річчю кафедри аналітичної хімії НФаУ (Харків, 2021, форма участі – публікація тез).
5. LXIV підсумкова науково-практична конференція (Тернопіль, 2021, форма участі – публікація тез).
6. Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю (Запоріжжя, 2021, форма участі – публікація тез).
7. IX Науково-практична конференція з міжнародною участю. Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів ТНМУ (Тернопіль, 2022, форма участі – доповідь і публікація тез).
8. X Науково-практична конференція Школи молодих науковців АТ «Фармак» (Київ, 2022, форма участі – доповідь і публікація тез).
9. Всеукраїнська науково-практична конференція. «Запорізький фармацевтичний форум - 2022» (Запоріжжя, 2022, форма участі – доповідь і публікація тез).

**Продовж. дод. Б**

10. Наукуково-практична конференція з міжнародною участю, присвяченої 30-річчю заснування Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету (Харків, 2023, форма участі – публікація тез).

11. Всеукраїнська науково-практична конференція. «Запорізький фармацевтичний форум - 2023» (Запоріжжя, 2023, форма участі – доповідь і публікація тез).

# Додаток В.1

«ПОГОДЖУЮ»
Начальник Державної служби з лікарських засобів та контролю за наркотиками у Запорізькій області
_____ А.В. Андрущенко
«09» листопада 2023 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Розробка методу кількісного визначення глібенкламіду в таблетках
2. **Установа-розробник, адреса, ПІБ авторів:** Запорізький державний медико-фармацевтичний університет МОЗ України, 69035, м. Запоріжжя, проспект Маяковського, 26, кафедра аналітичної хімії, Лелека Л. Г., д.фарм.н., професор Васюк С. О.
3. **Джерела інформації (назва, рік видання, вихідні дані):**

1) Leleka, L. Vasyuk, S. (2023). Development of a Method for the Quantitative Determination of Glibenclamide in tablets. Journal of Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, Vol. 16 (2), 135-140.

4. **Впроваджено:** в практичну роботу Державної служби з лікарських засобів та контролю за наркотиками у Запорізькій області.
5. **Термін впровадження:** 11.09.2023 – 11.10.2023.
6. **Ефективність впровадження:** розроблений спосіб кількісного визначення глібенкламіду дозволяє економічно та з достатньо високою точністю встановити його кількісний вміст в таблетках.
7. **Пропозиції та зауваження:** немає

**Відповідальний за впровадження:**
Завідувач лабораторії з контролю якості
лікарських засобів та медичної продукції
Державної служби з лікарських засобів та контролю за наркотиками
у Запорізькій області, к.ф.н. Ілля КЕЙТЛІН

# Додаток В.2

«ПОГОДЖУЮ»
Начальник Державної служби з лікарських засобів та контролю за наркотиками у Запорізькій області
А.В. Андрущенко
«09» листопада 2023 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Спектрофотометричне визначення метформіну гідрохлориду в таблетках за реакцією з бромкрезоловим зеленим
2. **Установа-розробник, адреса, ПІБ авторів:** Запорізький державний медико-фармацевтичний університет МОЗ України, 69035, м. Запоріжжя, проспект Маяковського, 26, кафедра аналітичної хімії, Лелека Л. Г., д.фарм.н., професор Васюк С. О.
3. **Джерела інформації (назва, рік видання, вихідні дані):**
4. Leleka, L. H., Vasyuk, S. O. (2023). СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ МЕТФОРМІНУ ГІДРОХЛОРИДУ В ТАБЛЕТКАХ ЗА РЕАКЦІЄЮ З БРОМКРЕЗОЛОВИМ ЗЕЛЕНИМ. *Фармацевтичний часопис*, (2), 19–30.
5. **Впроваджено:** в практичну роботу Державної служби з лікарських засобів та контролю за наркотиками у Запорізькій області.
6. **Термін впровадження:** 11.09.2023 – 11.10.2023.
7. **Ефективність впровадження:** розроблений спосіб кількісного визначення метформіну гідрохлориду дозволяє економічно та з достатньо високою точністю встановити його кількісний вміст в таблетках.
8. **Пропозиції та зауваження:** немає

**Відповідальний за впровадження:**
Завідувач лабораторії з контролю якості
лікарських засобів та медичної продукції
Державної служби з лікарських засобів та контролю за наркотиками
у Запорізькій області, к.ф.н. Ілля КЕЙТЛІН

# Додаток Д.1

**«ЗАТВЕРДЖУЮ»**
Проректор з наукової роботи
Запорізького державного медико-
фармацевтичного університету,
проф. Валерій ТУМАНСЬКИЙ
19 09 2023 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Розробка методу кількісного визначення глібенкламіду в таблетках
2. **Установа-розробник, адреса, ПІБ авторів:** Запорізький державний медико-фармацевтичний університет МОЗ України, 69035, м. Запоріжжя, проспект Маяковського, 26, кафедра аналітичної хімії, Лелека Л. Г., д.фарм.н., професор Васюк С. О.
3. **Джерела інформації (назва, рік видання, вихідні дані):**

   Leleka, L. Vasyuk, S. (2023). Development of a Method for the Quantitative Determination of Glibenclamide in tablets. Journal of Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, Vol. 16 (2), 135-140.
4. **Впроваджено:** кафедра фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету
5. **Термін впровадження:** 01.09.2023 – 31.10.2023.
6. **Ефективність впровадження:** результати проведених досліджень впроваджено у науково-дослідну роботу кафедри, а також у навчальний процес з метою поглиблення знань студентів з питань фармацевтичного аналізу та стандартизації лікарських засобів глібенкламіду.
7. **Пропозиції та зауваження:** немає

Завідувач кафедри фармацевтичної,
органічної та біоорганічної хімії
Запорізького державного медико-
фармацевтичного університету
д.фарм.н., професор Людмила КУЧЕРЕНКО

# Додаток Д.2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Проректор з наукової роботи
Запорізького державного медико-
фармацевтичного університету,
проф. Валерій ТУМАНСЬКИЙ
«18» 09 2023 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Спектрофотометричне визначення метформіну гідрохлориду в таблетках за реакцією з бромкрезоловим зеленим
2. **Установа-розробник, адреса, ПІБ авторів:** Запорізький державний медико-фармацевтичний університет МОЗ України, 69035, м. Запоріжжя, проспект Маяковського, 26, кафедра аналітичної хімії, Лелека Л. Г., д.фарм.н., професор Васюк С. О.
3. **Джерела інформації (назва, рік видання, вихідні дані):**

   Leleka, L. H., Vasyuk, S. O. (2023). СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ МЕТФОРМІНУ ГІДРОХЛОРИДУ В ТАБЛЕТКАХ ЗА РЕАКЦІЄЮ З БРОМКРЕЗОЛОВИМ ЗЕЛЕНИМ. *Фармацевтичний часопис*, (2), 19–30.
4. **Впроваджено:** кафедра фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету
5. **Термін впровадження:** 01.09.2023 – 31.10.2023.
6. **Ефективність впровадження:** результати проведених досліджень впроваджено у науково-дослідну роботу кафедри, а також у навчальний процес з метою поглиблення знань студентів з питань фармацевтичного аналізу та стандартизації лікарських засобів глібенкламіду.
7. **Пропозиції та зауваження:** немає

Завідувач кафедри фармацевтичної,
органічної та біоорганічної хімії
Запорізького державного медико-
фармацевтичного університету
д.фарм.н., професор Людмила КУЧЕРЕНКО

# Додаток Д.3

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Проректор з наукової роботи
Запорізького державного медико-
фармацевтичного університету,
проф. Валерій ТУМАНСЬКИЙ
«20» 02 2023 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Розробка та валідація спектрофотометричної методики для кількісного визначення гліклазиду в лікарських засобах
2. **Установа-розробник, адреса, ПІБ авторів:** Запорізький державний медико-фармацевтичний університет МОЗ України, 69035, м. Запоріжжя, проспект Маяковського, 26, кафедра аналітичної хімії, Лелека Л. Г., д.фарм.н., професор Васюк С. О.
3. **Джерела інформації (назва, рік видання, вихідні дані):**

1) Leleka, L. Vasyuk, S. (2022). SPECTROPHOTOMETRIC METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR GLICLAZIDE QUANTITATION IN TABLETS. Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University, 46 (3), 920-930.
2) Патент на корисну модель «Спосіб кількісного спектрофотометричного визначення гліклазиду в таблетках» № 150394 від 09.02.2022 р. Індекс МПК G01N21/78. Номер заявки u202105447. Дата подання 27.09.2021, дата чинності 10.02.2022, дата публікації 09.02.2022. Бюл. №6/2022.

4. **Впроваджено:** кафедра фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету
5. **Термін впровадження:** 01.11.2022 – 30.01.2023.
6. **Ефективність впровадження:** результати проведених досліджень впроваджено у науково-дослідну роботу кафедри, а також у навчальний процес з метою поглиблення знань студентів з питань фармацевтичного аналізу та стандартизації лікарських засобів гліклазиду.
7. **Пропозиції та зауваження:** немає

Завідувач кафедри фармацевтичної,
органічної та біоорганічної хімії
Запорізького державного медико-
фармацевтичного університету
д.фарм.н., професор Людмила КУЧЕРЕНКО

# Додаток Д.4

**«ЗАТВЕРДЖУЮ»**
Проректор з наукової роботи
Запорізького державного медико-фармацевтичного університету,
проф. Валерій ТУМАНСЬКИЙ
«20» 02 2023 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Розробка та валідація спектрофотометричної методики для кількісного визначення гліклазиду в лікарських засобах
2. **Установа-розробник, адреса, ПІБ авторів:** Запорізький державний медико-фармацевтичний університет МОЗ України, 69035, м. Запоріжжя, проспект Маяковського, 26, кафедра аналітичної хімії, Лелека Л. Г., д.фарм.н., професор Васюк С. О.
3. **Джерела інформації (назва, рік видання, вихідні дані):**

1) Leleka, L. Vasyuk, S. (2022). SPECTROPHOTOMETRIC METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR GLICLAZIDE QUANTITATION IN TABLETS. Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University, 46 (3), 920-930.
2) Патент на корисну модель «Спосіб кількісного спектрофотометричного визначення гліклазиду в таблетках» № 150394 від 09.02.2022 р. Індекс МПК G01N21/78. Номер заявки u202105447. Дата подання 27.09.2021, дата чинності 10.02.2022, дата публікації 09.02.2022. Бюл. №6/2022.

4. **Впроваджено:** кафедра природничих дисциплін для іноземних студентів та токсикологічної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету
5. **Термін впровадження:** 01.11.2022 – 30.01.2023.
6. **Ефективність впровадження:** результати проведених досліджень впроваджено у науково-дослідну роботу кафедри, а також у навчальний процес з метою поглиблення знань студентів з питань фармацевтичного аналізу та стандартизації лікарських засобів гліклазиду.
7. **Пропозиції та зауваження:** немає

Завідувач кафедри природничих
дисциплін для іноземних студентів
та токсикологічної хімії
Запорізького державного медико-
фармацевтичного університету
д.фарм.н., професор Олександр ПАНАСЕНКО

# Додаток Д.5

**«ЗАТВЕРДЖУЮ»**
Проректор з
наукової роботи Львівського
національного медичного
університету ім. Данила
Галицького, д. мед. н.,
проф. Вікторія СЕРГІЄНКО
24 травня 2023 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження**: Розробка та валідація спектрофотометричної методики для кількісного визначення гліклазиду в лікарських засобах

2. **Установа, автор**: Запорізький державний медико-фармацевтичний університет МОЗ України, 69035, м. Запоріжжя, проспект Маяковського, 26, кафедра аналітичної хімії, Лелека Л. Г., д.фарм.н., професор Васюк С. О.

3. **Джерело інформації**:

- Leleka, L. Vasyuk, S. (2022). SPECTROPHOTOMETRIC METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR GLICLAZIDE QUANTITATION IN TABLETS. Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University, 46 (3), 920-930.
- Патент на корисну модель «Спосіб кількісного спектрофотометричного визначення гліклазиду в таблетках» № 150394 від 09.02.2022 р. Індекс МПК G01N21/78. Номер заявки u202105447. Дата подання 27.09.2021, дата чинності 10.02.2022, дата публікації 09.02.2022. Бюл. №6/2022.

4. **Де впроваджено:** в навчальний процес та наукові дослідження кафедри загальної, біонеорганічної, фізколоїдної хімії ЛНМУ.

5. **Форма впровадження**: навчальний процес, лекційний курс та наукові дослідження кафедри загальної, біонеорганічної, фізколоїдної хімії ЛНМУ.

6. **Ефект від впровадження**: результати проведених досліджень впроваджено у науково-дослідну роботу кафедри, а також у навчальний процес з метою поглиблення знань студентів з питань фармацевтичного аналізу та стандартизації лікарських засобів гліклазиду.

7. **Термін впровадження** 2022-2023 навчальний рік

«24» 05 2023 р.

Відповідальний за впровадження
Зав. каф. загальної, біонеорганічної,
фізколоїдної хімії, д.фарм.н.,
проф. Ірина ДРАПАК

# Додаток Д.6

**«ЗАТВЕРДЖУЮ»**
Проректор закладу вищої освіти з науково-педагогічної роботи Національного фармацевтичного університету,
д. фарм. н., проф. Інна ВЛАДИМИРОВА

«23» 02 2023 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. **Найменування пропозиції для впровадження**: Розробка та валідація спектрофотометричної методики для кількісного визначення гліклазиду в лікарських засобах

2. **Установа-розробник, адреса, ПІБ авторів**: Запорізький державний медико-фармацевтичний університет МОЗ України, 69035, м. Запоріжжя, проспект Маяковського, 26, кафедра аналітичної хімії, аспірант Лелека Л. Г., д.фарм.н., професор Васюк С. О.

3. **Джерела інформації (назва, рік видання, вихідні дані):**
   - Leleka, L. Vasyuk, S. (2022). SPECTROPHOTOMETRIC METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR GLICLAZIDE QUANTITATION IN TABLETS. Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University, 46 (3), 920-930.
   - Патент на корисну модель «Спосіб кількісного спектрофотометричного визначення гліклазиду в таблетках» № 150394 від 09.02.2022 р. Індекс МПК G01N21/78. Номер заявки u202105447. Дата подання 27.09.2021, дата чинності 10.02.2022, дата пудлікації 09.02.2022. Бюл. №6/2022.

4. **Впроваджено:** в навчальний процес та наукові дослідження кафедри фармацевтичної хімії НФаУ.

5. **Термін впровадження**: 2022-2023 навчальний рік.

6. **Ефективність впровадження**: результати проведених досліджень впроваджено у науково-дослідну роботу кафедри, а також у навчальний процес з метою поглиблення знань студентів з питань фармацевтичного аналізу та стандартизації лікарських засобів гліклазиду.

7. **Пропозиції та зауваження:** немає.

Відповідальний за впровадження
Завідувач кафедри фармацевтичної хімії
Національного фармацевтичного університету
д.фарм.н., професор Вікторія ГЕОРГІЯНЦ

# Додаток Д.7

**«ЗАТВЕРДЖУЮ»**
Проректор закладу вищої освіти з наукової роботи Запорізького національного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського, д. б. н., проф. Іван КЛИЩ

«26» травня 2023 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження**: Розробка та валідація спектрофотометричної методики для кількісного визначення гліклазиду в лікарських засобах

2. **Установа, автор**: Запорізький державний медико-фармацевтичний університет МОЗ України, 69035, м. Запоріжжя, проспект Маяковського, 26, кафедра аналітичної хімії, Лелека Л. Г., д.фарм.н., професор Васюк С. О.

3. **Джерело інформації**:

   Leleka, L. Vasyuk, S. (2022). SPECTROPHOTOMETRIC METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR GLICLAZIDE QUANTITATION IN TABLETS. Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University, 46 (3), 920-930.
   Патент на корисну модель «Спосіб кількісного спектрофотометричного визначення гліклазиду в таблетках» № 150394 від 09.02.2022 р. Індекс МПК G01N21/78. Номер заявки u202105447. Дата подання 27.09.2021, дата чинності 10.02.2022, дата пудлікації 09.02.2022. Бюл. №6/2022.

4. **Де впроваджено:** в навчальний процес та наукові дослідження кафедри фармацевтичної хімії ТНМУ.

5. **Форма впровадження**: навчальний процес, лекційний курс та наукові дослідження кафедри фармацевтичної хімії ТНМУ.

6. **Ефект від впровадження**: результати проведених досліджень впроваджено у науково-дослідну роботу кафедри, а також у навчальний процес з метою поглиблення знань студентів з питань фармацевтичного аналізу та стандартизації лікарських засобів гліклазиду.

7. **Термін впровадження** 2022-2023 навчальний рік

«26» травня 2023 р.

Відповідальний за впровадження
Зав. каф. фармацевтичної хімії,
д.фарм.н., проф. Лілія ЛОГОЙДА

**Додаток Ж**

УКРАЇНА

ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

№ 150394

СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ГЛІКЛАЗИДУ В ТАБЛЕТКАХ

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі України корисних моделей **09.02.2022.**

Генеральний директор
Державного підприємства
«Український інститут
інтелектуальної власності» А.В. Кудін

«УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ»
Ідентифікаційний код
31032378

6221491345922573

На електронний документ накладено: 1 (Один) підписи чи печатки:
На момент друку копії, підписи чи печатки перевірено:
Програмний комплекс: eSign v. 2.3.0;
Засіб кваліфікованого електронного підпису чи печатки: ІІТ Користувач ЦСК-1
Експертний висновок: №05/02/02-1424 від 05.04.2016;
Цілісність даних: не порушена;

Підпис № 1 (реквізити підписувача та дані сертифіката)
Підписувач: Лелека Лідія Геннадіївна 3351606125;
Належність до Юридичної особи: ;
Код юридичної особи в ЄДР: 3351606125;
Серійний номер кваліфікованого сертифіката: 382367105294AF97040000006804DD005EDFC001;
Видавник кваліфікованого сертифіката: "Дія". Кваліфікований надавач електронних довірчих послуг;
Тип носія особистого ключа: Незахищений;
Тип підпису: Удосконалений;
Сертифікат: Кваліфікований;
Час та дата підпису (позначка часу для підпису): 13:51 18.12.2023;
Чинний на момент підпису. Підтверджено позначкою часу для підпису від АЦСК (кваліфікованого надавача електронних довірчих послуг)
Час та дата підпису (позначка часу для даних): 13:51 18.12.2023;
Чинний на момент підпису. Підтверджено позначкою часу для даних від АЦСК (кваліфікованого надавача електронних довірчих послуг)