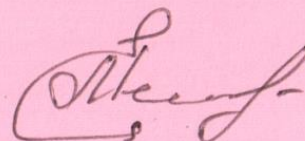


Міністерство охорони здоров'я України
Запорізький державний медичний університет

МЕДВЕДЕВА КАТЕРИНА ПАВЛІВНА



УДК 543.42.062:[615.31:074:547-304.2]

РОЗРОБКА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИХ МЕТОДИК КІЛЬКІСНОГО
ВИЗНАЧЕННЯ ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН, ЩО МІСТЯТЬ ПЕРВИННУ
АЛІФАТИЧНУ АМІНОГРУПУ

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук

Запоріжжя – 2015

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Запорізькому державному медичному університеті Міністерства охорони здоров'я України.

Науковий керівник доктор фармацевтичних наук, професор **Васюк Світлана Олександрівна**, Запорізький державний медичний університет, завідувач кафедри аналітичної хімії.

Офіційні опоненти:

доктор фармацевтичних наук, професор **Безуглий Петро Овксентійович**, професор кафедри фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету;

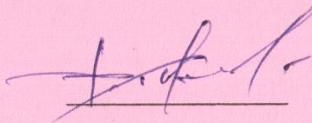
доктор фармацевтичних наук, професор **Вегютнева Наталія Олександрівна**, завідувач кафедри контролю якості і стандартизації лікарських засобів Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика.

Захист відбудеться «28» грудня 2015 р. о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 17.600.03 при Запорізькому державному медичному університеті (69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Запорізького державного медичного університету (69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26).

Автореферат розісланий «26» листопада 2015 р. -

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради



Парченко В. В.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Забезпечення якості ліків на усіх етапах їх життєвого циклу є важливою задачею фармацевтичної галузі. Важливим елементом цієї системи є контроль якості ліків, що здійснюється за допомогою сучасних фізико-хімічних методів аналізу, у тому числі абсорбційної спектрофотометрії в УФ- та видимій областях спектра. Можливість визначення за функціональними групами молекул лікарських речовин, доступність, простота виконання, експресність, висока точність вимірів, що забезпечується використанням відносно недорогої сучасної апаратури роблять спектрофотометричний аналіз одним з найбільш розповсюджених методів на хіміко-фармацевтичних підприємствах для встановлення доброякісності ліків, моніторингу напівпродуктів в ході виробництва, у контролі якості готової продукції та вихідної сировини. Цей метод широко застосовується в роботі Державної служби з лікарських засобів. У зв'язку з цим актуальним є розширення асортименту специфічних органічних аналітичних реагентів. Похідні нафтохінону, а саме, натрієва сіль 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти та 2,3-дихлор-1,4-нафтохінон є відомими кольорореагентами, однак, недостатньо досліджена можливість їх використання для кількісного визначення аміноглікозидних антибіотиків, глюкозаміну та деяких аліфатичних амінокислот. Отже, розробка доступних, чутливих, експресних, нескладних у виконанні спектрофотометричних методик кількісного визначення лікарських речовин у лікарських препаратах із застосуванням похідних нафтохінону є актуальною проблемою сучасного фармацевтичного аналізу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана у відповідності з планом наукових досліджень Запорізького державного медичного університету і є фрагментом комплексної теми «Застосування фізико-хімічних методів в аналізі лікарських речовин, похідних амінів, азолів та інших» (№ державної реєстрації 0111U005857). Дисертантом особисто розроблені методики кількісного визначення лікарських речовин, що містять первинну аліфатичну аміногрупу.

Мета і задачі дослідження. Мета дисертаційної роботи – наукове обґрунтування та розробка чутливих, простих у виконанні, валідованих спектрофотометричних методик визначення лікарських речовин, що містять первинну аліфатичну аміногрупу, у лікарських формах. Для реалізації поставленої мети необхідно було вирішити такі задачі:

- провести аналіз літературних джерел щодо кількісного визначення обраних лікарських речовин, що містять первинну аліфатичну аміногрупу, а також застосування похідних нафтохінону в спектрофотометричному аналізі;
- встановити оптимальні умови перебігу реакцій аналізованих лікарських речовин, що містять первинну аліфатичну аміногрупу з кольорореагентами та розрахувати аналітичні показники чутливості реакцій;
- розробити спектрофотометричні методики кількісного визначення лікарських речовин, що містять первинну аліфатичну аміногрупу, у складі готових лікарських форм;

- запропонувати хімізм взаємодії, встановити коефіцієнти стехіометричних співвідношень «реагент – лікарська речовина», виділити та встановити будову сполук, які утворюються в результаті реакцій;
- визначити валідаційні характеристики розроблених спектрофотометричних методик досліджуваних лікарських речовин;
- довести можливість застосування натрієвої солі 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти як проявного реагенту в тонкошаровій хроматографії для обраних лікарських речовин, що містять первинну аліфатичну аміногрупу.

Об'єкт дослідження. Розробка спектрофотометричних методів кількісного аналізу у видимій області спектра лікарських речовин, що містять в своєму складі первинну аліфатичну аміногрупу, у складі лікарських препаратів.

Предмет дослідження. 9 субстанцій, до складу яких входить первинна аліфатична аміногрупа, 25 лікарських форм, до складу яких входять досліджувані субстанції.

Методи дослідження. Для розробки нових методик кількісного аналізу досліджуваних лікарських речовин застосовано спектрофотометрію у видимій області спектра та тонкошарову хроматографію (ТШХ). Обробку спектрів проводили з використанням програмного пакету WinASPECT 2.2.1.0. Для ідентифікації продуктів реакцій використовували хромато-мас-спектрометрію. Стехіометричні співвідношення реагуючих речовин встановлювали спектрофотометричними методами: насичення, ізомольарних серій. Побудову графіків та розрахунок параметрів лінійної залежності проводили з використанням програми «Sigma Plot v.11.0».

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше експериментально доведено та науково обґрунтовано можливість застосування натрієвої солі 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти та 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону у фармацевтичному аналізі для кількісного спектрофотометричного визначення визначення глюкозаміну, аміноглікозидних антибіотиків та деяких амінокислот.

Встановлено оптимальні умови перебігу реакцій натрієвої солі 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти та 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону з 9 лікарськими речовинами, що містять первинну аліфатичну аміногрупу, розраховано аналітичні показники чутливості реакцій.

Визначено коефіцієнти стехіометричних співвідношень «реагент – лікарська речовина» для реакцій натрієвої солі 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти та 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону з лікарськими речовинами, що містять первинну аліфатичну аміногрупу, виділено та ідентифіковано продукти реакцій, запропоновано хімізми реакцій.

Запропоновано натрієву сіль 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоту як чутливий та доступний проявний реагент для обраних лікарських речовин, що містять первинну аліфатичну аміногрупу, із застосуванням методу ТШХ.

Наукова новизна одержаних результатів підтверджена 2 патентами України на корисну модель.

Практичне значення одержаних результатів. Розширено асортимент аналітичних реагентів для кількісного спектрофотометричного аналізу

глюкозаміну та аміноглікозидних антибіотиків. Розроблено та валідовано нові, чутливі та прості у виконанні методики кількісного визначення 9 досліджуваних сполук з первинною аліфатичною аміногрупою у складі 25 лікарських форм промислового виробництва.

Результати досліджень знайшли застосування в науково-педагогічному процесі при викладанні курсу фармацевтичної хімії на кафедрах фармацевтичних факультетів Запорізького державного медичного університету, Запорізького Національного університету, Національного фармацевтичного університету (м. Харків), Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, Тернопільського державного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського, Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика. Розроблені методики визначення впроваджено в практику роботи Державної служби з лікарських засобів у Запорізькій області.

Спектрофотометричний спосіб кількісного визначення глюкозаміну» включено до галузевого реєстру нововведень МОЗ України за 2014 р. (реєстр. № 171/1/14).

Особистий внесок здобувача. Здобувачем самостійно вивчені, проаналізовані та узагальнені дані літератури з питань, що стосуються теми дисертації, виконана експериментальна частина дисертаційної роботи, проведена графічна та статистична обробка одержаних результатів, написані всі розділи дисертаційної роботи, сформульовані висновки та запропоновані практичні рекомендації. Постановка мети та обговорення результатів проведені з науковим керівником.

Апробація результатів дисертації. Основні результати досліджень доповідалися та обговорювалися на Всеукраїнській конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2011» (Запоріжжя, 2011), 72 Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю, присвяченій Дню науки «Медицина та фармація XXI століття – крок у майбутнє» (Запоріжжя, 2012), I регіональній науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих наук» (Запоріжжя, 2012), I міжнародній інтернет-конференції «Современные достижения медицинской и фармацевтической науки» (Запоріжжя, 2012), XII міжнародному медичному конгресі студентів і молодих вчених (Тернопіль, 2013), міжнародній студентській науковій конференції «Перший крок в науку – 2013» (Вінниця, 2013), 73 Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю, присвяченій Дню науки «Медицина та фармація XXI століття – крок у майбутнє» (Запоріжжя, 2013), п'ятій науково-практичній конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 2013), третій міжнародній конференції «Plant – the source of research material» (Lublin, 2013), 67 міжнародному науково-практичному конгресі студентів та молодих вчених «Актуальні проблеми сучасної медицини» (Київ, 2013), науково-практичній конференції «Сучасні аспекти медицини і

фармації півдня України» (Одеса, 2013), II регіональній науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Актуальні проблеми та перспективи розвитку медичних, фармацевтичних та природничих наук – 2013» (Запоріжжя, 2013), Українській науково-практичній конференції, присвяченій 100-річчю з дня народження доктора хімічних наук, професора П. О. Петюніна» (Харків, 2014), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2014» (Запоріжжя, 2014), III регіональній науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Актуальні проблеми та перспективи розвитку медичних, фармацевтичних та природничих наук – 2014» (Запоріжжя, 2014), міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Аналітична хімія в фармації» (Харків, 2015), Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю, присвяченій Дню науки «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2015» (Запоріжжя, 2015), міжнародній науково-практичній конференції «Медична наука та практика на сучасному історичному етапі» (Київ, 2015), 55 ювілейній науковій конференції студентів та молодих вчених ЗКГМУ ім. Марата Оспанова з міжнародною участю (Актобе, 2015), XXXII Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (Харків, 2015), підсумковій науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (Тернопіль, 2015).

Апробацію роботи проведено 26 червня 2015 року на спільному засіданні професорсько-викладацького складу кафедр аналітичної хімії; біохімії та лабораторної діагностики; органічної та біоорганічної хімії; фармацевтичної хімії; фармакогнозії, фармакології та ботаніки; токсикологічної і неорганічної хімії; управління і економіки фармації, медичного та фармацевтичного товарознавства; фізикоїдної хімії Запорізького державного медичного університету.

Публікації. За результатами дисертаційних досліджень опубліковано 32 наукові роботи, у тому числі 7 статей (4 статті у фахових виданнях України, 3 статті у виданнях іноземних держав), з яких 6 статей у виданнях, що входять до міжнародних наукометричних баз, 2 патенти України на корисну модель, 22 тези доповідей, 1 нововведення.

Обсяг та структура дисертації. Дисертаційна робота складається з вступу, огляду літератури (розділ 1), об'єктів і методів дослідження (розділ 2), експериментальної частини (розділи 3-5), загальних висновків, списку використаних джерел та 13 додатків. Дисертація викладена на 151 сторінці друкованого тексту (обсяг основного тексту 108 сторінок), ілюстрована 37 рисунками та 25 таблицями. Список використаних джерел включає 164 найменування.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Методи аналізу лікарських речовин, що містять в своєму складі первинну аліфатичну аміногрупу (огляд літератури)

Проаналізовано літературні дані щодо використання похідних хінону та нафтохінону як перспективних аналітичних кольорореагентів в галузі фармацевтичного аналізу. Розглянуто існуючі фізико-хімічні, а також офіційні методи кількісного визначення аміноглікозидних антибіотиків, глюкозаміну та деяких аліфатичних амінокислот. Обґрунтовано актуальність розробки нових методів аналізу зазначених сполук.

Об'єкти дослідження, реагенти, розчинники та загальні методи аналізу

Для дослідження було взято 4 аміноглікозидних антибіотика (амікацину сульфат, гентаміцину сульфат, канаміцину сульфат та стрептоміцину сульфат), 4 аліфатичних амінокислоти (гліцин, таурин, β -аланін, γ -аміномасляна кислота), глюкозаміну гідрохлорид та 25 лікарських препаратів.

В якості реагентів було використано натрієву сіль 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти та 2,3-дихлор-1,4-нафтохінон.

Зазначено методи дослідження, що були застосовані при виконанні дисертаційної роботи.

Спектрофотометричне визначення лікарських речовин, що містять первинну аліфатичну аміногрупу

Для встановлення найбільш сприятливих умов утворення забарвлених сполук між обраними лікарськими речовинами та деякими похідними нафтохінону вивчалися фактори, що впливають як на характер спектра поглинання, так й на повноту перебігу реакції (величину абсорбції), а саме, природа розчинника, кількість та порядок додавання реагентів, рН реакційної суміші, температура та час нагрівання.

Вивчаючи оптимальні умови проведення реакцій між речовинами, що містять первинну аліфатичну аміногрупу, (амікацину сульфатом, глюкозаміну гідрохлоридом, канаміцину сульфатом, стрептоміцину сульфатом, таурином, β -аланіном, γ -аміномасляною кислотою) та натрієвою сіллю 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти, вибір розчинника ґрунтувався на розчинній здатності та кількості утвореного продукту реакції (за максимальним виходом продукту взаємодії). Тому, як розчинники, вивчалися вода очищена, етанол, ДМФА, ізопропіловий спирт. На підставі отриманих спектрів поглинання продуктів реакції натрієвої солі 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти з лікарськими речовинами в різних розчинниках, а також враховуючи їх доступність, подальшу реакцію проводили в середовищі води очищеної.

Згідно огляду літературних джерел та експериментальним шляхом було доведено, що обов'язковою умовою успішного перебігу реакції між реагентом та лікарською речовиною є створення лужного середовища. Водні розчини лугів є найбільш зручними, доступними та дешевими, тому були використані 0,01 М, 0,05 М, 0,2 М розчини NaOH.

Експериментально встановлено, що обрані лікарські речовини реагують з 0,50–2,0% водним розчином натрієвої солі 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти, доданий об'єм якого складає від 0,50 до 2,00 мл. Необхідне значення рН середовища створюється додаванням 1,00–3,00 мл 0,01 М, 0,05 М, 0,2 М розчину NaOH. Забарвлений продукт утворюється за кімнатної температури, але за достатньо великого проміжку часу (близько 60 хв), що не є доцільним в умовах рутинного контролю якості лікарських засобів, тому реакційну суміш необхідно нагрівати на водяній бані (60–95°C) 3–10 хв. У випадку деяких лікарських речовин, а саме, аміноглікозидів: амікацину, стрептоміцину та канаміцину, реакційну суміш до нагрівання необхідно витримувати близько 10 хв за кімнатної температури. Отримані продукти реакцій стабільні: величина оптичної густини не змінюється протягом 30 хв і більше.

Вивчаючи вплив різноманітних факторів на перебіг взаємодії між лікарськими речовинами (гліцином, гентаміцину сульфатом) та 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном враховувались природа розчинника, температура, час нагрівання та концентрація реагенту.

Так, експериментальним шляхом було встановлено, що обрані лікарські речовини реагують з 1,0 – 3,0 % розчином 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону в ДМФА, доданий об'єм якого складає від 2,50 до 4,00 мл. Забарвлений продукт утворюється при нагріванні на водяній бані (100°C) протягом 15 хв. Отримані продукти реакцій стабільні: величина оптичної густини не змінюється протягом 30 хв.

В оптимальних умовах проведення реакцій між досліджуваними лікарськими речовинами та обраними реагентами (натрієвою сіллю 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти та 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном) були виміряні спектри поглинання продуктів реакцій, встановлені максимуми поглинання та розрахованні показники чутливості даних реакцій (табл. 1).

Таблиця 1

**Аналітичні показники чутливості реакцій
лікарська речовина – реагент**

Лікарська речовина	λ_{\max} , нм	ϵ	a	W_s	C_{\min} , мкг/мл
1	2	3	4	5	6
За реакцією з натрієвою сіллю 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти					
Амікацину сульфат	530	$3,51 \cdot 10^3$	0,00599	0,167	8,34
Глюкозаміну гідрохлорид	510	$1,07 \cdot 10^3$	0,00600	0,167	8,33
Канаміцину моносульфат	560	$4,50 \cdot 10^3$	0,00929	0,108	5,38
Стрептоміцину сульфат	560	$1,16 \cdot 10^4$	0,00795	0,125	6,28
Таурин	470	$2,56 \cdot 10^3$	0,0204	0,0488	2,44

1	2	3	4	5	6
β-Аланін	470	$2,94 \cdot 10^3$	0,0330	0,0303	1,51
γ-Аміномасляна кислота	470	$3,24 \cdot 10^3$	0,0314	0,0318	1,59
За реакцією з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном					
Гентаміцину сульфат	490	$4,77 \cdot 10^3$	0,00998	0,100	5,00
Гліцин	470	$1,12 \cdot 10^3$	0,0149	0,0669	3,35

Достатньо високі значення молярних коефіцієнтів поглинання та відносно низькі значення меж виявлення свідчать про високу чутливість реакцій досліджуваних лікарських речовин, що містять первинну аліфатичну аміногрупу, з натрієвою сіллю 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти та 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном.

Опираючись на літературні та експериментально отримані дані щодо реакційної спроможності похідних нафтохінону натрієва сіль 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти була запропонована в якості детектуючого реагенту в ТШХ для якісного визначення досліджуваних лікарських речовин.

Для ТШХ деяких аліфатичних амінокислот (гліцин, аміналон, таурин, β-аланін), аміноглікозидних антибіотиків та глюкозаміну проводили підбір систем розчинників згідно даних літератури та з урахуванням фізико-хімічних властивостей лікарських речовин. Встановлено, що для проявлення плям найбільш доцільно використовувати 1,0 % водний розчин натрієвої солі 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти. Межі виявлення лікарських речовин становлять $0,0750 - 4,84 \text{ мкг} \cdot 10^{-1}$.

Стехіометричні співвідношення компонентів реакції лікарська речовина – реагент були встановлені на прикладі взаємодії натрієвої солі 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти з таурином, β-аланіном, глюкозаміном та 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону з гліцином. З цією метою були використані найбільш поширені спектрофотометричні методи дослідження стехіометричних співвідношень між реагуючими компонентами: метод ізомолярних серій (метод неперервних змін) та метод молярних співвідношень (метод насичення). Отримані дані узгоджуються між собою (табл. 2).

Таблиця 2

**Співвідношення компонентів реакції
«лікарська речовина – реагент»**

Лікарська речовина – реагент	Метод визначення	
	метод неперервних змін	метод молярних співвідношень
Таурин – натрієва сіль 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти	1:1	1:1
β-Аланін – натрієва сіль 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти	1:1	1:1
Глюкозамін – натрієва сіль 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти	1:1	1:1
Гліцин – 2,3-дихлор-1,4-нафтохінон	1:1	1:1

З урахуванням стехіометричних співвідношень лікарська речовина – реагент та оптимальних умов проведення реакцій були синтезовані, виділені та ідентифіковані забарвлені продукти реакцій таурину, β -аланіну з натрієвою сіллю 1,2-нафтохінон-4-сульфо кислоти, гліцину з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном.

Для доведення будови продуктів реакції була використана хромато-мас-спектрометрія.

Дані хромато-мас-спектрометрії продуктів взаємодії сполуки **1** з таурином демонструють (рис. 1), що результат реакції – суміш продуктів. Зазначені продукти представляють собою моно- (**2**) (36,2 %), бі- (**3**) (4,90 %) та міжмолекулярні біс-похідні (**4**) (22,3 %), які утворились за реакціями нуклеофільного заміщення по декількох електрофільних центрах. Важливо, що за подібною схемою перебігає реакція взаємодії сполуки з β -аланіном.

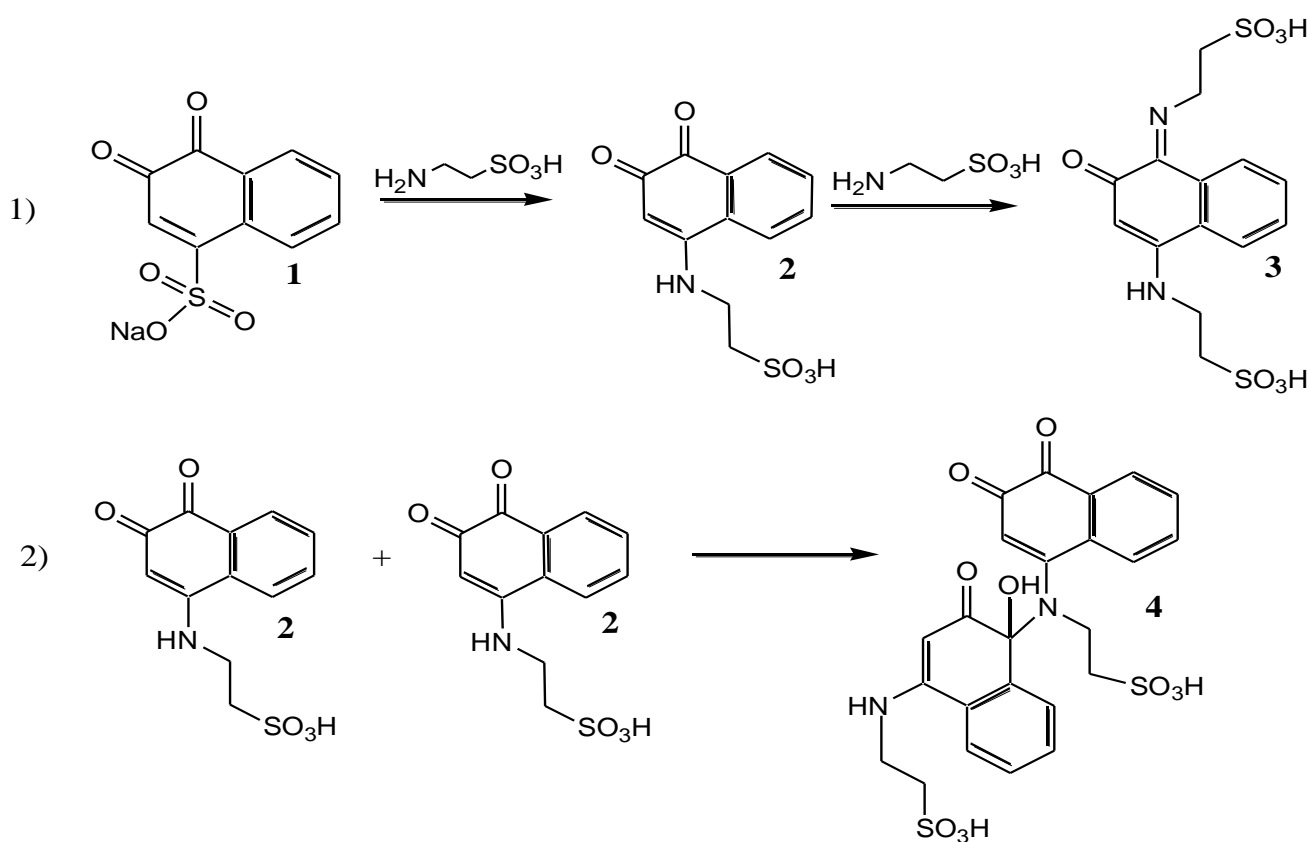


Рис. 1. Особливості перебігу реакції натрієвої солі 1,2-нафтохінон-4-сульфо кислоти (**1**) з таурином

Взаємодія між гліцином та 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном здійснюється шляхом нуклеофільного заміщення за наступною схемою (рис. 2):

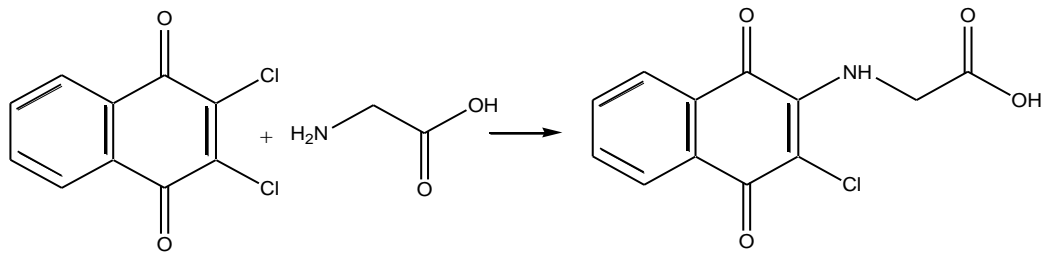


Рис. 2. Особливості перебігу реакції 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону з гліцином

Розробка методик кількісного визначення лікарських засобів за їх реакціями з натрієвою сіллю 1,2-нафтохінон-4-сульфо кислоти та 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном

Попередньо отримані дані щодо оптимальних умов перебігу реакцій між обраними лікарськими речовинами та реагентами були покладені в основу розробки спектрофотометричних методик кількісного визначення зазначених 9 лікарських речовин в 25 готових лікарських формах з урахування меж концентрацій, в яких спостерігається підпорядкування закону Бера (табл. 3).

Таблиця 3

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

Лікарська речовина	λ_{\max} , нм	Обраний інтервал концентрацій, мг/100 мл	$A_{1\text{см}}^{1\%}(\bar{x} \pm \Delta\bar{x})$
Амікацину сульфат	530	2,56–10,24	60±1
Гентаміцину сульфат	490	4,00–8,00	100±1
Гліцин	470	5,00–8,00	150±3
Глюкозаміну гідрохлорид	510	4,80–8,00	60±1
Канаміцину моносульфат	560	4,00–7,20	93±1
Стрептоміцину сульфат	560	2,00–8,00	80±1
Таурин	470	1,80–4,00	205±3
β-Аланін	470	1,60–3,60	330±3
γ-Аміномасляна кислота	470	2,80–5,20	310±3

Для отримання більш точних результатів аналізу та виключення систематичної похибки, спричиненої умовами, за яких проводиться дослід, було застосовано метод стандарту.

Загальна методика кількісного визначення обраних лікарських речовин на основі взаємодії з натрієвою сіллю 1,2-нафтохінон-4-сульфо кислоти полягає в наступному. Аліквоту досліджуваного розчину, концентрація якого входить до обраного інтервалу, вносять у мірну колбу ємністю 25,00 мл, додають водний розчин реагенту та розчин NaOH. В подальшому, одержану реакційну суміш

нагрівають на водяній бані, охолоджують. Паралельно проводять дослід з 1,00 мл розчину порівняння. Абсорбцію досліджуваного розчину та розчину порівняння вимірюють на фоні компенсаційного розчину, за зазначеної аналітичної довжини хвилі.

У випадку використання розчину 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону в якості реагенту, загальна методика полягає в наступному. Аліквоту аналізованої лікарської речовини вносять в мірну колбу ємністю 25,00 мл, обробляють розчином реагенту. Отриману реакційну суміш нагрівають на водяній бані, охолоджують. Паралельно проводять дослід з 1,00 мл розчину порівняння. Оптичну густину отриманих забарвлених розчинів вимірюють на фоні компенсаційного розчину в обраній області спектра.

Розробленим методикам притаманна значна економічність, доступність та простота у виконанні.

Валідація методик кількісного визначення лікарських речовин, що містять первинну аліфатичну аміногрупу

Основною умовою гарантування якості та надійності результатів, одержаних за розробленими методиками, є валідація. Валідність методик означає їх коректність та придатність для виконання запланованих завдань. Виходячи з цього, запропоновані методики кількісного визначення були перевірені згідно вимог ДФУ за основними валідаційними характеристиками, зокрема, специфічністю, лінійністю, прецизійністю, правильністю, діапазоном застосування та робастністю.

Специфічність розроблених методик кількісного визначення встановлювали шляхом приготування модельних сумішей допоміжних речовин та аналізували розчини «плацебо», якщо видавалось можливим отримати всі допоміжні речовини лікарської форми. В результаті встановлено, що допоміжні речовини досліджених препаратів майже не поглинають випромінювання в області спектра, в якій спостерігаються максимуми поглинання діючої речовини, і їх внесок у величину оптичної густини зразків складає менше 1%. Лікарські форми глюкозаміну – таблетки «Терафлекс» та «Хондромакс гербал»; гентаміцину – очні краплі «Декса-гентаміцин» та мазь «Кремген»; таурину – супозиторії «Генферон», гліцину – таблетки «Доппельгерц актив Гліцин + В-Вітаміни» відрізнялися складністю составу, тому приготувати для них модельні суміші та «плацебо» не вдалося можливим. Тому висновок щодо специфічності запропонованих методик було зроблено після визначення правильності даних методик шляхом використання методу добавок.

Валідація *лінійності* передбачає оцінку одержаної лінійної функції оптичної густини від концентрації шляхом виконання регресійного аналізу.

Лінійну залежність досліджували у межах діапазону застосування розроблених методик. Розчини з відомою концентрацією (не менше п'яти) отримували шляхом розведення стандартних розчинів та проводили визначення за розробленими методиками. За одержаними даними будували графіки залежності

оптичної густини від концентрації лікарського засобу. Розраховані параметри, що характеризують лінійність, а саме, коефіцієнт кореляції r (має бути більшим за загальний індекс кореляції R_c), залишкове стандартне відхилення по осі абсцис $S_{x,0}$ (%) (не повинно перевищувати $\Delta_{As}(\%)/t(95\%;n-2)$), точка перетину з віссю ординат a (повинна незначуще відрізнятись від 0, тобто $|a| \leq \Delta a$) та кутовий коефіцієнт b свідчать про лінійність методики у всьому діапазоні вибраних концентрацій (табл. 4).

Таблиця 4

Числові показники лінійної залежності

Лікарська речовина	b	a	$s_{x,0}(\%)$	$r \geq R_c$
Амікацину сульфат	0,0726	0,0012	0,1800	1,000
Гентаміцину сульфат	0,1156	0,0004	0,0270	1,000
Гліцин	0,1583	0,0004	0,1180	1,000
Глюкозаміну гідрохлорид	0,0383	0,0048	0,7750	0,9994
Канаміцину моносульфат	0,0914	-0,0004	0,0781	0,9999
Стрептоміцину сульфат	0,0880	0,0070	0,5310	0,9996
Таурин	0,1999	0,0003	0,0519	1,000
γ -Аміномасляна кислота	0,1978	0,0124	0,4420	0,9997
β -Аланін	0,3377	-0,0109	0,1700	1,000

Згідно до вимог ДФУ таку валідаційну характеристику як *правильність* розроблених методик кількісного визначення лікарських речовин у складі лікарських препаратів встановлювали методом модельних сумішей (табл. 5) та методом добавок (табл. 6). Загальною метою при визначенні правильності методик є виявлення можливих систематичних похибок, які виникають в результаті впливу на результати визначень допоміжних речовин, що входять до складу лікарського засобу.

Таблиця 5

Результати визначення правильності методом модельних сумішей

Модельні суміші	\bar{Z}	RSD	$\Delta_{\bar{z}}$	$ \bar{Z} - 100 $	$0,32 \cdot \Delta_{As}$
Порошок у пакетиках «Дона»: глюкозаміну 1,5 г/4,0 г	100,3	1,11	1,01	0,3	1,024
Розчин для ін'єкцій «Дона»: глюкозаміну 0,40 г/2 мл	99,86	1,42	1,09	0,14	1,024
«Кратал»: таурину 0,87 г	100,1	0,688	0,427	0,1	1,024

Результати визначення правильності методом добавок

Лікарський препарат	Взято, мг/100 мл	Добавка, мг/100 мл	Z*	$\bar{Z} \pm \Delta_{\bar{Z}}$	$ \bar{Z} - 100 $
1	2	3	4	5	6
«Аміцил»: амікацину сульфату 0,50 г	2,40	0,256	99,60	99,88±0,519	0,12
	2,40	0,384	99,93		
	2,40	0,512	100,1		
«Аміцил»: амікацину сульфату 1,0 г	2,40	0,256	100,0	99,96±0,039	0,04
	2,40	0,384	99,89		
	2,40	0,512	100,0		
«Стрептоміцин»: стрептоміцину сульфату 1,0 г	2,00	0,200	99,56	99,20±1,07	0,80
	2,00	0,300	98,63		
	2,00	0,400	100,0		
«Канаміцин»: канаміцину моносольфату 1,0 г	4,00	0,560	99,65	99,87±0,131	0,13
	4,00	1,68	99,96		
	4,00	2,80	100,0		
«Терафлекс»: глюкозаміну 0,50 г	4,80	0,640	99,96	99,93±0,395	0,07
	4,80	1,28	100,5		
	4,80	2,56	99,33		
«Аміналон-КВ»: γ-аміномасляної кислоти 0,25 г	2,80	0,280	99,72	99,96±0,235	0,04
	2,80	0,840	100,4		
	2,80	1,40	99,77		
«Аміналон»: γ-аміномасляної кислоти 0,25 г	2,80	0,280	99,66	99,78±0,305	0,22
	2,80	0,840	99,70		
	2,80	1,40	99,97		
Порошок у пакетиках «Дона»: глюкозаміну 1,5 г/4,0 г	4,80	0,640	100,4	100,3±0,688	0,3
	4,80	1,28	100,3		
	4,80	2,56	100,2		
«Артифлекс»: глюкозаміну 1,5 г/4,0 г	4,80	0,640	101,0	100,3±0,884	0,3
	4,80	1,28	98,72		
	4,80	2,56	101,1		
Розчин для ін'єкцій «Дона»: глюкозаміну 0,40 г/2 мл	4,80	0,640	99,90	99,86±0,880	0,14
	4,80	1,28	99,90		
	4,80	2,56	99,78		
«Лорікацин»: амікацину сульфату 0,50 г/2 мл	2,40	0,256	100,0	98,94±1,06	1,06
	2,40	0,384	99,66		
	2,40	0,512	97,19		
«Тауфон» 4 % (Фармак): таурину 40 мг/мл	1,80	0,580	100,0	99,78±0,305	0,22
	1,80	1,16	99,86		
	1,80	1,74	99,48		
«Тауфон» 4 % (ДЗ «ГНЦЛС»): таурину 40 мг/мл	1,80	0,580	100,1	100,1±0,178	0,1
	1,80	1,16	100,0		
	1,80	1,74	100,1		

1	2	3	4	5	6
«Генферон»: таурину 10 мг	1,80	0,580	99,46	99,82±0,190	0,18
	1,80	1,16	100,0		
	1,80	1,74	100,0		
«Аб'юфен»: β-аланіну 0,40 г	1,60	0,0520	100,0	100,8±0,375	0,8
	1,60	0,104	100,1		
	1,60	0,156	100,0		
«Кратал»: таурину 0,87 г	1,80	0,580	100,0	100,0±0,427	0,05
	1,80	1,16	100,1		
	1,80	1,74	100,0		
«Хондромакс»: глюкозаміну 0,50 г	4,80	0,640	99,66	99,83±0,639	0,17
	4,80	1,28	100,0		
	4,80	2,56	99,83		
«Доппельгерц актив»: гліцину 0,50 г	5,00	0,650	99,5	99,61±0,560	0,39
	5,00	1,30	100,0		
	5,00	2,60	99,33		
«Медихронал- Дарниця»: гліцину 7,0 г	5,00	0,650	100,0	99,68±0,972	0,32
	5,00	1,30	99,40		
	5,00	2,60	99,64		
Гентаміцину сульфат» (ПАТ Дарниця): гентаміцину сульфату 40 мг/мл	4,00	1,20	99,90	99,86±0,880	0,14
	4,00	1,80	99,78		
	4,00	2,40	99,90		
«Гентаміцину сульфат» (Корпорація ARTERIUM): гентаміцину сульфату 40 мг/мл	4,00	1,20	99,66	98,94±1,06	1,06
	4,00	1,80	100,0		
	4,00	2,40	97,19		
«Декса-гентаміцин»: гентаміцину сульфату 5,0 мг/мл	4,00	1,20	100,0	99,78±0,305	0,22
	4,00	1,80	99,85		
	4,00	2,40	99,48		
«Кремген»: гентаміцину сульфату 0,1 г/1,0 г	4,00	1,20	100,3	100,3±0,917	0,3
	4,00	1,80	100,1		
	4,00	2,40	100,3		
«Гліцин»: гліцину 0,10 г	5,00	0,650	100,5	99,78±0,223	0,22
	5,00	1,30	99,80		
	5,00	2,60	99,04		
«Гліцисед»: гліцину 0,10 г	5,00	0,650	101,0	100,8±1,06	0,8
	5,00	1,30	100,8		
	5,00	2,60	100,6		

Примітка. * Середнє для трьох визначень

Методики є правильними, коли відхилення середнього значення від 100% не перевищує свій довірчий інтервал Δ_z , тобто систематична похибка статистично не відрізняється від нуля. Якщо дане співвідношення не виконується, відповідно рекомендацій ДФУ використовується критерій практичної незначущості одержаної систематичної похибки $|\bar{Z} - 100|$ відносно максимально припустимої невизначеності аналізу Δ_{As} : $|\bar{Z} - 100| \leq 0,32 \cdot \Delta_{As}$.

Прецизійність методики визначається близькістю (або розкидом) результатів для серії вимірів, виконаних за даною методикою на різних пробах одного і того самого однорідного зрізка, та обумовлюється наявністю випадкових похибок. Згідно ДФУ, прецизійність методики розглядається на трьох рівнях: внутрішньолабораторна прецизійність, збіжність та відтворюваність. В даному дослідженні було проведено визначення прецизійності запропонованих методик на рівні збіжності. Для цього в кожному випадку проводили дев'ять паралельних визначень (три наважки, три повтори), а за результатами розраховували метрологічні характеристики. Згідно даних, наведених у табл. 7. встановлено, що у всіх випадках однобічний довірчий інтервал (Δ_x) не перевищує максимально допустиму невизначеність аналізу ($\Delta_{As} \%$), тому методики є точними на рівні збіжності.

Таблиця 7

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

Лікарський препарат	Метрологічні характеристики					
	\bar{X}	S	RSD	$\Delta_{x,r}$	$\Delta_{x,r}^-$	$\Delta_{As} \%$
1	2	3	4	5	6	7
«Аміцил»: амікацину сульфату 0,50 г	0,501	$3,95 \cdot 10^{-3}$	0,788	1,46	0,489	3,20
«Аміцил»: амікацину сульфату 1,0 г	0,998	$1,06 \cdot 10^{-2}$	1,06	1,98	0,658	3,20
«Стрептоміцин»: стрептоміцину сульфату 1,0 г	1,03	$1,09 \cdot 10^{-3}$	1,06	1,97	0,658	3,20
«Канаміцин»: канаміцину моносульфату 1,0 г	1,04	$3,94 \cdot 10^{-3}$	0,378	0,705	0,234	3,20
«Терафлекс»: глюкозаміну 0,50 г	0,499	$6,97 \cdot 10^{-3}$	1,39	2,59	0,866	3,20
«Аміналон-КВ»: γ-аміномасляної кислоти 0,25 г	0,249	$1,20 \cdot 10^{-3}$	0,483	0,898	0,299	3,20
Порошок у пакетиках «Дона»: глюкозаміну 1,5 г/4,0 г	1,50	$7,25 \cdot 10^{-3}$	0,483	0,903	0,301	1,60
«Артифлекс»: глюкозаміну 1,5 г/4,0 г	1,49	$9,39 \cdot 10^{-3}$	0,627	1,167	0,389	1,60
Розчин для ін'єкцій «Дона»: глюкозаміну 0,40 г/2 мл	0,398	$2,66 \cdot 10^{-3}$	0,672	1,24	0,416	1,60
«Лорікацин»: амікацину сульфату 0,50 г/2 мл	0,505	$8,32 \cdot 10^{-3}$	1,64	3,06	1,02	1,60

1	2	3	4	5	6	7
«Тауфон» 4 % (Фармак): таурину 40 мг/мл	0,0399	$2,88 \cdot 10^{-4}$	0,722	1,34	0,440	1,60
«Тауфон» 4 % (ДЗ «ГНЦЛС»): таурину 40 мг/мл	0,0405	$6,57 \cdot 10^{-4}$	1,62	3,01	1,00	1,60
«Генферон»: таурину 10 мг	0,00101	$9,28 \cdot 10^{-6}$	0,918	1,70	0,569	3,20
«Аб'юфен»: β-аланіну 0,40 г	0,402	$3,24 \cdot 10^{-3}$	0,806	1,49	0,499	3,20
«Кратал»: таурину 0,87 г	0,867	$4,72 \cdot 10^{-3}$	0,544	1,01	0,330	1,60
«Хондромакс»: глюкозаміну 0,50 г	0,496	$2,59 \cdot 10^{-3}$	0,522	0,971	0,324	3,20
«Аміналон»: γ-аміномасляної кислоти 0,25 г	0,250	$2,82 \cdot 10^{-3}$	1,12	2,09	0,699	3,20
«Доппельгерц актив»: гліцину 0,50 г	0,503	$4,60 \cdot 10^{-3}$	0,914	1,70	0,567	3,20
«Медихронал-Дарниця»: гліцину 7,0 г	7,01	$3,37 \cdot 10^{-2}$	0,481	0,895	0,298	1,60
«Гентаміцину сульфат» (ПАТ Дарниця): гентаміцину сульфату 40 мг/мл	0,0401	$2,61 \cdot 10^{-4}$	0,650	1,21	0,404	1,60
«Гентаміцину сульфат» (Корпорація ARTERIUM): гентаміцину сульфату 40 мг/мл	0,0401	$3,01 \cdot 10^{-4}$	0,770	1,43	0,477	1,60
«Декса-гентаміцин»: гентаміцину сульфату 5,0 мг/мл	0,00500	$9,60 \cdot 10^{-4}$	0,958	1,78	0,736	1,60
«Кремген»: гентаміцину сульфату 0,1 г/1,0 г	0,100	$1,08 \cdot 10^{-3}$	0,711	1,32	0,547	3,20
«Гліцин»: гліцину 0,10 г	0,100	$1,68 \cdot 10^{-3}$	1,68	3,12	1,04	3,20
«Гліцисед»: гліцину 0,10 г	0,100	$1,22 \cdot 10^{-3}$	1,22	2,28	0,759	3,20

Діапазоном застосування аналітичної методики є інтервал між мінімальною та максимальною концентраціями досліджуваної речовини, для якого показано, що методика має потрібну лінійність, правильність та прецизійність. За результатами проведених досліджень, діапазони застосування для розроблених методик знаходяться у межах робочих інтервалів для методик кількісного визначення згідно вимог ДФУ (80 – 120 %)

Оцінку робастності проводили на стадії розробки методик шляхом визначення факторів, що впливають на величину оптичної густини. Вплив цих факторів було враховано при виборі оптимальних умов визначення.

ВИСНОВКИ

Вперше науково обґрунтована та експериментально доведена можливість застосування в практиці фармацевтичного аналізу натрієвої солі 1,2-нафтохінон-4-сульфо кислоти та 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону як високочутливих аналітичних кольорореагентів для глюкозаміну, аміноглікозидних антибіотиків та деяких амінокислот, встановлена направленість перебігу реакцій та будова продуктів реакцій, на підставі чого розроблені доступні, чутливі, валідні методики визначення досліджуваних лікарських речовин в промислових лікарських формах.

1. На основі аналізу літературних джерел обґрунтована доцільність розробки нових методик кількісного визначення речовин, що містять первинну аліфатичну аміногрупу, із застосуванням похідних нафтохінону в якості кольорореагентів.

2. Досліджені оптимальні умови фотометричних реакцій натрієвої солі 1,2-нафтохінон-4-сульфо кислоти та 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону з 9 аналізованими лікарськими речовинами, що містять первинну аліфатичну аміногрупу. Експериментально встановлено, що обрані лікарські речовини реагують з розчинами натрієвої солі 1,2-нафтохінон-4-сульфо кислоти у середовищі води очищеної за присутності водного розчину NaOH, а з розчином 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону у середовищі вода–ДМФА при нагріванні на водяній бані (60–100°C).

3. За результатами розрахунків аналітичних показників чутливості досліджуваних реакцій встановлено, що межі виявлення становлять 1,51–3,35 мкг/мл для аліфатичних амінокислот та 5,00–8,34 мкг/мл для аміноглікозидних антибіотиків та глюкозаміну.

4. Доведена можливість застосування натрієвої солі 1,2-нафтохінон-4-сульфо кислоти як проявного реагенту в тонкошаровій хроматографії для обраних лікарських речовин, що містять первинну аліфатичну аміногрупу. Експериментально встановлені умови детектування для 8 лікарських речовин, в яких межі виявлення становлять 0,0750–0,781 мкг.

5. Визначено коефіцієнти стехіометричних співвідношень «реагент – лікарська речовина», які складають 1:1, виділено та встановлено будову продуктів взаємодії (на прикладі таурин, β-аланін – натрієва сіль 1,2-нафтохінон-4-сульфо кислоти та гліцин – 2,3-дихлор-1,4-нафтохінон) та запропоновано хімізми реакцій.

6. Розроблено і валідовано методики кількісного визначення 9 лікарських речовин у складі 25 лікарських препаратів. Методики не потребують особливих умов, є експресними та простими у виконанні.

7. Доведено, що розроблені методики кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин за такими характеристиками, як специфічність, лінійність, правильність, діапазон застосування, прецизійність та робасність є валідними.

8. Обґрунтовано можливість застосовування запропонованих методик для визначення якості лікарських засобів, зокрема в роботі Державних служб з лікарських засобів та ВТК хіміко-фармацевтичних заводів.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Портна К. П. Спектрофотометричне визначення глюкозаміну в препараті «Дона» / К. П. Портна, С. О. Васюк // Фармацевтичний часопис. – 2013. – № 1 (25). – С. 137-140. (Дисертант провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину дослідження, підготував статтю до друку).

2. Портна К. П. Кількісне визначення глюкозаміну спектрофотометричним методом / К. П. Портна, С. О. Васюк // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки і практики. – 2013. – № 2 (12). – С. 117-121. (Дисертант провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину дослідження, підготував статтю до друку).

3. Portna K. P. Spectrophotometric determination β -alanine in reaction with 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid sodium salt / K. P. Portna, S. O. Vasyuk // Zaporozhye medical journal. – 2015. – № 1 (88). – P. 95-98. (Дисертант провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину дослідження, підготував статтю до друку).

4. Портна К. П. Кількісне визначення гліцину в лікарських формах за реакцією з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном / Портна К. П., Васюк С. О. // Фармацевтичний журнал. – 2015. – № 3. – С. 22-28. (Дисертант провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину дослідження, підготував статтю до друку).

5. Portna K. P. Aminalol quantitative determination in drug dosage forms by spectrophotometric method / K. P. Portna, S. O. Vasyuk // The pharma innovation journal. – 2014. – № 3 (3). – P. 13-17. (Дисертант провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину дослідження, підготував статтю до друку).

6. Портная Е. П. Применение натриевой соли 1,2-нафтохинон-4-сульфокислоты для спектрофотометрического определения таурина в лекарственных формах / Е. П. Портная, С. А. Васюк // Химико-фармацевтический журнал. – 2014. – Т. 48, № 8. – С. 52-56. (Дисертант провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину дослідження, підготував статтю до друку).

7. Portna K. P. Spectrophotometric determination amikacin in reaction with 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid sodium salt / K. P. Portna, S. O. Vasyuk, A. S. Korzhova // International journal of current research in chemistry and pharmaceutical sciences. – 2015. – № 2 (4). – P. 15-18. (Дисертант провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину дослідження, підготував статтю до друку).

8. Пат. на корисну модель 78204 Україна, МПК G01N 21/78. Спектрофотометричний спосіб кількісного визначення глюкозаміну / Портна К. П., Васюк С. О. ; заявник та патентовласник Запорізь. держ. мед. ун-т та автори. – № u201210826 ; заявл. 17.09.12 ; опубл. 11.03.13, Бюл. № 5. – 4 с. (Дисертант провів експериментальне дослідження, приймав участь в узагальненні результатів та оформив патент).

9. Пат. на корисну модель 94770 Україна, МПК G01N 21/78. Спосіб спектрофотометричного визначення амікацину / Портна К. П., Васюк С. О. ; заявник та патентовласник Запорізь. держ. мед. ун-т та автори. – № u201407521 ; заявл. 04.07.14 ; опубл. 25.11.14, Бюл. № 22. – 4 с. (Дисертант провів експериментальне дослідження, приймав участь в узагальненні результатів та оформив патент).

10. Портна К. П. Спектрофотометричне визначення гентаміцину за реакцією з дихлоном / К. П. Портна, Ю. В. Монайкіна, О. О. Тарханова // Матеріали 71 Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю, присвячена Дню науки, 12-13 трав. 2011 року. – Запоріжжя, 2011. – С. 179. (Дисертант провів експериментальну частину дослідження, підготував та оформив тези).

11. Портна К. П. Спектрофотометричне визначення глюкозаміну / К. П. Портна // Матеріали 72 Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю, присвячена Дню науки «Медицина та фармація ХХІ століття – крок у майбутнє», 19-20 квіт. 2012 року. – Запоріжжя, 2012. – С. 213-214.

12. Портна К. П. Визначення деяких валідаційних характеристик для спектрофотометричної методики кількісного визначення глюкозаміну / К. П. Портна // Матеріали I регіональної наук.-практ. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених «Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих наук», 15 груд. 2012 року. – Запоріжжя, 2012. – С. 155-156.

13. Портна К. П. Спектрофотометричне визначення глюкозаміну у капсулах / Портна К. П. // Матеріали I міжнар. інтерн.-конф. «Современные достижения медицинской и фармацевтической науки», 23-25 жовт. 2012 року. – Запоріжжя, 2012. – С. 124.

14. Портна К. П. Застосування натрієвої солі 1,2-нафтохінон-4-сульфо кислоти для спектрофотометричного визначення аміналону / Портна К. П. // Матеріали XII міжнар. мед. конгресу студентів і молодих вчених, 22-24 квіт. 2013 року. – Т., 2013. – С. 321.

15. Портна К. П. Розробка спектрофотометричної методики кількісного визначення амікацину / Портна К. П., Васюк С. О. // Український медичний альманах. – Т. 16, № 1. – 2013. – С. 166-167. (Дисертант провів експериментальну частину дослідження, підготував та оформив тези).

16. Портна К. П. Розробка та валідація спектрофотометричних методик кількісного визначення речовин з первинною та вторинною аміногрупами / К. П. Портна, Ю. М. Жук // Матеріали X міжнар. студ. наук. конф. «Перший крок в науку – 2013», 11-12 квіт. 2013 року. – Вінниця, 2013. – С. 292. (Дисертант приймав участь у проведенні експериментальної частини дослідження, підготовці та оформленні тез).

17. Портна К. П. Розробка методики кількісного визначення таурину / Портна К. П. // Матеріали 73 Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю, присвячена Дню науки «Медицина та фармація ХХІ століття – крок у майбутнє», 16-17 трав. 2013 року. – Запоріжжя, 2013. – С. 231.

18. Портна К. П. Спектрофотометричне визначення таурину в очних краплях / Портна К. П., Васюк С. О. // Матеріали 5-ї наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів», 22-24 квіт. 2013 року. – Т., 2013. – С. 191-193. (Дисертант провів експериментальну частину дослідження, підготував та оформив тези).

19. Portna K. P. Development and validation of spectrophotometric methods of substances quantitative determination with primary amino group / Portna K. P., Vasyuk S. O. // 3 rd International conference and Workshop « Plant – the source of research material», 16-18 жовт. 2013 року. – Lublin, 2013. – С. 68.

20. Портна К. П. Спектрофотометричне визначення амікацину в препараті «Аміцил» / Портна К. П., Васюк С. О. // Матеріали 67 міжнар. наук.-практ. конгресу студентів та молодих вчених «Актуальні проблеми сучасної медицини», 23-25 жовт. 2013 року. – К., 2013. – С. 325-326. (Дисертант провів експериментальну частину дослідження, підготував та оформив тези).

21. Портна К. П. Застосування натрієвої солі 1,2-нафтохінон-4-сульфоїкислоти для спектрофотометричного визначення таурину / К. П. Портна, С. О. Васюк // Матеріали наук.-практ. конф. «Сучасні аспекти медицини і фармації півдня України», 6-7 груд. 2013 року. – О., 2013. – С. 93-94. (Дисертант провів експериментальну частину дослідження, підготував та оформив тези).

22. Портна К. П. Спектрофотометричне визначення гліцину / Портна К. П. // Матеріали 2 регіон. наук.-практ. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених «Актуальні проблеми та перспективи розвитку медичних, фармацевтичних та природничих наук – 2013», 21 груд. 2013 року. – Запоріжжя, 2013. – С. 26. (Дисертант провів експериментальну частину дослідження, підготував та оформив тези).

23. Розробка та валідація спектрофотометричних методик кількісного визначення речовин в лікарських формах на основі взаємодії з сульфофталеїновими барвниками та похідними хінону / Васюк С. О., Загородній С. Л., Портна К. П., Жук Ю. М. // Матеріали Укр. наук.-практ. конф., присвяченої 100-річчю з дня народження доктора хімічних наук, професора П. О. Петюніна», 24-25 квіт. 2014 року. – Х., 2014. – С. 88. (Дисертант приймав участь у проведенні експериментальної частини дослідження, підготував та оформив тези).

24. Портна К. П. Застосування 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону для спектрофотометричного визначення гентаміцину / Портна К. П. // Тези доповідей Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2014», 15-16 трав. 2014 року. – Запоріжжя, 2014. – С. 186. (Дисертант провів експериментальну частину дослідження, підготував та оформив тези).

25. Портна К. П. Розробка спектрофотометричної методики кількісного визначення гліцину в препараті «Медихронал-Дарниця» / К. П. Портна // Матеріали III регіональної наук.-практ. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених «Актуальні проблеми та перспективи розвитку медичних,

фармацевтичних та природничих наук – 2014», 29 листоп. 2014 року. – Запоріжжя, 2014. – С. 199-200.

26. Розробка та валідація методики кількісного визначення амікацину в розчині для ін'єкцій / Васюк С. О., Портна К. П., Мяснікова Г. Г., Вьюник Ю. А. // Матеріали міжнар. наук.-практ. інтерн.-конф. «Аналітична хімія в фармації», 19-20 квіт. 2015 року. – Х., 2015. – С. 23-24. (Дисертант приймав участь у проведенні експериментальної частини дослідження, підготовці та оформленні тез).

27. Вьюник Ю. А. Метод кількісного визначення гентаміцин сульфату в фармацевтичних препаратах / Вьюник Ю. А., Мяснікова Г. Г., Портна К. П. // Тези доповідей Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю, присвячена Дню науки «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2015», 14-15 квіт. 2015 року. – Запоріжжя, 2015. – С. 147-148. (Дисертант приймав участь у проведенні експериментальної частини дослідження, підготовці та оформленні тез).

28. Портна К. П. Розробка методики кількісного визначення β -аланіну в таблетках // Портна К. П., Васюк С. О. // Збірник матеріалів міжнар. наук.-практ. конф. «Медична наука та практика на сучасному історичному етапі», 8 трав. 2015 року. – К., 2015. – С. 119. (Дисертант провів експериментальну частину дослідження, підготував та оформив тези).

29. Портная Е. П. Разработка спектрофотометрических методик количественного определения лекарственных веществ в фармацевтических препаратах на основе реакций с сульфоталеиновыми красителями и производными хинона / Портная Е. П., Загородний С. Л., Васюк С. А. // Медицинский журнал Западного Казахстана. – № 1 (45). – 2015. – С. 25. (Дисертант приймав участь у проведенні експериментальної частини дослідження, підготовці та оформленні тез).

30. Васюк С. О. Спектрофотометричне визначення гліцину в лікарських формах / Васюк С. О., Портна К. П. // Матеріали XXXII Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів», 21 трав. 2015 року. – Х., 2015. – С. 24. (Дисертант провів експериментальну частину дослідження, підготував та оформив тези).

31. Портна К. П. Розробка спектрофотометричної методики кількісного визначення гентаміцину сульфату в препараті «Кремген» / Портна К. П., Мирошніченко Ю. О., Васюк С. О. // Матеріали підсумкової наук.-практ. конф. «Здобутки клінічної та експериментальної медицини», 17 черв. 2015 року. – Т., 2015. – С. 215-216. (Дисертант приймав участь у проведенні експериментальної частини дослідження, підготовці та оформленні тез).

32. Портна К. П. Спектрофотометричний спосіб кількісного визначення глюкозаміну / Портна К. П., Васюк С. О. // Реєстр галузевих нововведень МОЗ України (Реєстр. № 171/1/14). – К., 2014. – С. 14. (Дисертант провів експериментальну частину дослідження, підготував та оформив галузеве нововведення).

АНОТАЦІЯ

Портна К. П. Розробка спектрофотометричних методик кількісного визначення лікарських речовин, що містять первинну аліфатичну аміногрупу. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія. Запорізький державний медичний університет МОЗ України, Запоріжжя, 2015.

Дисертація присвячена розробці чутливих, простих у виконанні та валідних спектрофотометричних методик визначення лікарських речовин, що містять первинну аліфатичну аміногрупу, у лікарських формах.

Вивчено оптимальні умови фотометричних реакцій натрієвої солі 1,2-нафтохінон-4-сульфокислоти та 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону з 9 досліджуваними лікарськими речовинами, що містять первинну аліфатичну аміногрупу та розраховані аналітичні показники чутливості.

Доведена можливість застосування натрієвої солі 1,2-нафтохінон-4-сульфокислоти як проявного реагенту в тонкошаровій хроматографії для обраних лікарських речовин, що містять первинну аліфатичну аміногрупу.

Визначені коефіцієнти стехіометричних співвідношень «реагент – лікарська речовина», виділені продукти взаємодії (на прикладі таурин, β аланін – натрієва сіль 1,2-нафтохінон-4-сульфокислоти та гліцин – 2,3 дихлор-1,4-нафтохінон) та запропоновані хімізми реакцій.

Розроблено експресні та прості у виконанні методики кількісного визначення 9 лікарських речовин у складі 25 комерційних препаратів.

Доведено, що розроблені методики кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин є валідними відповідно до вимог ДФУ.

Ключові слова: аналіз, спектрофотометрія, лікарські речовини, первинна аліфатична аміногрупа, валідація.

АННОТАЦИЯ

Портная Е. П. Разработка спектрофотометрических методик количественного определения лекарственных веществ, которые содержат первичную алифатическую аминогруппу. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия. Запорожский государственный медицинский университет МЗ Украины, Запорожье, 2015.

Диссертация посвящена разработке чувствительных, простых в исполнении и валидированных методик определения лекарственных веществ, которые содержат первичную алифатическую аминогруппу, в лекарственных формах.

Изучены оптимальные условия фотометрических реакций натриевой соли 1,2-нафтохинон-4-сульфокислоты и 2,3-дихлор-1,4-нафтохинона с 9 изучаемыми лекарственными веществами, которые содержат первичную алифатическую

аминогруппу. Согласно максимальным значениям абсорбции анализируемых растворов установлено, что исследуемые лекарственные вещества взаимодействуют с раствором натриевой соли 1,2-нафтохинон-4-сульфоокислоты в водной среде, а с раствором 2,3-дихлор-1,4-нафтохинона в среде вода – ДМФА. Доказано необходимость создания щелочного рН среды для реакций натриевой соли 1,2-нафтохинон-4-сульфоокислоты с лекарственными веществами, с помощью водного раствора NaOH, и последующего нагревания реакционной смеси на водяной бане (60–100°C) на протяжении 3–15 мин. Установлена стабильность полученных продуктов реакций во времени.

Рассчитаны аналитические показатели чувствительности. Реакции характеризуются достаточно высокой чувствительностью – пределы обнаружения составляют 1,51–3,35 мкг/мл для алифатических аминокислот, 5,00–8,34 мкг/мл для аминогликозидных антибиотиков и глюкозамина.

Доказана возможность применения натриевой соли 1,2-нафтохинон-4-сульфоокислоты в качестве реагента-проявителя в тонкослойной хроматографии для выбранных лекарственных веществ, которые содержат первичную алифатическую аминогруппу. Рассчитанные открываемые минимумы лекарственных веществ (мкг·10⁻¹) составляют от 0,750 (глицин) до 7,81 (амикацин сульфат), что свидетельствует о достаточно высокой чувствительности реагента-проявителя.

При помощи спектрофотометрических методов определения состава (непрерывных изменений, изомолярных серий) установлены коэффициенты стехиометрических соотношений «лекарственное вещество – реагент», которые составили 1:1 для продуктов взаимодействия натриевой соли 1,2-нафтохинон-4-сульфоокислоты с таурином, β-аланином, 2,3-дихлор-1,4-нафтохинона с глицином.

Синтезированы, выделены и идентифицированы методом хромато-масс-спектрологии продукты реакций таурина, β-аланина с натриевой солью 1,2-нафтохинон-4-сульфоокислоты, глицина с 2,3-дихлор-1,4-нафтохиноном.

Установлены величины удельных показателей поглощения и найдены пределы концентраций, в которых наблюдается подчинение основному закону светопоглощения для 9 лекарственных веществ, которые содержат первичную алифатическую аминогруппу на основе реакций с натриевой солью 1,2-нафтохинон-4-сульфоокислоты и 2,3-дихлор-1,4-нафтохиноном. Предложены общие методики количественного определения лекарственных веществ с использованием натриевой соли 1,2-нафтохинон-4-сульфоокислоты и 2,3-дихлор-1,4-нафтохинона. Впервые для количественного определения аминогликозидных антибиотиков, глюкозамина и некоторых алифатических аминокислот в качестве реагентов были использованы производные нафтохинона, а именно натриевая соль 1,2-нафтохинон-4-сульфоокислоты и 2,3-дихлор-1,4-нафтохинон.

На основе полученных результатов разработаны спектрофотометрические методики количественного определения 9 лекарственных веществ в составе 25 лекарственных препаратов.

Установлено, что разработанные методики количественного определения характеризуются достаточной специфичностью относительно вспомогательных

веществ, которые не имеют первичной алифатической аминогруппы и пригодны для количественного определения исследуемых лекарственных веществ в составе лекарственных препаратов. Доказана линейность разработанных методик в выбранных рабочих диапазонах концентраций на основе расчетов показателей линейной зависимости, таких как коэффициента корреляции, свободного члена линейной регрессии и углового коэффициента. Методами добавок и модельных смесей подтверждена правильность разработанных методик. Доказано на уровне сходимости, что разработанные методики являются прецизионными, так как односторонний доверительный интервал не превышает максимально допустимую неопределенность анализа.

Доказано, что разработанные методики количественного определения исследуемых лекарственных веществ согласно таким характеристикам как специфичность, линейность, правильность, диапазон применения, прецизионность и робастность являются валидными.

Обоснована возможность применения предлагаемых методик для определения качества лекарственных средств, в частности для работы Государственных служб по лекарственным средствам и ОТК химико-фармацевтических заводов.

Ключевые слова: анализ, спектрофотометрия, первичная алифатическая аминогруппа, лекарственные вещества, валидация.

ANNOTATION

Portna K. P. Spectrophotometric method development for the quantitative determination of drugs containing the primary aliphatic amino group. – A manuscript.

Thesis for a candidate's degree in pharmaceutical chemistry on the speciality 15.00.02 – pharmaceutical chemistry and pharmacognosy. – Zaporizhzhia State Medical University, Ministry of Public Health of Ukraine, Zaporizhzhia, 2015.

This thesis is devoted to developing sensitive, easily implemented and valid spectrophotometric methods for the determination of drugs containing the primary aliphatic amino group in dosage forms.

Optimal conditions for the photometric reaction of the sodium salt 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid and 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone 9 as investigational medicinal substances containing the primary aliphatic amino group were studied with the analytical sensitivity performance.

In addition, the possibility of the use of the sodium salt of 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid as reagent in thin layer chromatography for selected drugs, containing primary aliphatic amino group was also studied.

Defined stoichiometric ratio relations «reagent – drug substance» for isolated reaction products (for example, taurine, β alanine – sodium salt of 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid and glycine – 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone) and the likely proposed chemical reactions.

The methods of quantitative drug determination for 9 out of 25 commercial agents are developed.

Proved developed methods for quantitative determination of investigational medicinal substances are valid according to GFU requirements.

Keywords: analysis, spectrophotometry, drugs, primary aliphatic amino group, validation.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- ДФУ – Державна фармакопея України;
ДМФА – диметилформамід;
ТШХ – тонкошарова хроматографія.

Підписано до друку 23.11.2015. Гарнітура Times New Roman
Папір друкарський. Формат 60×90 1/16. Умовн. друк. арк. 1,0.
Наклад – 100 прим. Замовлення № 6632.
Надруковано з оригінал-макету в типографії
Запорізького державного медичного університету
69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського 26