

Міністерство охорони здоров'я України
Запорізький державний медичний університет

ЗАГОРОДНІЙ СВЯТОСЛАВ ЛЕОНІДОВИЧ



УДК 543.544+543.422.3]:615.214.074:543.632.56

ЗАСТОСУВАННЯ ХРОМАТОГРАФІЧНИХ ТА СПЕКТРАЛЬНИХ
МЕТОДІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ ПСИХОТРОПНИХ РЕЧОВИН

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, Національний фармацевтичний університет, професор кафедри фармацевтичної хімії;

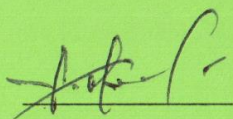
доктор фармацевтичних наук, професор Ветютнева Наталія Олександрівна, Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика, завідувач кафедри контролю якості і стандартизації лікарських засобів.

Захист відбудеться «27» грудня 2015 р. о 12⁰⁰ 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.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради



Парченко В. В.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Останнім часом стрімко зростає асортимент лікарських препаратів з груп антигістамінних та снодійних засобів, що мають вплив на центральну нервову систему. У першому випадку це обумовлено тенденцією до підвищення захворюваності людей на алергії різного типу, спричинене забрудненням навколишнього середовища речовинами техногенного походження, особливо у великих промислових містах. У другому випадку необхідність корекції психічної активності пацієнтів виникає через хронічні стресові стани, викликані надмірним перевантаженням людської психіки сучасними професійними видами діяльності. Тому у цих фармакологічних групах активно винаходяться нові діючі речовини, розробляються лікарські форми, збільшується асортимент препаратів-генериків. Вплив лікарських препаратів на центральну нервову систему призводить до виникнення та поширення випадків їх немедичного використання для досягнення психотропного ефекту, потенціювання дії інших психоактивних речовин, а також суїциду. У цих умовах актуальною залишається проблема вдосконалення існуючих та розробки нових методик кількісного визначення діючих речовин у лікарських препаратах для застосування у лабораторіях відділів технічного контролю фармацевтичних виробництв, регіональних лабораторіях контролю якості ліків та хімічних криміналістичних лабораторіях.

На сьогодні в світі провідну роль в аналізі лікарських засобів відіграють фізико-хімічні методи. Серед спектральних методів вигідно виділяється абсорбційна спектрофотометрія у видимій області спектра з використанням фотометричних реагентів. У зв'язку з цим, постає питання розширення можливостей цього методу через використання нових аналітичних реагентів. У цьому питанні перспективними є сульфоталеїнові барвники, які давно відомі хімічному аналізу як індикатори, але крім цього здатні утворювати інтенсивно забарвлені продукти з лікарськими речовинами різних хімічних та фармакологічних груп. Це дає можливість використання цих речовин для розробки нових спектрофотометричних методик аналізу лікарських засобів.

Серед хроматографічних методів одними з найпоширеніших є обернено-фазова високоефективна рідинна хроматографія завдяки можливості швидкого розділення компонентів, селективності та широких можливостей до автоматизації аналізу. Хоча вже відомо досить багато ВЕРХ-методик аналізу лікарських речовин, досі актуальним залишається питання їх валідації за вимогами Державної фармакопеї України.

Таким чином, розробка нових та вдосконалення існуючих спектрофотометричних та хроматографічних методик кількісного визначення діючих речовин у складі лікарських препаратів 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 теми «Застосування фізико-хімічних методів в аналізі лікарських речовин, похідних амінів, азолу та інших» (№ держреєстрації 0111U005857). Дисертантом особисто розроблені хроматографічні та спектрофотометричні методики кількісного визначення психотропних та антигістамінних лікарських речовин, похідних амінів, піридину, піримідину, піразину, піперидину та індолу.

Мета і задачі дослідження. Метою дослідження була розробка чутливих, швидких та простих у виконанні валідованих хроматографічних та спектрофотометричних методик визначення лікарських речовин, якими зловживають для досягнення психотропного ефекту, потенціювання дії інших психоактивних речовин, а також суїциду. Для досягнення поставленої мети вирішувались наступні задачі:

✓ провести огляд літературних даних щодо застосування сульфоталеїнових барвників у фармацевтичному аналізі, та існуючих методів аналізу лікарських речовин, якими зловживають для досягнення психотропного ефекту, потенціювання дії інших психоактивних речовин, а також суїциду;

✓ встановити оптимальні умови кількісного утворення продуктів реакцій сульфоталеїнових барвників з лікарськими речовинами, що знаходять застосування поза медичною практикою, і розрахувати аналітичні показники чутливості реакцій;

✓ встановити коефіцієнти стехіометричних співвідношень «лікарська речовина – реагент», виділити та ідентифікувати продукти реакцій, встановити їх хімічну будову;

✓ встановити оптимальні умови високоефективного рідинного хроматографування лікарських речовин, що знаходять застосування поза медичною практикою, і розрахувати показники придатності хроматографічної системи;

✓ розробити методики кількісного визначення зазначених лікарських речовин у складі лікарських препаратів;

✓ провести валідацію розроблених спектрофотометричних та хромаграфічних методик з метою доведення їх коректності та придатності для виконання запланованих задач.

Об'єкт дослідження. Розробка методик спектрофотометричного та хроматографічного визначення лікарських речовин, якими зловживають для досягнення психотропного ефекту, потенціювання дії інших психоактивних речовин, а також суїциду.

Предмет дослідження. Кількісний спектрофотометричний аналіз у видимій області спектра, обернено-фазовий високоефективний рідинний хроматографічний аналіз, лікарські речовини.

Методи дослідження. Для розробки нових спектрофотометричних методик кількісного аналізу досліджуваних лікарських речовин застосовували спектрофотометрію у видимій області спектра. Спектри реєстрували за допомогою спектрофотометра SPECORD 200, обробку проводили з використанням програмного пакету WinASPECT 2.2.1.0. Для вивчення хроматографічних методик

кількісного аналізу досліджуваних лікарських речовин застосовували високоефективну рідинну хроматографію з УФ-детектором. Хроматографування проводили за допомогою рідинного хроматографа Thermo Spectra System P2000/UV2000, реєстрацію та обробку хроматограм проводили за допомогою програмного пакету МультиХром. ^1H ЯМР спектри реагентів, досліджуваних речовин та продуктів реакцій записували на спектрометрах VarianMercury 400(400 МГц). ІЧ-спектри ($4000\text{-}400\text{ см}^{-1}$) знімали на модулі ALPHA-T (KBr) спектрометра Bruker ALPHA FT-IR. Хромато-мас-спектри знімались на високоефективному рідинному хроматографі Agilent 1100 Series з діодноматричним та мас-селективним детектором Agilent LC/MSD SL. Вимірювання рН розчинів проводилось за допомогою іоніміру універсального ЭВ-74. Встановлення температури плавлення проводилось на приладі Stuart SMP30 Melting Point Apparatus. Стехіометричні співвідношення реагуючих речовин встановлювали фотометричними методами: ізомольних серій, відносного виходу, насичення.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше науково обґрунтовано та експериментально доведено можливість застосування сульфоталейнових барвників в практиці фармацевтичного аналізу для кількісного визначення лікарських речовин групи антигістамінних засобів, снодійних засобів та інших, що знаходять застосування поза медичною практикою.

Вперше встановлено оптимальні умови перебігу реакцій бромтимолового синього з дифенгідраміном, зопіклоном та мебгідроліном, бромкрезолового зеленого з тригексифенідилом, тіопенталом натрію, лоратадином та дезлоратадином, бромкрезолового пурпурового з кетотифеном, розраховано аналітичні показники чутливості реакцій.

Запропоновано і підтверджено експериментально імовірні хімізми реакцій, для реакцій лікарських речовин групи антигістамінних засобів, снодійних засобів та інших, що знаходять застосування поза медичною практикою, з сульфоталейновими барвниками, визначено стехіометричні співвідношення учасників цих реакцій, виділено та ідентифіковано продукт реакції бромтимолового синього з мебгідроліном.

Уніфіковано та запропоновано просту та валідовану за вимогами Державної фармакопеї України обернено-фазову високоефективну рідинну хроматографічну методику кількісного визначення дифенгідраміну та зопіклону в таблетках із застосуванням рухомої фази ацетонітрил:фосфатний буфер (20:80).

Наукова новизна одержаних результатів підтверджена 1 патентом України на корисну модель.

Практичне значення одержаних результатів. Розширено можливості кількісного спектрофотометричного аналізу лікарських речовин. Розроблено та валідовано нові, високочутливі, швидкі та прості у виконанні методики кількісного визначення 8 досліджуваних лікарських речовин групи антигістамінних засобів, снодійних засобів та інших, що знаходять застосування поза медичною практикою, у складі 32 лікарських форм промислового виробництва.

Оптимізовано та валідовано за вимогами Державної фармакопеї України методику кількісного визначення дифенгідраміну та зопіклону в таблетках методом ВЕРХ із застосуванням рухомої фази ацетонітрил:фосфатний буфер (20:80), що розширює можливості кількісного аналізу цих речовин у лікарських препаратах.

Розроблені способи кількісного визначення зопіклону та кетотифену впроваджено в роботу лабораторії Державної інспекції з контролю якості лікарських засобів Запорізької області (акти впровадження від 15.08.2015), методики кількісного визначення дифенгідраміну і зопіклону методом ВЕРХ впроваджено в роботу відділу спеціальних видів досліджень Науково-дослідного експертно-криміналістичного центру при ГУ МВС України в Запорізькій області (акти впровадження від 15.08.2015).

Результати досліджень знайшли застосування в науково-педагогічному процесі при викладанні курсу фармацевтичної хімії на кафедрах фармацевтичних факультетів Запорізького державного медичного університету, Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, Національного фармацевтичного університету (м. Харків), Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського; при викладанні циклу «Сучасні аспекти створення, стандартизації і сертифікації лікарських засобів» на кафедрі контролю якості і стандартизації лікарських засобів Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика; при викладанні курсу хімії на кафедрі хімії Запорізького національного університету.

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 – 2010» (Запоріжжя, 2010), VII Національному з'їзді фармацевтів України «Фармація України. Погляд у майбутнє» (Харків, 2010), 71-й Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2011» (Запоріжжя, 2011), 72-й Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Медицина і фармація XXI століття – крок у майбутнє» (Запоріжжя, 2012), I міжнародній інтернет-конференції молодих вчених та студентів «Современные достижения медицинской и фармацевтической науки» (Запоріжжя, 2012), III Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Сучасні можливості стоматології» (Луганськ, 2013), XVII міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених (Тернопіль, 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 П. О. Петюніна «Проблеми синтезу біологічно активних речовин та створення на їх основі лікарських субстанцій» (Харків, 2014), 74-й Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів 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 у фармації» (Харків, 2015), Міжнародній науково-практичній конференції «Медична наука та практика на сучасному історичному етапі» (Київ, 2015), XXXII Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (Харків, 2015), 55-й науковій конференції студентів і молодих вчених Західно-Казахстанського державного медичного університету імені Марата Оспанова з міжнародною участю (Актобе, 2015), Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2015» (Запоріжжя, 2015), 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 20 наукових робіт, у тому числі 7 статей (5 статей у наукових фахових виданнях України, 2 статті у виданнях іноземних держав), 6 з яких включені до міжнародних наукометричних баз, 1 патент України на корисну модель, 12 тез доповідей.

Обсяг та структура дисертації. Дисертаційна робота складається з вступу, огляду літератури (розділ 1), методологічних підходів і методів дослідження (розділ 2), експериментальної частини (розділи 3-5), загальних висновків, списку використаних джерел та 16 додатків. Дисертація викладена на 201 сторінці друкованого тексту (обсяг основного тексту 142 сторінки), ілюстрована 81 рисунком та 30 таблицями. Список використаних джерел включає 228 найменувань, з яких 177 іноземні.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Методи аналізу лікарських речовин, що знаходять застосування поза медичною практикою (огляд літератури)

Проаналізовано літературні дані щодо використання сульфоталеїнових барвників у фармацевтичному аналізі лікарських речовин різних хімічних та фармакологічних груп. При цьому виявлено, що більшість робіт присвячена розробці спектрофотометричних методик зі стадією екстракції того чи іншого компонента реакційної суміші, а також, що можливість використання даної групи реагентів в аналізі лікарських речовин, що знаходять застосування поза медичною практикою та випадки зловживання якими поширюються останнім часом, вивчена недостатньо.

Узагальнено описані в літературі існуючі методики визначення зазначених речовин різними фізико-хімічними методами, а також офіційні методики їх аналізу. Доведена перспективність і актуальність досліджень в галузі застосування сульфоталеїнових барвників для розробки нових методик кількісного визначення лікарських речовин, що знаходять застосування поза медичною практикою.

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

При розробці методик кількісного визначення в якості об'єктів дослідження були використані фармакопейні стандартні зразки, а також робочі стандартні зразки субстанцій 8 лікарських речовин. Розроблені методики застосовані до 32 сучасних лікарських препаратів. В роботі було використано сульфоталеїнові барвники, розчинники та реагенти, що відповідали кваліфікації «х.ч.», «ч.д.а.» та «фарм.». Дослідження проводились методами спектрофотометрії, ВЕРХ з УФ-, мас- та діодноматричним детекторами, ІЧ-спектрометрії та ЯМР-спектрометрії на атестованих державними органами приладах.

Визначення оптимальних умов спектрофотометричного та хроматографічного аналізу досліджуваних лікарських речовин

В ході роботи було вивчено вплив на перебіг реакцій таких факторів як природа та склад розчинника, природа та кількість реагентів, швидкість перебігу реакцій та стійкість продуктів реакції у часі.

Дослідження впливу природи та складу розчинника на перебіг даних реакцій було вивчено на прикладі хлороформу, ацетону, ацетонітрилу, диметилформаміду, метанолу, етанолу, бензолу та етилацетату.

Критеріями оцінки придатності розчинника для використання у розробці методик кількісного аналізу досліджуваних лікарських речовин були максимальна чутливість реакції з сульфоталеїновим барвниками, стабільність оптичної

густини отриманого розчину у часі, а також достатній інтервал концентрацій, в якому відбувалось підпорядкування основному закону світлопоглинання.

Для кетотифену, зопіклону та тригексифенідилу найвища оптична густина розчину спостерігалась у ацетонітрилі, проте, при подальших дослідженнях продуктів реакції спостерігалася їх нестабільність за кімнатної температури. З огляду на це для розробки методик їх кількісного визначення було обрано ацетон, який дозволяв отримати досить високу і стабільну у часі оптичну густина розчину.

Для тіопенталу натрію та дифенгідраміну гідрохлориду найбільша чутливість реакції спостерігалась у середовищі хлороформу. Але подальші дослідження показали, що швидкість реакції не достатньо висока. Тому для розробки методики кількісного аналізу, був обраний ацетон. Проведені експерименти довели стабільність продукту реакції у часі.

Для вивчення впливу розчинника на перебіг реакції нерозчинного у більшості розчинників мебгідроліну з сульфоталеїновими барвниками застосували стандартну операцію його переекстракції з лужного середовища. В результаті проведених досліджень в якості найбільш придатного реакційного середовища для взаємодії кетотифену, зопіклону, тригексифенідилу, тіопенталу натрію, дифенгідраміну, лоратадину та дезлоратадину з сульфоталеїновими барвниками було обрано ацетон, а для мебгідроліну – хлороформ.

З метою підбору оптимального реагента для розробки методик кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин порівнювали спектри їх продуктів реакції з двократним надлишком найпоширеніших сульфоталеїнових барвників та вивчали стабільність продуктів реакції та лінійність залежності оптичної густини від концентрації лікарських речовин. Спираючись на результати проведених дослідів для подальшої розробки спектрофотометричних методик кількісного визначення були обрані наступні сульфоталеїнові барвники та відповідні довжини хвиль поглинання: БТС для аналізу дифенгідраміну ($\lambda_{\max} = 400$ нм), зопіклону ($\lambda_{\max} = 400$ нм) та мебгідроліну ($\lambda_{\max} = 412$ нм); БКЗ для аналізу тригексифенідилу ($\lambda_{\max} = 410$ нм), тіопенталу натрію ($\lambda_{\max} = 408$ нм), лоратадину ($\lambda_{\max} = 411$ нм) та дезлоратадину ($\lambda_{\max} = 407$ нм); БКП для аналізу кетотифену ($\lambda_{\max} = 399$ нм).

Наступним етапом досліджень було встановлення кількості реагента, необхідної для повноти перебігу реакції. Її визначали експериментально, виходячи з максимального виходу продуктів реакції. В результаті встановлено, що для зопіклону, тіопенталу натрію, кетотифену, лоратадину, дезлоратадину, при збільшенні об'єму доданого розчину реагенту від 1,00 до 2,50 мл не відбувається істотного збільшення оптичної густини отриманого розчину. Тому до цих речовин у подальших дослідженнях з розробки спектрофотометричних методик кількісного аналізу додавали по 1,00 мл розчину реагенту відповідної концентрації. Що ж до дифенгідраміну та тригексифенідилу, то при додаванні до їх розчинів 1,00% розчину БТС та БКЗ відповідно від 1,00 до 2,50 мл, величина абсорбції продуктів реакції зростала. У випадку дифенгідраміну зростання

абсорбції відбувалось стрімкіше за абсорбцію продуктів реакції тригексифенідилу. Тому експеримент для цих речовин був повторений з 2,50% розчином БТС для дифенгідраміну і з 1,60 % розчином БКЗ для тригексифенідилу. В результаті для дифенгідраміну максимум було досягнуто при додаванні 2,00 мл 2,50% розчину реагенту, а для тригексифенідилу – 1,00 мл 1,60%. При вивченні кількості реагенту, необхідної для повноти перебігу реакції мебгідроліну з БТС, експерименти показали, що оптимальним є додавання 1,00 мл 0,60% реагенту.

Стабільність продуктів взаємодії досліджуваних лікарських речовин з обраними сульфогфталейновими барвниками у ацетоновому розчині досліджували шляхом вимірювання оптичної густини отриманих розчинів протягом год з інтервалом 10 хв.

В оптимальних умовах перебігу обраних реакцій були виміряні спектри поглинання та розраховані показники чутливості даних реакцій, які наведені у табл. 1.

Таблиця 1

Аналітичні показники чутливості реакцій досліджуваних лікарських речовин з сульфогфталейновими барвниками

Лікарська речовина	λ_{\max} , нм	ϵ	a	W_s	C_{\min} , мкг/мл
За реакцією з БТС					
Дифенгідрамін	400	$6,47 \cdot 10^3$	0,0555	0,0451	0,71
Зопіклон	400	$1,40 \cdot 10^4$	0,0454	0,0278	1,4
Мебгідролін	412	$1,27 \cdot 10^4$	0,0457	0,0218	1,1
За реакцією з БКЗ					
Тригексифенідил	410	$9,08 \cdot 10^3$	0,0302	0,0331	1,7
Тиопентал натрію	408	$1,92 \cdot 10^4$	0,0849	0,0118	0,59
Лоратадин	411	$1,97 \cdot 10^4$	0,0514	0,0194	0,97
Дезлоратадин	407	$3,28 \cdot 10^4$	0,1055	0,0095	0,47
За реакцією з БКП					
Кетотифен	399	$2,42 \cdot 10^4$	0,0685	0,0129	0,74

З табл. 1 видно, що молярні коефіцієнти поглинання мають високі значення, а відкривальні мінімуми мають низькі значення, що свідчить про високу чутливість реакцій досліджуваних лікарських речовин з сульфогфталейновими барвниками.

В оптимальних умовах були встановлені стехіометричні співвідношення компонентів у реакціях досліджуваних лікарських речовин з сульфогфталейновими барвниками методами ізомолярних серій, насичення та відносного виходу. Отримані результати не суперечать один одному і наведені у табл. 2.

**Стехиометричні співвідношення компонентів реакції
«лікарська речовина – сульфоталеїновий барвник»**

Лікарська речовина – сульфоталеїновий барвник	Метод визначення		
	метод ізомолярних серій	метод насичення	метод відносного виходу
Дифенгідрамін – БТС	1:1	1:1	1:1
Зопіклон – БТС	1:1	1:1	1:1
Мебгідролін – БТС	1:1	1:1	1:1
Тригексифенідил – БКЗ	1:1	1:1	1:1

Відповідно до встановленого співвідношення компонентів реакції мебгідролін – БТС та оптимальних умов проведення реакції був синтезований, виділений та ідентифікований забарвлений продукт реакції. Для встановлення структури виділеного продукту реакції було застосовано методи ІЧ-спектроскопії, хромато-мас-спектрометрії та спектроскопії протонного магнітного резонансу.

При порівнянні ІЧ-спектрів мебгідроліну та БТС зі спектром продукту їх взаємодії виявилось, що на спектрі продукту спостерігаються ті самі смуги поглинання, які притаманні реагуючим сполукам. Але його характерною відмінністю є відсутність смуги валентних коливань зв'язків О–Н, що проявляється в спектрі БТС в інтервалі $3550\text{--}3450\text{ см}^{-1}$, що свідчить про те, що в реакції утворення іонних асоціатів приймають участь саме протони ОН-груп сульфоталеїнових барвників.

Згідно результатів хромато-мас-спектрометричного дослідження на хроматограмі іонного асоціату реєструвалися два піки, що відповідають мебгідроліну та БТС. При цьому площі піків на хроматограмі продукту вивченої реакції співвідносні майже один до одного (42% на 57%), що свідчить про склад продукту 1:1.

Протонні ЯМР-спектри мебгідроліну, БТС та утвореного продукту було знято у дейтерованих розчинах диметилсульфоксиду. Доказом утворення іонної пари мебгідроліну з бромтимоловим синім саме по атому нітрогену індольного залишку є перетворення сигналу протонів NCH_2Ph з синглету на квадруплет у ^1H ЯМР спектрі та його дезекранований хімічний зсув з 5,36 м.ч. до 5,39 м.ч. через утворення четвертинної амонієвої солі при протонуванні сульфокислотним залишком барвника (табл. 3).

Хімічні зсуви у ^1H -ЯМР спектрах досліджуваних сполук, м.ч.

Мебгідролін	Бромтимоловий синій	Іона пара
1	2	3
9.90 (с, 1H), 19'	-	9.91 (с, 1H), 19'
8.84 (д, $J = 8.5\text{ Гц}$, 1H), 3'	-	8.23 (с, 1H), 8'
7.90 (д, $J = 6.6\text{ Гц}$, 1H), 5'	7.94 (д, $J = 6.8\text{ Гц}$, 1H), 9	7.90 (д, $J = 6.8\text{ Гц}$, 2H), 5', 9

1	2	3
7.44 (т, $J = 6.9$ Гц, 2H), 2', 6'	7.42 (т, $J = 6.9$ Гц, 1H), 7	7.44 (т, $J = 6.9$ Гц, 3H), 2', 6', 7
7.28 (м, 4H), 13'-16'	7.36 (т, $J = 6.9$ Гц, 1H), 8	7.27 (м, 5H), 13'-16', 8
7.13 (т, $J = 7.3$ Гц, 1H), 1'		7.13 (т, $J = 7.2$ Гц, 1H), 1'
7.05 (д, $J = 6.8$ Гц, 2H), 9', 10'	7.06 (м, 1H), 6	7.06 (д, $J = 4.9$ Гц, 3H), 9', 10', 6
-	6.88 (м, 2H), 16, 28	6.83 (с, 1H), 28
-	-	6.73 (с, 1H), 16
-	5.88 (уш. с, 2H), 18, 30	-
5.36 (с, 2H), 7'	-	5.39 (кв, $J = 16.9$ Гц, 2H), 7'
4.64, 4.32 (м, 2H), 17'	-	4.67, 4.34 (м, 2H), 17'
3.73, 3.47 (м, 2H), 18'	-	3.75, 3.51 (м, 2H), 18'
3.05 (м, 2H), 20'	3.07 (м, 1H), 32	3.09 (м, 3H), 20', 32
3.00 (м, 3H), 21'	2.98 (м, 1H), 20	3.01 (м, 4H), 21', 20
-	2.06 (с, 3H), 31	2.07 (с, 3H), 31
-	1.90 (с, 3H), 19	1.83 (с, 3H), 19
-	0.97 (дд, $J = 18.2, 4.3$ Гц, 12H), 21, 22, 33, 34	0.96 (д, $J = 5.7$ Гц, 12H), 21, 22, 33, 34

Важливим показником зазначеної структури продукту реакції є зникнення сигналів протонів ОН-груп при 5,88 м.ч. у порівнянні зі спектром бромтимолового синього та поява піку при 8,23 м.ч., що свідчить про появу у молекулі іонної пари нового NH^+ зв'язку за даних умов.

З отриманих даних можна припустити наступну схему взаємодії мебгідроліну з БТС у хлороформному середовищі (рис. 1).

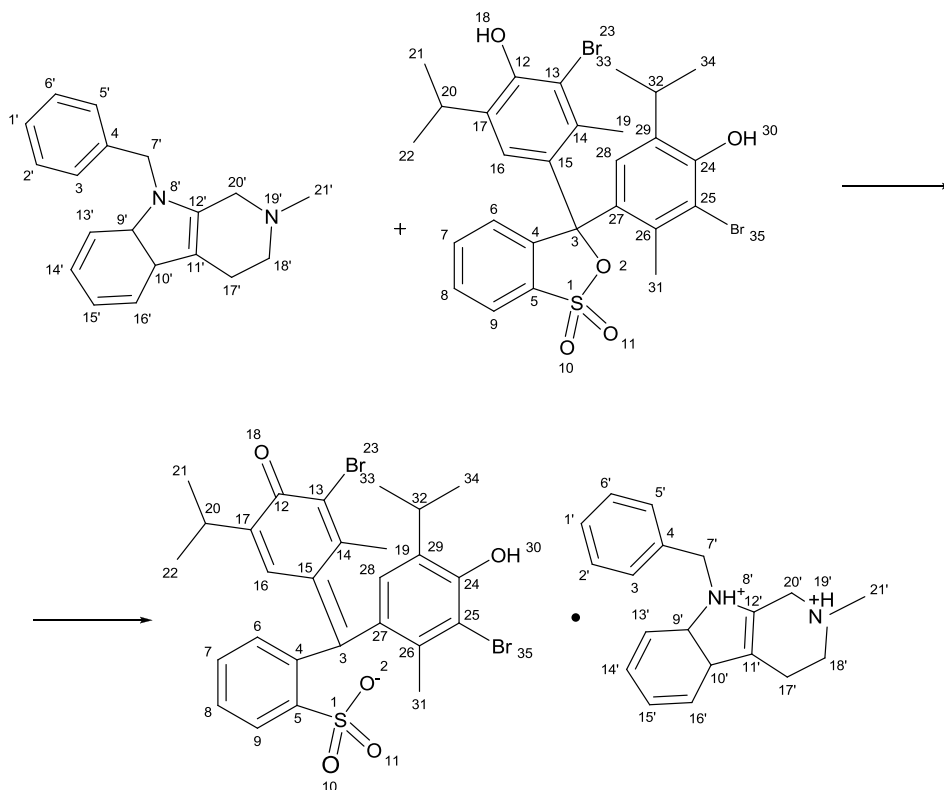


Рис. 1. Схема взаємодії мебгідроліну з бромтимоловим синім у хлороформі

Надалі були вивчені умови хроматографування лікарських речовин на прикладі дифенгідраміну та зопіклону з використанням кількох описаних в літературі рухомих фаз. Критеріями оцінки у цьому випадку були максимальна площа піку досліджуваної речовини та мінімальний час аналізу. Також немаловажним фактором вважалась доступність компонентів рухомої фази та її витрати на аналіз. В результаті за оптимальну було обрано рухому фазу складу ацетонітрил:фосфатний буфер рН 3,0 (20:80) при швидкості потоку 1 мл/хв. Вивчено вплив коливання в межах $\pm 5\%$ величини рН буферу, швидкості потоку рухомої фази та її відносного складу. Встановлено, що такі відхилення не мають істотного впливу на результати кількісного визначення досліджених речовин.

Розробка методик кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин

Розробка спектрофотометричних та хроматографічних методик кількісного аналізу лікарських речовин у фармацевтичних препаратах проводилась за оптимальних умов, встановлених попередніми дослідженнями. Розрахунок кількісного вмісту речовини проводилось найбільш точним та надійним методом стандарту. Для цього застосовували стандартні розчини лікарських речовин, приготовані з ФСЗ або РСЗ досліджуваних лікарських речовин.

Для встановлення меж концентрацій лікарських речовин, в яких світлопоглинання розчину підпорядковується закону Бера, готували серії розчинів різної концентрації, в оптимальних умовах вимірювали оптичну густину продуктів реакцій та розраховували величини питомих показників поглинання ($A_{1cm}^{1\%}$). З отриманих значень вибирали інтервал, у якому вони були постійними або близькими. Результати наведені у табл. 4.

Таблиця 4

Межі концентрацій лікарських речовин, в яких світлопоглинання підпорядковується закону Бера та питомі показники поглинання

Лікарська речовина	Концентрація, мг/100 мл	$A_{1cm}^{1\%}(\bar{x} \pm \Delta\bar{x})$
Дифенгідрамін	2,00 – 3,00	547 \pm 3
Зопіклон	1,80 – 3,00	444 \pm 3
Меггідролін	1,60 – 3,20	460 \pm 3
Тригексифенідил	1,60 – 2,80	328 \pm 4
Тіопентал натрію	0,40 – 1,60	788 \pm 7
Лоратадин	1,50 – 3,00	466 \pm 4
Дезлоратадин	0,50 – 1,20	1094 \pm 5
Кетотифен	0,50 – 1,50	676 \pm 6

За результатами досліджень запропонована загальна спектрофотометрична методика кількісного визначення дифенгідраміну, зопіклону, тригексифенідилу, тіопенталу натрію, кетотифену, лоратадину та дезлоратадину у лікарських препаратах. Точну наважку подрібненої лікарської форми вміщують у мірну

колбу, розчиняють, доводять ацетоном до позначки, перемішують та фільтрують крізь паперовий фільтр «синя стрічка». Аліквоту одержаного розчину переносять у мірну колбу ємністю 10,00 мл, додають розчин сульффталеїнового барвника у ацетоні, доводять ацетоном до позначки та перемішують.

Оскільки мебгідролін нерозчинний у більшості розчинників, для його кількісного визначення була розроблена наступна методика. Точну наважку подрібненої лікарської форми (близько 0,01000 діючої речовини), вміщують у ділильну лійку, розчиняють у 1 мл 0,5 М гідроксиду натрію, додають 10,00 хлороформу, струшують протягом 1 хв, витримують 10 хв, відділяють хлороформний шар та фільтрують його крізь паперовий фільтр «синя стрічка». 5,00 мл одержаного розчину переносять у мірну колбу ємністю 25,00 мл, доводять хлороформом до позначки та перемішують. 1,00 мл одержаного розчину переносять у мірну колбу ємністю 10,00 мл, додають 1,00 мл 0,60% розчину БТС у хлороформі, доводять хлороформом до позначки та перемішують. Абсорбцію отриманих розчинів вимірюють на фоні компенсаційних розчинів.

З метою встановлення придатності хроматографічної системи для кількісного визначення досліджуваних речовин за оптимальних умов проводили хроматографування, визначали площі піків та розраховували величини коефіцієнтів симетрії (A_s), число теоретичних тарілок (N) та відносне стандартне відхилення (RSD). Отримані показники придатності хроматографічної системи не перевищують рекомендовані межі (табл. 5), тобто застосована хроматографічна система є ефективною для розділення досліджуваних речовин.

Таблиця 5

Параметри придатності хроматографічної системи

Лікарська речовина	(t_R), хв	A_s	N	RSD
Дифенгідрамін	5,82	1,07	1865	0,93
Зопіклон	7,54	1,12	1910	1,16

В результаті запропоновано наступну методику кількісного визначення дифенгідраміну та зопіклону в таблетках. Точну наважку подрібненої лікарської форми (близько 0,00500 діючої речовини) вміщують у мірну колбу ємністю 25,00 мл, розчиняють у рухомій фазі ацетонітрил:фосфатний буфер рН 3,0 (20:80), доводять нею до позначки, перемішують та фільтрують крізь паперовий фільтр «синя стрічка». 1,00 мл одержаного вихідного розчину переносять у мірну колбу ємністю 10,00 мл, доводять рухомою фазою до позначки та перемішують. Хроматографують за наступних умов: об'єм проби 20 мкл, колонка обернено-фазова C18, швидкість потоку 1 мл/хв, УФ-детектор при 254 нм (дифенгідраміну гідрохлорид) та 304 нм (зопіклон).

За розробленими методиками було проведено кількісне визначення досліджуваних лікарських речовин у 32 фармацевтичних препаратах.

Статистичною обробкою показано, що відносна невизначеність середнього результату вимірювань у всіх випадках знаходилась в межах 1%.

Валідація методик кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин

Державна Фармакопея України вимагає валідації методик кількісного визначення лікарських речовин за наступними характеристиками: специфічність, лінійність, збіжність, правильність, робасність та діапазон застосування.

З метою визначення *специфічності* запропонованих спектрофотометричних методик кількісного аналізу лікарських препаратів, якщо були наявні всі допоміжні речовини лікарської форми, створювали модельні суміші і проводили випробування розчинів «плацебо». 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 аналізованих розчинів складає менше 1%. Деякі досліджені лікарські форми мають відносно складні набори допоміжних речовин, відтворити які у модельних сумішах не виявилось можливим. Тому специфічність запропонованих методик для цих препаратів була оцінена після проведення визначення правильності запропонованих методик методом добавок.

З метою визначення рівня специфічності запропонованих хроматографічних методик кількісного аналізу дифенгідраміну гідрохлориду та зопіклону у таблетках проводили тест на чистоту піка. Для цього створювали модельні суміші допоміжних речовин лікарської форми, що не містили діючої речовини, та аналізували за запропонованою методикою. Було встановлено, що допоміжні речовини досліджених лікарських форм не впливають на площу хроматографічного піку аналізованої речовини.

Встановлення *лінійності* залежності величини абсорбції або площі хроматографічного піку від концентрації лікарської речовини проводилось шляхом регресійного аналізу отриманих даних аналізу не менше п'яти розчинів з відомою концентрацією.

Для кожної залежності методом найменших квадратів розраховували рівняння лінійної регресії, що мали загальний вигляд: $y = a + b \cdot x$, де y – вимірювана величина (абсорбція), x – концентрація досліджуваної речовини, a – вільний член лінійної регресії, b – кутовий коефіцієнт. Також з метою подальшого аналізу отриманих лінійних залежностей були розраховані такі числові показники: коефіцієнт кореляції r (повинен бути більше загального індексу кореляції R_c), залишкове стандартне відхилення по осі абсцис $s_{x,0}(\%)$ (не повинно перевищувати $\Delta_{As}(\%)$), точка перетину з віссю ординат a ($|a| \leq \Delta a$) (табл. 6).

Таблиця 6

Числові показники лінійної залежності

Лікарська речовина	b	a	$s_{x,0}(\%)$	$r \geq R_c$
1	2	3	4	5
Спектрофотометричні методики				
Дифенгідрамін	0,4271±(0,0077)	-0,0171±(0,0219)	0,577	0,9995
Зопіклон	0,4621±(0,0073)	-0,0337±(0,0185)	0,502	0,9993

Продовж. табл. 6

1	2	3	4	5
Меггідролін	0,4690±(0,0071)	-0,0208±(0,0175)	0,800	0,9997
Тригексифенідил	0,2928±(0,0052)	0,0322±(0,0152)	1,207	0,9995
Тиопентал натрію	0,7861±(0,0075)	0,0007±(0,0092)	0,487	0,9999
Лоратадин	0,4573±(0,0078)	-0,0052±(0,0179)	0,807	0,9996
Дезлоратадин	1,0622±(0,0200)	-0,0088±(0,0182)	1,14	0,9995
Кетотифен	0,8024±(0,0099)	-0,0183±(0,0099)	1,13	0,9998
Хроматографічні методики				
Дифенгідрамін	920±(18)	63,6±(45,6)	0,615	0,9994
Зопіклон	772,4±(23,8)	-25,2±(60,1)	0,974	0,9989

Розраховані величини свідчать, що лінійність методик відповідає вимогам ДФУ у обраних діапазонах концентрацій.

Правильність запропонованих методик кількісного визначення лікарських форм встановлювали за вимогами ДФУ. Аналізували модельні суміші допоміжних речовин, до яких було додано відомі кількості досліджуваного активного інгредієнту (табл. 7). Згідно ДФУ систематична похибка статистично не відрізняється від нуля, якщо відхилення \bar{Z} від 100% не перевищує свій довірчий інтервал $\Delta_{\bar{z}}$.

Таблиця 7

**Визначення правильності запропонованих методик
на модельних сумішах досліджуваних лікарських засобів**

Модельні суміші	\bar{Z}	RSD	$\Delta_{\bar{z}}$	$ \bar{Z}-100 $
1	2	3	4	5
<i>Спектрофотометричні методики</i>				
Таблетки «Димедрол» 0,05 г («Луганський ХФЗ»)	100,1	1,02	0,64	0,1
Таблетки «Димедрол» 0,05 г («Біостимулятор»)	99,79	1,13	0,70	0,21
Таблетки «Димедрол-Дарниця»	99,60	1,48	0,92	0,40
Розчин для ін'єкцій «Димедрол-Дарниця»	100,1	1,55	0,96	0,1
Розчин для ін'єкцій «Димедрол»	100,1	1,56	0,97	0,1
Таблетки «Зопіклон»	100,8	1,35	0,83	0,8
Таблетки «Соннат»	100,6	1,93	1,19	0,6
Порошок «Тиопентал»	100,8	2,60	1,61	0,8
Таблетки «Кетотифен»	100,7	2,52	1,55	0,7
Таблетки «Кетотифен-ЛХ»	99,52	1,9	1,18	0,48
Капсули «Кетотифен-В»	100,6	1,85	1,15	0,6
Таблетки «Алерік»	100,9	3,13	1,94	0,9
Таблетки «Кларитин»	100,5	1,85	1,15	0,5
Таблетки «Лорано»	100,3	1,60	0,99	0,3
Таблетки «Лоратадин»	100,1	2,26	1,40	0,1
Таблетки «Лоризан»	100,1	1,33	0,820	0,1
Таблетки «Діазолін-Дарниця»	100,9	2,37	1,47	0,9
Драже Діазолін 0,1 г	100,2	1,23	0,76	0,2
Драже Діазолін 0,05 г	100,9	2,55	1,58	0,9
Суспензія Діазолін	100,1	1,26	0,78	0,1

Продовж. табл. 7

1	2	3	4	5
Хроматографічні методики				
Таблетки «Димедрол-Дарниця» 0,05 г	98,90	3,07	1,92	1,10
Таблетки «Димедрол» 0,1 г	100,2	2,19	1,35	0,2
Таблетки «Зопіклон»	101,8	3,31	2,01	1,8
Таблетки «Соннат»	98,20	4,25	2,68	1,80

У разі неможливості одержання усіх компонентів лікарського засобу застосовували метод добавок (табл. 8).

Таблиця 8

**Визначення правильності запропонованих методик
на модельних сумішах досліджуваних лікарських засобів**

Модельні суміші	\bar{Z}	RSD	$\Delta_{\bar{z}}$	$ \bar{Z}-100 $
Таблетки «Димедрол» 0,1 г	99,97	1,23	0,76	0,03
Таблетки «Сонован»	100,2	1,32	0,81	0,2
Таблетки «Зопіклон-3Н»	98,98	1,86	1,17	1,02
Таблетки «Циклодол»	99,42	0,869	0,69	0,58
Таблетки «Лоратадин-Дарниця»	100,8	3,00	1,86	0,8
Таблетки «Алергомакс»	100,1	0,93	0,58	0,1
Таблетки «Трексил-нео»	99,34	1,35	0,84	0,66
Таблетки «Едем»	100,0	1,25	0,78	0,00
Таблетки «Дезлоратадин»	99,29	1,25	0,78	0,71
Таблетки «Алергостоп»	99,89	0,87	0,54	0,11
Таблетки «Алерсіс»	99,39	1,83	1,13	0,61

Прецизійність запропонованих методик була встановлена на рівні збіжності. Прецизійність досліджували на готових лікарських засобах, оскільки в цих умовах процедура визначення максимально наближена до звичайного процесу аналізу. Для оцінки збіжності проводили по 9 паралельних визначень кожного препарату і результати обробляли статистично (табл. 9). З одержаних результатів видно, що однобічний довірчий інтервал не перевищує максимально припустиму невизначеність аналізу ($\Delta_{As}\%$) відповідно до вимог ДФУ, тому методики є прецизійними і дозволяють провести кількісне визначення активних речовин у складі лікарських форм з достатнім рівнем точності.

В ході дослідження лінійність, правильність та прецизійність методик визначались у межах *діапазонів застосування*, які перевищували мінімально припустимі за вимогами ДФУ (80–120% від номінального вмісту діючої речовини).

Робастність оцінювали на стадії розробки методик шляхом вивчення факторів, що впливають на результати вимірювань. У подальшому вплив цих факторів було враховано при виборі оптимальних умов визначення.

**Визначення прецизійності результатів кількісного аналізу лікарських форм
за запропонованими методиками**

Лікарський препарат	Метрологічні характеристики					
	\bar{x}	S	RSD	$\Delta_{x, r}$	$\Delta_{\bar{x}, r}$	$\Delta_{As}, \%$
Спектрофотометричні методики						
Таблетки «Димедрол» 0,05 г («Луганський ХФЗ»)	0,0499	$4,58 \cdot 10^{-4}$	0,918	1,71	0,569	3,20
Таблетки «Димедрол» 0,05 г («Біостимулятор»)	0,0500	$2,74 \cdot 10^{-4}$	0,548	1,02	0,340	3,20
Таблетки «Димедрол-Дарниця»	0,0501	$6,27 \cdot 10^{-4}$	1,251	2,33	0,775	3,20
Таблетки «Димедрол»	0,1008	$1,20 \cdot 10^{-3}$	1,190	2,21	0,738	3,20
Розчин для ін'єкцій «Димедрол-Дарниця»	0,01010	$1,17 \cdot 10^{-4}$	1,158	2,15	0,718	3,20
Розчин для ін'єкцій «Димедрол»	0,01008	$1,38 \cdot 10^{-4}$	1,369	2,54	0,848	3,20
Таблетки «Зопіклон	0,00748	$8,98 \cdot 10^{-5}$	1,198	2,23	0,743	3,20
Таблетки «Соннат»	0,00752	$2,96 \cdot 10^{-5}$	0,394	0,732	0,244	3,20
Таблетки «Сонован»	0,00750	$2,69 \cdot 10^{-5}$	0,359	0,667	0,222	3,20
Таблетки «Зопіклон-ЗН»	0,00747	$6,70 \cdot 10^{-5}$	0,897	1,67	0,556	3,20
Таблетки «Циклодол»	0,00201	$3,44 \cdot 10^{-5}$	1,71	3,16	1,05	3,20
Порошок «Гіопентал»	0,99000	$1,50 \cdot 10^{-2}$	1,16	2,16	0,720	3,20
Таблетки «Кетотифен-ЛХ»	0,00103	$1,20 \cdot 10^{-5}$	1,16	2,17	0,723	3,20
Таблетки «Кетотифен Софарма»	0,00104	$1,60 \cdot 10^{-5}$	1,54	2,86	0,957	3,20
Таблетки «Кетотифен»	0,00099	$1,16 \cdot 10^{-5}$	1,17	2,17	0,725	3,20
Капсули «Кетотифен-В»	0,00100	$1,05 \cdot 10^{-5}$	1,06	1,97	0,817	3,20
Таблетки «Лоратадин-Дарниця»	0,01017	$1,29 \cdot 10^{-4}$	1,27	2,36	0,787	3,20
Таблетки «Алерік»	0,00989	$1,64 \cdot 10^{-4}$	1,66	3,08	1,027	3,20
Таблетки «Кларитин»	0,01018	$1,65 \cdot 10^{-4}$	1,62	3,01	1,003	3,20
Таблетки «Лорано»	0,00995	$1,16 \cdot 10^{-4}$	1,16	2,17	0,723	3,20
Таблетки «Лоратадин»	0,01000	$1,00 \cdot 10^{-4}$	1,00	1,86	0,620	3,20
Таблетки «Лоризан»	0,01005	$1,04 \cdot 10^{-4}$	1,03	1,92	0,64	3,20
Таблетки «Едем»	0,00499	$1,50 \cdot 10^{-5}$	0,30	0,56	0,19	3,20
Таблетки «Трексил-нео»	0,00500	$3,50 \cdot 10^{-5}$	0,70	1,30	0,43	3,20
Таблетки «Алергомакс»	0,00501	$3,60 \cdot 10^{-5}$	0,72	1,34	0,45	3,20
Таблетки «Дезлоратадин»	0,00499	$2,96 \cdot 10^{-5}$	1,10	0,37	0,19	3,20
Таблетки «Алергостоп»	0,00499	$2,90 \cdot 10^{-5}$	0,58	1,08	0,36	3,20
Таблетки «Алерсіс»	0,00499	$2,40 \cdot 10^{-5}$	0,48	0,89	0,30	3,20
Таблетки «Діазолін-Дарниця»	0,10015	$5,54 \cdot 10^{-4}$	0,55	1,03	0,34	3,20
Драже «Діазолін» 0,1	0,10066	$1,55 \cdot 10^{-3}$	1,54	2,77	0,93	3,20
Драже «Діазолін» 0,05	0,04995	$2,83 \cdot 10^{-4}$	0,57	1,05	0,35	3,20
Суспензія «Діазолін»	0,60366	$4,33 \cdot 10^{-3}$	0,72	1,33	0,44	3,20
Хроматографічні методики						
Таблетки «Димедрол-Дарниця» 0,05 г	0,0501	$5,39 \cdot 10^{-4}$	1,08	2,01	0,669	3,20
Таблетки «Димедрол» 0,1 г	0,1001	$1,40 \cdot 10^{-3}$	1,40	2,60	0,868	3,20
Таблетки «Зопіклон»	0,00745	$7,78 \cdot 10^{-5}$	1,05	1,95	0,650	3,20
Таблетки «Соннат»	0,00747	$6,12 \cdot 10^{-5}$	0,823	1,52	0,507	3,20

Таким чином, проведені розрахунки доводять, що запропоновані методики відповідають вимогам Державної фармакопеї України і можуть бути застосовані для кількісного аналізу препаратів на виробництві та у регіональних лабораторіях з контролю якості лікарських засобів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі викладене теоретичне узагальнення та нове експериментальне вирішення наукової задачі з розробки та валідації чутливих, експресних та простих у виконанні хроматографічних та спектрофотометричних методик визначення лікарських речовин, якими зловживають для досягнення психотропного ефекту, потенціювання дії інших психоактивних речовин, а також суїциду, у складі медикаментів.

1. На основі аналізу літературних джерел обґрунтована доцільність розробки нових хроматографічних та спектрофотометричних методик визначення лікарських речовин, якими зловживають для досягнення психотропного ефекту, потенціювання дії інших психоактивних речовин, а також суїциду, у складі медикаментів.

2. Встановлено, що оптимальними умовами перебігу фотометричних реакцій сульфталейнових барвників з лікарськими речовинами: дифенгідраміном, зопіклоном, тригексифенідилом, тіопентал натрієм, кетотифеном, лоратадином, дезлоратадином є середовище ацетону, кімнатна температура та надлишок реагенту. Розраховані аналітичні показники свідчать про високу чутливість застосованих реакцій – межі виявлення досліджуваних речовин складають 0,47–1,7 мкг/мл.

3. Методами ізомолярних серій, молярних співвідношень та відносного виходу на прикладі дифенгідраміну, зопіклону та мебгідроліну з бромтимоловим синім, тригексифенідилу з бромкрезоловим зеленим визначено стехіометричні співвідношення для реакції сульфоталейнових барвників з лікарськими речовинами, які склали 1:1. Синтезовано і виділено продукт реакції бромтимолового синього з мебгідроліном. За допомогою ІЧ- та ^1H ЯМР-спектроскопії встановлено його будову і підтверджено, що за своєю природою даний продукт є іонним асоціатом.

4. Встановлено що оптимальними умовами хроматографування лікарських речовин дифенгідраміну та зопіклону, методом ВЕРХ на обернено-фазовій колонці є елюювання рухомою фазою ацетонітрил:фосфатний буфер з рН=3, зі швидкістю 1 мл/хв. Розраховані показники придатності хроматографічної системи: коефіцієнт асиметрії піку не більше 1,12, число теоретичних тарілок не менше 1865, що свідчать про високу ефективність розділення досліджених речовин.

5. Розроблено і валідовано спектрофотометричні методики кількісного визначення 7 лікарських речовин у складі 32 лікарських форм промислового виробництва. Запропоновані методики відрізняються простотою виконання та не

потребують складного обладнання. Встановлено, що відносне відхилення середнього результату за розробленими спектрофотометричними методиками знаходиться в межах 1%, що свідчить про їх високу відтворюваність.

6. Запропоновано ВЕРХ-методики кількісного визначення 2 лікарських речовин у складі 4 лікарських форм промислового виробництва. Встановлено, що відносне відхилення середнього результату за розробленими методиками не перевищує 1 %, що свідчить про їх високу відтворюваність.

7. Встановлено основні валідаційні характеристики і доведено, що за специфічністю, лінійністю, правильністю, прецизійністю, діапазоном застосування та робастністю розроблені спектрофотометричні та ВЕРХ-методики кількісного визначення досліджуваних лікарських речовин відповідають вимогам ДФУ і можуть бути застосовані у лабораторіях відділів технічного контролю виробників лікарських засобів і інспекцій з контролю якості лікарських засобів, а також хіміко-криміналістичних лабораторіях.

8. Розроблені методики впроваджені у практичну діяльність Запорізької обласної інспекції контролю якості лікарських засобів і відділу спеціальних видів досліджень Науково-дослідного експертно-криміналістичного центру при ГУ МВС України в Запорізькій області, а також у навчально-педагогічний процес вищих навчальних закладів України.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Загородній С. Л. Спектрофотометричне визначення димедролу в таблетках / С. Л. Загородній, С. О. Васюк // Актуальні питання фармац. та мед. науки та практики. – 2013. – № 2 (12). – С. 98–101. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину дослідження, написав статтю).

2. Загородній С. Л. Кількісне визначення зопіклону у таблетках «Сонован» методом спектрофотометрії / С. Л. Загородній, С. О. Васюк // Актуальні питання фармац. та мед. науки та практики. – 2014. – № 2 (15). – С. 23–26. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину дослідження, написав статтю).

3. Загородній С. Л. Спектрофотометричне визначення циклодолу в таблетках / С. Л. Загородній, С. О. Васюк // Фармац. часопис. – 2014. – № 4 (32). – С. 58-63. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину дослідження, написав статтю).

4. Zagorodniy S. L. Validation of quantitative determination methods of diphenhydramine tablets by high performance liquid chromatography / S. L. Zagorodniy, S. O. Vasyuk // Запорж. мед. журн. – 2015. – № 2 (89). – С. 89-93. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину дослідження, написав статтю).

5. Загородній С. Л. Валідація методики кількісного визначення зопіклону в таблетках методом високоефективної рідинної хроматографії / С. Л. Загородній,

С. О. Васюк // Фармац. журн. – 2015. – № 2 (15). – С. 69-73. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину дослідження, написав статтю).

6. Загородній С. Л. Спектрофотометрическое определение зопиклона в таблетках / С. Л. Загородній, С. О. Васюк // Рецепт. – 2014. – № 2 (94). – С. 71-78. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину дослідження, написав статтю).

7. Zagorodniy S. L. Quantitative determination of ketotifen in drug dosage forms by spectrophotometric method / S. L. Zagorodniy, Y. V. Monaykina, S. O. Vasyuk // ІАРВС. – 2015. – № 4 (2). – С. 373-377. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав основну експериментальну частину дослідження, приймав участь у написанні статті).

8. Патент на корисну модель 92249 Україна, МПК G01N 21/78. Спектрофотометричний спосіб кількісного визначення зопіклону / С. Л. Загородній, С. О. Васюк – № u201401711 ; заявл. 21.02.14 ; опубл. 11.08.14, Бюл. № 5. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину, аналіз отриманих даних, проводив роботу за патентами).

9. Загородній С. Л. Спектрофотометрична методика визначення димедролу / С. Л. Загородній, С. О. Васюк // Сучас. можлив. стоматології : тези доп. III Всеукр. наук.-практ. конф. студ. та мол. вчених, м. Луганськ, 11-12 квіт. 2013 р. – Луганськ, 2013. – С. 158. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину дослідження, написав тези).

10. Загородній С. Л. Визначення деяких валідаційних характеристик для спектрофотометричної методики кількісного визначення димедролу в таблетках / С. Л. Загородній // Матер. XVII міжнар. мед. конгрес студ. та мол. вчених, м. Тернопіль, 22-24 квіт. 2013 р. – Т., 2013. – С. 306.

11. Загородній С. Л. Спектрофотометрична методика кількісного визначення циклодолу / С. Л. Загородній // Актуал. пробл. та персп. розв. мед., фармац. та природн. наук – 2013 : тези доп. II Регіон. наук.-практ. конф. студ., аспір. та мол. вчених, м. Запоріжжя, 21 груд. 2013 р. – Запоріжжя, 2013. – С. 10–11.

12. Розробка та валідація спектрофотометричних методик кількісного визначення речовин в лікарських формах на основі взаємодії з сульфоталейновими барвниками та похідними хінону / С. Л. Загородній, С. О. Васюк, К. П. Портна, Ю. М. Жук // Проблеми синтезу біологічно активних речовин та створення на їх основі лікарських субстанцій : матеріали Укр. наук.-практ. конф., присв. 100-річчю з дня народження д.х.н. П. О. Петюніна, м. Харків, 24-25 квіт. 2014 р. – Х., 2014. – С. 88. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, експериментальні дослідження з розробки методик кількісного визначення димедролу, зопіклону, циклодолу).

13. Загородній С. Л. Застосування сульфоталейнових барвників у спектрофотометричному аналізі психотропних лікарських засобів / С. Л. Загородній // Сучас. аспекти мед. і фармац. – 2014 : тези доп. 74 Всеукр.

наук.-практ. конф. мол. вчених та студ. з міжнар. участю, м. Запоріжжя, 15-16 трав. 2014 р. – Запоріжжя, 2014. – С. 174.

14. Загородній С. Л. Визначення деяких валідаційних характеристик методики кількісного визначення димедролу в таблетках методом високоефективної рідинної хроматографії / С. Л. Загородній // Актуал. пробл. та персп. розв. мед., фармац. та природн. наук : тези доп. III Регіон. наук.-практ. конф. студ., аспір. та мол. вчених, м. Запоріжжя, 29 лист. 2014 р. – Запоріжжя, 2014. – С. 167-168.

15. Загородній С. Л. Розробка та валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення тиопенталу натрію / С. Л. Загородній, С. О. Васюк // Аналіт. хім. у фармації : матер. міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 19-20 бер. 2015 р. – Х., 2015. – С. 38-39. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину дослідження, написав тези).

16. Загородній С. Л. Розробка та валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення лоратадину в таблетках / С. Л. Загородній, С. О. Васюк, В. В. Бугайова // Мед. наука та практ. на сучас. істор. етапі : тези доп. міжнар. наук.-практ. конф., м. Київ, 8 трав. 2015 р. – К., 2015. – С. 112-113. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав основну експериментальну частину дослідження, написав тези).

17. Загородній С. Л. Розробка та валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення лоратадину / С. Л. Загородній, В. В. Бугайова // Сучас. аспекти мед. і фармац. – 2015 : тези доп. Всеукр. наук.-практ. конф. мол. вчених та студ. з міжнар. участю, м. Запоріжжя, 14-15 трав. 2015 р. – Запоріжжя, 2015. – С. 150-151. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав основну експериментальну частину дослідження, написав тези).

18. Загородній С. Л. Разработка спектрофотометрических методик количественного определения лекарственных веществ в фармацевтических препаратах на основе реакций с сульфоталеиновыми красителями и производными хинона / С. Л. Загородній, С. О. Васюк, К. П. Портна // Батыс Казакстан медицина журналы : тези доп. 55-ї юбіл. Міжнар. наук. конф. студ. і мол. вчених, м. Актобе, 19-20 трав. 2015 р. – 2015. – № 1 (45). – С. 25. (Дисертант самостійно провів аналіз частини літературних джерел, виконав значну частину експериментальних досліджень).

19. Загородній С. Л. Розробка та валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення лоратадину в таблетках «Алерік» / С. Л. Загородній, С. О. Васюк // Ліки – людині. Сучас. пробл. фармакотер. і признач. лік. засобів : тези доп. XXXII Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Харків, 21 трав. 2015 р. – Х., 2015. – С. 36. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав експериментальну частину дослідження, написав тези).

20. Загородній С. Л. Спектрофотометрична методика кількісного визначення лоратадину в таблетках / С. Л. Загородній, С. О. Васюк, В. В. Бугайова // Здобут. клін. та експерим. медицини : тези доп. наук.-практ. конф.,

м. Тернопіль, 17 черв. 2015 р. – Т., 2015. – С. 195. (Дисертант самостійно провів аналіз літературних джерел, виконав основну експериментальну частину дослідження, написав тези).

АНОТАЦІЯ

Загородній С. Л. Застосування хроматографічних та спектральних методів для аналізу психотропних речовин. – 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.

Метою дисертації стала розробка чутливих, експресних, доступних, валідованих спектрофотометричних та хроматографічних методик кількісного визначення лікарських речовин, що знаходять застосування поза медичною практикою. В основу розробки спектрофотометричних методик були покладені реакції досліджених речовин з сульфогталеїновими барвниками. Вивчено умови перебігу фотометричних реакцій, розраховані аналітичні показники чутливості реакцій, встановлено стехіометричні коефіцієнти реакцій. Синтезовано, виділено та встановлено будову іонного асоціату мебгідлоліну з бромтимоловим синім. Вивчено умови високоефективного рідинного хроматографування досліджених речовин із застосуванням обернено-фазової колонки, розраховано показники придатності системи.

Розроблено методики кількісного визначення 8 лікарських речовин у складі лікарських форм, що дозволило підвищити селективність визначення, запобігти багатостадійності процесу і необхідності використання дорогого обладнання.

Розроблено методики застосовано до 32 вітчизняних та закордонних фармацевтичних препаратів промислового виробництва.

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

Ключові слова: спектрофотометрія, сульфогталеїнові барвники, високоефективна рідинна хроматографія, лікарські речовини, валідація.

АННОТАЦИЯ

Загородний С. Л. Применение хроматографических и спектральных методов для анализа психотропных веществ. – 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.

Целью диссертации стала разработка доступных, чувствительных, экспресных, простых в выполнении, валидированных спектрофотометрических и

хроматографических методик количественного анализа лекарственных веществ, которые находят немедицинское применение.

В основу разработки спектрофотометрических методик были положены реакции исследуемых веществ с сульффталеиновыми красителями. Изучены условия фотометрических реакций дифенгидрамина гидрохлорида, зопиклона, тригексифенидила гидрохлорида, тиопентала натрия, кетотифена гидрофумарата, лоратадина, дезлоратадина и мебгидролина с бромтимоловым синим, бромкрезоловым пурпурным, бромфеноловым синим, бромкрезоловым зеленым, тимоловым синим и крезоловым красным. Доказано, что оптимальным является взаимодействие дифенгидрамина гидрохлорида с 2,5% бромтимоловым синим, зопиклона с 0,125% бромтимоловым синим, тригексифенидила гидрохлорида с 1,6% бромкрезоловым зеленым, тиопентала натрия с 0,15% бромкрезоловым зеленым, кетотифена гидрофумарата с 0,15% бромкрезоловым пурпурным, лоратадина с 0,3% бромкрезоловым зеленым, дезлоратадина с 0,2% бромкрезоловым зеленым в ацетоне, а мебгидролина с 0,6% бромтимоловым синим в хлороформе. Установлено, что реакции протекают быстро, с образованием стабильных продуктов и не требуют дополнительных условий.

Рассчитанные аналитические показатели свидетельствуют о высокой чувствительности реакций – открываемый минимум составляет 0,47–1,7 мкг/мл, молярные коэффициенты светопоглощения составляют $6,47 \cdot 10^3$ – $3,28 \cdot 10^4$ л·моль⁻¹·см⁻¹. При помощи спектрофотометрических методов определения состава (изомолярных серий, непрерывных изменений, и относительного выхода) установлены стехиометрические коэффициенты реакций «лекарственное вещество – реагент», которые составили 1:1 для взаимодействия дифенгидрамина гидрохлорида, зопиклона и мебгидролина с бромтимоловым синим, тригексифенидила гидрохлорида с бромкрезоловым зеленым.

Синтезирован продукт реакции мебгидролина с бромтимоловым синим, структура которого установлена на основе анализа ИК-, масс- и ¹H ЯМР-спектров. При соотношении ИК-спектров продукта реакций со спектрами реагирующих веществ установлено, что основные полосы поглощения в них совпадают, но отсутствуют полосы валентных колебаний связей О–Н в фрагменте молекулы бромтимолового синего, что свидетельствует о том, что именно протоны ОН-групп принимают участие в образовании ионных ассоциатов. Путем сравнения основных спектральных параметров ¹H ЯМР-спектров реагирующих веществ и полученного продукта, а именно, химического сдвига, констант спин-спинового взаимодействия и интегральных характеристик пиков взаимодействующих молекул, установлена структура ионного асоциата и выявлены реакционные центры молекул, принимающих участие в его образовании.

Изучены условия высокоэффективного жидкостного хроматографирования лекарственных веществ на примере дифенгидрамина и зопиклона с использованием нескольких описанных в литературе подвижных фаз. Критериями оценки в этом случае были максимальная площадь пика исследуемого вещества и минимальное время анализа. Также немаловажным фактором считалась

доступность компонентов подвижной фазы и ее расходы на анализ. В результате оптимальной была выбрана подвижная фаза состава ацетонитрил:фосфатный буфер рН 3,0 (20:80) при скорости потока 1 мл/мин. Изучено влияние колебания в пределах $\pm 5\%$ величины рН буфера, скорости потока подвижной фазы и ее относительного состава. Установлено, что такие отклонения не имеют существенного влияния на результаты количественного определения исследованных веществ.

На основе полученных результатов разработаны методики количественного определения 8 лекарственных веществ в составе 32 современных фармацевтических препаратов отечественного и импортного производства. Разработанные методики не требуют специальных условий, длительного этапа подготовки пробы, являются экспрессными и простыми в выполнении.

Суть разработанных спектрофотометрических методик количественного определения заключается в обработке исследуемой пробы реагентом в среде ацетона или хлороформа при комнатной температуре с последующим измерением оптической плотности полученных окрашенных растворов.

Корректность предложенных спектрофотометрических и хроматографических методик подтверждена при помощи процедуры валидации. Доказано, что разработанные методики количественного определения исследуемых лекарственных веществ по специфичности, линейности, правильности, прецизионности, диапазону применения и робастности, соответствуют требованиям Государственной Фармакопеи Украины и могут применяться для количественного определения лекарственных средств.

Ключевые слова: спектрофотометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография, сульфопфталеиновые красители, лекарственные вещества, валидация.

ANNOTATION

Zagorodny S. L. Application of chromatographic and spectroscopic methods for the analysis of psychotropic substances. – 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.

The aim of the thesis was to develop sensitive, expressive, accessible, valid spectrophotometric and chromatographic methods quantitative determination of drugs of abuse. The formulation spectrophotometric techniques were entrusted with the matters investigated reaction sulphonphthalein dyes. Studied reactions photometric flow conditions, designed performance analytical sensitivity reactions, installed the stoichiometric reactions. Synthesized, isolated and determined the structure of the ion associate mebhylolone with bromine thymol blue. Studied high-performance liquid chromatography conditions studied compounds using reversed-phase column indices calculated the suitability of the system.

The methods of quantification of 8 drugs in dosage forms part, thus improving the selectivity determining multistage process and prevent the need for expensive equipment. The methods applied to 32 domestic and foreign pharmaceutical manufacturing.

The methods don't require any critical reaction conditions or tedious sample preparation, are fast and simple for routine quality control. It was proved that the methods are valid according to The Ukrainian Pharmacopoea requirements.

Key words: spectrophotometry, sulphonphthalein dyes, high-performance liquid chromatography, medicinal substances, validation.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- БТС – бромтимоловий синій;
- БКЗ – бромкрезоловий зелений;
- БКП – бромкрезоловий пурпуровий;
- ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія;
- ДФУ – Державна фармакопея України;
- ІЧ – інфрачервоний;
- РСЗ – робочий стандартний зразок;
- УФ – ультрафіолетовий;
- ФСЗ – фармакопейний стандартний зразок;
- ЯМР – ядерний магнітний резонанс.

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 № 6630.
Надруковано з оригінал-макету в типографії
Запорізького державного медичного університету
69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського 26