

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**АЛЬФРЕД-УГБЕНБО ДЕЙНМОТЕЙ САМУЕЛ**

**УДК 615.12:615.254:658.56:54.061/.062:543.42:543.544.94.943.3**

**РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ СУСПЕНЗІЙ,  
ЩО МІСТЯТЬ ДІУРЕТИКИ, АПТЕЧНОГО ВИГОТОВЛЕННЯ ТА  
ВИВЧЕННЯ ЇХ СТАБІЛЬНОСТІ**

**15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія**

**Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата фармацевтичних наук**

**Харків – 2018**

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Національному фармацевтичному університеті Міністерства охорони здоров'я України.

**Науковий керівник:** кандидат фармацевтичних наук, доцент  
**ЗДОРИК ОЛЕКСАНДР АНАТОЛІЙОВИЧ**  
Національний фармацевтичний університет,  
декан факультету промислової фармації, управління та адміністрування

**Офіційні опоненти:** доктор хімічних наук, професор  
**СВЄЧНІКОВА ОЛЕНА МИКОЛАЇВНА**  
Харківський національний педагогічний університет імені Г. С. Сковороди, завідувач кафедри хімії

доктор фармацевтичних наук, професор  
**ВАСЮК СВІТЛАНА ОЛЕКСАНДРІВНА,**  
Запорізький державний медичний університет,  
завідувач кафедри аналітичної хімії

Захист відбудеться «23» квітня 2018 р. о 10<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.01 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4).

Автореферат розісланий «22» березня 2018 р.

Учений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
професор

В. А. Георгіянц

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Практика аптечного виготовлення лікарських засобів у різних країнах світу націлена на приготування індивідуальних ліків, які не є комерційно доступними, для задоволення потреб окремих пацієнтів. Традиційне виготовлення екстемпоральних лікарських засобів (ЕЛЗ) здійснюється невеликими серіями або за індивідуальним рецептом лікаря. Проте, вимоги до регуляторного контролю, контролю якості є значно меншими у порівнянні з лікарськими засобами промислового виробництва, що, в свою чергу, несе додаткові ризики для пацієнтів. Готові лікарські засоби (ГЛЗ) виробляються відповідно до правил належної виробничої практики (GMP), які є загальними та регулюють виробництво і контроль якості фармацевтичної продукції. У той час для ЕЛЗ правила GMP не є обов'язковими, ряд випробувань для оцінки якості продукції є неприйнятними, до того ж ЕЛЗ не оцінюються клінічними дослідженнями з точки зору безпеки та ефективності. Для світової практики аптечного виготовлення характерна відсутність стандартних підходів до контролю якості, стабільності, строків придатності, маркування продукції, призначення, інформації щодо безпечного використання, повідомлення про побічні ефекти та ін. Деякі аптеки займаються діяльністю, яка виходить за межі традиційної рецептури, – виготовляють ЕЛЗ про запас, внутрішньоаптечну заготовку. У зв'язку з чим вітчизняними та іноземними фахівцями піднімаються питання, що потребують вирішення, за відсутності обов'язкових вимог GMP для ЕЛЗ, підвищення ризиків для пацієнтів та потенціалу виникнення помилок приготування.

Аналіз діяльності виробничих аптек півдня Нігерії, України, Таджикистану та інших країн вказують на ряд особливостей і проблем, пов'язаних з якістю ЕЛЗ, кваліфікацією персоналу, відсутністю або недосконалістю національних стандартів виготовлення та контролю якості ЕЛЗ, відсутністю досліджень стабільності. Разом з тим встановлено, що світовою тенденцією при виготовленні ЕЛЗ є використання комерційно доступних препаратів з фіксованими дозами (таблетки, капсули та розчини для ін'єкцій) у якості активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ). Досить часто рідкі лікарські засоби для перорального застосування у вигляді суспензій, сиропів прописуються для дітей із використанням різноманітних дисперсійних середовищ та брендів ГЛЗ, що ускладнює як оцінку якості, так і визначення термінів придатності. У зв'язку з чим розробка і валідація методик контролю якості ЕЛЗ, дослідження їх стабільності, термінів придатності є одним з необхідних напрямків досліджень сучасної фармацевтичної науки.

Дисертаційна робота присвячена опрацюванню та валідації методик кількісного визначення фуросеміду, гідрохлортіазиду, каптоприлу та спіронолактону у лікарських формах у вигляді суспензій аптечного виготовлення, а також дослідженню їх терміну придатності та певних умов зберігання, з'ясуванню відповідності якості суспензій аптечного виготовлення фармакопейним вимогам.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.** Робота є частиною наукових досліджень, що проводяться співробітниками хімічних кафедр Національного фармацевтичного університету (НФаУ) у напрямку стандартизації лікарських засобів аптечного виготовлення і розробки та валідації

методик контролю якості лікарських засобів. Дисертація виконана у відповідності з планом науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету за темою «Розробка та валідація методів контролю якості лікарських засобів аптечного і промислового виробництва» (№ державної реєстрації 0114U000949); затвердженою темою на засіданні вченої ради НФаУ (протокол № 8 від 29.04.2015 р.); внесеними редакційними змінами у назві теми на засіданні вченої ради НФаУ (протокол № 2 від 30.10.2017 р.).

**Мета і завдання дослідження.** Метою роботи була розробка та валідація методик контролю якості суспензій аптечного виготовлення, що містять діуретики – фуросемід, гідрохлортіазид спіронолактон та каптоприл, експериментальне дослідження фізичної, хімічної та мікробіологічної стабільності досліджуваних суспензій; встановлення відповідності суспензій аптечного виготовлення вимогам ДФУ.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

- вивчити асортимент ЕЛЗ, що виготовляють в госпітальних аптеках Нігерії;
- дослідити проблеми виготовлення ЕЛЗ в лікарняних аптеках південної Нігерії;
- проаналізувати сучасні методи контролю якості діуретиків у лікарських засобах
- розробити та валідувати методики контролю якості суспензій аптечного виготовлення, що містять фуросемід, гідрохлортіазид, спіронолактон, каптоприл;
- визначити показники якості досліджуваних суспензій та оцінити їх відповідність фармакопейним вимогам;
- вивчити фізичну, хімічну, мікробіологічну стабільність суспензій аптечного виготовлення, що містять фуросемід, гідрохлортіазид, спіронолактон, каптоприл.

*Об'єкт дослідження* – контроль якості та стабільність суспензій аптечного виготовлення, що містять фуросемід, гідрохлортіазид, спіронолактон, каптоприл.

*Предмет дослідження* – методики ідентифікації та кількісного визначення фуросеміду, гідрохлортіазиду, каптоприлу та спіронолактону, вибір показників і критеріїв якості суспензій аптечного виготовлення, обґрунтування терміну придатності і умов зберігання, встановлення відповідності досліджуваних суспензій аптечного виготовлення фармакопейним вимогам.

**Методи дослідження.** При виконанні експериментальних досліджень використовували фізичні, фізико-хімічні методи аналізу (тонкошарова хроматографія (ТШХ), потенціометричне визначення рН, капілярна віскозиметрія, визначення об'єму седиментації, абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій і видимій областях). Для ідентифікації АФІ у досліджуваних зразках використовували реакції ідентифікації та метод ТШХ, кількісне визначення компонентів здійснювали методами аргентометрії та спектрофотометрії в УФ та видимій областях. Мікробіологічну чистоту вивчали методами глибинного і двошарового висівання. Встановлювали фармако-технологічні показники якості суспензій: розмір часток методом мікроскопії, однорідність дозованих одиниць методом спектрофотометрії в ультрафіолетовій та видимій областях, однорідність маси доз, об'єм седиментації. Валідацію аналітичних методик проводили у відповідності до стандартизованої процедури валідації аналітичних методик для ЕЛЗ, що відповідає фармакопейним вимогам. Обробку експериментальних даних

хімічного експерименту здійснювали статистичними методами обробки експериментальних даних із використанням пакету програм Microsoft Office.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше проведений аналіз якості суспензій аптечного виготовлення, які виготовлені із субстанцій та ГЛЗ фуросеміду, каптоприлу, гідрохлортіазиду та спіронолактону.

Опрацьовані методики та показана можливість здійснення ідентифікації гідрохлортіазиду, фуросеміду, спіронолактону та каптоприлу у складі суспензій аптечного виготовлення за допомогою реакцій ідентифікації та методик ТШХ, здійснена валідаційна оцінка аналітичних методик. Вперше розроблені та валідовані методики кількісного визначення гідрохлортіазиду, фуросеміду, спіронолактону у суспензіях аптечного виготовлення методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ та видимій областях (заявки на патент України на корисну модель № U 2017 10523 від 31.10.2017 р., № U 2017 11112 від 13.11.2017 р., № U 2017 11089 від 13.11.2017 р. відповідно). Розроблено селективну методику кількісного визначення каптоприлу методом аргентометрії у комбінованій лікарській формі з фуросемідом.

Вперше здійснено оцінку фармако-технологічних показників якості суспензій аптечного виготовлення, що містять фуросемід, гідрохлортіазид, спіронолактон та каптоприл, на відповідність фармакопейним вимогам: розмір часток, однорідність дозованих одиниць, однорідність маси доз, об'єм седиментації.

Уперше за результатами експериментальних досліджень фізичної, хімічної та мікробіологічної стабільності встановлені терміни придатності та умови зберігання суспензій, що містять фуросемід, гідрохлортіазид, спіронолактон, каптоприл; вивчені фактори, що впливають на стабільність досліджуваних лікарських форм.

**Практичне значення отриманих результатів.** Отримані результати досліджень мають важливе практичне значення для опрацювання підходів до здійснення стандартизації лікарських засобів аптечного виготовлення, зокрема визначення підходів вивчення стабільності, терміну придатності суспензій екстемпорального виготовлення, до складу яких входять гідрохлортіазид, фуросемід, каптоприл та спіронолактон.

Обґрунтовані практичні рекомендації стосовно термінів та умов зберігання суспензій з гідрохлортіазидом, фуросемідом, каптоприлом та спіронолактоном, які були виготовлені як із лікарських субстанцій, так і з готових лікарських форм промислового виробництва. За результатами проведених експериментальних досліджень стабільності одно- та двокомпонентних суспензій розширені їх терміни придатності з 10 до 30-ти діб. Результати з розробки та валідації методик, вивчення термінів та умов зберігання суспензій можуть бути використані в подальшому при розробці монографій на лікарські засоби виготовлені в аптеках.

Окремі результати з вивчення стабільності суспензій гідрохлортіазиду, фуросеміду та спіронолактону, методики ідентифікації та кількісного визначення запроваджені в роботу аптек і лабораторій з контролю якості лікарських засобів та медичної продукції Сумської, Житомирської областей, а також у науково-педагогічний процес кафедр вищих навчальних закладів.

**Особистий внесок здобувача.** Наукові дослідження за темою дисертаційної роботи проводилися у співавторстві з науковим керівником к. фарм. н., доц.

Здориком О. А., д. фарм. н., проф. Георгіянц В. А., к.фарм. н., доц. Бевз Н. Ю., к. фарм. н., доц. Грудько В. О. Основна частина виконана автором особисто, а саме:

- інформаційно-патентний пошук та аналіз джерел літератури щодо методик контролю якості діуретиків у лікарських засобах, підходів до вивчення стабільності, показників якості суспензій, відповідність їх фармакопейним вимогам;
- вивчений асортимент та визначені проблеми виготовлення ЕЛЗ в лікарняних аптеках південної Нігерії
- вивчені стандартизовані процедури валідації методик контролю якості кількісного визначення та ідентифікації активних фармацевтичних інгредієнтів в екстемпоральних лікарських засобах для проведення експерименту;
- розроблені і валідовані методики ідентифікації та кількісного визначення фуросеміду, гідрохлортіазиду, спіронолактону, каптоприлу;
- обрані специфікації для вивчення стабільності суспензій аптечного виготовлення, що містять діуретики;
- досліджена стабільність екстемпоральних лікарських засобів, що містять діуретики.

Разом з науковим керівником к. фарм. н., доц. Здориком О. А. визначені напрямки досліджень, сплановано експеримент, проаналізовано і узагальнено експериментальний матеріал за даними фізичних та фізико-хімічних досліджень.

**Апробація результатів дисертації.** Основний зміст дисертаційної роботи був представлений на науково-практичних конференціях: «Topical issues of new drugs development» (Харків, 2015, 2016, 2017), The 7th International Pharmaceutical Conference «Science and practice» (Каунас, Литва, 2016); «Modern aspects of extemporaneous allopathic, homeopathic and cosmetic medicines» (Харків, 2017), X Ukrainian scientific conference for students and young scientists with international participation «Current chemical Problems» (Вінниця, 2017), VI науково-практичній конференції з міжнародною участю «Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике» (Алмати, Казахстан, 2017).

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 7 статей у фахових наукових журналах, 9 тез доповідей і матеріалів наукових конференцій.

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 193 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу та чотирьох розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 139 сторінки друкованого тексту. Робота ілюстрована 38 таблицями, 27 рисунками, 3 схемами. Список використаних джерел містить 150 найменувань, з них 8 кирилицею та 142 латиницею.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Розділ 1. Особливості виготовлення лікарських засобів в аптеках Нігерії (Огляд літератури).** Огляд літератури присвячено вивченню досвіду виготовлення ЕЛЗ у Федеративній Республіці Нігерія, факторам, що впливають на стабільність лікарських засобів та огляду існуючих методів контролю якості фуросеміду, гідрохлортіазиду, спіронолактону та каптоприлу. Приділено увагу історії і традиціям аптечного виготовлення, законодавчому регулюванню, фармацевтичній

освіті, особливостям та проблемам аптечного виготовлення ЕЛЗ в Нігерії. Розглянуті найбільш типові фактори, що впливають на фізичну, хімічну, мікробіологічну стабільність лікарських засобів. Вивчені фізичні, хімічні властивості методики ідентифікації та кількісного визначення фуросеміду, гідрохлортіазиду, спіронолактону та каптоприлу.

## **Розділ 2. Вибір об'єктів дослідження та характеристика методів аналізу.**

Вперше в лікарняних аптеках Нігерії було проведено анкетування серед фармацевтів штату Ріверс. За результатами проведеного опитування були виявлені проблеми, які стосуються: браку кваліфікованих спеціалістів, ведення електронної документації, фінансування, обладнання та планування виробничих приміщень, забезпечення АФІ та допоміжними речовинами, відсутності національних стандартів виготовлення ЕЛЗ, внутрішньоаптечного контролю якості, дослідження стабільності ЕЛЗ. За результатами аналізу екстемпоральної рецептури лікарняних аптек (1157 прописів) півдня Нігерії у 2014-2015 рр. було встановлено, що більшість ЕЛЗ є рідкими лікарськими засобами для перорального застосування та виготовляються з комерційно доступних пероральних твердих лікарських форм та готових основ. Значним попитом користуються ЕЛЗ, до складу яких входять противиразкові, антибактеріальні, діуретичні, протипухлинні, вітамінні, протитуберкульозні, аналгетичні, урантисептичні, анти-ВІЛ препарати. Достатньо часто прописуються ЕЛЗ, що містять гідрохлортіазид, фуросемід, каптоприл та спіронолактон, для використання у педіатричній практиці.

Враховуючи результати проведеного аналізу рецептури ЕЛЗ на півдні Нігерії, Республіці Таджикистан, Україні для дослідження були обрані суспензії, що містять діуретики: фуросемід, гідрохлортіазид, спіронолактон, склад яких наведений нижче:

### **Склад 1**

Фуросемід 0.5 г  
Простий сироп 100 мл

### **Склад 2**

Фуросемід з таблеток 0.5 г  
Простий сироп 100 мл

### **Склад 3**

Гідрохлортіазид 0.5 г  
Простий сироп 100 мл

### **Склад 4**

Гідрохлортіазид з таблеток 0.5 г  
Простий сироп 100 мл

### **Склад 5**

Спіронолактон 0.5 г  
Простий сироп 100 мл

### **Склад 6**

Спіронолактон з таблеток 0.5 г  
Простий сироп 100 мл

### **Склад 7**

Фуросемід 0.25 г  
Каптоприл 0.25 г  
Простий сироп 100 мл

У розділі описані методи дослідження та випробування, які використовувалися для контролю якості та дослідження стабільності суспензій аптечного виготовлення: органолептичний контроль, потенціометричне визначення рН, метод капілярної віскозиметрії, визначення об'єму седиментації, ТШХ, абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій і видимій областях, валідація аналітичних методик, мікробіологічна чистота лікарських засобів, статистична обробка результатів хімічного експерименту. У розділі наведений перелік АФІ,

допоміжних речовин та обладнання, що використовувалися при виконанні експериментальних досліджень.

**Розділ 3. Розробка та валідація методик контролю якості фуросеміду, каптоприлу, гідрохлортіазиду, спіронолактону у суспензіях аптечного виготовлення.** Створення та виписування нової рецептури ЕЛЗ, введення до складу готових лікарських форм, сучасних АФІ, допоміжних речовин потребує від аптек та лабораторій як розробки методів проведення внутрішньоаптечного контролю якості, так і вивчення стабільності. І якщо письмовий, опитувальний, органолептичний, фізичний контроль та контроль при відпуску є стандартними видами контролю, то для проведення хімічного контролю є необхідними розробка та валідація методик для конкретної лікарської форми, незалежно підлягає даний ЛЗ повному, обов'язковому або вибірковому виду контролю чи ні. Вибір і розробку методик контролю якості фуросеміду у лікарських засобах аптечного виготовлення здійснювали виходячи із фізико-хімічних властивостей субстанцій, лікарської форми, враховуючи відомі методи контролю якості.

Для ідентифікації фуросеміду у суспензіях аптечного виготовлення запропоновано використовувати кольорові реакції з реагентами: солями металів купрум (II) сульфату, кобальт (II) хлориду, ферум (III) хлориду у лужному середовищі. При валідації запропонованих методик порівнювали ефекти реакцій з контрольним та холостим дослідом. Дані методики випробовували на модельних розчинах суспензій фуросеміду складу 1 та 2 у діапазоні визначення від 80 % до 120 % від прописаної кількості в умовах трьох різних лабораторій. В результаті проведених досліджень з валідації методик ідентифікації фуросеміду встановлено, що у концентраційному діапазоні 4–6 мг/мл методики характеризуються 100 % достовірністю результатів виявлення фуросеміду. Для підтвердження вмісту фуросеміду у присутності каптоприлу (суспензія склад 7) було апробовано методику із реактивом ферум (III) сульфату. Експериментально було доведено, що дана реакція є специфічною для ідентифікації фуросеміду у комбінованій лікарській формі, у концентраційному діапазоні 2–10 мг/мл фуросеміду у досліджуваних зразках імовірність виявлення фуросеміду складає 100 %. Для експрес аналізу фуросеміду у суспензіях перевіряли функціональну придатність використання паперових тест-систем, модифікованих реактивами металів. За результатами експериментальних досліджень було встановлено, що для ідентифікації фуросеміду у суспензіях аптечного виготовлення придатна тест-система, модифікована ферум (III) хлоридом, що було підтверджено шляхом повторення дослідів на модельних зразках у концентраційному діапазоні 4–6 мг/мл, до того ж за допомогою даної тест-системи можна ідентифікувати фуросемід у комбінованій лікарській формі з каптоприлом.

При розробці методики ТШХ аналізу фуросеміду підбирали склад рухомої фази, факторами вибору були: знаходження плями досліджуваного АФІ у центральній частині хроматограми, можливість розділення фуросеміду і інших досліджуваних діуретиків і каптоприлу, можливість використання системи для дослідження стабільності шляхом перевірки впливу стрес-факторів. При експериментальному дослідженні рухомої фази складу хлороформ–етилацетат Р–кислота оцтова льодяна Р (7:3:0.5) було встановлено, що вона дозволяє розділити



фуросемід та каптоприл  $R_f$  фуросеміду – 0.43, каптоприлу – 0.28. Плями випробуваних розчинів знаходяться на рівні плям розчинів порівняння та відповідають їм за розміром та кольором при детекції як в УФ-світлі, так і після обробки парами йоду. Для обраної методики досліджували прецизійність на одній пластинці, на різних пластинках в одній лабораторії. Отримані результати хроматографування свіжоприготовлених розчинів фуросеміду 0.4 мг/мл показали, що методика придатна для ідентифікації фуросеміду в препараті, значення  $R_f$  варіювало у межах 0.43–0.44. З метою підтвердження, що методика може бути використана для дослідження хімічної стабільності суспензій фуросеміду аптечного виготовлення вивчали вплив стрес-факторів на фуросемід та досліджували можливість ідентифікації продуктів розкладу фуросеміду за даною методикою (рис. 1).

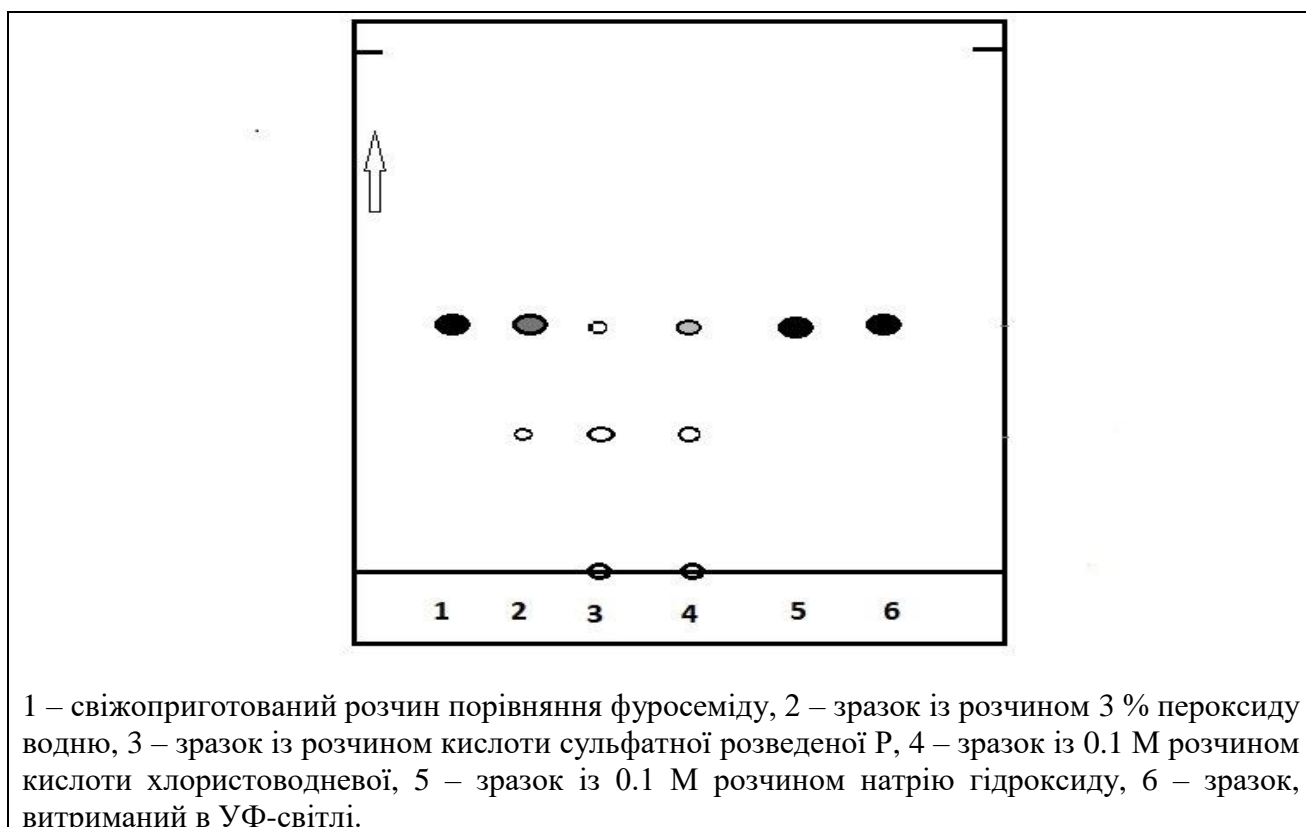


Рис. 1 Схема хроматограми ідентифікації фуросеміду та вплив стрес-факторів (детекція – УФ світло 254 нм)

Під впливом стрес-факторів (окиснення та вплив кислот, треки 2–4) фуросемід розкладається, що підтверджується появою додаткових зон на хроматограмі та зміною забарвлення, розміру та інтенсивності плям на рівні маркеру. На треках 3 та 4 на лінії старту виявлені флуоресціюючі плями жовтого та фіолетового кольору, що свідчить про нестабільність фуросеміду при дії кислот. Розроблена методика апробована для ідентифікації каптоприлу і фуросеміду (склад 7). При вивченні хроматограм під УФ-світлом для всіх випробуваних проб і еталонного розчину спостерігали плями з синьою флуоресценцією, що відповідають плямам фуросеміду.  $R_f$  фуросеміду склав 0.43, а при  $R_f$  0.28 спостерігали темні плями, що відносяться до каптоприлу. При проявленні пластинки парами йоду спостерігали жовті плями, що відповідають каптоприлу і фуросеміду.

Для кількісного визначення фуросеміду у суспензіях аптечного виготовлення запропоновано спектрофотометричну методику, яка полягає у приготуванні розведення суспензії фуросеміду  $1 \cdot 10^{-5}$  г/мл із використанням у якості розчинника 0.1 М розчину натрію гідроксиду, аналітична довжина хвилі 271 нм, питомий показник поглинання фуросеміду  $A$  (1 %, 1 см) при 271 нм складає 580. При оцінюванні невизначеності аналітичної методики враховували невизначеність пробопідготовки та невизначеність кінцевої аналітичної операції. Невизначеність аналітичної методики складає 0.72 %, що не перевищує критичного значення.

На рис. 2 наведені спектри поглинання аналітичних розчинів субстанції фуросеміду, таблеток фуросеміду та простого сиропу. Експериментально підтверджено, що ні сахароза, ні допоміжні речовини, що входять до складу таблеток, істотно не впливають на показник оптичної густини за аналітичної довжини хвилі. Вплив плацебо на загальне поглинання складає 0.17 %. Максимуми поглинання як для субстанції, так і для таблеток фуросеміду збігаються за довжини хвилі 271 нм.

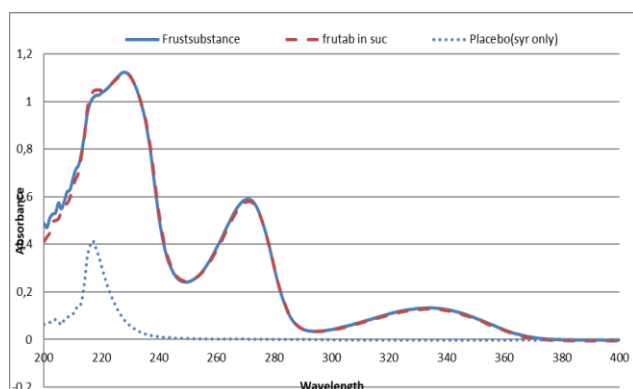


Рис. 2 Спектри поглинання субстанції фуросеміду, таблеток фуросеміду та сахарози

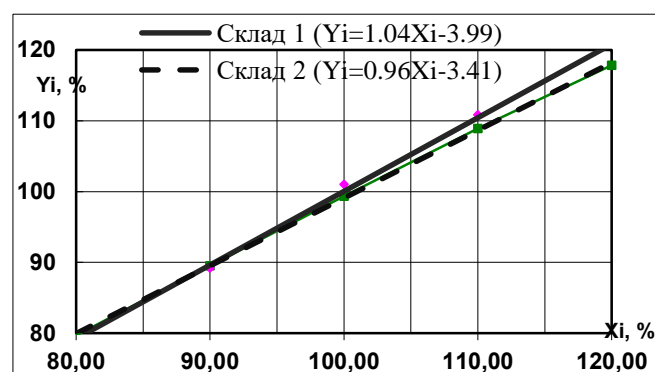


Рис. 3 Графік залежності оптичної густини від концентрації фуросеміду в нормалізованих координатах

Оптичну густину вимірювали для зразків у концентраційному діапазоні  $0.8 \cdot 10^{-5}$ – $1.2 \cdot 10^{-5}$  г/мл, що відповідає 80–120 % номінального вмісту фуросеміду у 5 мг/мл сиропі. На рис. 3 наведені графіки залежності оптичної густини від концентрації фуросеміду, результати підтверджують лінійність методики визначення фуросеміду в усьому діапазоні концентрацій (табл. 1).

Для оцінки прецизійності, внутрішньолaborаторної точності та відтворюваності оптичну густину досліджували для зразків приготовлених із субстанції та таблеток в умовах різних лабораторій, різними аналітиками (табл. 1). За результатами міжlaborаторного дослідження встановлено, що об'єднане середнє складає 99.95 %, загальне відносне стандартне відхилення (RSD,%), яке є критерієм прецизійності – 0.43 %, інтервал ненадійності – 0.73 %. Експериментально підтверджено можливість використання даної методики для кількісного визначення фуросеміду у суспензії складу 7 у присутності каптоприлу. Систематична похибка методики склала 0.25 %, відносне стандартне відхилення 0.33 %, інтервал ненадійності 0.59 %. Виконуються вимоги до параметрів лінійної залежності: кутовий коефіцієнт лінійного рівняння – 1.02 %, вільний член – 1.78 %, залишкове стандартне відхилення 0.22 %, коефіцієнт кореляції 0.9999.

**Результати визначення правильності, прецизійності та лінійності аналітичної методики спектрофотометричного визначення фуросеміду**

Валідаційні характеристики	Склад 1	Склад 2
<i>Правильність та прецизійність</i>		
$Z, \%$	99.92	99.14
$S_z, \%$	0.99	0.54
$\Delta_z, \%$	1.74	0.95
$\delta, \%$	0.08	0.86
<i>Лінійність</i>		
$b$	1.04	0.96
$S_b$	0.0134	0.0055
$a$	-3.99	3.42
$S_a$	1.3501	0.5546
$S_o$	0.73	0.30
$r$	0.9989	0.9998

Розроблено методику ідентифікації гідрохлортіазиду у суспензіях аптечного виготовлення, яка ґрунтується на утворенні ауринового барвника. Досліджено достовірність ефекту реакції ідентифікації гідрохлортіазиду у суспензії аптечного виготовлення з спиртовим розчином кислоти саліцилової у середовищі розчину кислоти сульфатної у концентраційному діапазоні 0.05–30 мг/мл (рис. 4). Імовірність виявлення гідрохлортіазиду у кількості 2.5 мг складає 0.95. Встановлено, що суттєвим фактором, що впливає на ефект реакції є кількість гідрохлортіазиду, що беруть для аналізу. При кількості гідрохлортіазиду від 3.5 мг/мл до 30 мг/мл за даною методикою достовірність ефекту реакції складає 100 %.

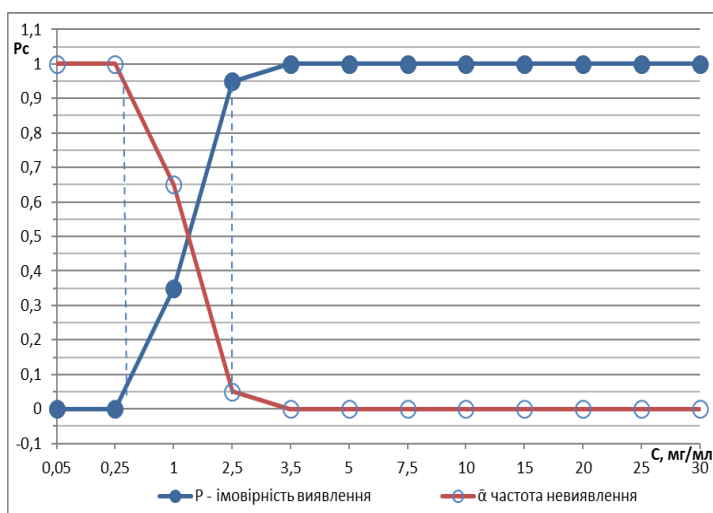


Рис. 4 Крива ефективності реакції гідрохлортіазиду з розчином кислоти саліцилової та кислоти сульфатної концентрованої

Уперше для ідентифікації та дослідження стабільності гідрохлортіазиду у суспензії аптечного виготовлення розроблено методику його ідентифікації методом ТШХ. За результатами валідації методики були обрані наступні умови хроматографування: ТШХ-пластинки з шаром силікагелю на алюмінієвій підложці з флуоресцентним індикатором 254 нм, об'єм нанесення як досліджуваних зразків, так і стандартних зразків 5 мкл (25 мкг), рухома фаза: етилацетат–метанол–амоніак у співвідношенні (8:2:0.5), відстань хроматографування – 8 см, виявлення – перегляд в УФ-світлі при 254 нм. Досліджено вплив стрес-факторів (окиснення, впливу кислот

та луку, дії світла) на результати хроматографування. Підтверджено, що розроблена методика дозволяє виявити продукти деградації гідрохлортіазиду за появою додаткових зон на хроматограмі, зміною розміру та інтенсивності плям на рівні маркеру (рис. 5). Для дослідження специфічності підтверджували рухливість плями гідрохлортіазиду в обраній системі. Максимальна різниця величин  $R_f$  у межах однієї пластини (для двох серій пластин) не повинна перевищувати значення 0.02. За результатами досліджень на одній та різних пластинах величина  $R_f$  гідрохлортіазиду варіювала у межах 0.59–0.61.

Для кількісного визначення гідрохлортіазиду у суспензіях аптечного виготовлення уперше запропоновано методику прямої спектрофотометрії, яка полягає у приготуванні розведення гідрохлортіазиду  $1 \times 10^{-5}$  г/мл у 0.01 М розчині натрію гідроксиду та вимірюванні оптичної густини за довжини хвилі 273 нм. Розрахунок кількості гідрохлортіазиду здійснюють методом питомого показника поглинання.

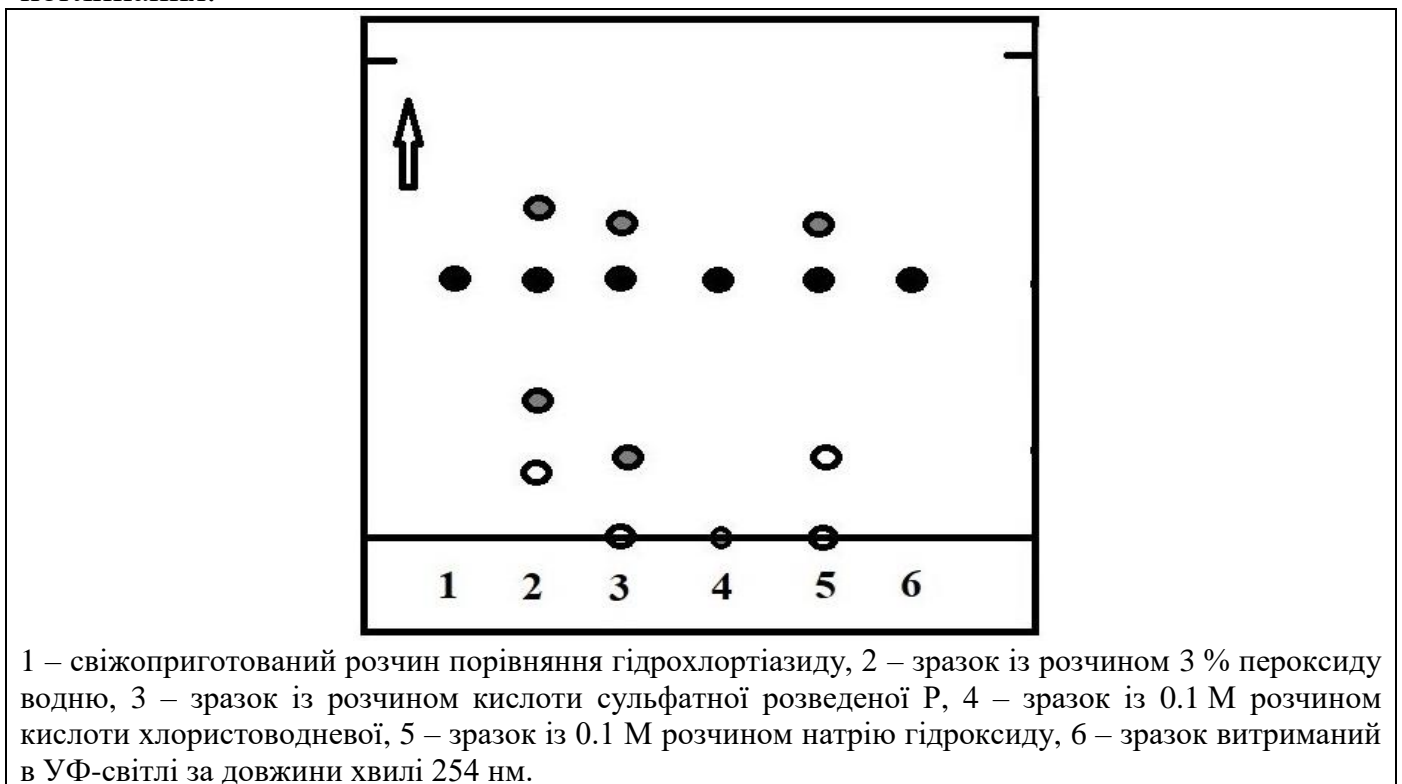


Рис. 5 Схема хроматограми ідентифікації гідрохлортіазиду та вплив стрес-факторів (детекція – УФ світло 254 нм)

Таке саме розведення суспензій гідрохлортіазиду, виготовлених із субстанції та порошку розтертих таблеток (склад 3 і 4), простого сиропу, використовували для дослідження спектрів поглинання (рис. 6). При розробці методики визначено, що основа суспензії та допоміжні речовини таблеток не впливають на оптичну густину, вплив плацебо складає 1.15 %.

Для методики досліджені валідаційні характеристики: правильність, збіжність, лінійність, робасність, відтворюваність. При оцінці робасності досліджували вплив зміни довжини хвилі  $\pm 1$  нм, зміну часу пробопідготовки та стабільність аналітичних розчинів протягом години. Для оцінки лінійності методики отримані результати переводили у нормалізовані координати та статистично обробляли методом

найменших квадратів. Експериментально встановлені критерії лінійності для суспензій складу 3:  $b = 0.99$ ,  $a = 0.38$ ,  $S_r = 0.07$ ,  $r = 0.9999$ , складу 4:  $b = 0.99$ ,  $a = 0.53$ ,  $S_r = 0.07$ ,  $r = 0.9999$  (рис. 7), не перевищують критерії прийнятності валідаційних характеристик. За результатами валідації встановлено, що методика характеризується відтворюваністю, при довірчій імовірності 95 %, відхилення одиничного значення становить  $99.73 \pm 0.84$  %.

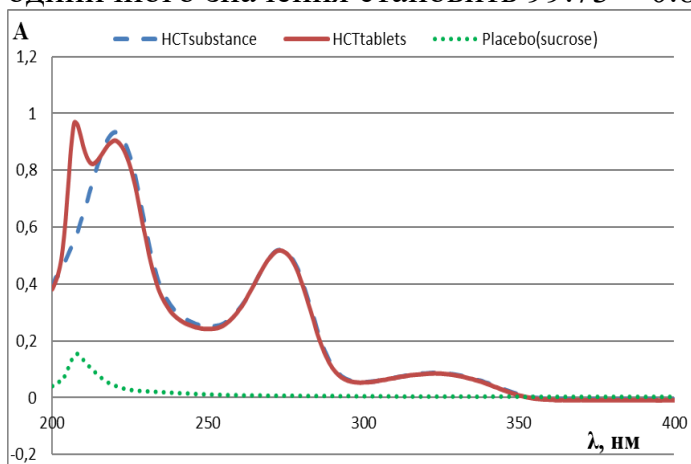


Рис. 6 Спектри поглинання субстанції гідрохлортіазиду, таблеток гідрохлортіазиду та сахарози у лужному середовищі

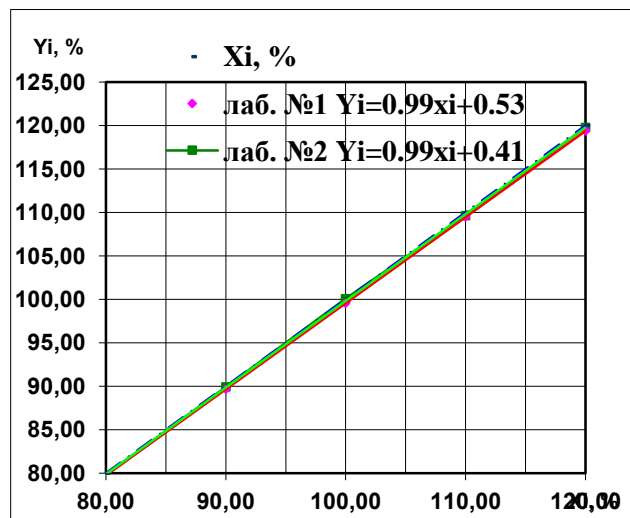


Рис. 7 Графік залежності оптичної густини від концентрації гідрохлортіазиду в нормалізованих координатах (склад 4)

Для ідентифікації спіронолактону у суспензії аптечного виготовлення запропоновано реакцію ідентифікації із кислотою сульфатною і методику ТШХ. При додаванні до розчину спіронолактону кислоти сульфатної з'являється помаранчеве забарвлення, а в УФ-світлі спостерігається жовто-зелена флуоресценція. Для методики досліджено відтворюваність ефекту реакції у концентраційному діапазоні 0.05–6 мг/мл та досліджено вплив на ефект реакції основи суспензії та допоміжних речовин, шляхом порівняння результатів основного, холостого та контрольного дослідів. Достовірність ефекту реакції складає 100 % у концентраційному діапазоні від 2.5 мг/мл до 6 мг/мл.

Уперше розроблено методику ідентифікації спіронолактону у суспензії аптечного виготовлення методом тонкошарової хроматографії. Підібрана рухома фаза гексан Р–етилацетат Р–вода Р (4.8:14.8:0.4) для ідентифікації спіронолактону методом тонкошарової хроматографії (рис. 8). Рекомендована відстань хроматографування складає 8 см, об'єм нанесення 10 мкл (1 мкг), виявлення – перегляд в УФ-світлі при 254 нм, оброблення парами йоду. З метою підтвердження можливості виявлення продуктів деградації спіронолактону з допомогою обраної рухомої фази були проведені дослідження впливу стрес факторів. Для чого до випробуваних розчинів додавали розчини кислот, лугу, гідроген пероксиду, та опромінювали зразок УФ-світлом (254 нм) протягом доби (рис. 8).

Уперше кількісне визначення спіронолактону у суспензіях аптечного виготовлення запропоновано проводити методом абсорбційної спектрофотометрії. Пробопідготовка полягає у приготуванні розведення спіронолактону  $1 \cdot 10^{-5}$  г/мл у

96% спирті етиловому, оптичну густина вимірюють за довжини хвилі 238 нм. Специфічність методики вивчали шляхом порівняння спектрів поглинання субстанції, таблеток спіронолактону та сахарози (рис. 9). Вплив плацебо на оптичну густина аналітичного розчину складає 2.34 %, що знаходиться в межах критерію ( $\delta_{\text{noise}} = 2.34\% \leq \delta_{\text{abs}}=3.01$ ).



Рис. 8 Схема хроматограми ідентифікації спіронолактону та вплив стрес-факторів (детекція – УФ світло 254 нм)

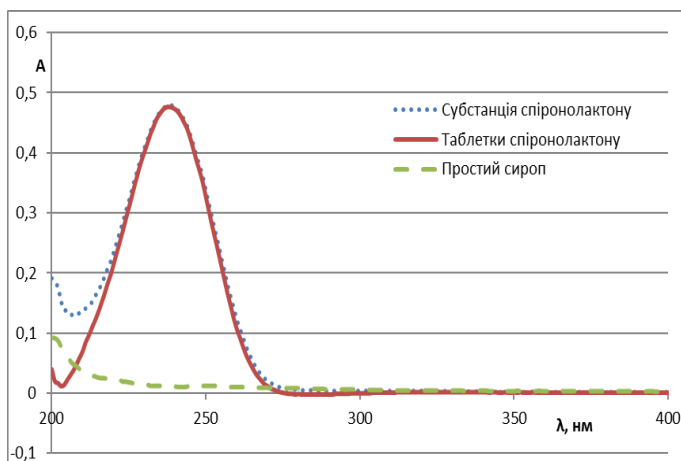


Рис. 9 Спектри поглинання субстанції, таблеток спіронолактону та сахарози при розведенні у 96% спирті

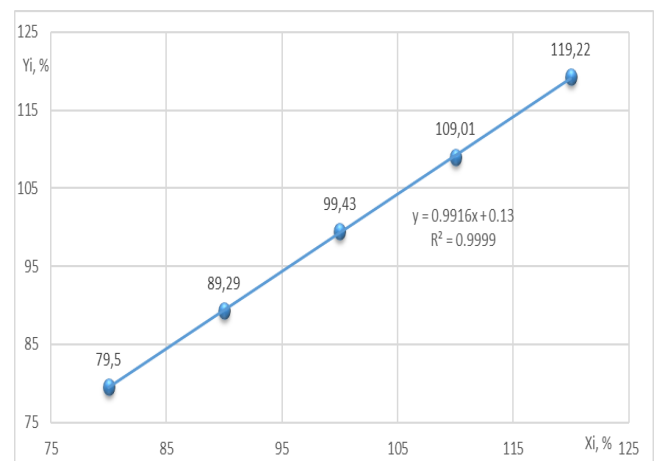


Рис. 10 Графік залежності оптичної густини від концентрації спіронолактону в нормалізованих координатах (суспензія складу б)

При вивченні лінійності методики досліджували оптичну густина зразків в діапазоні концентрацій  $8 \times 10^{-3}$ – $1.2 \times 10^{-2}$  мг/мл, що відповідає 80–120 % від номінальної концентрації спіронолактону в суспензії. У результаті експериментальних



досліджень було підтверджено відповідну лінійну залежність, отримані рівняння кореляції для зразків суспензій складу 5 і 6 –  $Y = 0.9985 \cdot X + 1.23$  і  $Y = 0.9916 \cdot X + 0.13$  відповідно (рис. 10). Метрологічні характеристики методики відповідають валідаційним критеріям для допусків вмісту  $\pm 10\%$ . Методика може бути відтворена в умовах лабораторії при довірчій імовірності 95% відхилення одиничного значення становить  $99.84 \pm 0.75\%$ .

Для ідентифікації каптоприлу у присутності фуросеміду була розроблена реакція ідентифікації з натрію нітропрусидом у присутності розчину аміаку (випробування на сульфгідрильну групу). При валідації методики порівнювали ефекти реакцій холостого та контрольного дослідів та вплив допоміжних речовин та фуросеміду на результати аналізу. Достовірність ефекту реакції складає 100% у концентраційному діапазоні 2.5–15 мг/мл. Кількісне визначення каптоприлу у двокомпонентній лікарській формі запропоновано проводити методом прямої аргентометрії, індикатор – бромфеноловий синій. Методика характеризується прийнятною правильністю, лінійністю та збіжністю результатів. Систематична похибка методики складає 1.08%, стандартне відхилення 0.28%, довірчий інтервал 0.51%, коефіцієнти лінійного рівняння  $b = 0.99$ ,  $a = 0.78$ , величина залишкового стандартного відхилення 0.48%.

**Розділ 4. Дослідження стабільності суспензій аптечного виготовлення, що містять гідрохлортіазид, фуросемід, спіронолактон.** Виходячи з аналізу існуючих підходів з вивчення стабільності лікарських засобів були обрані показники якості для дослідження стабільності суспензій, що містять фуросемід, гідрохлортіазид, каптоприл та спіронолактон. Попередньо для суспензій досліджувалися такі показники якості, як однорідність маси доз, однорідність дозованих одиниць, об'єм седиментації та мікроскопічне дослідження розміру часток. Фізичну стабільність модельних зразків досліджували за органолептичними показниками, рН, кінематичною в'язкістю. Хімічну стабільність визначали за допомогою розроблених методик ідентифікації методом ТШХ та кількісного визначення методом прямої спектрофотометрії. Також для кожного з модельних зразків досліджували мікробіологічну чистоту протягом 30 діб.

За результатами досліджень показників якості суспензій аптечного виготовлення встановлено, що вони відповідають фармакопейним вимогам за показниками однорідність маси доз, однорідність дозованих одиниць. За результатами мікроскопії було встановлено, що розмір часток у суспензіях, що містять субстанцію, не перевищує 20 мкм, що містять порошок розтертих таблеток не перевищує 50 мкм (табл. 2), що не перевищує критерій 1–100 мкм.

Дослідження стабільності суспензій фуросеміду 5 мг/мл проводили на трьох серіях, які були виготовлені із субстанції та порошку подрібнених таблеток двох різних виробників «Артеріум» –  $T_1$  і «Sanofi» –  $T_2$ . Кожну з цих серій аналізували одразу після приготування (день 0) і на 7, 15, 23, 30 добу. Зразки зберігали у скляних флаконах, захищених від дії світла, при двох температурних режимах при  $5 \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$  та  $23 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ . Результати однорідності вмісту для суспензій фуросеміду складу 2 різних виробників складають 10.56%, 5.76%, що не перевищує критичне значення  $\leq 15.0\%$ . Протягом 30-денного періоду дослідження не було виявлено суттєвих змін за зовнішнім виглядом, запахом, кольором, смаком. Значення рН знаходились в

межах  $\pm 0.05$ . Кінематична в'язкість при певному діапазоні температур зберігання відрізнялися не більше ніж на 1 %. Об'єм седиментації зразків протягом терміну зберігання 30 діб залишався на рівні  $\geq 0.94$ . При оцінці результатів ідентифікації фуросеміду методом ТШХ не спостерігалось утворення нових плям, відмінних від основної плями фуросеміду, коефіцієнт утримування відповідних плям не виходив за межі 0.02.

Таблиця 2

## Показники якості суспензій аптечного виготовлення

Склад	Однорідність дозованих одиниць ( $\leq 15.0$ %)	Однорідність маси доз ( $\leq 10$ %)	Об'єм седиментації (макс. $\geq 0.85$ )
Склад 1	9.6	5.23	0.99
Склад 2	10.56	7.47	0.94
Склад 2	5.76	1.14	0.95
Склад 3	8.35	3.10	0.99
Склад 4	11.04	3.58	0.96
Склад 4	6.26	2.49	0.97
Склад 5	9.38	0.20	0.99
Склад 6	6.85	4.57	0.98
Склад 6	7.75	7.45	0.98
Склад 7	8.59	4.22	0.99

За результатами кількісного визначення методом УФ-спектрофотометрії на 30 добу кількість фуросеміду у зразках знаходилась у межах 99.31–99.96 % від початкової концентрації. Визначення мікробіологічної чистоти зразків суспензій фуросеміду протягом 30 діб методом двошарового висівання показало, що загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів (ТАМС) не перевищує 100 КУО/мл, загальне число дріжджових і плісневих грибів (ТУМС) не перевищує 10 КУО/г, *Escherichia coli* протягом дослідження виявлено не було.

Оцінку стабільності суспензій гідрохлортіазиду проводили для трьох серій модельних зразків, а саме однієї серії суспензій, виготовлених із субстанції (склад 3) та двох серій, виготовлених із таблеток гідрохлортіазиду двох різних виробників («Борщагівський ХФЗ» – Т<sub>1</sub>, «Санofi-Авентис» – Т<sub>2</sub>). Модельні зразки зберігали при температурному режимі  $5 \pm 3$  ° С і  $23 \pm 2$  ° С протягом 30 днів. Протягом всього терміну досліджень істотних змін органолептичних характеристик, значення рН та в'язкості досліджуваних зразків не спостерігалось. Значення рН були в межах  $\pm 0.12$ . Характеристики в'язкості при певному діапазоні температур зберігання відрізнялися не більше ніж на 1 %. Хімічну стабільність досліджуваних серій суспензій гідрохлортіазиду досліджували методом ТШХ та УФ-спектрофотометрії. Протягом зберігання всі досліджувані зразки залишалися стабільними, кількісний вміст гідрохлортіазиду у зразках на 30 день був у межах 98.85–99.96 % від початкового незалежно від умов зберігання. Усі зразки відповідали вимогам до мікробіологічної чистоти лікарських засобів: кількість аеробних мікроорганізмів не перевищувала 36 КУО/мл, дріжджових і плісневих грибів – 10 КУО/мл, *Escherichia coli* – не виявлена, що відповідає фармакопейним вимогам.



Оцінку стабільності суспензій спіронолактону проводили для трьох серій модельних зразків, а саме однієї серії суспензій, виготовлених із субстанції (склад 5) та двох серій, виготовлених із таблеток спіронолактону двох різних виробників («Salutas Pharma» – T<sub>1</sub>, «Gedeon Richter» – T<sub>2</sub>). Дослідження стабільності зразків проводили протягом 30 днів. Як і для попередніх суспензій при визначенні стабільності суспензій спіронолактону за фізичними показниками (рН, в'язкість) та органолептичними показниками, відхилень від встановлених специфікацій виявлено не було. Значення рН були в межах  $\pm 0,05$ . Характеристики в'язкості під час зберігання не відрізнялися більш ніж на 1% від початкового значення. При проведенні хімічного контролю методом ТШХ та УФ-спектрофотометрії ознак нестабільності препаратів виявлено не було. Концентрація спіронолактону у зразках на 30-й день порівняно з початковою концентрацією залишалась на рівні 98 %. Протягом досліджуваного періоду зразки відповідали фармакопейним вимогам до мікробіологічної чистоти, кількість аеробних мікроорганізмів, дріжджових і плісневих грибів не перевищували критерії, *Escherichia coli* виявлено не було.

При дослідженні хімічної стабільності суспензії складу 7 (фуросеміду та каптоприлу) за розробленими методиками ТШХ, УФ-спектрофотометрії (фуросемід), аргентометрії (каптоприл) продуктів розкладу інгредієнтів виявлено не було, а концентрація відповідала допускам вмісту в екстемпоральних лікарських засобах. Кількісний вміст каптоприлу і фуросеміду на 30 день зберігання склав на рівні 99 % у порівнянні з днем виготовлення модельних зразків. За фізичними (рН, в'язкість), органолептичними показниками та мікробіологічною чистотою зразків суспензії складу 7 ознак нестабільності виявлено не було.

## ВИСНОВКИ

У дисертації наведене експериментальне вирішення наукової задачі, що полягає в розробці та валідації методик кількісного визначення фуросеміду, каптоприлу, гідрохлортіазиду, спіронолактону у суспензіях аптечного виготовлення та дослідженні їх стабільності, визначенні терміну та умов зберігання, встановленні відповідності якості суспензій аптечного виготовлення фармакопейним вимогам.

1. За результатами проведеного анкетування фармацевтичних працівників лікарняних аптек півдня Нігерії були виявлені проблеми аптечного виготовлення, пов'язані із недостатністю кваліфікованих кадрів, фінансування, необхідністю оновлення матеріально-технічної бази, відсутністю національних стандартів виготовлення та контролю якості ЕЛЗ.

2. За результатами аналізу рецептури лікарняних аптек штатів Ріверс та Баєлса Нігерії встановлено, що більшість ЕЛЗ є суспензіями для перорального застосування для дітей, а у якості АФІ часто використовують комерційно доступні препарати діуретиків з фіксованими дозами (таблетки, капсули та ін'єкції).

3. Розроблені методики ідентифікації фуросеміду у суспензії аптечного виготовлення, що ґрунтується на реакціях з солями ферум (III) хлориду, купрум (II) сульфату, кобальт (II) хлориду. Досліджено достовірність ефекту реакцій його ідентифікації. Розроблено методику ідентифікації фуросеміду у ЕЛЗ методом ТШХ. За результатами валідації методики були обрані оптимальні умови

хроматографування: ТШХ-пластинки з шаром силікагелю на алюмінієвій підложці з флуоресцентним індикатором 254 нм, об'єм нанесення як досліджуваних зразків так і стандартних зразків 0.4 мг/мл – 1 мкл, рухома фаза: хлороформ–етилацетат Р–кислота оцтова льодяна Р (7:3:0.5), відстань хроматографування – 8 см, виявлення – перегляд в УФ-світлі при 254 нм. Кількісне визначення фуросеміду у суспензіях аптечного визначення запропоновано проводити методом абсорбційної спектрофотометрії за довжини хвилі 271 нм. За результатами міжлабораторного експерименту було встановлено, що метрологічні характеристики методики не перевищують валідаційні критерії. Методика може бути відтворена в умовах лабораторії, при довірчій імовірності 95 %, відхилення одиничного значення становить  $99.95 \pm 0.73$  %.

4. Розроблено методику ідентифікації гідрохлортіазиду, достовірність ефекту реакції ідентифікації гідрохлортіазиду у суспензії аптечного виготовлення з спиртовим розчином кислоти саліцилової 20 мг/мл у середовищі розчину кислоти сульфатної Р складає 100 % у концентраційному діапазоні 3.5–30 мг/мл. Розроблено методику ідентифікації гідрохлортіазиду у ЕЛЗ методом ТШХ. За результатами валідації методики були обрані оптимальні умови хроматографування: ТШХ-пластинки з шаром силікагелю на алюмінієвій підложці з флуоресцентним індикатором 254 нм, об'єм нанесення як досліджуваних зразків так і стандартних зразків 5 мг/мл – 5 мкл, рухома фаза: етилацетат Р–метанол–розчин аміаку концентрований Р (8:2:0.5), відстань хроматографування – 8 см, виявлення – перегляд в УФ-світлі при 254 нм. Кількісне визначення гідрохлортіазиду у ЕЛЗ аптечного визначення запропоновано проводити методом абсорбційної спектрофотометрії за довжини хвилі 273 нм, шляхом приготування випробуваного розчину у 0.1 М натрію гідроксиду із розведенням  $1 \cdot 10^{-5}$  г/мл. Метрологічні характеристики методики відповідають валідаційним критеріям. Методика може бути відтворена в умовах лабораторії, при довірчій імовірності 95 %, відхилення одиничного значення становить  $99.73 \pm 0.84$  %.

5. Розроблено методику ідентифікації спіронолактону у суспензії аптечного виготовлення з кислотою сульфатною Р. При кількості спіронолактону від 2.5 мг/мл до 6 мг/мл достовірність ефект реакції складає 100 %. Розроблено методику ідентифікації спіронолактону у суспензії аптечного виготовлення методом ТШХ. За результатами валідації методики були обрані наступні умови хроматографування: ТШХ-пластинки з шаром силікагелю на алюмінієвій підложці з флуоресцентним індикатором 254 нм, об'єм нанесення як досліджуваних зразків так і стандартних зразків 1 мг/мл – 10 мкл, рухома фаза: гексан Р–етилацетат Р–вода Р (4.8:14.8:0.4), відстань хроматографування – 8 см, виявлення – перегляд в УФ-світлі при 254 нм. Кількісне визначення спіронолактону у ЕЛЗ аптечного визначення запропоновано проводити методом абсорбційної спектрофотометрії за довжини хвилі 238 нм, шляхом приготування розведення  $1 \cdot 10^{-5}$  г/мл у 96% спирті етиловому. Метрологічні характеристики методики відповідають валідаційним критеріям. Методика може бути відтворена в умовах лабораторії, при довірчій імовірності 95 %, відхилення одиничного значення становить  $99.84 \pm 0.75$  %.

6. За результатами дослідження показників якості суспензій аптечного виготовлення встановлено, що вони відповідають вимогам за показниками

однорідність маси доз, однорідність дозованих одиниць, об'єм седиментації та мікроскопічне дослідження розміру часток.

7. При дослідженні хімічної, фізичної, мікробіологічної стабільності зразків суспензій діуретиків аптечного виготовлення було підтверджено їх стабільність протягом 30 днів при зберіганні у темному місці при температурі та  $25 \pm 2$  °C та  $5 \pm 3$  °C.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Alfred-Ugbenbo D., Zdoryk O. A., Georgiyants V. A. Contemporary challenges of pharmaceutical compounding in southern Nigeria: results of survey. *ScienceRise*. 2016. № 2(4). P. 13-18. (Особистий внесок – участь у виконанні експериментальних досліджень та підготовці статті).
2. Alfred-Ugbenbo D., Zdoryk O. A., Georgiyants V. A. Prescription analysis for extemporaneous preparations in hospital pharmacies of Southern Nigeria. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*. 2016. № 3. P. 46-52. (Особистий внесок – участь у виконанні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті).
3. Validation of assay method for hydrochlorothiazide in extemporaneous preparations. D. Alfred-Ugbenbo, O. A. Zdoryk, N. Yu. Bevz, V. A. Georgiyants. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2017. № 2. P. 12-17. (Особистий внесок – виконання експериментальних досліджень, участь в узагальненні результатів та підготовці статті).
4. Alfred-Ugbenbo D., Zdoryk O. A., Georgiyants V. A. Validation of analytical method for determination of extemporaneous preparation of furosemide in extemporaneous syrup. *Медична та клінічна хімія*. 2017. № 2(19). P. 5-11. (Особистий внесок – виконання експериментальних досліджень, участь в узагальненні результатів та підготовці статті).
5. Alfred-Ugbenbo D. S., Zdoryk O. A., Georgiyants V. A. Quality assessment and stability study of compounded furosemide syrup. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2017. № 5(9). P. 28-35. (Особистий внесок – участь у плануванні та виконанні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті).
6. Compounding in Nigeria. D. Alfred-Ugbenbo, O. A. Zdoryk, V. A. Georgiyants, R. Schnatz. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. 2016. Vol. 20, № 3. P. 189-192. (Особистий внесок – участь в узагальненні результатів та підготовці статті).
7. Features of pharmaceutical compounding in the republic of Tajikistan. D. Alfred-Ugbenbo, A. H. Valiev, O. A. Zdoryk, V. A. Georgiyants. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. 2017. Vol. 21, № 6. P. 463-467. (Особистий внесок – участь в узагальненні результатів та підготовці статті).
8. Alfred-Ugbenbo D., Nechiporenko N. A., Zdoryk O. A. Compounding preparation syrups and their standardization. *Topical issues of new drugs development : Abstracts of International Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Student*, April 23, 2015, Kharkiv. Kh. : NUPh, 2015. P. 117.

9. Development of quality assurance methods of hydrochlorothiazide in compounded powder and syrup preparations. D. Alfred-Ugbenbo, I. V. Moskalenko, O. A. Zdoryk, N. Yu. Bevz. *Topical issues of new drugs development* : Abstracts of XXIII International Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Student (April 21, 2016). In 2 vol. Vol. 1. Kharkiv : Publishing Office NUPh, 2016. P. 149.
10. Nechiporenko N. A., Alfred-Ugbenbo D., Zdoryk O. A. Development of quantitative determination method for furosemide in compounded syrups. *Topical issues of new drugs development* : Abstracts of XXIII International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student (April 21, 2016). In 2 vol. Vol.1. Kharkiv : Publishing Office NUPh, 2016. P. 201.
11. Alfred-Ugbenbo D. S., Zdoryk O. A., Georgiyants V. A. Stability study of extemporaneously prepared syrups containing diuretics. *The 7 th International Pharmaceutical Conference "Science and practice 2016"*, Kaunas, Lithuania, 20-21 October, 2016. Kaunas, 2016. P. 47-48.
12. Alfred-Ugbenbo D., Zdoryk O. A. Qualitative analysis of furosemide in compounded syrups. *Modern aspects of extemporaneous allopathic, homeopathic and cosmetic medicines* : Abstracts of International scientific and practical internet conference, March 3-4, 2017., Kharkiv. Kh. : NUPh, 2017. P. 13-14.
13. Alfred-Ugbenbo D., Taran K. A, Zdoryk O. A. Development of identification tests for compounded preparations containing furosemide. *Current chemical Problems* : Abstracts of X Ukrainian scientific conference for students and young scientists with international participation, March 27-29, 2017, Vinnytsia, 2017. P. 66.
14. Alfred-Ugbenbo D., Zdoryk O. A. Development of quantitative determination method for spironolactone in compounded syrups. *Current chemical Problems* : Abstracts of X Ukrainian scientific conference for students and young scientists with international participation, March 27–29, 2017, Vinnytsia, 2017. P. 67.
15. Alfred-Ugbenbo D., Zdoryk O. A. Georgiyants V. A. Development of simultaneous determination method for captopril and furosemide in compounded syrups. *Topical issues of new drugs development* : Abstracts of XXIV International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student (April 20, 2017). In 2 vol. Vol.1. Kharkiv : Publishing Office NUPh, 2017. P. 150.
16. Alfred-Ugbenbo D., Zdoryk O. A., Georgiyants V. A. Stability study of extemporaneous multicomponent syrup of captopril and furosemide for pediatric use. *Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике: сб. материалов VI науч.-практ. конф. с междунар. участием., 24 нояб. 2017 г. Алматы, 2017. С. 60.*

## АНОТАЦІЯ

*Альфред-Угбенбо Д. С.* Розробка та валідація методик контролю якості суспензій, що містять діуретики, аптечного виготовлення та вивчення їх стабільності. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 «Фармацевтична хімія та фармакогнозія». – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2017.

Дисертаційна робота присвячена експериментальному вирішенню наукової

задачі, що полягає в розробці та валідації методик ідентифікації та кількісного визначення фуросеміду, гідрохлортіазиду, спіронолактону, каптоприлу у суспензіях аптечного виготовлення, дослідженні їх стабільності при зберіганні, визначенні терміну та умов зберігання, встановленні відповідності якості суспензій аптечного виготовлення фармакопейним вимогам.

Вивчено стан розвитку аптечного виготовлення та проаналізовано асортимент рецептури лікарняних аптек штатів Ріверс та Баєлса півдня Нігерії. Вперше розроблені та валідовані методики ідентифікації та кількісного визначення фуросеміду, каптоприлу, гідрохлортіазиду, спіронолактону. Розроблені методики ідентифікації діуретиків методом тонкошарової хроматографії, які можуть бути використані для дослідження хімічної стабільності. Кількісне визначення запропоновано проводити методом абсорбційної спектрофотометрії методом питомого показника поглинання. Для досліджуваних суспензій аптечного виготовлення вивчено відповідність якості за показниками однорідність маси доз, однорідність дозованих одиниць, об'єм седиментації та мікроскопічне дослідження розміру часток. Вперше досліджено хімічну, фізичну та мікробіологічну стабільність суспензій аптечного виготовлення, що містять фуросемід, каптоприл, гідрохлортіазид, спіронолактон, які виготовлені із субстанцій та готових лікарських форм. За результатами досліджень стабільності встановлені терміни та умови зберігання суспензій аптечного виготовлення, що містять діуретики.

*Ключові слова:* контроль якості, лікарські засоби виготовлені в аптеках, госпітальна аптека, валідація аналітичних методик, стабільність, абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій та видимій ділянках спектра, тонкошарова хроматографія, діуретики.

## АННОТАЦІЯ

*Альфред-Угбенбо Д. С.* Разработка и валидация методик контроля качества суспензий, что содержат диуретики, аптечного приготовления и изучение их стабильности. – Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02 «Фармацевтическая химия и фармакогнозия». – Национальный фармацевтический университет, МЗ Украины, Харьков, 2017.

Диссертационная работа посвящена экспериментальному решению научной задачи, которая заключается в разработке и валидации методик идентификации и количественного определения фуросемида, гидрохлортиазида, спиронолактона, каптоприла в суспензиях аптечного приготовления, исследовании их стабильности при хранении, определении срока и условий хранения, установлении соответствия качества суспензий аптечного приготовления фармакопейным требованиям.

Изучено состояние развития аптечного приготовления и проанализирован асортимент рецептуры больничных аптек штатов Риверс и Баєлса юга Нигерии. Впервые разработаны и валидированы методики идентификации и количественного определения фуросемида, каптоприла, гидрохлортиазида, спиронолактона. Разработаны методики идентификации диуретиков методом тонкослойной хроматографии, которые могут быть использованы для исследования химической

стабильности. Количественное определение предложено проводить методом абсорбционной спектрофотометрии методом удельного показателя поглощения. Для исследуемых суспензий аптечного приготовления изучено соответствие качества по показателям однородность массы доз, однородность дозированных единиц, объем седиментации и микроскопическое исследование размера частиц. Впервые исследованы химическая, физическая и микробиологическая стабильность суспензий аптечного приготовления, содержащие фуросемид, каптоприл, гидрохлортиазид, спиронолактон, приготовленные из субстанций и готовых лекарственных форм. По результатам исследований стабильности установлены сроки и условия хранения суспензий аптечного приготовления, содержащие диуретики.

*Ключевые слова:* контроль качества, лекарственные средства, приготовленные в аптеках, госпитальная аптека, валидация аналитических методик, стабильность, абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой частях спектра, тонкослойная хроматография, диуретики.

## SUMMARY

*Alfred-Ugbenbo D. S.* Development and validation of quality control methods for compounded suspensions containing diuretics and study of their stability. – Qualified scientific work with manuscript copyright.

Dissertation work submitted for award of the degree of Candidate of Pharmaceutical Sciences, specialty 15.00.02 «Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy». – National University of Pharmacy, Ministry of Health, Kharkiv, 2017.

The dissertation work is dedicated to provision of experimental solutions to scientific problems of development and validation of methods for identification and quantitation of furosemide, hydrochlorothiazide, spironolactone and captopril in pharmacy compounded suspensions; investigation of conditions and duration of storage of these preparations and establishing conformity of the quality of the compounded suspensions to pharmacopoeial requirements.

Analyses of pharmaceutical compounding and questioning of compounding pharmacists in Southern Nigeria revealed problems facing the practice. Results from analysis of compounded prescriptions obtained from hospitals in Rivers and Bayelsa states of Nigeria attest to the fact that most extemporaneously prepared medications are oral liquids for pediatric use. Available commercial fixed dosed products (tablets, capsules, injection) are used mostly as sources of prescribed active pharmaceutical ingredients and most frequently prescribed drugs are diuretics. In view of this, seven different suspensions containing diuretics (spironolactone, furosemide, hydrochlorothiazide) were selected as objects for research.

Taking into account their importance in chemical control and stability study of stored compounded suspensions, priority was given to the development of identification and assay methods for assessment of furosemide, captopril, hydrochlorothiazide and spironolactone in such preparations. Identification methods for furosemide in compounded suspensions were developed based on reactions with ferric chloride, copper (II) sulfate and cobalt (II) chloride in alkaline medium. Results from experiments prove that test strips

impregnated with ferric chloride reagent can be used for identification of furosemide in compounded suspensions. The thin layer chromatography method for analysis of furosemide and captopril was developed (mobile phase of chloroform–ethylacetate–glacial acetic acid in the ratio (7:3:0.5)). It has been proven that this method can be used to identify both captopril and furosemide in bi-active component dosage forms. Direct ultraviolet absorption spectrophotometric method is suggested for the quantitative determination of furosemide in compounded suspensions. Results of validation and interlaboratory precision of this method have established that its metrological characteristics do not exceed the  $\pm 10\%$  limit for deviation in content.

Identification method, based on the formation of aurin dye, has been developed for hydrochlorothiazide in compounded suspensions. A thin layer chromatographic method has been developed for the identification of hydrochlorothiazide in compounded suspensions, mobile phase of ethyl acetate–methanol–ammonia ratio (8:2:0.4). This method's stability-indicating properties were tested by analyzing stressed (hydrolytic, oxidative, acidic, alkaline and exposure to ultraviolet irradiation) samples of hydrochlorothiazide. For quantitative determination of hydrochlorothiazide in compounded suspensions, the direct ultraviolet spectrophotometric assay method is suggested. During the validation it was established that the vehicle and excipients from tablets had no significant influence on the absorbance of analyte. Validation characteristics such as accuracy, precision, linearity, robustness and reproducibility were evaluated. The robustness was assessed by observing change in absorbance by variation of some parameters such as extraction time during sample preparation, one hour stability of the analytical solution and measuring absorbance at a  $\pm 1$  nm change in wavelength. Results obtained from validation showed the method to be reproducible at 95% confidence level with a unit value deviation of  $99.73 \pm 0.65\%$ .

Reaction with sulfuric acid was suggested for wet chemistry while a thin layer chromatographic method was developed for identification of spironolactone in compounded syrups. On addition of sulfuric acid to spironolactone, an orange colour is produced and a yellowish-green fluorescence is seen under UV light. Effects on the reaction such as the influence of the suspending vehicle and excipients were studied and the identification method for spironolactone was found to be reproducible at a concentration range of 2.5–6 mg/ml. Selected chromatographic conditions comprise silicagel-coated aluminium TLC plates with fluorescent indicator at 254 nm, application volume of 10  $\mu$ L (10  $\mu$ g) of spironolactone per spot, mobile phase of n-hexane–water–ethylacetate in the ratio (4.8:0.4:14.8), development distance – 8 cm, detection – under ultraviolet light at 254 nm, sublime fumes of iodine.

Direct ultraviolet absorption spectrophotometric method is suggested for the quantitative determination of spironolactone in compounded suspensions. Metrological characteristics of the method meet validation criteria and the  $\pm 10\%$  limit for deviation in content. The method is reproducible in laboratory conditions at 95% confidence level with a unit value deviation of  $99.84 \pm 0.75\%$ .

Identification of captopril in the presence of furosemide was developed based on its reaction with sodium nitroprusside in the presence of ammonia solution. For determination of captopril in the bi-active dosage form, argentometry is suggested using bromophenol blue as indicator. The method is characterized by acceptable accurate, linear and precise

results. The systematic error was 1.8%, standard deviation of 0.78%, residual standard deviation of 0.71%.

The compounded syrups were initially assessed for quality using parameters such as uniformity of mass of delivered doses from multidose containers, uniformity of content in dosage units, kinematic viscosity, volume of sedimentation and microscopic study of particle size. Results obtained from conducted experiments have established that the compounded suspensions meet pharmacopoeial requirements.

Physical stability of stored model samples was evaluated by organoleptic parameters, pH and kinematic viscosity. Chemical stability of stored samples was evaluated the aid of developed stability indicating thin layer chromatographic methods for identification and direct ultraviolet spectrophotometric assay methods. The microbial stability of stored model samples was also investigated over a period of 30 days. With the aid of results from the investigation of the physical, chemical and microbial stability of compounded suspensions containing furosemide, hydrochlorothiazide, captopril and spironolactone it has been established that they are stable for 30 days when stored at a temperature of  $25 \pm 2$  ° C and  $5 \pm 3$  ° C.

Results of the research work have been introduced to laboratories engaged in quality control of medicines and departments of tertiary institutions. Results can be used in the development of monographs on compounded preparations, for inclusion in the State Pharmacopoeia of Ukraine.

*Keywords:* quality control, compounded preparations, hospital pharmacy, validation of analytical methods, stability, ultraviolet and visible absorption spectroscopy, thin layer chromatography, diuretics.

### Перелік умовних позначень

АФІ –	активні фармацевтичні інгредієнти;
ГЛЗ –	готові лікарські засоби;
ДФУ –	Державна фармакопея України;
ЕЛЗ –	екстемпоральні лікарські засоби;
КУО –	колонієутворюючі одиниці;
НФаУ –	Національний фармацевтичний університет;
ТШХ –	тонкошарова хроматографія;
УФ –	ультрафіолетовий;
GMP –	належна виробнича практика;
RSD –	відносне стандартне відхилення;
ТАМС –	загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів;
ТУМС –	загальне число дріжджових і плісневих грибів.