

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ О. О. БОГОМОЛЬЦЯ
ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА АНАЛІТИЧНОЇ, ФІЗИЧНОЇ ТА КОЛОЇДНОЇ ХІМІЇ

ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

На тему «**Кількісне визначення гідрохлортіазиду у таблетках інструментальними методами**».

Виконала: здобувачка вищої освіти 3-го курсу, групи 138Б1А
напряму підготовки 226 Фармація, промислова фармація

Прунцева Марина Дмитрівна

Керівник: доцент кафедри аналітичної, фізичної та колоїдної
хімії, кандидат хімічних наук, Гождзінський С.М.

Рецензент: Доцентка кафедри хімії ліків та лікарської
токсикології, к.фарм.н., Нароха Віолета Петрівна

Київ – 2026

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів.	4
Вступ.	5
Основна частина. Розділ 1. Гідрохлортіазид, фізико-хімічні властивості, методи ідентифікації та кількісного визначення.	8
1.1. Механізм дії та метаболізм гідрохлортіазиду.	10
1.2. Електрохімічні методи аналізу. Потенціометрія.	13
1.3. УФ – спектрофотометрія.	16
Розділ 2. Експериментальна частина.	18
2.1. Матеріали та методи.	18
2.1.1. Мета дослідження.	18
2.1.2. Об'єкти дослідження.	18
2.1.3. Посуд та обладнання.	19
2.1.4. Реактиви.	21
2.1.5. Приготування розчинів.	21
2.2. Методики аналізу.	23
2.2.1. УФ -спектрофотометричного визначення.	23
2.2.2. Алкаліметричного титрування з наступним визначенням точки еквівалентності потенціометрично.	23
Розділ 3. Результати та їх обговорення.	24
3.1. Кількісне визначення гідрохлортіазиду у Зразках методом УФ – спектрофотометрії.	24
3.1.1. Визначення найоптимальнішої довжини хвилі дослідження λ .	24
3.1.2. Побудова градууювального графіка та його аналіз на лінійність.	26
3.1.3. Результати кількісного визначення діючої речовини	28

гідрохлортіазид у Зразках.	
3.1.4. Перевірка стабільності розчинів у часі.	29
3.2. Кількісне визначення гідрохлортіазиду у Зразках методом алкаліметричного титрування з наступним потенціометричним визначенням точки еквівалентності.	31
3.3. Часткова валідація методик.	32
Висновки.	33
Список використаних джерел.	34
Додатки.	37
Анотація (Summary).	41

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ДМСО – диметилсульфоксид

АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт

ЦНС – центральна нервова система

ІХС – ішемічна хвороба серця

АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт

ЕХМА – електрохімічні методи аналізу

УФ- спектrophотометрія – ультрафіолетова спектrophотометрія

ФСЗ – фармакопейний стандартний зразок

ГГ – градуювальний графік

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

РФ – рухома фаза

НФ – нерухома фаза

ДФУ – державна фармакопея України

Ph.Eur. – European Pharmacopoeia

г – грам

ІЧ, УФ спектр – інфрачервоний, ультрафіолетовий спектр поглинання

мкг – мікрограм

мл – мілілітр

нм – нанометр

Т. кип. – температура кипіння

Т. пл. – температура плавлення

С⁰ – градуси Цельсія

ВСТУП

Діуретичними лікарськими засобами (у подальшому – діуретики, сечогінні препарати) називають препарати, які мають можливість збільшувати виведення надлишкової рідини та певних солей з організму завдяки посиленню процесів сечоутворення [1]. У лікарській практиці ця група лікарських засобів використовується при терапії гіпертонічної хвороби, ішемічній хворобі серця, хворобах нирок тощо [2 -8].

Принцип дії діуретиків можна описати нижченаведеними тезами:

1. Всмоктування у кров (через шлунково-кишковий тракт або через ін'єкцію);
2. Потрапляння до нирок та вплив на нефрони та ниркові канали шляхом блокування процесу реабсорбції катіонів лужних металів, аніонів хлору та води;
3. Створення осмотичного тиску у клітинах, який призводить до форсованого діурезу.

Класифікація діуретиків [2-8], як правило, відбувається за характеристикою дії лікарських засобів та за хімічною будовою, отже розрізняють:

- Петльові діуретики. Діють, переважно, через трансфер іонів Натрію, Калію та Хлору у нирках;
- Калійзберігаючі діуретики. Спрямовані на зберігання в організмі катіонів Калію, використовуються при терапії гіпертонічної хвороби;
- Осмотичні діуретики. Мають властивість притягувати молекули води;
- Салуретичні діуретики. Мають властивість знижувати реабсорбцію катіонів натрію;
- Нетіазидні діуретики. Використовують при лікуванні гіпертонічної хвороби. Принцип дії полягає у зменшенні води у нирках;

- Тіазидні діуретики. Проявляють дію у дистальних канальцях нирок. Використовують при лікуванні гіпертонічної хвороби.

Препарат *гідрохлортіазид* є синтетичною сполукою, яка належить до класу тіазидних діуретиків. З хімічної точки зору сполуку можна розглядати як похідне бензотіазиду, до складу якого входить сульфонамідна група,

Рисунок 1:

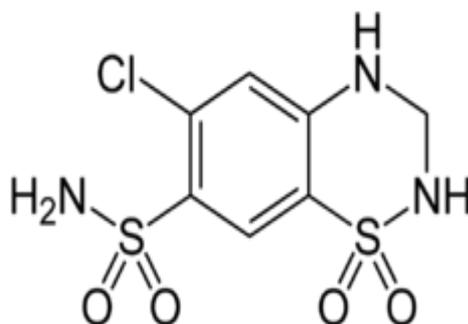


Рисунок 1. Структурна формула гідрохлортіазиду.

Гідрохлортіазид застосовується для лікування лише у вигляді таблеток та капсул оскільки лікарські засоби, до складу яких входить ця сполука, застосовують лише перорально.

Лікарські засоби, до складу яких входить гідрохлортіазид, показані при терапії артеріальної гіпертензії, нецукрового діабету, ожирінні, глаукомах, при сечокам'яній хворобі. При тривалій терапії гідрохлортіазидом треба робити постійний контроль балансу концентрації електролітів (катіонів Калію та Натрію) оскільки спостерігається посилене сечовипускання [2-8].

Серед протипоказань при використанні тіазидних діуретиків виділяють присутність зневоднення організму, ниркову або печінкову недостатність, гіпокалімію та гіпонатрімію. Тіазидні діуретики не використовують при гіпотонічній хворобі (ризик виникнення запаморочення, непритомності у пацієнта тощо), подагрі.

Актуальність теми: Розробка та апробація нових методик кількісного визначення тiazидних діуретиків.

Мета: Розробити, провести часткову валідацію методик кількісного визначення гідрохлортiazиду методом алкаліметрії з визначенням точки еквівалентності потенціометрично та методом УФ - спектрофотометрії .

Завдання дослідження:

1. Провести бібліосемантичний аналіз щодо фізико-хімічних та фармакологічних властивостей гідрохлортiazиду.
2. Провести бібліосемантичний аналіз щодо методик ідентифікації та кількісного визначення гідрохлортiazиду у субстанції та лікарських формах.
3. Розробити методики кількісного визначення гідрохлортiazиду у таблетках методом алкаліметричного потенціометричного титрування та УФ – спектрофотометричного визначення, провести часткову валідацію методик.

Методи дослідження: Бібліосемантичний, алкаліметричне титрування з потенціометричним визначенням точки еквівалентності, УФ – спектрофотометрія.

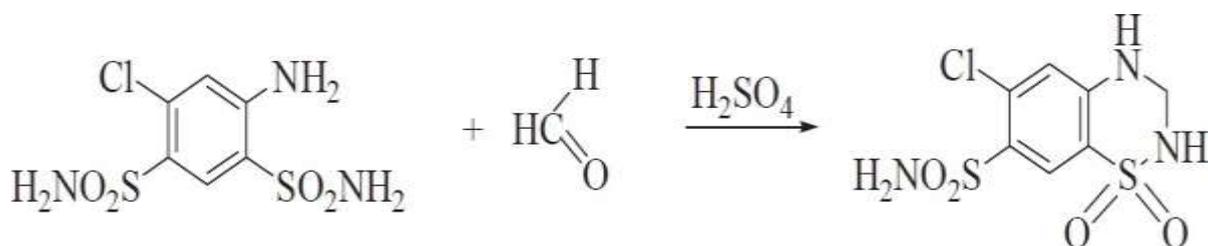
Апробація результатів дослідження. Результати роботи були представлені на VI Науково-практичній конференції з міжнародною участю « Planta+. Наука, практика та освіта». Київ, Україна, 23 січня 2026 р.

Структура роботи. Робота представлена на 42 сторінках, додатків -2, рисунків- 7, таблиць- 5.

ОСНОВНА ЧАСТИНА

Розділ 1. Гідрохлортіазид, фізико-хімічні властивості, методи ідентифікації та кількісного визначення.

Гідрохлортіазид синтезують за нижченаведеною схемою реакцією конденсації 6-хлор-4-аміно-1,3-бензолдисульфаміду із формальдегідом у кислому середовищі [9]:



Гідрохлортіазид погано розчиняється у воді, розчиняється у етиловому спирті та неорганічних сильних основах та кислотах, має найкращу розчинність в ацетоні, $T_{\text{пл}}^0$ сполуки 274°C , зберігають речовину у посуді з темного скла у сухому місці [9].

Ідентифікація та кількісне визначення.

Ідентифікацію проводять відповідно нормативних документів Державної Фармакопеї України (Додаток 1) та Європейської фармакопеї (Додаток 2) за ІЧ-спектрами поглинання та температурою плавлення.

Якщо ідентифікацію гідрохлортіазиду проводити хімічними реакціями, найчутливішими будуть реакції:

- З хромотроповою кислотою після кислотного гідролізу, утворюється характерне фіалкове забарвлення;
- З розчином кобальту нітрату при $\text{pH} \geq 8,0$, утворюється характерний зеленкувато-блакитний осад;
- З розчином концентрованої сульфатної кислоти спостерігається пурпурове забарвлення;
- Після лужного гіролізу на первинні аміни.

Кількісно (Додаток 1 та Додаток 2):

Методом високоефективної рідинної хроматографії.

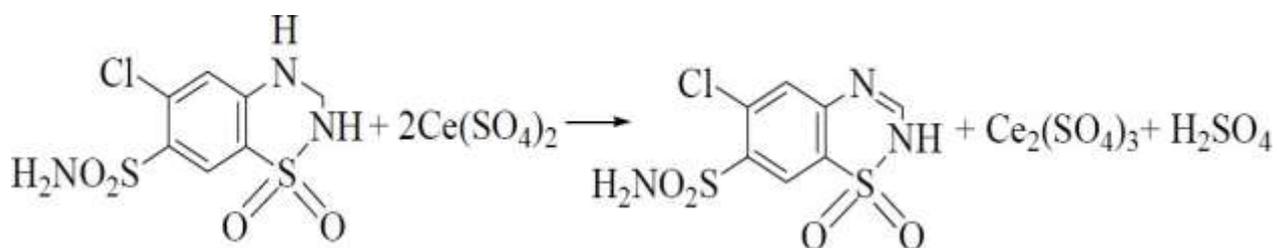
Аналіз проводять при швидкості пропускання 1,6 мл/хв, об'єм інжекції 10 мкл, детектування проводять при 224 нм.

Склад РФ А: 940 мл фосфатного буферного розчину з рН = 3,2 змішують з 60 мл метанолу та 10 мл тетрагідрофурану;

Склад РФ В: 500 мл метанолу змішують з 500 мл фосфатного буферного розчину з рН = 3,2 та додають 50 мл тетрагідрофурану.

У фаховій літературі представлено і інші методи кількісного визначення гідрохлортіазиду, а саме [10]:

- методом цериметрії (за методикою зворотного титрування) зі специфічним індикатором крохмалем:



- методом кислотно-основного титрування (алкаліметрією), титрант – тетрабутиламоній гідроксид, середовище ДМСО. Точку еквівалентності визначають потенціометрично[11].
- методом УФ – спектроскопії [12]. Автори наукового дослідження пропонують методику кількісного визначення гідрохлортіазиду у сиропях та порошках при довжині хвилі 273 нм.

1.1. Механізм дії та метаболізм гідрохлортіазиду.

Сполука гідрохлортіазид є діуретиком середньої сили. Механізм дії речовини заключається лише у зниженні реабсорбції катіонів Натрію на рівні кортикального сегменту петлі Генле, блокуванні карбоангідази і прискоренні виведення з сечею катіонів Калію та аніонів гідрокарбонатів та фосфатів. Гідрохлортіазид має можливість сприяти підвищенню виведення катіонів Магнію і гальмує виведення уратів, тобто, побічним впливом сполуки є зменшення утворення каменів у нирках. Клінічні дослідження показали, що гідрохлортіазид має можливість проявляти гіпотензивну дію і вона зберігається навіть тиждень після завершення терапії препаратом. Максимальна гіпотензивна дія зафіксована на четвертий тиждень після початку лікування. Діуретичний ефект досягається через 3-4 години після прийому, триває до 10 годин. Препарат швидко всмоктується і кількісно відсоток всмоктування досягає 80%. Препарат має здатність проникати через плацентарний бар'єр, з білками плазми зв'язується на 40%. Істотний метаболізм не спостерігається, у середньому період напіввиведення становить 6 годин.

Лікарський засіб, до складу якого входить гідрохлортіазид, використовують у терапії при лікуванні [2-8]:

Набряків (при ішемічній хворобі серця, цирозі печінки, нирковій недостатності, надлишкової ваги тощо);

Артеріальній гіпертензії;

Нецукрового діабету;

Глаукомі;

Кам'яній хвороби нирок.

Серед протипоказань треба враховувати важкі форми ниркової та печінкової недостатності, прояви падагри, декомпенсований діабет, порушення у пацієнтів водно-сольового обміну.

Взаємодія з іншими лікарськими засобами.

При призначенні пацієнту лікарського засобу з гідрохлортіазидом лікарю або фармацевту необхідно мати на увазі можливу взаємодію препарату з іншими лікарськими засобами, і, особливо із тими, при одночасному прийомі з якими можуть спостерігатися небажані ефекти [2-8], а саме:

Одночасний прийом з серцевими глікозидами призводить до зростання токсичних ефектів внаслідок зростання тіазидіндукованих гіпокаліємії та гіпомагніємії;

Одночасний прийом з проносними засобами підсилює електролітичний дисбаланс;

Одночасний прийом з вітаміном D або кальцієвмісними препаратами сприяє зростанню концентрації катіонів Кальцію у плазмі;

Одночасний прийом з калієвмісними препаратами призводить до змін у рівноважній концентрації катіонів Калію у кров'яній сироватці. Це, відповідно, дає початок розвитку різноманітних серцевих аритмій;

Одночасний прийом з *карбамазепіном* призводить до розвитку гіпонатріємії;

Одночасний прийом з протизапальними нестероїдними препаратами послаблює антигіпертензивний ефект гідрохлортіазиду;

При одночасному прийомі з *дифлузанілом* знижується гіперурекемічна дія гідрохлортіазиду та підвищується його концентрація;

Фенобарбітал, *діазепам*, *етанол* сприяють зростанню гіпотензивної дії гідрохлортіазиду;

Аміновмісні лікарські форми при одночасному прийомі з гідрохлортіазидом зменшують власний вплив на артеріальний вплив;

Одночасний прийом з гіпотензивними препаратами приводить до корекції доз оскільки надмірно зменшується артеріальний тиск;

Одночасний прийом з проти діабетичними препаратами приводить до корекції доз оскільки можливий розвиток гіперглікемії;

Препарат *метформін* рекомендовано застосовувати при одночасному прийомі з гідрохлортіазидом з обережністю, причиною цього є ризик виникнення лактатного ацидозу;

При одночасному прийомі з гідрохлортіазидом *тубокурарин* посилює міорелаксуючий ефект;

При одночасному прийомі з цитотоксичними препаратами знижується ниркова екскреція та підсилюється міелосупресивний ефект;

Удвічі знижується всмоктування гідрохлортіазиду з шлунково-кишкового тракту при одночасному прийомі з холестираміною чи колестиполовою смолами;

Гідрохлортіазид має властивість підвищувати концентрацію сечової кислоти у сировотці крові, тому, корекція доз антиподагричних препаратів при одночасному прийомі є необхідною;

Антихолінергічні лікарські засоби підвищують біодоступність гідрохлортіазиду оскільки знижують моторику шлунково-кишкового тракту;

При одночасному прийомі гідрохлортіазиду з *саліцилатами* визначають посилення токсичної дії останніх на ЦНС;

При одночасному прийомі гідрохлортіазиду з *циклоспорином* виникає ризик виникнення подагри;

Підвищується розвиток ниркової недостатності у випадку одночасного прийому гідрохлортіазиду з йодовмісними засобами.

При призначенні гідрохлортіазиду лікарю або фармацевту необхідно звертати увагу на особливості застосування лікарського засобу з цією діючою речовиною, а саме:

- Ризок розвитку немеланомного раку шкіри у випадку збільшення кумулятивної дози препарату за рахунок фото сенсibiliзуючої дії гідрохлортіазиду;
- Ризик порушення функції нирок (прискорюється розвиток азотемії);

- Ризик порушення функцій печінки (прискорюється внутрішньо печінковий холестаза);
- Ризик виникнення алергічних захворювань;
- При глаукомі виникає ризик втрати зору;
- Ризик виникнення гострої респіраторної токсичності;
- При порушенні водноелектролітичного балансу і, навіть, при наявності попереджувальних симптомів;
- При артеріальній гіпотензії або гіпертензії;
- При ішемічних хворобах;
- Пацієнтам літнього віку дозу препарату треба постійно контролювати;
- При наявності ендокринологічних патологій;
- При вагітності та годуванні немовля груддю.

При передозуванні виникають небажані симптоми у вигляді нудоти, блювання, слабкості, порушенні свідомості, судоми тощо, побічні реакції у вигляді лейкопенії, анемії, лімфаденопатії, анафілактичного шоку, гіперурекимії, психічних розладів, холециститів, шкірних висипів, алопецій.

1.2. Електрохімічні методи аналізу. Потенціометрія.

Електрохімічними методами аналізу [13] (ЕХМА) називають фізико-хімічні методи дослідження, які засновані на вимірюванні певних змін електричних параметрів розчинів або інших систем. У фармацевтичній практиці електрохімічні методи аналізу знайшли широке використання завдяки високій точності та відтворюваності, простоті методик, автоматизації.

Електрохімічні методи умовно класифікують на три групи:

- Перша група електрохімічних методів охоплює методи, які ґрунтуються на процесах виникнення red-ox реакцій на електродах (потенціометрія, кулонометрія, вольтамперометрія);

- Друга група електрохімічних методів охоплює методи, які не пов'язані з red-ox реакціями на електродах (кондуктометрія);
- Третя група охоплює методи, які базуються на змінах міжмолекулярної та міжатомної взаємодії (на змінах сил Ван-дер-Ваальса).

У фармацевтичному аналізі найбільш розповсюдженим є метод потенціометричного визначення (потенціометрія – пряма, або потенціометричне титрування).

Потенціометрія [14] базується на законі розподілу Нернста, який пов'язує зміну електродного потенціалу системи з концентраціями (активностями, тобто, рівноважними концентраціями) окисника та відновника:

$$E = E^0 + \frac{0.059}{z} \lg \frac{a_{ox}}{a_{red}}$$

E = електродний потенціал, В

E^0 = стандартний електродний потенціал, В

z = кількість електронів, яка приймає участь в окисно-відновному процесі;

a_{ox} – концентрація (активність) речовини, яка має властивість окисника, моль/л;

a_{red} – концентрація (активність) речовини, яка має властивість відновника, моль/л.

Потенціометричне титрування вивчає залежність величини електродного потенціалу E від об'єму титранту V , який витрачається на реакцію з аналізованою речовиною. Методика проведення потенціометричного титрування є простою та доступною, достатньо точною та економічною. Основним елементом у обладнанні є гальванічна комірка (або гальванічний елемент), яка складається з пари електродів –

визначувального та порівнювального. Дослідник підключає створену гальванічну пару до потенціометра і починає титрувати аналіт, при цьому постійно фіксує зміни у величині електродного потенціалу (вимірює аналітичний сигнал). Результати визначення кінця реакції, як правило, представляють графічно, оскільки точку еквівалентності для подальших розрахунків концентрації аналізованої речовини зручно виявляти саме за допомогою графіків (Рисунок 2):

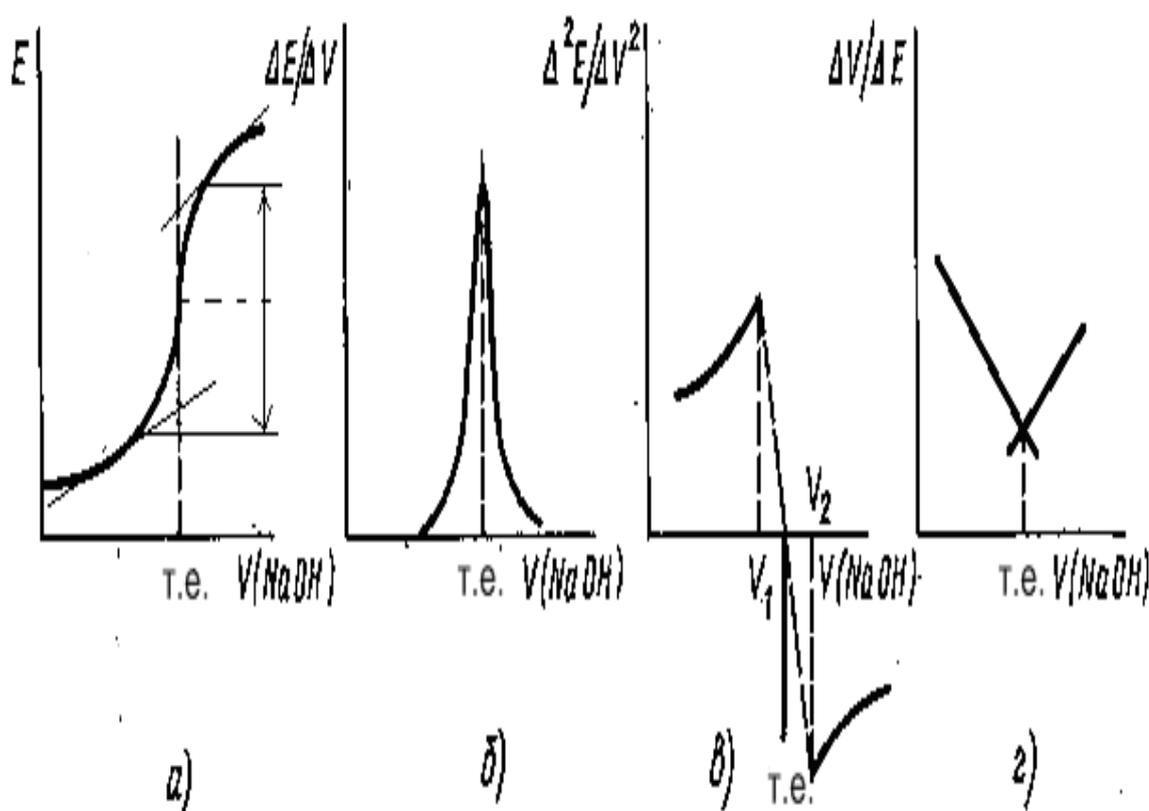


Рисунок 2. Графічна залежність зміни електродного потенціалу системи від об'єму титранту.

При проведенні потенціометричного титрування використовують реакції, які відповідають певним вимогам, а саме:

1. Реакції притаманна стехіометричність;
2. Реакція відбувається миттєво, і, відповідно, рівновага встановлюється дуже швидко;
3. Побічні реакції (при наявності) не впливають на результат.

Результати кількісного визначення маси або концентрації аналізованої речовини розраховують традиційно, спираючись на Закон еквівалентів (лежить в основі будь-якого методу титриметричного аналізу).

1.3. УФ – спектрофотометрія.

Ультрафіолетова спектрофотометрія [15] є розділом фізичних оптичних методів аналізу, яка досліджує абсорбцію (спектри поглинання) речовини при довжині хвилі 10-400 нм. Величину абсорбції (аналітичний сигнал методу, позначається літерою А) часто називають оптичною густиною. УФ – спектрофотометрію можна використовувати для проведення якісних та кількісних визначень, метод знайшов широке використання при розв'язуванні задач з аналітичної та фармацевтичної хімії оскільки є точним (помилка, як правило, не перебільшує 2%), чутливим (межа визначення 10^{-6} М), простим у виконанні та доступним.

В основі методу кількісного визначення лежить Закон Бугера – Ламберта-Бера, який пов'язує прямою залежністю оптичну густину (кількісна характеристика абсорбованого монохроматичного світла) та концентрацію досліджуваної речовини:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

A – оптична густина;

ε - молярний коефіцієнт абсорбції;

l – товщина шару речовини.

Метод є достатньо універсальним, але, як і кожний метод УФ – спектрофотометрія має певні недоліки. З нашої точки зору, це низка селективність та необхідність проведення попереднього відокремлення певних компонентів.

Концентрацію досліджуваної речовини можна визначити:

За методом градуювального графіка;

За методом стандартних добавок;

За методом обмежувачих розчинів.

Сутність методу градуовального графіка (використаний у даній роботі) заключається у тому, що кількісному визначенню аналізованої речовини передуює приготування стандартних (еталонних) розчинів з відомою концентрацією. Після приготування еталонів при певній сталій довжині хвилі вимірюється оптична густина кожного розчину та будується графічна залежність $A = f(C)$. Наступним кроком дослідник вимірює оптичну густина аналізованого розчину і за допомогою градуовального графіка встановлює концентрацію [16].

Сутність молярного коефіцієнту світлопоглинання ϵ можна характеризувати як величину оптичної густини розчину, концентрація якого 1 моль/л. Іноді кажуть, що молярний коефіцієнт світлопоглинання є мірою чутливості фотометричних реакцій.

Розділ 2. Експериментальна частина.

Експериментальна частина випускної кваліфікаційної роботи була виконана на кафедрі аналітичної, фізичної та колоїдної хімії Університету.

2.1. Матеріали та методи.

2.1.1. Мета дослідження.

Метою дослідження є розробка, апробація та часткова валідація методик кількісного визначення гідрохлортіазиду у таблетованих лікарських формах інструментальними методами.

2.1.2. Об'єкти дослідження.

Зразок 1. Лікарська форма –таблетки. До складу таблетки входить 25 мг АФІ.

Допоміжними речовинами виробником заявлено присутність лактози моногідрату, повідону, целюлози мікрокристалічної, крохмалю та солі магній стеарат.

Виготовлення лікарської форми відбувається вітчизняним виробником «Науково-виробничий центр Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод».

Зразок 2. Лікарська форма – таблетки. До складу таблетки входить 25 мг АФІ.

Допоміжними речовинами виробником заявлено присутність лактози моногідрату, целюлози мікрокристалічної, гідроксипропілцелюлози, заліза оксид червоний, заліза оксид жовтий, сіль магній стеарат.

Виготовлення лікарської форми відбувається вітчизняним виробником ТОВ КУСУМ- ФАРМ.

Зразок 1



Зразок 2



Рисунок 3. Об'єкти дослідження, які були використані у роботі.
<https://tabletki.ua>

2.1.3. Посуд та обладнання.

1. Хімічний (колби, бюретки, стакани) лабораторний мірний посуд.
2. Ваги лабораторні MettlerToledo XS 204.
3. Порцелянова ступка з товкачиком.

Для алкаліметричного титрування з наступним визначенням точки еквівалентності потенціометричним методом:

4. Іономір лабораторний «И-130» (Рисунок 4) та гальванічна пара електродів (хлоридосрібний та індикаторний платиновий ЕПВ -1).
5. Магнітний змішувач.

Для УФ – спектрофотометричного визначення:

6. Спектрофотометр SPECORD 200-222 U 214 (Рисунок 5).



Рисунок 4. Ионімір лабораторний «И-130».



Рисунок 5. УФ – спектрофотометр SPECORD 200-222 U 214.

2.1.4. Реактиви.

1. ФСЗ ДФУ Hydrochlorothiazide, каталожний номер Н0196 реєстраційний номер 58-93-5.

2. Спирт етиловий концентрації 96%.

3. Розчин тетрабутиламін гідроксиду $(C_4H_9)_4NOH$ концентрації 0,1М (готували наступним чином: готовий метанольний одномолярний розчин у кількості 100 мл розчиняли у 1 л деіонізованої води).

4. Розчин NaOH концентрації 0,1М (готували наступним чином: розбивали одну капсулу стандарт-титру (фіксаналу) та розчиняли її зміст у 1000 мл деіонізованої води. Ретельно струшували). Розчин NaOH концентрації 0,01М готували за стандартними методиками розведення.

5. Вода деіонізована.

2.1.5. Приготування розчинів.

Приготування розчинів ФСЗ.

Зважували 50 мг фармакопейного стандартного зразка та розчиняли у 25 мл етилового спирту концентрації 96%. Струшували. Концентрація приготованого розчину становила 200 мг/100 мл. Після цього відбирали 2 мл приготованого розчину піпеткою, переносили у мірну колбу на 100 мл і доводили етиловим спиртом до позначки. Концентрація стандартного розчину становила 1 мг/100 мл.

Приготування стандартних розведених розчинів ФСЗ для побудови градууювального графіка.

Стандартними методиками розведення готували серію стандартних розчинів ФСЗ концентрації 0,5-10 мг/100 мл. Для цього відбирали нижче наведений об'єм (Таблиця 1) розчину ФСЗ концентрації 200 мг/100 мл, вміщували його у мірну колбу на 100 мл, розчин доводили до позначки етиловим спиртом, ретельно струшували:

Таблиця 1. Приготування розведених стандартних розчинів ФСЗ для побудови градуювального графіка.

№	Відібраний об'єм розчину, концентрація якого 200 мг/100 мл, мл	Концентрація приготованого розчину, мг/100 мл
1	1	0,5
2	2	1
3	3	1,5
4	5	2,5
5	7	3,5
6	10	5

Приготування аналізованих розчинів (Зразок 1 та Зразок 2).

У порцеляновій ступці розтирали одну таблетку Зразка (кожного окремо), вміщували у мірну колбу на 100 мл, ретельно розчиняли порошок у 20 мл етилового спирту, доводили до позначки етиловим спиртом. Струшували та фільтрували за необхідністю. Піпеткою на 10 мл відбирали приготований аналізований розчин та вміщували у мірну колбу на 10 мл, доводили етиловим спиртом до позначки. Вважали, що концентрація діючої речовини гідрохлортіазид у аналізованому розчині становила 2,5 мг/100 мл.

2.2. Методики аналізу.

2.2.1. УФ -спектрофотометричного визначення.

Аліквоту (2 мл) аналізованого розчину переносили у мірну колбу на 10 мл, доводили до позначки розчином 0,1М NaOH. Перемішували. Визначення оптичної густини проводили при 273 нм, використовували кювети з кварцю, товщина шару 10 мм.

2.2.2. Алкаліметричного титрування з наступним визначенням точки еквівалентності потенціометрично.

Аліквоту (10 мл) аналізованого розчину переносили у контактну колбу або хімічний стакан для потенціометричного титрування, занурювали гальванічний елемент (електрод порівняння та електрод визначення), вмикали магнітну мішалку і титрували розчином $(C_4H_9)_4NOH$ концентрації 0,1М до наступу кінця реакції, який встановлювали за показанням приладу. Точку еквівалентності встановлювали по точці зламу на кривій титрування (графічна залежність потенціалу системи Е від об'єму титранту V).

Вміст діючої речовини встановлювали за стандартними формулами визначення маси аналізованої речовини при виконанні об'ємного аналізу:

$$m(C_7H_8ClN_3O_4S_2) = V((C_4H_9)_4NOH) \cdot C((C_4H_9)_4NOH) \cdot M(C_7H_8ClN_3O_4S_2)$$

$V((C_4H_9)_4NOH)$ · - середній об'єм титранту, л

$C((C_4H_9)_4NOH)$ · - молярна концентрація титранту, моль/л

Розділ 3. Результати та їх обговорення.

При аналізі наукових джерел щодо кількісного визначення гідрохлортіазиду ми дійшли висновку, що гідрохлортіазид у субстанції та ліках можна визначити низкою інструментальних методів [17-23]. Нам імпонують висновки вчених Аніщенко С., Бевз Н. та Георгіянц В [17] щодо методик визначення концентрації цієї діючої речовини у лікарських засобах спектрофотометрією. Вчені Національного фармацевтичного університету зробили наголос на тому, що найоптимальніше гідрохлортіазид можна визначити:

- Абсорбційною спектрофотометрією в ІЧ-області завдяки утворенню комплексної сполуки зеленого кольору з амоній метаванадатом;
- Абсорбційною спектрофотометрією в УФ – області у різних розчинниках завдяки наявності хромофорів у молекулі.

Спираючись на умовиводи українських вчених і узявши за основу методику, яка наведена у роботі [18] ми поставили задачу розробити та частково валідувати кількісне УФ – спектрофотометричне визначення гідрохлортіазиду у таблетованих формах. Водночас, кількісне визначення гідрохлортіазиду потенціометрично [11] також визвало нашу зацікавленість (оскільки обидва методи є достатньо точними та доступними), тому, метою нашої роботи була також розробка методики кількісного визначення гідрохлортіазиду алкіліметрією з наступним визначенням кінця реакції потенціометрично.

3.1. Кількісне визначення гідрохлортіазиду у Зразках методом УФ – спектрофотометрії.

3.1.1. Визначення найоптимальнішої довжини хвилі дослідження λ .

Для визначення найоптимальнішої довжини хвилі λ при розробці УФ - спектрофотометричної методики дослідник повинен проаналізувати залежність величини абсорбції (оптичної густини A розчину) від довжини

хвилі, тобто вивчити функцію $A = f(\lambda)$, іншими словами, проаналізувати спектр поглинання. Для проведення цього дослідження 2 мл стандартного розчину №4 (концентрація якого становила 2,5 мг/100 мл) вміщували у мірну колбу на 10 мл і доводили до позначки 0,1 М розчином NaOH, вимірювали оптичну густину у межах 240 нм - 320 нм та аналізували залежність $A = f(\lambda)$, результати представляли у вигляді кривої, Рисунок 6:

λ	240	250	260	270	273	280	290	300	310	320
A	0,021	0,033	0,042	0,071	0,074	0,042	0,021	0,010	0,009	0,008

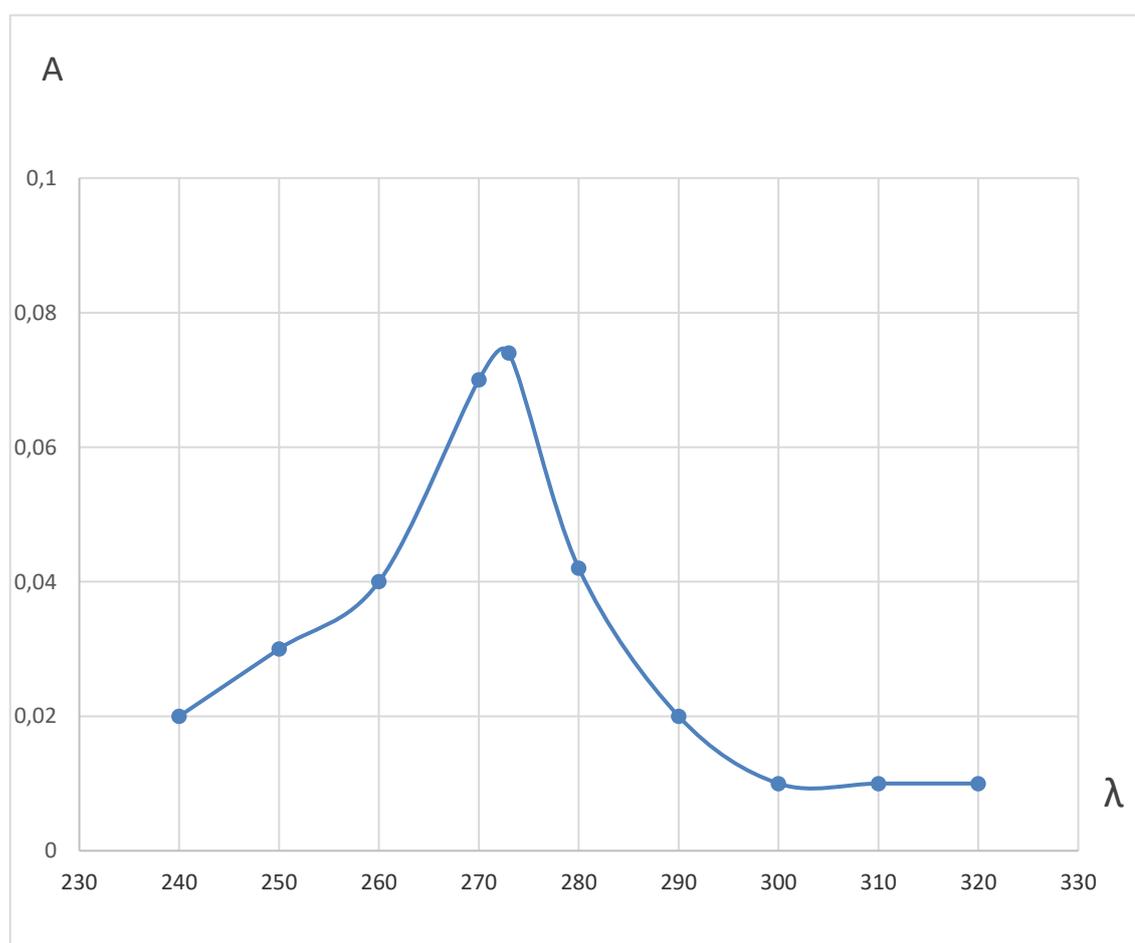


Рисунок 6. Залежність величини абсорбції (оптичної густини A) від довжини хвилі λ , концентрація розчину 2,5 мг/100 мл.

Аналізуючи спектр поглинання, можна зробити висновок, що найоптимальнішою довжиною хвилі є 273 нм (величина максимального поглинання), тому, наступні спектрофотометричні визначення доцільно було проводити саме при такому значенні λ .

3.1.2. Побудова градувального графіка та його аналіз на лінійність.

Для подальшого кількісного визначення діючої речовини гідрохлортіазид у Зразках будували градувальний графік (Рисунок 7), для цього вимірювали величину оптичної густини A у стандартних розведених розчинах та будували залежність $A = f(c)$. Лінійність оцінювали згідно вимогам ДФУ:

Функція лінійної регресії має вигляд $y = 0,027 \cdot x + 0,0055$ (коефіцієнт кореляції $R^2 = 0,9959$);

Стандартні відхилення та довірчі інтервали ($P = 0,95$ та ступенях свободи $\nu = 5 - t(0,95; 5) = 2,5706$) мають вигляд:

$$s_0^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - Y_i)^2}{\nu} = 0,00001155$$

$$s_b^2 = \frac{n \cdot s_0^2}{n \cdot \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2} = 6,0789 \cdot 10^{-7}$$

$$s_a^2 = \frac{s_b^2}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i^2 = 4,08158 \cdot 10^{-6}$$

$$s_b = \sqrt{s_b^2} = 0,0007797$$

$$s_a = \sqrt{s_a^2} = 0,00202$$

Довірчий інтервал для коефіцієнта a :

$$a \pm s_a \cdot t(0,95; 5) = 0,027 \pm 0,0052$$

Довірчий інтервал для коефіцієнта b :

$$b \pm s_b \cdot t(0,95; 5) = 0,0055 \pm 0,0020.$$

Результати відповідають вимогам ДФУ [24-25], методику можна вважати лінійною.

Значення оптичної густини A розведених стандартних розчинів представлено у Таблиці 2:

Таблиця 2. Значення оптичної густини розведених стандартних розчинів.

№	Концентрація стандартного розведеного розчину, мг/100 мл	Оптична густина A
1	0,5	0,021
2	1	0,034
3	1,5	0,051
4	2,5	0,074
5	3,5	0,098
6	5	0,14

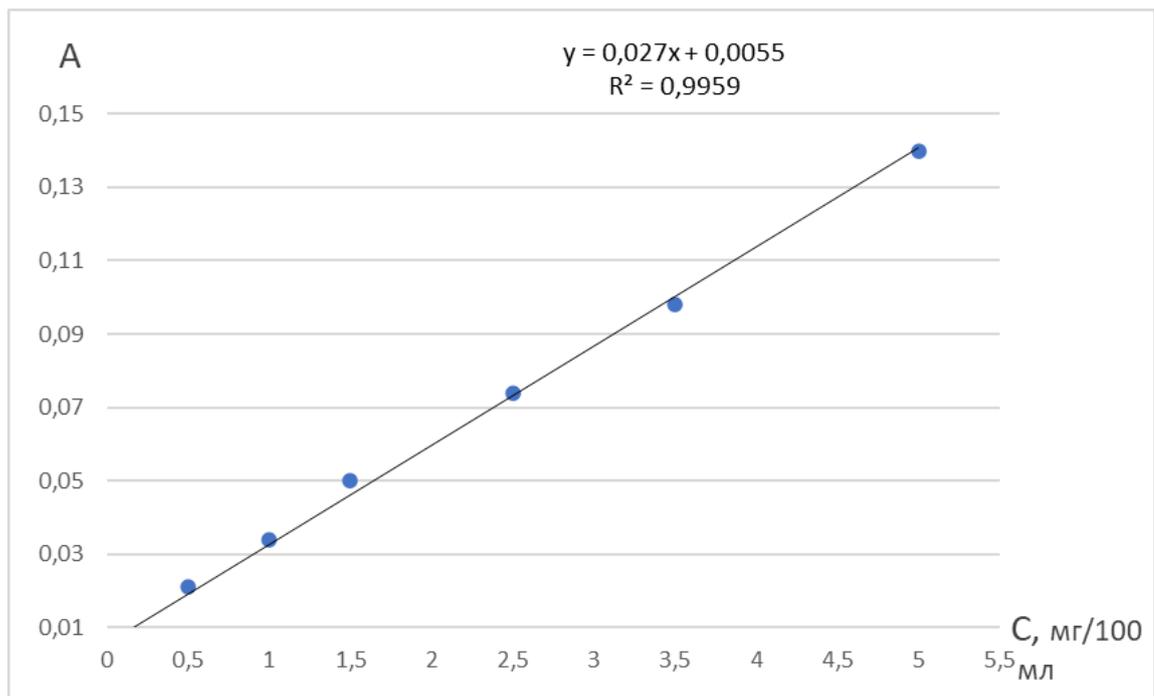


Рисунок 7. Градувальний графік.

3.1.3. Результати кількісного визначення діючої речовини гідрохлортіазид у Зразках.

Після побудови градувального графіка (ГГ) та аналізу методики УФ-спектрофотометричного визначення гідрохлортіазиду на лінійність, ми вимірювали оптичну густину аналізованих зразків, за допомогою ГГ встановлювали концентрацію гідрохлортіазиду у лікарських засобах. Результати визначення діючої речовини у Зразках (враховуючи розведення) та статистична обробка результатів наведено у Таблиці 3:

Таблиця 3. Результати кількісного визначення гідрохлортіазиду у Зразках методом УФ – спектрофотометрії.

Об'єкти дослідження	Кількісний вміст діючої речовини гідрохлортіазид, мг, враховуючи розведення	
	Зразок 1	Зразок 2
	25,21 25,06 25,44 24,95 24,68	25,17 25,12 25,62 24,86 24,94
Середнє значення,	25,07	25,14
Стандартне відхилення, s	0,28	0,30
Дисперсія, s^2	0,078	0,090
Відносне стандартне відхилення, %	1,13	1,18
Довірчий інтервал,	$25,07 \pm 0,35$	$25,14 \pm 0,37$
Відносна похибка середнього значення, , %	1,41	1,46

3.1.4. Перевірка стабільності розчинів у часі.

Одним із етапів валідації аналітичної методики є перевірка стабільності аналізованих розчинів у часі [24-25]. Для перевірки стабільності ми вивчали величину абсорбції (оптичну густину A) як функцію від часу $A = f(t)$ для розчину, концентрація якого 2,5 мг/100 мл. Результати наведено Таблиці 4. Отримані результати дозволяють зробити висновок, що розчин гідрохлортіазиду є стабільним протягом однієї години:

Таблиця 4.

Вивчення стабільності розчину гідрохлортіазиду у часі, концентрація розчину 2,5 мг/100 мл.

								Середнє	RSD,%	Довірчий інтервал	Відносна похибка середнього значення	Дисперсія
t, хв.	0	10	20	30	40	50	60					
A	0,074	0,074	0,075	0,075	0,075	0,076	0,076	0,075	1,09	0,075 ± 0,00076	1,01	6,67·10 ⁻⁷

3.2. Кількісне визначення гідрохлортіазиду у Зразках методом алкаліметричного титрування з наступним потенціометричним визначенням точки еквівалентності.

Після розробки та апробації методики УФ – спектрофотометричного кількісного визначення гідрохлортіазиду у Зразках ми поставили задачу провести визначення концентрації АФІ у таблетках об'ємним методом (алкаліметрією) і розробили методику, спираючись на [11]. Результати кількісного визначення гідрохлортіазиду представлено у Таблиці 5:

Таблиця 5. Результати кількісного визначення гідрохлортіазиду у Зразках методом алкаліметричного титрування з наступним визначенням точки еквівалентності потенціометрією.

№	Концентрація гідрохлортіазиду, враховуючи розведення, мг	
	Зразок 1	Зразок 2
1	25,87	25,65
2	25,43	25,31
3	25,25	25,15
4	24,75	24,86
5	24,64	24,55
Середнє значення	25,19	25,10
Стандартне відхилення, s	0,50	0,42
Дисперсія, s^2	0,25	0,18
Відносне стандартне відхилення, %	2,00	1,68
Довірчий інтервал	$25,19 \pm 0,63$	$25,10 \pm 0,52$
Відносна похибка середнього значення, %	2,49	2,08

Результати кількісного визначення відповідають вимогам ДФУ [24-25], але відносна похибка середнього значення є майже удвічі більшою у порівнянні з УФ – спектрофотометричним визначенням.

3.3. Часткова валідація методик.

Валідацією аналітичних методик називають певні дії, які спрямовані на з'ясування питань щодо спроможності використання методик при системній роботі [24-25]. Як правило, часткову валідацію вивчають при аналізі специфічності, правильності, лінійності тощо. Апробація запропонованих методик дала можливість зробити висновок щодо їх специфічності оскільки допоміжні речовини, які присутні у лікарському засобі не впливають на якість кількісного визначення діючої речовини, величина помилки відповідає вимогам ДФУ і не перебільшує 2 %, результати корелюють між собою. У процесі проведення експерименту доведена лінійність методики УФ-спектрофотометричного визначення, статистичні величини стандартних відхилень та довірчих інтервалів знаходяться у межах допустимого значення. Враховуючи вищезазначене, методики є правильними оскільки заявлені виробником концентрації АФІ гідрохлортіазид відповідають знайденим.

ВИСНОВКИ

1. Проаналізовано фізико-хімічні та фармакологічні властивості гідрохлортіазиду.
2. Проаналізовано методики ідентифікації та кількісного визначення гідрохлортіазиду у субстанції та лікарських засобах.
3. Розроблено методики кількісного визначення гідрохлортіазиду у таблетках методом алкаліметричного потенціометричного титрування та УФ – спектрофотометрією, проведена часткова валідація методик.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Довідник лікарських препаратів Компендіум [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <https://compendium.com.ua/>
2. Фармакологія за Рангом і Дейлом, пер.9-го англ.вид. у 2-х томах Т.1/Джеймс М.Рітер, Род Флавер, ГремГендерсон, Юн Конг Лоук, Девід Мак К,юн, Гемфрі П Ранг; наук.ред.перекл. Ганна Зайченко, Микола Хайтович.-К.ВСВ ”Медицина“, 2021-588 с.
3. Фармакологія з основами патології / Колесник Ю.М.,Чекман І.С., Беленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Нагорна О.О., Бухтіярова Н.В., Моргунцова С.А., Зайченко Г.В. : підручник. Вінниця: Нова книга, 2021. – 572 с.
4. Побічна дія ліків: підручник для студентів вищих навчальних закладів медичної освіти/Беленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Бухтіярова Н.В, Самура Т.А., Бухтіярова Т.А., Нагорна О.О., Моргунцова С.А., Єгоров А.А., Риженко О.В., Тихоновський О.В. Запоріжський державний медичний Університет. Вінниця: Нова книга, 2021. – 360 с.
5. Фармакологія. Підручник для медичних і стоматологічного факультетів Вищих медичних навчальних закладів освіти. І.С.Чекман, В.М.Бобирьов, В.В.Кресюн, В.В.Годован, Н.О.Горчакова, Л.І.Казак, Т.В.Кава, Г.Ю.ОстровськаТ.А.Петрова, Л.М.Рябушко Вінниця: Нова книга, 2020. – 472 с.
6. Довідник еквівалентності лікарських засобів Rxindex Спеціалізоване медичне видання / за ред І.А. Зупанця, В.П. Черних 4 вид. Перероблене К.: Фармацевт практик- 2020. – 2033 с.
7. Pharmacology / [M. A. Clark, R. Finkel, J. A. Rey et al.]. – [7th ed.]. – Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins, 2018. – 638 p.
8. www.pharma-center.com.ua.веб-сайт ДЦФ МОЗ України [web-page] URL.
9. Фармацевтична хімія: Підручник. Ред. П.О. Безуглий. – Вінниця: Нова Книга, 2008 – 560с.

10. Курс лекцій з фармацевтичної хімії : для студентів мед. ф-ту спец. "Фармація". Кн. 2 / Г. В. Різак. - Ужгород : ФОП Сабов А. М., 2022.- 284 с.
11. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3247/gidroxlorotiazid>
12. Ugbenbo, D. A.; Zdoryk, O. A.; Bevz, N. Y.; Georgiyants, V. A. Валідація методики кількісного визначення гідрохлоротіазиду в екстемпоральних лікарських засобах. *J. Org. Pharm. Chem.* 2017, 15, 47-54.
13. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2339/elektroximichni-metodi-analizu>.
14. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/913/potenciometriya>.
15. <https://kc.pnu.edu.ua/wp-content/uploads/sites/11/2021/02/L-2-Spectroskopy-inorg.pdf>.
16. Аналітична хімія. Підручник для вищих навчальних закладів / А.С. Алемасова, В.М. Зайцев, Л.Я. Єнальєва, Н.Д. Щепіна, С.М. Гождзінський / Під ред. В.М. Зайцева. – Донецьк: ДонНУ, 2009. – 415 с.
17. <https://journals.uran.ua/sciencerise/article/view/57208>
18. Hapse, S. A., Wagh, V. S., Kadaskar, P. T., Dokhe, M. D., Shirsath, A. S. (2012). Spectrophotometric estimation and validation of hydrochlorothiazide in tablet dosage forms by using different solvents. *Der Pharma Chemica*, 4 (1), 10–14. Available at: <http://derpharmachemica.com/vol4-iss1/DPC-2012-4-1-10-14.pdf>
19. Vlasova, I. V., Shylova, A. V. (2011). Spektrofotometricheskije metody v analize lekarstvennyh preparatov (obzor) [Spectrophotometric methods in the analysis of medicines (review)] *Zavodskaja laboratorija. Diagnostika materialov*, 1 (77), 21–26. Available at: <http://www.zldm.ru/upload/iblock/a11/20117701021.pdf>
20. Georgiyevsky, V. P. (2011). Analiticheskaja khimiia v sozdanii, standartizatsii i kontrole kachestva lekarstvennykh sredstv [Analytical chemistry in the

development, standardization and quality control of medications]. (Vols. 1-3). Kharkov: NTMT [in Russian].

21. Vlasova, I. V., Shylova, A. V. (2007). *Novyye podkhody k spektrofotometricheskomu analizu mnogokomponentnykh smesei* [New approaches to spectrophotometric analysis of multicomponent mixtures]. *Visnyk Kharkivskoho natsionalnoho universitetu N 770 Khimiia*, 15 (38), 141–146. Available at: http://www-chemistry.univer.kharkov.ua/files/16_Vlasova.pdf
22. Dibbern, H. W., Muller, R. M., Wirbitzky, E. (2002). *UV and IR spectra: pharmaceutical substances (UV and IR) and pharmaceutical and cosmetic excipients (IR)*. Aulendorf (Germany): ECV, Editio Cantor-Verl, 1764.
23. *British Pharmacopoeia*. Vol. 1 (2009). The British Pharmacopoeia Secretariat. London, 10952.
24. Валідація аналітичних методик і випробувань. Державна Фармакопея України. Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е видання. Харків : PIPEГ, 2001. С.58 – 67. Доповнення 1. 2004. С. 2 – 4.
25. Георгіянц В.А. Валідація аналітичних методик у фармації : теорія, нормативні аспекти, проблеми практики. В.А. Георгіянц. О.А. Євтіфєєва. *Фармацевтичний часопис*. 2007. №2. С.13 – 18.

ДОДАТКИ

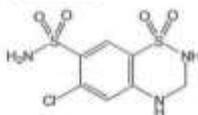
Додаток 1. Витяг з Державної Фармакопеї.

Гідрохлортіазид

ГІДРОХЛОРТІАЗИД

Hydrochlorothiazidum

HYDROCHLOROTHIAZIDE



$C_7H_8ClN_2O_4S_2$
[58-93-5]

М.м. 297.7

6-Хлор-3,4-дигідро-2Н-1,2,4-бензотіадазін-7-сульфонамід 1,1-діоксид.

Вміст: не менше 97.5 % і не більше 102.0 %, у перерахунку на суху речовину.

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Кристалічний порошок білого або майже білого кольору.

Розчинність. Дуже мало розчинний у воді Р, розчинний в ацетоні Р, помірно розчинний в етанолі (96 %) Р.

Розчиняється в розведених розчинах гідроксидів лужних металів.

Виявляє поліморфізм (5.9).

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Перша ідентифікація: В.
Друга ідентифікація: А, С, D.

А. Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій і видимій областях (2.2.25).

Випробовуваний розчин. 50.0 мг субстанції розчиняють у 10 мл 0.1 М розчину натрію гідроксиду і доводять об'єм розчину водою Р до 100.0 мл. 2.0 мл одержаного розчину доводять 0.01 М розчином натрію гідроксиду до об'єму 100.0 мл.

Спектральна область: від 250 нм до 350 нм.

Максимуми поглинання: за довжин хвиль 273 нм і 323 нм.

Відношення оптичних густих: A_{273}/A_{323} становить від 5.4 до 5.7.

В. Абсорбційна спектрофотометрія в інфрачервоній області (2.2.24).

Відповідність: спектру ФСЗ гідрохлортіазиду.

У разі різниці одержаних для речовин у твердому стані спектрів, окремо розчиняють субстанцію та

ФСЗ гідрохлортіазиду в етанолі Р1, упарюють насухо та повторно записують спектри одержаних залишків.

С. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Випробовуваний розчин. 50 мг субстанції розчиняють в ацетоні Р1 доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Розчин порівняння (а). 50 мг ФСЗ гідрохлортіазиду розчиняють в ацетоні Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Розчин порівняння (б). 25 мг хлортіазиду Р розчиняють у розчині порівняння (а) і доводять об'єм розчину розчином порівняння (а) до 5 мл.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю F_{254} Р.

Рухома фаза: етилацетат Р.

Об'єм проб: 2 мкл.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 1/2 довжини пластинки.

Висушування: у потоці повітря.

Виявлення: переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (б):

— на хроматограмі виявляються дві чітко розділені плями.

Результати: на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння (а), відповідна їй за розміром.

D. Близько 1 мг субстанції обережно нагрівають із 2 мл свіжоприготованого розчину 0.5 г/л хроматропової кислоти натрієвої солі Р в охолодженій суміші вода Р – сірчана кислота Р (35:65); з'являється фіолетове забарвлення.

ВИПРОБУВАННЯ

Кислотність або лужність. 0.5 г розтертої субстанції струшують із 25 мл води Р протягом 2 хв і фільтрують. До 10 мл одержаного фільтрату додають 0.2 мл 0.01 М розчину натрію гідроксиду та 0.15 мл метилового червоного розчину Р; розчин жовтий. Червоне забарвлення розчину має з'явитися при додаванні не більше 0.4 мл 0.01 М розчину хлористоводневої кислоти.

Супровідні домішки. Рідинна хроматографія (2.2.29).

Суміш розчинників. 50.0 мл суміші рівних об'ємів ацетонітрилу Р1 і метанолу Р2 доводять фосфатним буферним розчином рН 3.2 Р1 до об'єму 200.0 мл.

Випробовуваний розчин (а). 30.0 мг субстанції розчиняють у 5 мл суміші рівних об'ємів ацетонітрилу Р1

Гідрохлортіазид

і метанолу *P2*, якщо необхідно, використовуючи ультразвукову баню, і доводять об'єм розчину фосфатним буферним розчином *pH 3.2 P1* до 20.0 мл.

Випробуваний розчин (b). 1.0 мл випробовуваного розчину (a) доводять фосфатним буферним розчином *pH 3.2 P1* до об'єму 20.0 мл.

Розчин порівняння (a). 3 мг ФСЗ хлортіазиду (домішка А) і 3 мг ФСЗ гідрохлортіазиду розчиняють у 5 мл суміші рівних об'ємів ацетонітрилу *P1* і метанолу *P2*, якщо необхідно, використовуючи ультразвукову баню, і доводять об'єм розчину фосфатним буферним розчином *pH 3.2 P1* до 20.0 мл. 5.0 мл одержаного розчину доводять сумішню розчинників до об'єму 100.0 мл.

Розчин порівняння (b). 1.0 мл випробовуваного розчину (a) доводять сумішню розчинників до об'єму 100.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять сумішню розчинників до об'єму 10.0 мл.

Розчин порівняння (c). 30.0 мг ФСЗ гідрохлортіазиду розчиняють у 5 мл суміші рівних об'ємів ацетонітрилу *P1* і метанолу *P2*, якщо необхідно, використовуючи ультразвукову баню, і доводять об'єм розчину фосфатним буферним розчином *pH 3.2 P1* до 20.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять фосфатним буферним розчином *pH 3.2 P1* до об'єму 20.0 мл.

Розчин порівняння (d). 3 мг ФСЗ гідрохлортіазиду для ідентифікації піка (містить домішки В і С) розчиняють у суміші рівних об'ємів ацетонітрилу *P1* і метанолу *P2*, якщо необхідно, використовуючи ультразвукову баню, і доводять об'єм розчину фосфатним буферним розчином *pH 3.2 P1* до 2.0 мл.

Колонка:

- розмір: 0.1 м × 4.6 мм;
- нерухома фаза: силікагель для хроматографії, октадецилсилільний *P* (3 мкм).

Рухома фаза:

- рухома фаза А: до 940 мл фосфатного буферного розчину *pH 3.2 P1* додають 60.0 мл метанолу *P2* і 10.0 мл тетрагідрофурану *P* і перемішують;
- рухома фаза В: до суміші 500 мл метанолу *P2* і 500 мл фосфатного буферного розчину *pH 3.2 P1* додають 50.0 мл тетрагідрофурану *P* і перемішують;

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - 17	100 → 55	0 → 45
17 - 30	55	45

Швидкість рухомої фази: 0.8 мл/хв.

Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 224 нм.

Інжекції: 10 мкл. Вводять випробовуваний розчин (a) і розчини порівняння (a), (b) і (d).

Ідентифікація домішок: використовують хроматограму розчину порівняння (a) для ідентифікації піка домішки А; використовують хроматограму, що

надіється до ФСЗ гідрохлортіазиду для ідентифікації піка, та хроматограму розчину порівняння (d) для ідентифікації піків домішок В і С.

Відносні утримування до гідрохлортіазиду (час утримування гідрохлортіазиду близько 8 хв): домішки В — близько 0.7, домішки А — близько 0.9, домішки С — близько 2.8.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (a):

- ступінь розділення: не менше 2.5 між піками домішки А та гідрохлортіазиду.

Нормування:

- домішки А, В, С: площа піка кожної домішки не має перевищувати 5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.5 %);
- неспецифіковані домішки: площа піка кожної домішки не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.10 %);
- сума домішок: сума площ піків не має перевищувати 10 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (b) (1.0 %);
- не враховують: домішки, площа піків яких становить менше 0.5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.05 %).

Хлориди (2.4.4). Не більше 0.01 % (100 ppm).

1.0 г субстанції розчиняють у 25 мл ацетону *P* і доводять об'єм розчину водою *P* до 30 мл. Еталон готують із використанням 5 мл ацетону *P*, що містить 15 % (об/об) води *P*, і 10 мл хлориду еталонного розчину (5 ppm *Cl*) *P*.

Втрата в масі при висушуванні (2.2.32). Не більше 0.5 %. 1.000 г субстанції сушать при температурі 105 °С.

Сульфатна зола (2.4.14). Не більше 0.1 %. Визначення проводять з 1.0 г субстанції.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Рідинна хроматографія (2.2.29) як описано у випробуванні «Супровідні домішки» із такими змінами.

Рухома фаза:

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - 4	80	20
4 - 10	80 → 20	20 → 80

Швидкість рухомої фази: 1.6 мл/хв.

Інжекції: випробовуваний розчин (b), розчини порівняння (a) і (c).

Відносне утримування до гідрохлортіазиду (час утримування гідрохлортіазиду близько 2.2 хв): домішки А — близько 0.9.

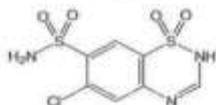
Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (a):

— ступінь розділення: не менше 2.0 між піками домішки А та гідрохлортиазиду.

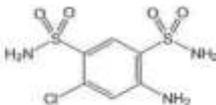
Вміст $C_7H_7ClN_3O_4S_2$ у відсотках, обчислюють, використовуючи заявлений вміст у ФСЗ гідрохлортиазиду.

ДОМІШКИ

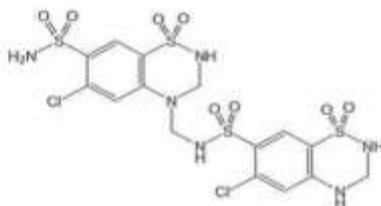
Специфіковані домішки: А, В, С.



А. 6-хлор-2H-1,2,4-бензотіазин-7-сульфонамід 1,1-діоксид (хлортіазид),



В. 4-аміно-6-хлорбензол-1,3-дисульфонамід (салмід),

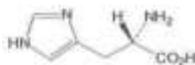


С. 6-хлор-N-[(6-хлор-7-сульфамойл-2,3-дигідро-4H-1,2,4-бензотіазин-4-іл) 1,1-діоксид]метил]-3,4-дигідро-2H-1,2,4-бензотіазин-7-сульфонамід 1,1-діоксид.

ГІСТИДИН

Histidinum

HISTIDINE



$C_6H_9N_3O_2$
[71-00-1]

М.м. 155.2

(S)-2-Аміно-3-(імідазол-4-іл)пропанова кислота.

Вміст: не менше 98.5 % і не більше 101.0 %, у перерахунку на суху речовину.

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Кристалічний порошок білого або майже білого кольору або безбарвні кристали.

Розчинність. Розчинний у воді Р, дуже мало розчинний в етанолі (96 %) Р.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Перша ідентифікація: А, В.

Друга ідентифікація: А, С, D.

А. Субстанція має відповідати вимогам щодо питомого оптичного обернення як зазначено в розділі «Випробування».

В. Абсорбційна спектрофотометрія в інфрачервоній області (2.2.24).

Підготування зразка: субстанцію досліджують у дисках.

Відповідність: спектру ФСЗ гістидину.

У разі різниці одержаних спектрів окремо розчиняють субстанцію та ФСЗ гістидину в мінімальному об'ємі води Р, упарюють насухо при температурі 60 °С і повторно записують спектри одержаних залишків.

С. На хроматограмі випробовуваного розчину (в), одержаній у випробуванні «Речовини, виявлені нінгідрином», має виявитися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння (а), відповідна їй за розміром і забарвленням.

D. 0.1 г субстанції розчиняють у 7 мл води Р і додають 3 мл розчину 200 г/л натрію гідроксиду Р. 50 мг сульфаноїлової кислоти Р розчиняють у суміші 0.1 мл хлористоводневої кислоти Р і 10 мл води Р і додають 0.1 мл натрію нітриту розчину Р. Другий розчин додають до першого і перемішують; з'являється оранжево-червоне забарвлення.

ВИПРОБУВАННЯ

Розчин S. 2.5 г субстанції розчиняють у воді дистильованій Р при нагріванні у водяній бані та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50 мл.

Прозорість розчину (2.2.1). Розчин S має бути прозорим.

Кольоровість розчину (2.2.2, метод II). Забарвлення розчину S має бути не інтенсивнішим за еталон ВУ₂.

Питоме оптичне обернення (2.2.7). Від +11.4 до +12.4, у перерахунку на суху речовину.

2.75 г субстанції розчиняють у 12 мл хлористоводневої кислоти Р і доводять об'єм розчину водою Р до 25.0 мл.

Додаток 2. Витяг з Європейської фармакопеї.

Hydrocodone hydrogen tartrate 2.5-hydrate

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.0

Mobile phase:

- mobile phase A: to 940 mL of phosphate buffer solution pH 3.2 R1 add 60.0 mL of methanol R2 and 10.0 mL of tetrahydrofuran R and mix;
- mobile phase B: to a mixture of 500 mL of methanol R2 and 500 mL of phosphate buffer solution pH 3.2 R1 add 50.0 mL of tetrahydrofuran R and mix;

Time (min)	Mobile phase A (per cent V/V)	Mobile phase B (per cent V/V)
0 - 17	100 → 55	0 → 45
17 - 30	55	45

Flow rate: 0.8 mL/min.

Detection: spectrophotometer at 224 nm.

Injection: 10 µL of test solution (a) and reference solutions (a), (b) and (d).

Identification of impurities: use the chromatogram obtained with reference solution (a) to identify the peak due to impurity A; use the chromatogram supplied with hydrochlorothiazide for peak identification CRS and the chromatogram obtained with reference solution (d) to identify the peaks due to impurities B and C.

Relative retention with reference to hydrochlorothiazide (retention time = about 8 min): impurity B = about 0.7; impurity A = about 0.9; impurity C = about 2.8.

System suitability: reference solution (a):

- resolution: minimum 2.5 between the peaks due to impurity A and hydrochlorothiazide.

Limits:

- impurities A, B, C: for each impurity, not more than 5 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.5 per cent);
- unspecified impurities: for each impurity, not more than the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.10 per cent);
- total: not more than 10 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (1.0 per cent);
- disregard limit: 0.5 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.05 per cent).

Chlorides (2.4.4): maximum 100 ppm.

Dissolve 1.0 g in 25 mL of acetone R and dilute to 30 mL with water R. Prepare the standard using 5 mL of acetone R containing 15 per cent V/V of water R and 10 mL of chloride standard solution (5 ppm Cl) R.

Loss on drying (2.2.32): maximum 0.5 per cent, determined on 1.000 g by drying in an oven at 105 °C.

Sulfated ash (2.4.14): maximum 0.1 per cent, determined on 1.0 g.

ASSAY

Liquid chromatography (2.2.29) as described in the test for related substances with the following modifications.

Mobile phase:

Time (min)	Mobile phase A (per cent V/V)	Mobile phase B (per cent V/V)
0 - 4	80	20
4 - 10	80 → 20	20 → 80

Flow rate: 1.6 mL/min.

Injection: test solution (b) and reference solutions (a) and (c).

Relative retention with reference to hydrochlorothiazide (retention time = about 2.2 min): impurity A = about 0.9.

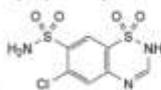
System suitability: reference solution (a):

- resolution: minimum 2.0 between the peaks due to impurity A and hydrochlorothiazide.

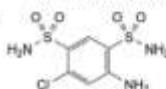
Calculate the percentage content of C₁₇H₁₉ClN₂O₅S₂ taking into account the assigned content of hydrochlorothiazide CRS.

IMPURITIES

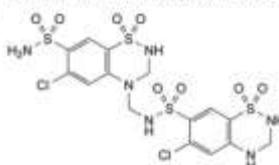
Specified impurities: A, B, C.



A. 6-chloro-2H-1,2,4-benzothiadiazine-7-sulfonamide 1,1-dioxide (chlorothiazide),



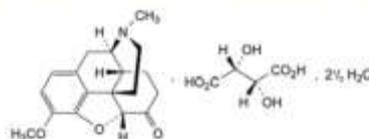
B. 4-amino-6-chlorobenzene-1,3-disulfonamide (salamide),



C. 6-chloro-N-[(6-chloro-7-sulfamoyl-2,3-dihydro-4H-1,2,4-benzothiazin-4-yl) 1,1-dioxide)methyl]-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine-7-sulfonamide 1,1-dioxide.

04/2009:1784
corrected 7.0HYDROCODONE HYDROGEN
TARTRATE 2.5-HYDRATE

Hydrocodoni hydrogenotartras 2.5-hydricus

C₁₇H₂₁NO₈·2.5H₂OM_r 494.5

DEFINITION

4,5α-Epoxy-3-methoxy-17-methylmorphinan-6-one hydrogen (2R,3R)-2,3-dihydroxybutanedioate 2,5-hydrate.

Content: 99.0 per cent to 101.0 per cent (anhydrous substance).

CHARACTERS

Appearance: white or almost white, hygroscopic, crystalline powder.

Solubility: freely soluble or soluble in water, sparingly soluble in ethanol (96 per cent), practically insoluble in cyclohexane.

IDENTIFICATION

Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

Comparison: hydrocodone hydrogen tartrate 2.5-hydrate CRS.

If the spectra obtained in the solid state show differences, dry the substance to be examined and the reference substance at 105 °C and record new spectra using the residues.

Анотація (Summary)

Introduction. Medicines containing the API hydrochlorothiazide (medium-strength diuretic) are used in the treatment of hypertension, glaucoma, urolithiasis, etc.

Purpose of the study. To develop a method for quantitative UV-spectrophotometric determination of the API hydrochlorothiazide in tablets.

Research methods. Bibliosemantic, UV-spectrophotometry.

Results. The professional literature presents a fairly significant number of methods for quantitative determination of hydrochlorothiazide. Hydrochlorothiazide as an API can be determined by the volumetric method (cerimetry), alkalimetry with subsequent determination of the equivalence point by potentiometry, spectrophotometry. Among the presented methods, we highlight the achievements of scientists of the National Pharmaceutical Academy (Anishchenko S., Bevz N., Georgiyants V.), who proposed to conduct UV spectrophotometric determinations of hydrochlorothiazide in medicines at a wavelength of 273 nm. Based on the conclusions of colleagues, we developed a UV spectrophotometric method for the quantitative determination of the API hydrochlorothiazide using the calibration graph method (standard diluted solutions with a concentration of 0.5-10 mg/100 ml for constructing the calibration graph were prepared according to well-known dilution methods, the pharmacopoeial standard sample of hydrochlorothiazide was used in the work, ethyl alcohol was chosen as the solvent, weighing was carried out using a MettlerToledo XS 204 laboratory balance). The optimal wavelength (in our case 270 nm), at which it is advisable to measure the absorbance (optical density) of the samples, was found by analyzing the absorption spectrum in the range of 240-320 nm, the optical density was measured on a SPECORD 200-222 U 214 spectrophotometer. The stability of hydrochlorothiazide solutions was studied through the dependence of the optical density on time under constant conditions (the RSD value,% was 1.1%). The

method was analyzed for linearity, the linear regression function ($y = 0.027 \cdot x + 0.0055$) was determined by the least squares method, the results met the requirements of the State Federal University of Health Sciences.

Conclusions. A method for quantitative spectrophotometric determination of the API hydrochlorothiazide in tablets has been developed, tested and partially validated, the results correlate with the concentrations specified by the manufacturer in the instructions for medical use.