



УДК 615.073/.074:543.421.3:614.224:615.3

## VALIDATION OF THE SPECTROPHOTOMETRIC TECHNIQUE FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF BISOPROLOL IN TABLETS ПРОВЕДЕННЯ ВАЛІДАЦІЇ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ БІСОПРОЛОЛУ В ТАБЛЕТКАХ

Zarivna N.O. / Зарівна Н.О.

c.pharm.s., as.prof. / к.фарм.н., доц.

ORCID: 0000-0002-8522-4024

I. Horbachevsky Ternopil national medical university,

Ternopil, Ruska, 36, 46000

Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського,

Тернопіль, Руська, 36, 46000

**Анотація.** За останні роки суттєво збільшилась кількість пацієнтів, що хворіють на гіпертонічну хворобу. Проаналізувавши протоколи лікування, лікарі надають перевагу препаратам із групи блокаторів  $\beta$ -адренорецепторів, лідируючу позицію серед яких займає бісопролол, який при застосуванні у терапевтичних дозах не має внутрішньої симпатоміметичної активності, клінічно виражених мембраностабілізуючих властивостей, а також проявляє антиангінальну та гіпотензивну дію.

Існуючі на сьогодні аналітичні методики визначення бісопрололу в лікарських засобах є досить трудоемними, не селективними, а часто вимагають використання дороговартісного обладнання та відповідних реактивів, тому було вирішено розробити експресну, точну, екологічну та безпечну методику кількісного визначення бісопрололу фумарату в таблетках. Попередніми нашими дослідженнями підбиралися оптимальні умови пробопідготовки для розробки УФ-спектрофотометричної методики його кількісного визначення. В результаті проведених експериментів оптимальною довжиною хвилі було обрано 272 нм, оптимальним розчинником метанол Р, оптимальною концентрацією розчинів  $1.00 \times 10^{-3}$  М, а також підтверджено, стабільність приготовлених розчинів впродовж 45 хвилин без використання регуляторів рН, буферних розчинів, додаткових реагентів, що суттєво полегшує проведення даного аналізу. Наступним етапом експерименту є проведення валідації розробленої нами методики за основними валідаційними параметрами згідно вимог Державної фармакопеї України.

**Ключові слова:** бісопрололу фумарат, таблетки, спектрофотометрія, валідація.

### Вступ.

Серцево-судинна патологія – це основна причина захворюваності, інвалідизації та смертності осіб працездатного віку в усіх країнах світу. В Україні гіпертонічна хвороба є важливою медико-соціальною проблемою, яка призводить до більшості серцево-судинних ускладнень [1-3]. Її лікування направлене на максимально можливе зниження потенційного ризику розвитку серцево-судинних ускладнень шляхом досягнення та підтримання цільового рівня артеріального тиску та на запобігання розвитку тяжких ускладнень з боку серцево-судинної системи (хронічна серцева недостатність, миготлива аритмія, цереброваскулярні порушення периферичних судин) [2-4]. Аналізуючи протоколи лікування гіпертонії часто призначення спеціалістів розпочинається із групи блокаторів  $\beta$ -адренорецепторів. Вони застосовуються для хворих, що страждають на стенокардію, які перенесли інфаркт міокарда в минулому, або серцеву недостатність. Також, їх приписують для контролю серцевого ритму. У



відповідні схеми лікування щодо цього захворювання часто призначають бісопролол, який зменшує потребу міокарду в кисні завдяки зменшенню частоти серцевих скорочень і серцевого викиду, знижує, не лише артеріальний тиск, а й збільшує постачання міокарда киснем за рахунок зменшення кінцевого діастолічного тиску та подовженням діастоли відповідно [4]. Поглиблене вивчення бісопрололу в області фармацевтичного аналізу було і залишається актуальним на сьогодні, адже розробка нових методів аналізу, або модифікації існуючих дасть змогу не тільки визначати його якісний склад та кількісний вміст, а й дозволить належно контролювати якість медикаментів на його основі контрольними-аналітичними лабораторіями та хіміко-фармацевтичними підприємствами.

Доступні нам, в джерелах літератури, аналітичні методики визначення бісопрололу фумарату є недостатньо селективними, вимагають використання дороговартісного обладнання та відповідних реактивів, останні можуть бути токсичними та не відповідати вимогам «зеленої» хімії. Тому, розробка нових, або модифікації існуючих методів його визначення в готових лікарських засобах є актуальним завданням фармацевтичної науки та практики.

У попередніх наших дослідженнях [5] представлено підбір оптимальних умов пробопідготовки, яка є надважливим етапом для розробки методики кількісного визначення, адже вона необхідна не лише для покращення метрологічних характеристик дослідження, а й для підвищення точності, правильності та розширення діапазону досліджуваних значень концентрацій і тим самим для зменшення похибки результатів аналізу. Після підбору оптимальних умов пробопідготовки необхідно провести валідацію розробленої нами методики кількісного визначення. Оскільки валідація – це експериментальний доказ того, що методика є придатною для поставлених цілей і задач, тому метою нашої роботи є – вивчення валідаційних параметрів при проведенні валідації УФ-спектрофотометричної методики кількісного визначення бісопрололу фумарату в таблетках.

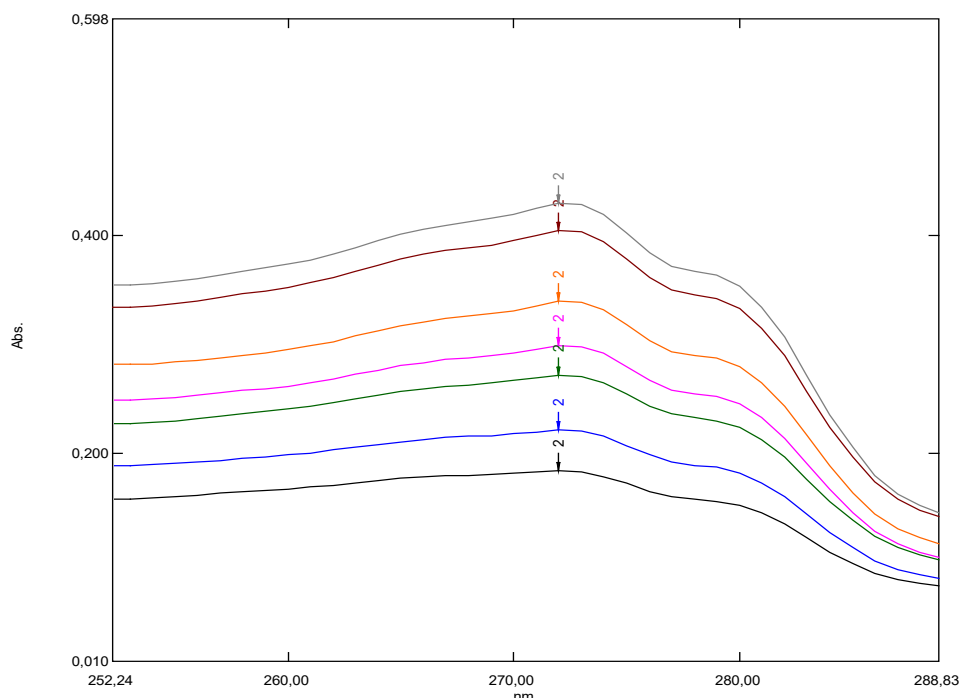
*Джерело: [1-7].*

#### **Основний текст.**

Для проведення експерименту використовували спектрофотометр “Shimadzu UV-1800” (Японія) із застосуванням програмного пакета UV-Probe 2.62, кварцові кювети 1 см, таблетки «Бісопрол» 10 мг, фармакопейний стандартний зразок (ФСЗ) бісопрололу фумарату (“Sigma-Aldrich”,  $\geq 98\%$ , високоефективна рідинна хроматографія), метанол Р (“Honeywell Riedel-de Haen™”, 99,9 %).

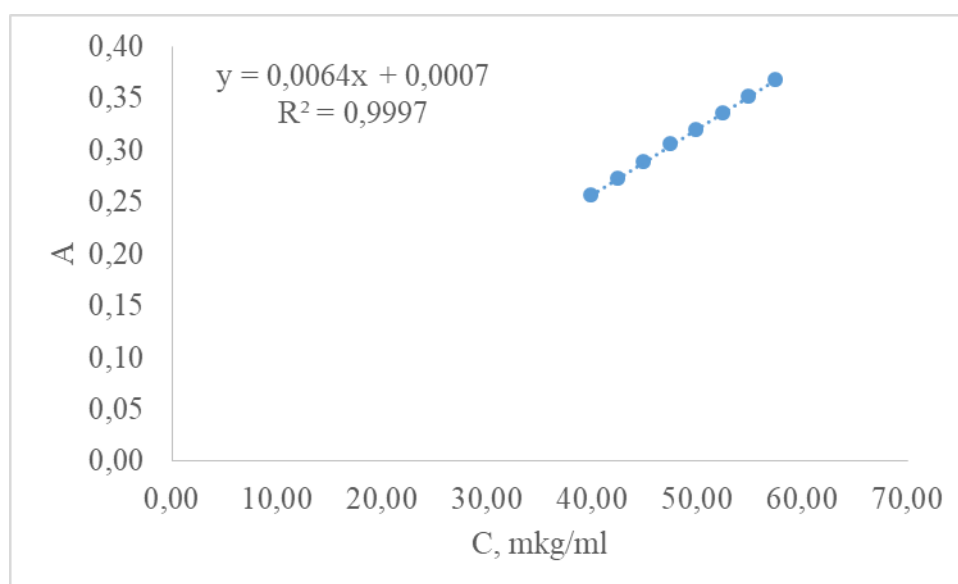
Проведення валідації досліджували за такими параметрами як: лінійність, збіжність, правильність і прецизійність, а також робастність. Вивчали, також невизначеність пробопідготовки розробленої методики.

Лінійність аналітичної методики вивчали згідно до вимог ДФУ [6] методом найменших квадратів у діапазоні концентрацій від 39.94 – 59.90 мкг/мл, використовуючи модельні розчини зразків. Абсорбційні спектри поглинання метанольних розчинів досліджуваних АФІ за умов вивчення лінійності аналітичної методики показано на рисунку 1.



**Рисунок 1 – Електронні спектри поглинання розчинів бісопрололу фумарату в метанолі при вивченні лінійності УФ-спектрофотометричної методики (0.9 – 1.5 мл (0.9 мл – чорний; 1.0 мл – синій; 1.1 мл – зелений; 1.2 мл – рожевий; 1.3 мл – оранжевий; 1.4 мл – коричневий; 1.5 мл – сірий))**

На рис. 2 зображено графік лінійності бісопрололу фумарату та прослідковано залежність його поглинання від концентрації визначуваного ЛЗ із 39.94 мкг/мл до 59.90 мкг/мл. Згідно цього, показники межа виявлення (МВ) та межа кількісного визначення (МКВ) досліджували з використанням параметрів стандартного відхилення аналітичного сигналу ( $\sigma$ ) та тангенсу нахилу регресійної прямої ( $b$ ). В результаті, МВ становила 0.9636 мкг/мл, а МКВ – 2.92 мкг/мл. При цьому рівняння лінійної регресії виглядало таким чином:  $y = 0.0064x + 0.0007$ , коефіцієнт кореляції ( $R^2$ ) при цьому становить 0.9997.



**Рисунок 2 – Графік лінійності бісопрололу фумарату в таблетках**



Метрологічні характеристики рівняння регресії для кількісного визначення бісопрололу фумарату наведено в таблиці 1. Параметри лінійності відповідають вимогам ДФУ по всьому діапазоні застосування аналітичної методики (39.94 – 59.90 мкг/мл).

**Таблиця 1 – Метрологічні характеристики лінійної залежності бісопрололу фумарату в таблетках**

Величина	Значення	Критерій	Висновок (відповідає або не відповідає)
$b \pm (S_b)$	0.0064±(0.000085)	–	
$a \pm (S_a)$	0.0007±(0.0043)	$ a  \leq 2.6$	Відповідає
$R^2$	0.99976	$> 0.9980$	Відповідає
МВ (мкг/мл)	0.9636	–	
МКВ (мкг/мл)	2.92	–	
Діапазон застосування (мкг/мл)	39.94-59.90	–	

Наступним етапом проведення валідації є вивчення правильності методики та прецизійності. Правильність та прецизійність УФ-спектрофотометричної методики перевіряли шляхом приготування модельних розчинів з точно відомою концентрацією з вмістом 80-120 % від номінального (згідно вимог ДФУ) [6, 7]. Одержані результати проведених розрахунків наведено в таблиці 2.

Як впливає з таблиці 2, методика визначення бісопрололу фумарату характеризується хорошою прецизійністю, адже отримане значення відносного довірчого інтервалу  $\Delta z$  дорівнює 0.12, що є менше критичного значення, що становить, відповідно, 1.6 % для збіжності результатів аналізу. Згідно з вимогами ДФУ [7], результати визначень є правильними, якщо не обтяжені значущою систематичною похибкою, тобто справжнє значення величини, що визначається, входить у встановлений довірчий інтервал. Так, і в розробленій нами методиці виконується критерій незначущості систематичної похибки методики, адже її значення відповідає 0.01 %, що вказує на наближеність до номінальних, середніх результатів одержаних значень оптичних густин, тому можна її вважати - практично незначущою.

Отже, розроблена УФ-спектрофотометрична методика характеризується достатньою правильністю по всьому діапазоні концентрацій від 80 до 120 %.

Як відомо, розрахунок повної невизначеності аналітичної методики складається з розрахунку  $\Delta_{SP}$  - невизначеності пробопідготовки та  $\Delta_{FAO}$  - кінцевої аналітичної операції. Розрахунок невизначеності пробопідготовки для методики кількісного визначення бісопрололу фумарату представлено в таблиці 3. Невизначеність кінцевої аналітичної операції для спектрофотометричного визначення складає 0.70 % (ДФУ) [6, 7].



**Таблиця 2 – Результати аналізу модельних сумішей і їх статистична обробка для кількісного визначення бісопрололу фумарату**

Модельні розчини	Вміст бісопрололу фумарату, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100 \%$
	введено, $X_i = (C_i/C_{rs}) 100 \%$	знайдено, $Y_i = (A_i/A_{rs}) 100 \%$	
M <sub>1</sub>	80.03	80.01	99.98
M <sub>2</sub>	85.06	85.03	99.96
M <sub>3</sub>	90.08	90.03	99.94
M <sub>4</sub>	95.03	95.01	99.98
M <sub>5</sub>	100.14	100.18	100.04
M <sub>6</sub>	105.04	105.12	100.08
M <sub>7</sub>	110.08	110.16	100.07
M <sub>8</sub>	116.05	116.01	99.97
M <sub>9</sub>	120.02	120.09	100.06
Середнє значення, Z, %			100.01
Стандартне відхилення, S <sub>z</sub> , %			0.05
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95 \%, 8) \cdot S_z = 2.3060 S_z, \%$			0.12
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta_{As} = 2.4 \%$			Виконується (0.12 < 2.4)
Систематична похибка $\delta =  Z - 100 , \%$			0.01
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta \%$			Виконується (0.01 < 0.51)
Загальний висновок про методуку			Коректна

Розрахована невизначеність пробопідготовки ( $\Delta_{SP}$ ) для визначення бісопрололу фумарату в досліджуваних таблетках дорівнює 1.69 %. Максимальний внесок у невизначеність пробопідготовки складають такі операції: 3, 7 – це взяття аліквоти розчину піпеткою на 1 мл. Повна невизначеність аналітичної методики ( $\Delta_{As}$ ) при аналізі ЛЗ становила 1.83 %, що є менше критичного значення, згідно вимог ДФУ ( $\Delta_{As} = 1.83 \% \leq \max \Delta_{As} = 2.4 \%$ ) [7].

Запропонована УФ-спектрофотометрична методика кількісного визначення бісопрололу фумарату в таблетках даватиме коректні результати також, і в інших лабораторіях по контролю якості ЛЗ, адже прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не є більшою за критичне значення ( $\max \Delta_{As}$ ) та відповідає критеріям прийнятності.



Результати визначення вмісту бісопрололу fumarату в таблетках наведено в таблиці 4. Для цього було проаналізовано таблетки виробництва ПАТ «Фармак» двох серій.

**Таблиця 3 – Розрахунок невизначеності пробопідготовки для УФ-методики кількісного визначення бісопрололу fumarату в таблетках**

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
<b>Розчин порівняння бісопрололу fumarату</b>		
1) взяття наважки ФСЗ бісопрололу fumarату	$m_0$	$0.2 \text{ мг}/20.8 \text{ мг} \times 100 \% = 0.96$
2) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.0 мл	25	0.23
3) взяття аліквоти піпеткою 1.0 мл	1.0	0.74
4) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 10.0 мл	10	0.5
<b>Випробовуваний розчин</b>		
5) взяття наважки таблеток	$m_1$	$0.2 \text{ мг}/40 \text{ мг} \times 100 \% = 0.50$
6) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 25.0 мл	25	0.23
7) взяття аліквоти піпеткою 1.0 мл	1.0	0.74
8) доведення до об'єму в мірній колбі місткістю 10.0 мл	10	0.5

**Таблиця 4 – Результати кількісного визначення бісопрололу fumarату в таблетках (n=6, p=0.95)**

Лікарський засіб	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
1	2	3
Таблетки «Бісопрол» (Фармак) 10 мг №1	0.0104	$\bar{m} = 0.0105 \text{ г}$ $S = 1.87 \times 10^{-4}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 1.96 \times 10^{-4}$ $RSD = 1.79 \%$ $\varepsilon = 1.88 \%$
	0.0106	
	0.0105	
	0.0103	
	0.0107	
	0.0102	
Таблетки «Бісопрол» (Фармак) 10 мг №2	0.0103	$\bar{m} = 0.0104 \text{ г}$ $S = 1.87 \times 10^{-4}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 1.96 \times 10^{-4}$ $RSD = 1.81 \%$ $\varepsilon = 1.90 \%$
	0.0102	
	0.0104	
	0.0106	
	0.0101	
	0.0105	





Отримані результати дослідження вказують на те, що вміст АФІ в досліджуваних таблетках не значно коливається, входить в межі прийнятності, що вказує на кореляцію кількісного вмісту бісопрололу в ГЛЗ.

Робасність розробленої УФ-спектрофотометричної методики визначення бісопрололу фумарату в таблетках «Бісопрол», вивчали шляхом оцінювання стабільності аналізованих розчинів впродовж певного проміжку часу (2 год). Результати вивчення стабільності випробовуваних розчинів у часі представлено в таблиці 5.

**Таблиця 5 – Результати вивчення стабільності випробовуваного розчину бісопрололу фумарату (1) та розчину ФСЗ бісопрололу фумарату (2)**

№	t, хв						A сер	RSD <sub>t</sub> , %
	0	20	40	60	90	120		
1	0.506	0.510	0.514	0.520	0.521	0.521	0.515	1.23
2	0.508	0.512	0.513	0.513	0.514	0.514	0.512	0.44

Результати вивчення стабільності свідчать про те, що аналізовані розчини є стабільними впродовж 2 год.

Підсумовуючи вище описані факти можна зробити висновок, що розроблена УФ-спектрофотометрична методика визначення бісопрололу фумарату в ГЛЗ є експресною, простою у виконанні, не дорогою, нетрудоємною і може бути використана в рутинному аналізі ГЛЗ на основі бісопрололу фумарату, коли час і вартість є критичними.

Відповідно до одержаних результатів аналізу, середня похибка ( $\delta$ ) методики дорівнює 0.01 %, стандартне відхилення ( $S_z$ ) - 0.05 %. І як наслідок, одержані дані підтверджують відповідність УФ-методики кількісного визначення бісопрололу фумарату валідаційним параметрам: правильності та прецизійності згідно вимог ДФУ [7].

Наступним етапом експерименту буде дослідження екологічності та безпеки УФ-спектрофотометричної методики кількісного визначення бісопрололу фумарату в таблетках.

#### **Висновки.**

В результаті проведених досліджень проведено валідацію УФ-спектрофотометричної методики кількісного визначення бісопрололу фумарату в таблетках, досліджено основні валідаційні параметри згідно вимог ДФУ.

Представлена методика є лінійною в діапазоні концентрацій (39.94 – 59.90 мкг/мл), характеризується хорошою прецизійністю (відносний довірчий інтервал  $\Delta z$  дорівнює 0.12), достатньою правильністю по всьому діапазоні концентрацій від 80 до 120 %.

Невизначеність кінцевої аналітичної операції для спектрофотометричного визначення складає 0.70 %, що відповідає критеріям прийнятності.

Одержані дані підтверджують відповідність УФ-спектрофотометричної методики кількісного визначення бісопрололу фумарату основним валідаційним параметрам згідно вимог ДФУ, що дозволить в майбутньому належно контролювати якість готових лікарських засобів на його основі.



## Література:

1. Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW. & American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee American Heart Association Circulation. 2020;141(9):e139-596
2. Management of Hypertension With a Fixed-Dose (Single-Pill) Combination of Bisoprolol and Amlodipine/ U. Gottwald-Hostalek, N. Sun, C. Barho [et al.] // Clinical Pharmacology in Drug Development. – 2017. – No. 6. – P. 9-18.
3. Рекомендації Української Асоціації кардіологів з профілактики та лікування артеріальної гіпертензії. Посібник до Національної програми профілактики і лікування артеріальної гіпертензії. – К.: ПП ВМБ; 2008. – 80 с. 4-е видання, виправлене і доповнене.
4. Effects of Celiprolol and Bisoprolol on Blood Pressure, Vascular Stiffness, and Baroreflex Sensitivity /K. Eguchi, S. Hoshide, K. Kario// American Journal of Hypertension. – 2015. – No. 7 (28). – P. 858–867.
5. Росіл У. Ю. Дослідження умов пробопідготовки при розробці УФ-спектрофотометричної методики кількісного визначення бісопрололу в таблетках/ У. Ю. Росіл, Н. О. Зарівна// Modern engineering and innovative technologies, Germany. - 2024.- Part 4., Issue № 32.- P. 127-132.
6. Державна фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство „Український науково-експертний фармакопейний центр якості лікарських засобів”. – 2-е вид. – Харків: Державне підприємство „Український науково-експертний фармакопейний центр якості лікарських засобів”, 2014. Т.2 – 724 с.
7. Державна Фармакопея України/ Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Доповнення 6. Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2023. 424 с

## References.

1. Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW. (2020). American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee American Heart Association Circulation*, 141(9):e139-59.
2. Gottwald-Hostalek, U., Sun, N., Barho, C., Hildemann, S. (2017). Management of Hypertension With a Fixed-Dose (Single-Pill) Combination of Bisoprolol and Amlodipine. *Clinical Pharmacology in Drug Development*, 6, 9-18.
3. Recommendations of the Ukrainian Association of Cardiology on the prevention and treatment of arterial hypertension (2008). Manual to the National Program for the Prevention and Treatment of Arterial Hypertension. – К.: PP VMB; 4th edition, corrected and supplemented. – 80 p [in Ukrainian].
4. Eguchi, K., Hoshide, S., Kario, K. (2015) Effects of Celiprolol and Bisoprolol on Blood Pressure, Vascular Stiffness, and Baroreflex Sensitivity. *American Journal of Hypertension*, 7 (28), 858–867.
5. Rosil U. Yu., N. O. Zarivna (2024) Doslidzhennia umov probopidhotovky pry rozrobtsi UF-spektrofotometrychnoi metodyky kilkisnoho vyznachennia bisoprololu v tabletkakh// Modern engineering and innovative technologies, Germany, Part 4., Issue № 32, 127-132.





6. Derzhavna Farmakopeia Ukrainy: v 3 t. (2015) State Pharmacopoeia of Ukraine:in 3 vol.]. State Enterprise "Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for the Quality Medicines " [in Ukrainian].

7. Derzhavna Farmakopeia Ukrainy: 2 v., 6 6 dopovnennia (2023) State Pharmacopoeia of Ukraine: 2 v., 6 dop.]. State Enterprise "Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for the Quality Medicines". - 424 p. [in Ukrainian].

**Abstract.** *For the rest of the time, the number of patients who fell ill for a hypertonic ailment increased. By analysing the protocols of treatment, the drugs of the group of blockers of  $\beta$ -adrenergic receptors, leading the position of some bisoprolol borrowings, which, when stagnated at therapeutic doses, cannot have internal sympathomimetic activity, clinary virulent membrane powers, but also manifests antianginal and hypotensive action. Based on the current analytical methods of determining bisoprolol in medicinal uses, it is necessary to achieve labor, not selective, but often to use the use of expensive and invasive reagents, which is necessary to develop an expressive, accurate, ecological and careless method of calcible detection of bisoprolol fumarate in tablets.*

*Our previous studies selected the optimal conditions for sample preparation for the development of a UV spectrophotometric technique for its quantitative determination. As a result of the experiments, 272 nm was chosen as the optimal wavelength, methanol P as the optimal solvent, the optimal concentration of solutions was  $1.00 \times 10^{-3}$  M, and the stability of the prepared solutions for 45 minutes without the use of pH regulators, buffer solutions, additional reagents was confirmed, which greatly facilitates this analysis. The next stage of the experiment is to validate the methodology developed by us according to the main validation parameters in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine.*

**Key words:** *bisoprolol fumarate, tablets, spectrophotometry, validation.*

Стаття відправлена: 22.10.24

© Зарівна Н.О.