

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НОВОКАИНА В СУБСТАНЦИИ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ

С.О. Васюк, А.С. Коржова, И.Д. Повстенко, Л.С. Горбань

Запорожский государственный медицинский университет

Резюме: предложены спектрофотометрические методики количественного определения новокаина в субстанции и готовых лекарственных формах, в основе которых лежит реакция взаимодействия препарата с натриевой солью 1,2-нафтохинон-4-сульфо кислоты.

Ключевые слова: количественное определение, новокаин, субстанции.

SPECTROPHOTOMETRIC IDENTIFICATION OF PROCAINE HYDROCHLORIDE IN SUBSTANCE AND MEDICINAL FORMS

S.O. Vasyuk, A.S. Korzhova, I.D. Povstenko, L.S. Horban

Zaporizhyan State Medical University

Summary: the methods for quantitative spectrophotometric identification of procaine hydrochloride in substance and in drug dosages are offered. These methods are based on the reaction of interaction of a preparation with sodium salt of 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid.

Key words: quantitative determination, procaine hydrochloride, substances.

Рекомендована д-м фармац. наук, проф. В.А. Георгіянц

УДК 547.972.35:543.42.062

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КАЛЬЦІЮ ДОБЕЗИЛАТУ

©О.О. Тарханова, С.О. Васюк

Запорізький державний медичний університет

Резюме: запропоновано спосіб кількісного визначення кальцію добезилату в таблетках, заснований на взаємодії препарату з п-нітротетразолієм фіолетовим. Проведена стандартна процедура валідації розробленої методики.

Ключові слова: спектрофотометричне визначення, кальцій добезилат

Вступ. Добезилат кальцію – вітчизняний лікарський засіб, випускається Луганським хіміко-фармацевтичним заводом, проявляє виражену ангіопротекторну дію та деякою мірою антигеморагічну активність. Широко застосовується при діабетичній ангіопатії, геморагічному синдромі, варикозному розширенні вен та ін. [8]. Огляд літератури щодо кількісного визначення зазначеної сполуки виявив дуже незначну кількість джерел з вирішення цього питання. Так, згідно з АНД до Р.05.02/04659, кальцію добезилат в субстанції визначають методом цериметричного титруван-

ня з індикатором о-фенантронілом. Для визначення кальцію добезилату в таблетках (АНД до П.07.01/03318) застосовують пряму УФ-спектрофотометрію. Відомий метод кількісного визначення, заснований на реакції азосполучення кальцію добезилату зі стабілізованою сіллю діазонію – діазолем червоним 2Ж [9]. Розроблено також методику ВЕРХ [2].

Мета роботи – вивчення реакції добезилату кальцію з п-нітротетразолієм фіолетовим (5-дифеніл-3-(4-нітрофеніл)-2-(α -нафтил) тетразолію хлорид), розробка на цій основі методики його

кількісного визначення в таблетках і проведення валідації розробленої методики.

Методи дослідження. Об'єкти дослідження, застосовані реагенти та обладнання

Об'єктом дослідження були таблетки "Кальцію добезилат" по 0,250 г (серія 2032002), що містять як допоміжні речовини кальцію фосфат, натрію піросульфід, полівінілпіролідон низькомолекулярний, лимонну кислоту та кальцію стеарат.

У роботі використовували реактиви і розчини: РСО добезилату кальцію (АНД до Р.05.02/04659), п-нітротетразолію фіолетовий кваліфікації хч, вода дистильована (ДФУ, 1095504), пропанол-1 (ДФУ, 1072000) кваліфікації осч, 0,1 М розчин натрію гідроксиду (ДФУ, 3006600), 0,1 М розчин хлористоводневої кислоти (ДФУ, 3002100), аналітичне обладнання: спектрофотометр СФ-46, спектрофотометр Specord 200, ваги АДВ-200, мірний посуд класу В.

Методика кількісного визначення добезилату кальцію в таблетках. Точну наважку порошку розтертих таблеток (0,0255 – 0,0510) вміщують в мірну колбу ємністю 100,00 мл, розчиняють у воді та доводять водою до позначки, перемішують. 1,00 мл одержаного розчину переносять в мірну колбу ємністю 25,00 мл, додають 5,00 мл 0,1 % розчину п-нітротетразолію фіолетового в пропанолі, 0,10 мл 0,1 М розчину гідроксиду натрію, потім додають 0,1 мл 0,1 М розчину хло-

ристоводневої кислоти для стабілізації продукту реакції та доводять пропанолом до позначки. Паралельно проводять реакцію з 1,00 мл стандартного розчину добезилату кальцію, для приготування якого розчиняють 0,0300 г добезилату кальцію в 100,0 мл води ($C_0 = 0,0012$ г/100мл). Оптичну густину вимірюють на фоні компенсаційного розчину, що не містить досліджуваної речовини, при довжині хвилі 480 нм.

Розрахунок вмісту добезилату кальцію в 1 таблетці проводять за формулою:

$$C\% = \frac{A \cdot C_0 \cdot 100 \cdot 25 \cdot P_{cp}}{A_0 \cdot p \cdot 1 \cdot 1 \cdot 100}, \quad (1)$$

де A – оптична густина досліджуваного розчину;

A_0 – оптична густина стандартного розчину;

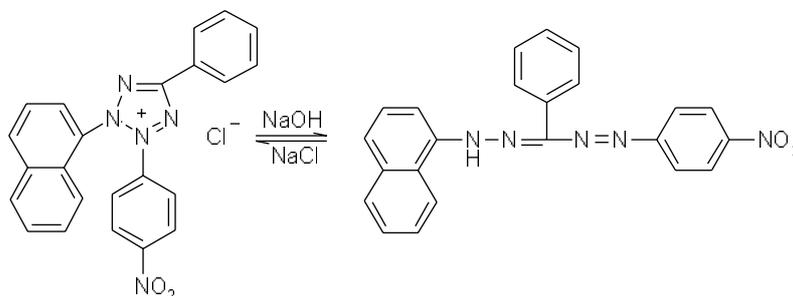
C_0 – концентрація спектрофотометрованого розчину порівняння (0,0012 г у 100 мл);

p – наважка, г;

P_{cp} – середня маса таблетки;

l – товщина шару, см.

Результати й обговорення. Нами було встановлено, що добезилат кальцію окислюється п-нітротетразолієм фіолетовим при кімнатній температурі у середовищі пропанолу в присутності водного розчину гідроксиду натрію. Продуктом відновлення солі тетразолію є формаза червоного кольору з максимумом світлопоглинання при 480 нм:



Для стабілізації одержаного формазану додавали розчин хлористоводневої кислоти, яка нейтралізує надлишок гідроксиду натрію, зміщує рівновагу реакції вліво, що перешкоджає подальшому відновленню солі тетразолію (рис.1).

Стехіометричні співвідношення реагуючих речовин були визначені методом неперервних змін (метод ізомолярних серій) та методом насичення (метод молярних співвідношень) [1]. Було встановлено співвідношення "реагент – кальцію добезилат" – 2:1.

Межа виявлення для препарату, розрахована за загальновідомою методикою [1], становить 0,715 мкг/мл.

Підпорядкування закону світлопоглинання перебуває в межах концентрацій дофаміну 0,80 – 1,60 мг/100 мл.

Валідація спектрофотометричних методик

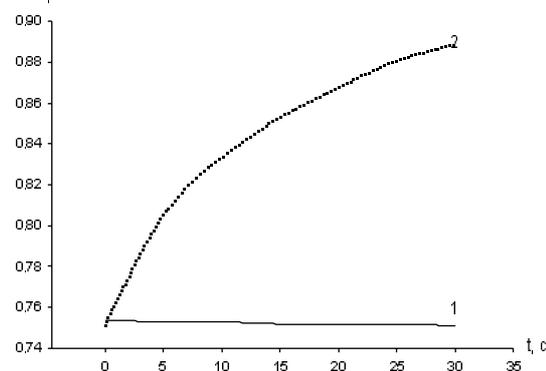


Рис. 1. Залежність величини оптичної густини продукту реакції п-нітротетразолію фіолетового з добезилатом кальцію з додаванням 0,1 М розчину НСІ, $\lambda_{max} = 480$ нм (1) та без додавання $\lambda_{max} = 468$ нм (2) від часу.

Згідно з вимогами ДФУ [6], методики кількісного визначення, що включаються до аналітичної нормативної документації, мають бути валідовані.

Нами була проведена валідація розробленої аналітичної методики "кількісне визначення" для готового лікарського засобу – таблеток кальцію добезилату за основними валідаційними характеристиками – специфічністю, лінійністю, правильністю, точністю, робастністю, згідно з стандартизованою процедурою валідації методик кількісного аналізу лікарських засобів методом стандарту [4,5,6,10].

Згідно з АНД № П.07.01/03318 до кількісного вмісту добезилату кальцію в таблетках висуваються наступні вимоги: 0,237 – 0,262 г/мл, що

дорівнює 94,80 – 104,8% від номінального вмісту діючої речовини в препараті.

1. Специфічність

Специфічність визначали шляхом порівняння спектральних кривих продуктів реакції п-нітротетразолію фіолетового зі стандартним розчином добезилату кальцію, з розчином таблеток добезилату кальцію та розчином "плацебо" (рис. 2). Допоміжні речовини не вступають в реакцію з реагентом, тому формаган не утворюється, про що свідчать наведені спектри. Щодо розчину таблеток, продукти, що утворюються в результаті реакції нічим, за спектральними характеристиками, не відрізняються від продуктів, що утворюються в результаті взаємодії реагенту зі стандартним розчином кальцію добезилату.

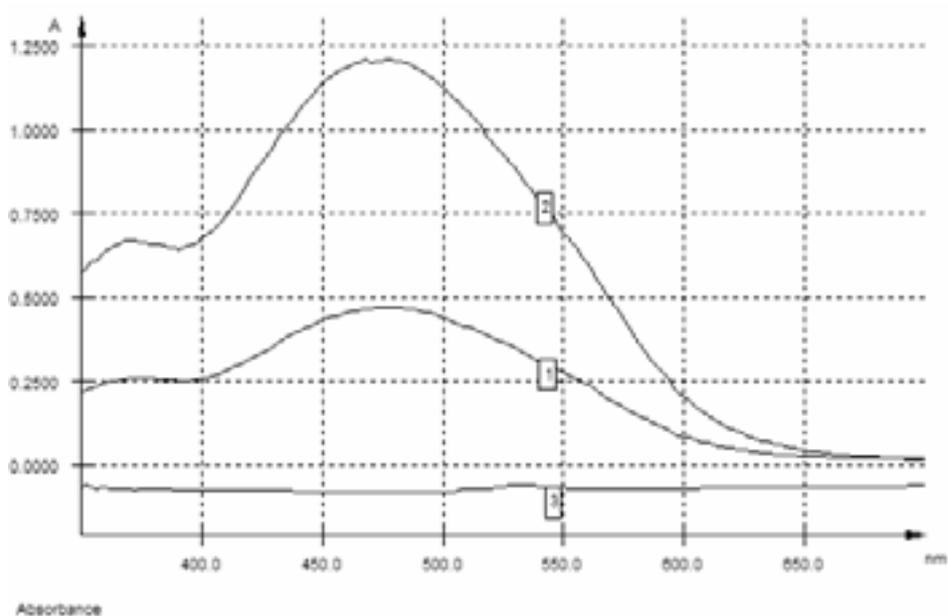


Рис. 2. Визначення специфічності реакції кальцію добезилату з п-нітротетразолієм фіолетовим: 1 – стандартний розчин кальцію добезилату, 2 – розчин таблеток, 3 – розчин "плацебо".

2. Лінійність

Лінійність визначали у межах 70-130 % від номінальної концентрації кальцію добезилату. Розчини з відомою концентрацією отримували шляхом розведення 0,0200 % розчину добезилату кальцію – 1,00; 1,20; 1,40; 1,60; 1,80; 2,00 мл вміщували в колби ємністю 25,00 мл та проводили визначення за вищевказаною методикою. На основі отриманих даних буду-

вали графік залежності оптичної густини від концентрації кальцію добезилату. Лінійну залежність розраховували за допомогою регресійного аналізу та метода найменших квадратів [5, 7, 9]. Знайдено: $Y_i = 0,6168 \cdot X_i - 0,04150$. Одержані величини: коефіцієнти b , a , стандартні відхилення для b і a – s_b , s_a , залишкове стандартне відхилення s_r і коефіцієнт кореляції R_c наведені у таблиці 1.

Таблиця 1. Метрологічні характеристики лінійної залежності

Величина	Значення	Критерії (для допусків (95,0-105,0)%, число точок 5)	Висновок
$b \pm (s_b)$	$0,6168 \pm (0,01016)$	-	-
$a \pm (s_a)$	$-0,04150 \pm (0,01393)$	$ \alpha \geq \delta_a = t(95\%; 4) \cdot S_a = 0,03867$	відповідає
s_r	0,006800	$S_r \leq 0,32 \cdot B/t(95\%, 3) \leq 0,58$	відповідає
R_c	0,9995	$\geq 0,9981$	відповідає

Як видно з таблиці 1, виконуються усі вимоги щодо параметрів лінійної залежності, тобто лінійність методики підтверджується у всьому діапазоні концентрацій (70-130) %.

3. Точність

Точність запропонованих методик визначали на рівні збіжності та внутрішньолабораторної точності [3, 6, 7].

Для оцінки збіжності із трьох наважок готували три розчини, з якими проводили по три паралельні виміри (всього 9). Вимірювали оптичну густину всіх 9 розчинів при аналітичній довжині хвилі. Паралельно вимірювали оптичну густину розчину порівняння. Розраховували вміст у грамах досліджуваних речовин за формулою (1). На основі одержаних результатів розраховували стандартне відхилення ($S = 0,00145$), відносне стандартне відхилення ($S_r = 0,0058$), довірчий інтервал ($\Delta x = \pm 0,00334$), а також відносну невизначеність ($\varepsilon = 1,34$ %). Методика є точною на рівні збіжності, оскільки знайдене значення відносної невизначеності менше від максимально допустимої невизначеності методики, що становить 1,6 % ($\Delta_{As}(\%) = 0,32 \cdot B$, де B – регламентований допуск вмісту).

Дослідження внутрішньолабораторної точності проводили на 5 пробах одного зразку препарату у 3 різні дні (m) різними аналітиками на різному обладнанні. Аналіз кожної проби проводили за вищезазначеною методикою. За результатами визначень розраховували єдине відносне стандартне відхилення ($S_r = 0,0147$), єдиний довірчий інтервал середнього ($\Delta x = \pm 0,00208$), а також єдину відносну невизначеність середнього ($\varepsilon = 0,813$ %). Методика є точною на рівні внутрішньолабораторної точності, оскільки знайдене значення відносної невизначеності середнього результату менше від максимально допустимої невизначеності методики, що становить 1,6 %.

4. Правильність

Правильність визначали паралельно з точністю [6, 7], шляхом порівняння отриманих результатів кількісного визначення кальцію добезилату

з результатами визначення за методикою АНД (пряма УФ-спектрофотометрія, $\lambda = 301$ нм). Для перевірки наявності значущої систематичної похибки обчислювали t -критерій Ст'юдента (1,95) та порівнювали отримане значення із табличним $t(95 \%, 8) = 2,31$. Наявність значущої систематичної похибки виключали на основі виконання нерівності $t < t(95 \%, 8)$, що підтверджує точність методик.

5. Діапазон застосування методики

З огляду на дані, отримані при визначенні лінійності, точності та правильності, діапазон застосування запропонованих методик становить 70-130 % від номінального вмісту кальцію добезилату в лікарському засобі.

6. Робасність

Для перевірки робасності методики кількісного визначення вивчали: стабільність розчинів у часі, вплив кількості доданих реагентів на результати визначення, а також суб'єктивний фактор (різні аналітики). Встановлено, аналізований розчин є стійким близько 1 години, а коливання кількості доданих реагентів у межах +10 % не впливають на величину оптичної густини. Незначущість впливу обладнання, реактивів та суб'єктивного фактора були підтверджені при перевірці внутрішньолабораторної точності.

Висновки. 1. Вивчено умови фотометричної реакції кальцію добезилату з *p*-нітротетразолієм фіолетовим. Розраховані аналітичні показники чутливості реакції та визначені коефіцієнти стехіометричного співвідношення "реагент – лікарська речовина".

2. Запропоновано спектрофотометричний спосіб кількісного визначення кальцію добезилату за реакцією з *p*-нітротетразолієм фіолетовим.

3. Проведена процедура валідації методики кількісного визначення кальцію добезилату в таблетках "Кальція добезилат" по 0,250 г (серія 2032002).

4. Запропонована методика характеризується достатньою чутливістю, простотою виконання і може бути використана при контролі якості лікарських засобів.

Література

1. Булатов М.И., Калинин И.П. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа. – 5-е изд. – Л.: Химия, 1986. – 432 с.
2. Васюк С.О. Використання високоефективної рідинної хроматографії для визначення етамзилату та добезилату кальцію // Створення, виробництво, стандартизація, фармакоэкономика лікарських засобів та біологічно активних добавок: Мат. наук.-практ. конф. з міжнар. участю. – Тернопіль, 2004. – С. 267-271.
3. Воспроизводимость фармакопейных спектрофотометрических методик количественного определения

лекарственных средств в различных лабораториях // А.И. Гризодуб, Н.Н. Зволинская, Н.Н. Архипова и др. // Фармаком. – 2004. – № 2. – С. 1-16.

4. Гризодуб А.И. Валидация спектрофотометрических методик количественного анализа лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ // Фармаком. – 2002. – № 3. – С. 42-50.

5. Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Доценко Т.Н., Денисенко Н.В. Критерии для параметров линейной зависимости при проведении валидации аналитических методик по ГФУ // Актуальні питання медичної і фар-

мацевтичної науки і практики: Збірник наукових статей. – Запоріжжя: Видавництво ЗДМУ, 2003. – Випуск X. – С. 30-32.

6. Державна Фармакопея України. – 1-ше вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – С. 36-41, 56-67, 169-290.

7. Державна Фармакопея України. – 1-ше вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – Доповнення 1. – 2004. – С. 187-214.

8. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2 т. – Харьков: Торсинг, 1998. – Т. 1. – С. 449-450.

9. Пат. 69764 А. Україна, МКИ⁷ G 01 N 21/78. Спосіб кількісного визначення кальцію добезилату: Пат. 69764 А. Україна, МКИ⁷ G 01 N 21/78 / С.О. Васюк. – № 20031210865; Заявл. 01.12.2003; Опубл. 15.09.2004. Бюл. № 9. – 2 с.

10. Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта / А.И. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, Н.В. Денисенко, Ю.В. Подпужников // Фармаком. – 2004. – № 3. – С. 1-15.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ ДОБЕЗИЛАТА

О.О. Тарханова, С.О. Васюк

Запорожский государственный медицинский университет

Резюме: предложен способ количественного определения кальция добезилата в таблетках, основанный на взаимодействии с п-нитротетразолием фиолетовым. Проведена стандартная процедура валидации разработанной методики.

Ключевые слова: спектрофотометрическое определение, кальций добезилат.

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF CALCIUM DOBESYLATE

O.O. Tarkhanova, S.O. Vasyuk

Zaporizhyan State Medical University

Summary: method of quantitative spectrophotometric determination of calcium dobessylate in tablets is worked out. This method is based on the reaction of a preparation with p-nitrotetrazolum violet. The standard procedure of validation for methods has been carried out.

Key words: spectrophotometric determination, calcium dobessylate.

Рекомендована д-м біол. наук, проф. І.М. Кліщем

УДК 615.281/282.312.1.07

ПРОТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ ПРОДУКТІВ РЕАКЦІЇ ХЛОР-, БРОМ- І ТІОЦІАНОАРИЛЮВАННЯ 2-МЕТИЛ-3-ХЛОРПРОПЕНУ

©**С.І. Климнюк, Б.Д. Грищук, П.М. Горбовий, Г.М. Тулайдан, О.В. Покришко**

*Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського
Тернопільський національний педагогічний університет імені В. Гнатюка*

Резюме: синтезовано 2-хлор(бром,тіоціанато)-1-арил-2-метил-3-хлорпропани та вивчені їх протимікробні властивості. Найбільш ефективними у плані вивчення хіміотерапевтичної активності є 2-хлор-1-феніл- і 2-бром-1-п-метилфеніл(-1-п-метоксифеніл)-2-метил-3-хлорпропани.

Ключові слова: протимікробні властивості, синтез, реакція.

Вступ. Раніше реакцією аніонарилювання [1] одержано різні функціалізовані похідні ненаси-

чених сполук, які є біологічно активними речовинами [2]. Серед них, перш за все, значний