

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
Національний медичний університет імені О. О. Богомольця
Фармацевтичний факультет
Спеціальність – 226 «Фармація, промислова фармація»
Кафедра аналітичної, фізичної та колоїдної хімії

КВАЛІФІКАЦІЙНА ВИПУСКНА РОБОТА
КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ІНДИГОКАРМІНУ В ТАБЛЕТОВАНИХ
ФОРМАХ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ

Виконала: студентка 6-го курсу, групи
882А фармацевтичного факультету

Коротченко Юлія Анатоліївна

Керівник:

доцент кафедри аналітичної, фізичної
та колоїдної хімії, к.х.н., доцент

Тимощук Ольга Борисівна

Рецензент:

доцент кафедри ліків та лікарської
токсикології, к.пед.н., доцент

Головченко Оксана Іванівна

Київ – 2023

ЗМІСТ

	<i>ст.</i>
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	4
ОСНОВНА ЧАСТИНА	5
ВСТУП	5
Розділ 1. Властивості індигокарміну та його застосування	8
1.1. Фізико-хімічні властивості	10
1.2. Методи отримання	11
1.3. Сфери застосування	12
1.4. Фармакологічна дія	14
Розділ 2. Матеріали та методи	16
2.1. Об'єкт дослідження	16
2.2. Посуд та обладнання	18
2.3. Реактиви	18
2.4. Методика та умови спектрофотометричного аналізу	18
2.4.1. <i>Вимоги до стандартних розчинів</i>	20
2.4.2. <i>Вимоги до побудови калібрувального графіка</i>	21
2.4.3. <i>Вимоги до вимірювання зразка</i>	21
2.4.4. <i>Вимоги до розрахунку</i>	22
Розділ 3. Результати та їх обговорення	23
3.1. Побудова калібрувального графіка	23
3.2. Результати визначення вмісту індигокарміну у досліджуваних лікарських засобах	25
3.3. Валідація методики	26
3.3.1. <i>Перевірка специфічності методики</i>	26
3.3.2. <i>Перевірка лінійності методики</i>	27

<i>3.3.3. Перевірка робастності методики</i>	27
<i>3.3.4. Перевірка правильності методики</i>	28
3.4. Порівняльний аналіз методик кількісного визначення	28
ВИСНОВКИ	29
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	30
ДОДАТКИ	34
SUMMARY	46

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

CAC – Комісія Кодексу Аліментаріус

CAS №65–85–0 – Реєстраційний номер відповідно до CAS REGISTRY
(режим доступу до ресурсу: https://commonchemistry.cas.org/detail?cas_rm=65-85-0)

PubChem – інформаційним ресурсом для спільноти біомедичних досліджень (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

ДФУ – Державна фармакопея України

ЛЗ – лікарський засіб

М – молярність

мг – міліграм

мл – мілілітр

нм – нанометр

ОСНОВНА ЧАСТИНА

ВСТУП

Протягом життя людина постійно зустрічається з речовинами, які називаються барвниками. Із розвитком хімічної промисловості значного поширення набули синтетичні барвники, які зазвичай мають дрібнодисперсний стан і здатні рівномірно розподілятися по поверхні, однорідно їх забарвлюючи. Широкого застосування барвники набули і в фармації, оскільки за допомогою кольору вирішується завдання запобігання ймовірного помилкового застосування лікарських засобів. Також їх застосовують з метою захисту світлочутливих активних фармацевтичних інгредієнтів, маскування неприємного забарвлення тощо [1]. Одним із таких барвників є індигокармін [2, 4, 5].

Індигокармін (або індиготин) – це барвник синього кольору, який за своєю природою є динатрієвою сіллю [2-4]. Відомий з давніх часів, був надзвичайно цінним та використовувався для фарбування тканин, а в подальшому сфера його застосування істотно збільшилася. Так, широкого поширення він набув у медицині, де використовується переважно з діагностичною метою та як компонент лікарських засобів у фармації [4-7].

Попри широке застосування індигокарміну він може чинити негативний вплив на здоров'я людини, а тому вживаються заходи для контролю його споживання. Так, допустимою добовою нормою його споживання є 5 мг/кг маси тіла, оскільки за умови не перевищення саме такої дози не виявляються побічні ефекти у дослідженнях гострої і хронічної токсичності, токсичності для репродуктивної системи та розвитку, а також змін гематологічних та біологічних параметрів [8, 9]. Тому надзвичайно важливо розробити методи ефективного розділення, швидкого виявлення та оцінки кількісного вмісту індигокарміну.

Для визначення кількісного вмісту синтетичних барвників переважно застосовують метод прямого титрування, а з розвитком технологій все

більшого поширення набуває метод високоефективної рідинної хроматографії. Проте, у зв'язку із своєю простотою, доступністю та відносно низькою вартістю досить перспективним може бути метод спектрофотометрії.

Спектрофотометрія – це найбільш поширений інструментальний метод аналізу, застосування якого засноване на визначенні та оцінці спектру поглинання досліджуваної речовини. За допомогою цього спектрофотометрії здійснюють ідентифікацію різноманітних речовини в лікарських препаратах. Окрім цього, метод дозволяє визначати їхній склад, будову та кількісний вміст у забарвлених і безбарвних розчинах, який можна проводити у широкому діапазоні довжин хвиль. Важливою особливістю спектрофотометрії є її простота, низька вартість, доступність і точність.

Актуальність теми. Пошук нових перспективних методик кількісного визначення індигокарміну.

Мета і завдання досліджень. Метою досліджень було розробити спектрофотометричну методику кількісного визначення індигокарміну у таблетованих лікарських засобах.

Для досягнення поставленої мети були передбачені наступні завдання:

- аналіз фармакопейних та аналітичних методик ідентифікації та кількісного визначення індигокарміну;
- розробити методику спектрофотометричного кількісного визначення індигокарміну в таблетованих лікарських засобах;
- провести валідацію методики.

Методи дослідження. Для досягнення поставленої мети досліджень були використані емпіричні (спостереження, порівняння, вимірювання, експеримент), комплексні (абстрагування, аналіз і синтез) і теоретичні методи.

Новизна та значення одержаних результатів. Оцінка та підтвердження ефективності застосування однокомпонентного однохвильового аналізу є пошуком альтернативного методу кількісного визначення індигокарміну в таблетованих лікарських засобах.

Апробація результатів. Результати роботи були апробовані на VI міжнародній науково-практичній конференції «KYIVLVIVPHARMA-2023. Pharmaceutical technology and pharmacology in ensuring active longevity» (Додаток 5).

Публікації. Публікації відсутні.

Структура роботи. Робота написана згідно із затвердженим Вченою радою Національного медичного університету імені О.О. Богомольця Положенням «Про порядок підготовки та захисту випускної кваліфікаційної роботи за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація» у Національному медичному університеті імені О.О. Богомольця» та складається з наступних структурних елементів:

- загальна кількість сторінок – 47 ст.;
- основна частина складається зі вступу, 3-х розділів та висновків;
- кількість додатків – 5 додатків;
- кількість джерел використаної літератури – 35 посилань.

Розділ 1. Властивості індигокарміну та його застосування

Важливою характеристикою лікарських засобів є колір, який утворюється за допомогою застосування барвників. За своєю природою барвники можуть містити в собі природні пігменти рослинного або тваринного походження або штучно синтезовані пігменти, які не зустрічаються в природі, а тому розрізняють природні (флавоноїди, каротиноїди, хлорофіли) та синтетичні (органічні та неорганічні) барвники [10, 11]. Окремо слід виділити мінеральні барвники (оксиди феруму, титан (IV) оксид, кальцій карбонат тощо).

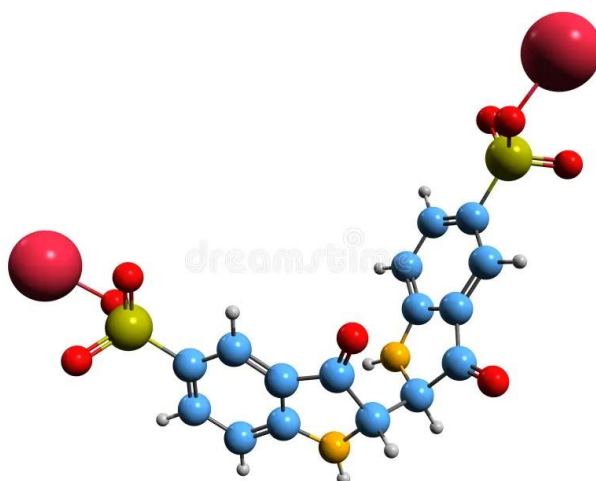
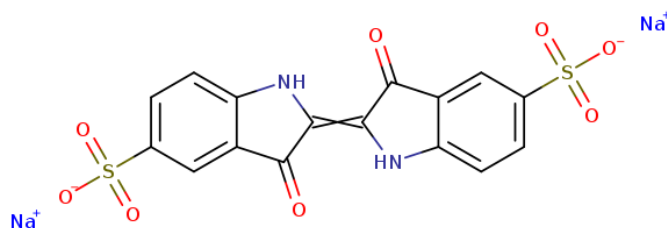
Природні барвники виготовляються із ягід, квітів, листя, коренеплодові, або із тіл тваринного походження (кармін, який виділяють із тіл самок комах кошенилі). Основним способом вилучення барвників із природних об'єктів є екстрагування розчинником, очищення від супутніх сполук і стабілізація пігменту. У ролі розчинника-екстрагента застосовують етиловий спирт, воду, олію тощо. Проте із розвитком хімічної промисловості значної ваги набули синтетичні барвники, оскільки вони зазвичай дешевші, ніж натуральні, менш чутливі до умов технологічної переробки та зберігання, надають яскравіші і легше відтворювані кольори і т.д. [10, 11].

Синтетичні барвники переважно є натрієвими солями, оскільки вони добре розчинні у воді. За хімічним складом синтетичні барвники поділяються на азобарвники (тартазин, жовтий «сонячний захід», азорубін, кармуазин, понсо 4R, діамантовий чорний PN), триарилметанові (синій патентований V, діамантовий синій FCF, зелений S, коричневий HT), ксантанові (еритрозин), хінолінові (жовтий хіноліновий) та індигоїдні (індигокармін) [10, 11].

Індигокармін, який у інших класифікаторах (CAS, CAS, PubChem та ін.) також відомий як індиготин, E 132. «860-22-0», «Acid Blue 74», «Indigotindisulfonate sodium» тощо – це динатрієва сіль індиго-5,5'-дисульфокислоти [2-5]. Це відомий з давніх часів синій барвник, котрий

відноситься до категорії синтетичних барвників, хоча його також можна отримувати з природних матеріалів – переважно чагарників виду *Indigofera*, що і було основним джерелом індигокарміну протягом 4000 років аж до другої половини XIX століття. Є основою синього пігменту, відомого як індиго, вміст у якому становить 90% [4].

Індигокармін



1.1. Фізико-хімічні властивості

Індигокармін – це органічна натрієва сіль, яка утворюється шляхом сульфування індиго.

За стандартних умов є порошком або гранулятом від індиго до темно-синього забарвлення з молекулярною масою 466,4 г/моль (точна та моноізотопна маса – 465.95174613 г/моль). Має високу термостійкість – до 150 °С, але характеризується високою чутливістю до світла, лугів та кислот. У водному середовищі поглинає світло з довжиною хвилі 610 нм [2-4, 12, 13].

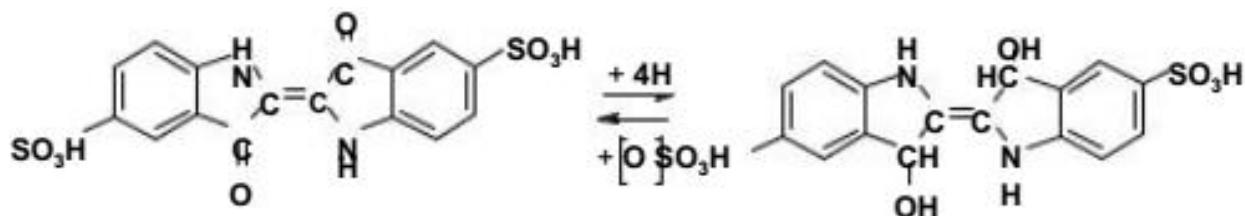
Добре розчинний у воді (10 г/л в умовах температури – 25 °С), гліцерині; слабозрозчинний в етанолі та нерозчинний в оліях. У поєднанні з алюмінієм індигокармін (алюмінієвий лак) стає нерозчинним у воді, спиртах та жирах [2-4, 12].

Виявляє властивості кислотно-основного індикатора, оскільки у інтервалі рН 11,6-14,0 змінює забарвлення від яскраво-синього до жовтого [2-4, 12]. Може використовуватися як індикатор розчиненого озону шляхом перетворення на ізатин-5-сульфонову кислоту [14].

Виявляє типові для сполук свого класу хімічні властивості [14-18].

Так, легко вступає в реакцію відновлення в слаболужному або амонійному середовищі:

а) речовинами, котрі легко окислюються киснем повітря, наприклад ГЛЮКОЗОЮ



б) дитіонітом натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) в лужному середовищі до лейкоформи індиго (білого індиго)



Крім того, індигокармін здатен окиснюватися лакказою (ферментом класу оксидази, який був виділений із дереворуйнуючого гриба *Trametes versicolor*) у поєднанні з медіатором (2,2,6,6-тетраметилпіперидин-1-іл) оксил ($\text{TEMPO}\cdot$) [19].

1.2. Методи отримання

Індигокармін відомий зі стародавніх часів. Спочатку його видобували із природної сировини. Так, ще стародавні фінікійці для виробництва індигокарміну використовували екскременти морських равликів, а тому цей барвник був надзвичайно рідкісним та коштовним. У подальшому були виявлені способи його видобутку із матеріалів рослинного походження – представників виду *Indigofera* (*Indigofera tinctoria* L., *Isatis tinctoria* L. та ін.). Ця технологія виробництва індигокарміну проіснувала майже 4000 років.

Важливою особливістю природного індигокарміну є поступова втрата інтенсивності забарвлення. Тому, після встановлення його хімічної будови та отримання у 1883 році А. Байером синтетичного аналога, виробництво

природного барвника зупинилося і він був замінений синтетичним індигокарміном.

У наш час відомо багато методів отриманні індигокарміну [15-18, 20, 21], але більшість із них забезпечують синтез технічного барвника, не придатного для використання у фармації, харчовій промисловості тощо.

Зазвичай індигокармін отримують сульфуванням технічного індиго з подальшою нейтралізацією сульфомаси та виділенням кінцевого продукту.

Так, відомий промисловий спосіб отримання рідкого барвника для текстильних матеріалів як складової, що містить індигокармін, одержуваний сульфуванням індиго концентрованою сірчаною кислотою в мольному співвідношенні індиго : кислота 1 : 4,68 протягом 30 хв. за температури сульфування 135-140 °С з наступною нейтралізацією триетаноламіном.

Також відомий промисловий спосіб отримання харчового індигокарміну шляхом сульфування індиго моногідратом в мольному співвідношенні індиго : моногідрат 1 : 4,68 за температури 140-145 °С протягом 20-40 хв. з подальшим розведенням сульфомаси і нейтралізацією розчином їдкого натру із масовою часткою основної речовини 40%. Нейтралізовану реакційну масу використовують як харчовий барвник.

Крім того, для отримання індигокарміну застосовується взаємодія аніліну та монохлорацетатної кислоти за температури 100 °С та наявності $\text{Fe}(\text{OH})_2$, подальшим плавленням за температури 200 °С і тиску 0,2-0,3 МПа отриманого N-фенілгліцину в суміші NaOH , KOH і NaNH_2 та наступним послідовним окисненням за допомогою кисню (достатньо кисню, наявного у повітрі).

1.3. Сфери застосування

Як різновид синтетичного барвника, індигокармін набув широкого застосування. Як харчовий барвник у однокомпонентному вигляді або у суміші з іншими барвниками він використовується для покращення кольору кондитерських виробів (цукерок, фруктових начинок, цукатів, яєчних та

заморожених десертів, пудингів, сухого печива, кремів та ін.), снєків (картопляних і зернових), лікерів та вина, холодних напоїв, кисломолочних продуктів (у тому числі сиру та морозива), хлібобулочних виробів, каш та супів швидкого приготування, різноманітних вегетаріанських страв, сурімі (наприклад крабові палички) та рибу'ячої ікри, спецій, гірчиці, масла, жирів, а також у всіх продуктах, що містять желатин, у тому числі в таблетках і капсулах [22-24].

Має також значне технічне застосування [14, 23, 24]:

- як барвник для фарбування тканин;
- для виготовлення чорнила;
- як один із компонентів при виробництві ополіскувача для волосся;
- як окислювально-відновний та кислотно-основний індикатор та реагент;
- використовується для колориметричного визначення нітратів у кислому середовищі.

Крім того, індигокармін добре відомий у медицині як діагностичний засіб та у фармацевтиці як барвник при виготовленні деяких капсул і таблеток.

Під торговою маркою *Bludigo* індигокармін використовується як діагностичний барвник під час хірургічних процедур. Оскільки він не поглинається клітинами, діагностична фарба з індигокарміном підсвічує рельєф поверхні обробленої тканини своїм синім кольором. Фарбування індигокарміном є корисним методом скринінгу для діагностики дрібних уражень, для диференціації доброякісних і злоякісних уражень, а також для полегшення застосування збільшувальних ендоскопів для спостереження та аналізу структури поверхні ураження [25].

Застосовується в гастроентерології для діагностики стравоходу Барретта, оцінки атрофії ворсинок, діагностики та розрізнення поліпозних і неполіпозних утворень у товстій кишці, а також діагностики аденоми та раку шлунку [26].

В урології внутрішньовенна ін'єкція індигокарміну часто використовується для виділення ділянок сечовивідних шляхів. Барвник швидко фільтрується нирками з крові та забарвлює сечу у синій колір. Це дозволяє побачити структури сечовивідних шляхів в операційному полі та продемонструвати, чи є витік. Однак у деяких випадках барвник може спричинити потенційно небезпечне підвищення артеріального тиску [25, 27].

В акушерській хірургії розчини індигокарміну можуть використовуватися для виявлення витоків амніотичної рідини [27].

Наразі, як і в минулому, в урологічній, гінекологічній, хірургічній практиці існують ситуації, коли альтернативи індигокарміну як діагностичному препарату не існує [25-27]:

- в екстреній хірургії як хромоцистоскопія для диференціальної діагностики між каменем нижньої третини правого сечоводу та гострим апендицитом;
- інтраопераційне ушкодження сечоводу, сечового міхура, ниркових лоханок в урології, гінекології, хірургії;
- діагностика порушення цілісності порожнистих органів при різних травмах та ін. в урології, гінекології, хірургії;
- фарбування свищевих ходів у хірургії, епітеліальних копчикових ходів у проктології, нефростом тощо;
- ендоскопічна діагностика прохідності маткових труб у гінекології тощо.

1.4. Фармакологічна дія

Нещодавні дослідження показують, що індигокармін може викликати у людей різні побічні симптоми та небажані реакції [2, 3, 8, 28-30]:

- серцево-судинні симптоми;
- церебральну вазоконстрикцію;
- роздратування та гіперактивність;
- нудоту і блювоту;

- діарею;
- приступи задухи;
- алергічні реакції та ін.

Внутрішньовенне введення індигокарміну може призвести до тимчасової стимуляції альфа-адренорецепторів, збільшуючи загальний периферичний опір, діастолічний і систолічний артеріальний тиск, центральний венозний тиск, а також зменшуючи серцевий викид, ударний об'єм і частоту серцевих скорочень. Відомі повідомлення про важку артеріальну гіпертензію, яка поєднувалася зі значним підвищенням індексу системного судинного опору та невеликим збільшенням серцевого індексу [2].

В інших випадках повідомлялося про гіпотензію, ймовірно, внаслідок гострого вивільнення гістаміну як частини неопосередкованої IgE анафілактичної (анафілактоїдної) реакції [2, 28-30].

Також індигокармін асоціюється з атріовентрикулярною блокадою і поліморфною суправентрикулярною бігемінією [2, 30].

Вважається, що індигокарміну властива канцерогенна дія (але таке припущення наразі науково не підтверджене), а тому не рекомендується перевищувати допустимі норми його споживання (5 мг/кг маси тіла/день) використовувати для годування дітей.

В цілому, відповідно до санітарно-епідеміологічних правил та норм України фізіологічно допустимою нормою добового споживання індигокарміну є 5 мг на 1 кг маси тіла людини із середньою вагою – 60 кг. Крім того, для уникнення негативного впливу індигокарміну на організм людини рекомендованим є дотримання умов його зберігання. Також заборонено зберігати цей барвник поруч із окисниками, лугами, отруйними і леткими хімічними речовинами.

Розділ 2. Матеріали та методи

Мета досліджень полягала у розробці альтернативної методики кількісного визначення індигокарміну в таблетованих лікарських засобах на основі однокомпонентного однохвильового аналізу.

2.1. Об'єкт дослідження

Об'єктом дослідження слугували лікарські засоби, позначені як «ЛЗ №1», «ЛЗ №2» та «ЛЗ №3», які мають державну реєстрацію [31] і у своєму складі містять індигокармін.

Ці засоби мають подібну лікарську форму – таблетки, а також не потребують рецепту для продажу.

«ЛЗ №1» – це лікарський засіб, що застосовуються при біліарній патології. Він застосовується для покращення секреторної функції печінкових клітин, спричиняючи помірний холеретичний ефект. Стимулює синтез жовчних кислот; підвищує осмотичний градієнт між жовчю і кров'ю, що зумовлює збільшення фільтрації у жовчні капіляри води та електролітів; прискорює потік жовчі жовчними шляхами, запобігаючи поширенню інфекції і зменшуючи інтенсивність запального процесу; знижує можливість випадання холестерину в осад із наступним утворенням каменів.

За фізико-хімічними властивостями – це таблетки, вкриті плівковою оболонкою, від жовтого до зеленувато-жовтого кольору, круглої форми з двоопуклою поверхнею.

Протипоказаннями його застосування є:

- підвищена чутливість до будь-якого компоненту лікарського засобу;
- гострий гепатит;
- жовчнокам'яна хвороба;
- обтураційна жовтяниця;
- спазм сфінктера Одді;

- гострий панкреатит;
- виразкова хвороба шлунку та дванадцятипалої кишки в стадії загострення;
- гострий ентероколіт.

Внаслідок взаємодії з іншими лікарськими засобами може призводити до негативних (посилює жовчоутворення) або позитивних (сприяє кращому всмоктуванню, покращує терапевтичну ефективність деяких лікарських засобів та ін.) наслідків.

«ЛЗ №2» – це антигістамінний засіб для системного застосування. Застосовується для усунення симптомів, пов'язаних з алергічним ринітом та кропив'янкою.

За фізико-хімічними властивостями – це круглі двоопуклі таблетки, вкриті плівковою оболонкою, синього кольору з розподільчою рискою з одного боку.

Протипоказанням його застосування є підвищена чутливість до дезлоратадину, лоратадину та/або до будь-якої з допоміжних речовин лікарського засобу. Жодних клінічно значущих ознак взаємодії з іншими лікарськими засобами не було виявлено. Проте, відомі випадки непереносимості алкоголю та алкогольна інтоксикація під час застосування під час застосування досліджуваного засобу. Лікарський засіб слід обережно застосовувати пацієнтам із судомами в особовому та родинному анамнезі, особливо дітям молодшого віку, котрі можуть бути чутливішими до розвитку нового нападу судом.

«ЛЗ №3» – це антигістамінний засіб для системного застосування. Застосовується для усунення симптомів, викликаних кропив'янкою та алергічним ринітом.

За фізико-хімічними властивостями – це таблетки круглої форми з двоопуклою поверхнею, вкриті оболонкою блакитного кольору.

Протипоказано застосовувати людям із підвищеною чутливістю до активної речовини або до будь-якої з допоміжних речовин препарату чи до

лоратадину. У клінічних дослідженнях жодних клінічно значущих взаємодій не спостерігалось. За даними клініко-фармакологічних досліджень при застосуванні препарату разом із алкоголем не відзначалося посилення негативного впливу етанолу на психомоторну функцію. Однак у постреєстраційному періоді спостерігалися випадки непереносимості алкоголю та алкогольна інтоксикація під час застосування препарату. Крім того, є обмеження щодо застосування цього засобу хворим із нирковою недостатністю високого ступеня, пацієнтам із судомами в анамнезі або зі спадковою схильністю, пацієнтам із рідкісними спадковими проявами непереносимості галактози, вродженою недостатністю лактози або синдромом мальабсорбції глюкози та галактози.

2.2. Посуд та обладнання

Аналіз досліджуваних лікарських засобів здійснювали за допомогою наступного обладнання:

- спектрофотометр ULAB 108 UV (додаток 2);
- ваги аналітичні Radwag AS 220.R2 (додаток 3);
- мірні колби, циліндри, піпетки класу точності А (додаток 4).

2.3. Реактиви

Для аналізу досліджуваних лікарських засобів були використані наступні реактиви:

- вода дистильована;
- індигокарміну порошок (ч. д. а.).

2.4. Методика та умови спектрофотометричного аналізу

Спектрофотометрія – метод аналізу, який ґрунтується на визначенні спектра поглинання або вимірюванні світлопоглинання при певній довжині хвилі, яка відповідає максимуму кривої поглинання досліджуваної речовини. Теоретичним обґрунтуванням спектрофотометрії є закон Бугера-Ламберта-

Бераб якій описує процес ослаблення інтенсивності променя світла після його проходження через зразок або після відбиття від поверхні певного зразка, що відбувається внаслідок поглинання світла, яке є прямо пропорційним довжині шляху променя, що проходить крізь зразок, і концентрації абсорбуючого зразка. Таким чином, цей метод широко застосовується для оцінки досліджуваної речовини та визначення її якісного та кількісного складу [2].

Застосування спектрофотометрії в ультрафіолетовій і видимій областях спектра засноване на поглинанні електромагнітного випромінювання сполуками, що містять хромофорні і ауксохромні групи. Поглинання випромінювання в цих областях пов'язане зі збудженням електронів орбіталей основного стану та переходами у збуджений стан.

Спектрофотометричний аналіз здійснюється за допомогою спеціалізованого приладу – спектрофотометра. Основною характеристикою спектрофотометра є його здатність пропускати через досліджуваний зразок світловий потік будь-якої необхідної довжини хвилі та проводити фотометричні вимірювання, скануючи (переглядаючи) весь діапазон довжин хвиль як видимого світла, так і ультрафіолетового. До основних вузлів спектрофотометра (Рис. 1) належить: джерело світла (переважно вольфрамова, воднева або дейтерієва лампи); кювети з кварцового скла; диспергуючий елемент (призми або дифракційні решітки) [32, 33].

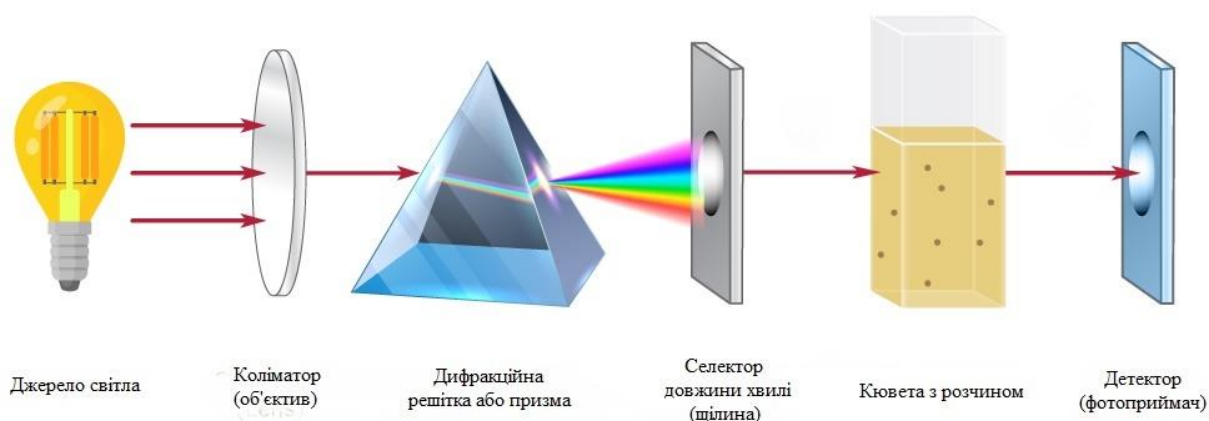


Рис. 1. Схема розташування функціональних блоків спектрофотометра

Для кількісного визначення індигокарміну у досліджуваних лікарських засобах використовували однокомпонентний однохвильовий аналіз – кількісне визначення одного з компонентів лікарського засобу за допомогою вимірювання оптичної густини розчину випробуваного зразка за однієї аналітичної довжини хвилі [32]. Такий аналіз здійснювали методом стандарту.

Однокомпонентний однохвильовий аналіз методом стандарту полягає у вимірюванні аналітичної довжини хвилі оптичних густин розчину випробуваного зразка і розчину порівняння з відомою концентрацією та розрахунку концентрації аналізованого компонента згідно з рівнянням (1):

$$\frac{C}{C_0} = \frac{A}{A_0} \quad (1),$$

де:

C – концентрація досліджуваного розчину, М;

C_0 – концентрація стандартного розчину, М;

A – аналітична довжина хвилі досліджуваного розчину, нм;

A_0 – аналітична довжина хвилі стандартного розчину, нм.

Вимірювання оптичних густин стандартного і досліджуваного розчинів проводили за однакових умов з мінімальним інтервалом у часі.

Визначення та послідовність дій для проведення вищезазначених вимірювань користувалися інструкціями до експлуатації спектрофотометра ULAB 108 UV.

2.4.1. Вимоги до стандартних розчинів

Визначення концентрації індигокарміну у досліджуваних розчинах здійснюється із використанням калібрувального графіка залежності оптичної щільності стандартних розчинів від концентрації.

Як стандартні використали водний розчини індигокарміну з концентрацією 10^{-3} , 5×10^{-4} , 10^{-4} , 5×10^{-5} , 10^{-5} та 5×10^{-6} М. Для їх приготування відповідні наважки індигокарміну розчиняли у 10 мл дистильованої води.

2.4.2. Вимоги до побудови калібрувального графіка

Побудова калібрувального графіка залежності оптичної щільності від концентрації здійснювалась шляхом вимірювання значень оптичної щільності стандартних розчинів, передбачених у пункті 2.4.1 розділу 2. Визначення та послідовність дій для проведення вищезазначених вимірювань проводилися згідно з інструкціями до експлуатації спектрофотометра ULAB 108 UV.

2.4.3. Вимоги до вимірювання зразка

У дослідженні використовуються три лікарські засоби, які мають таблетовану препаративну форму, а тому приготування досліджуваних зразків здійснюється у декілька етапів:

- відокремлення оболонки (барвник міститься у кольоровій оболонці таблетки, а тому для дослідження використовуються лише оболонка чотирьох таблеток);
- розчинення у 40 мл дистильованої води;
- центрифугування протягом 10 хвилин зі швидкістю 6000 об/хв.;
- відбір для дослідження 10 мл надосадового розчину.

Вимірювання досліджуваних зразків здійснюється за допомогою спектрофотометра ULAB 108 UV згідно з інструкціями до його застосування.

Підключення приладу до електричної мережі проводиться згідно з інструкцією. Після підключення та увімкнення джерела світла виконуються наступні кроки:

- встановити в кюветотримачі кювети з контрольним і досліджуваним розчином, помістити кюветотримач в кюветний відділ таким чином, щоб на шляху потоку випромінювання знаходився контрольний розчин

(кюветотримач повинен бути повернутий білою точкою до працюючого), закріпити його відповідним зажимом, закрити кришку кюветного відділу;

- встановити на шкалі значення належної довжини хвилі;
- фотоелемент встановити в робоче положення;
- перемістити вимикач у положення «викл» і закрити фотоелемент, встановити шторку в положення «закр»;
- встановити відповідний світлофільтр;
- встановити селектор довжини хвилі (щілину) в одне із положень – 1, 2, 3 чи 4 (варто зазначити, що якщо потрібно здійснити вимірювання з високою чутливістю і можна знехтувати зниженням монохроматичності та працювати з широкою щілиною, то необхідно встановити положення 1, а якщо необхідно працювати з вузькою щілиною, то проводяться вимірювання у положенні 4);
- скомпенсувати темновий потік важелями грубого і плавного регулювання, підводячи стрілку міліамперметра до нуля;
- відкрити фотоелемент, перемістити вимикач у положення «відкр»;
- змінити ширину щілини, установити стрілку міліамперметра на нульове значення;
- установити на шляху випромінювання досліджуваній зразок, переміщаючи каретку з кюветотримачем відповідним важелем;
- перемістити вимикач у положення «викл», відновити нульове положення стрілки міліамперметра;
- виміряти значення оптичної густини або проценту пропускання;
- облік повторити 3-4 рази.

2.4.4. Вимоги до розрахунку

Вміст індигокарміну у досліджуваних розчинах (ЛЗ №1, ЛЗ №2 та ЛЗ №3) визначали за допомогою калібрувального графіка.

Розділ 3. Результати та їх обговорення

Метод спектрофотометрії – це поширений та доступний методом аналізу забарвлених та безбарвних розчинів хімічних сполук. Важливою перевагою цього методу є висока точність отриманих результатів. Проте для отримання таких результатів необхідно попередньо створювати спеціальні умови для здійснення аналізу – розчини, взяті для дослідження, повинні бути прозорими або рівномірно слабо забарвленими, без сторонніх часток, опалесценції або осаду. Зазначена вимога для проведення спектрофотометричного аналізу досліджуваних лікарських засобів ЛЗ №1, ЛЗ №2 та ЛЗ №3 було дотримана, оскільки робочі розчини цих засобів готувалися за допомогою центрифугування.

Оцінювання досліджуваних лікарських засобів здійснювали у області спектру, що охоплює ультрафіолетову та видиму частини (відповідно до технічних характеристик спектрофотометра ULAB 108 UV). Вимірювання проводили у трьох серіях з часовим інтервалом, який становив 7 діб, та у трьох повтореннях. Для кожної серії використовували новий зразок досліджуваного лікарського засобу.

3.1. Побудова калібрувального графіка

Калібрувальний графік будували відповідно до вимог пункту 2.4.2 розділу 2 за результатами вимірювання оптичної щільності стандартних розчинів індигокарміну з відомою її концентрацією (пункт 2.4.1 розділу 2). За результатами здійснених вимірювань були визначені значення оптичної щільності кожного розчину та розрахована її залежність від концентрації досліджуваної речовини у розчині (Рис. 2).

Крім того, була побудована спектрограма стандартних розчинів (Рис. 3), яка показала залежність здатності пропускати промені світла від зміни вмісту індигокарміну у розчині.

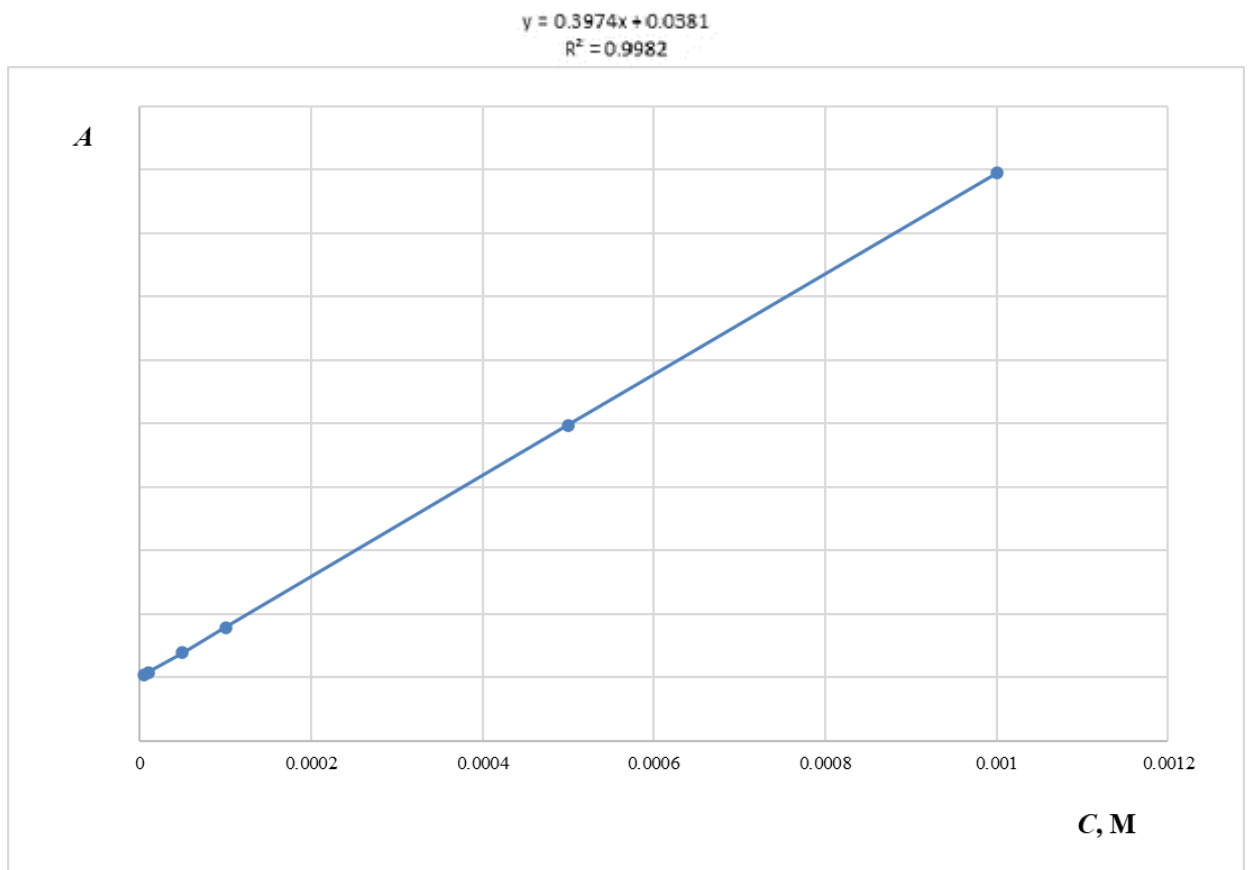


Рис. 2. Калібрувальний графік залежності оптичної щільності стандартних розчинів індигокарміну від їх концентрації

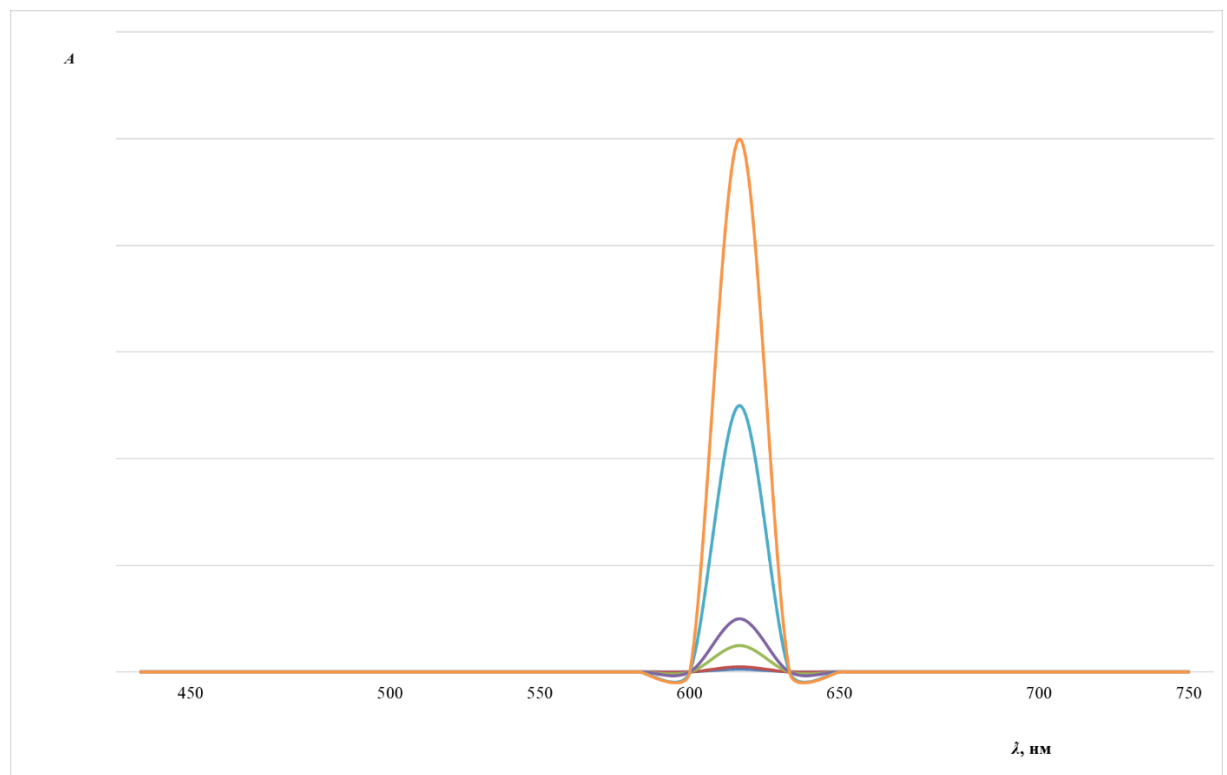


Рис. 3. Спектрограма стандартних розчинів

На спектрограмі чітко видно, що збільшення вмісту індигокарміну у розчині викликає зростання його оптичної густини (послаблює його спроможність пропускати світло відповідної довжини хвилі) і призводить до появи значних піків.

Також підтверджено, що індигокармін у всіх варіантах стандартних розчинів характеризується поглинання хвиль із довжиною ≈ 614 нм.

3.2. Результати визначення вмісту індигокарміну у досліджуваних лікарських засобах

Визначення кількості індигокарміну у досліджуваному розчині здійснювали за допомогою калібрувального графіка. Для цього, відповідно до інструкцій, передбачених у пункті 2.4.3 розділу 2, провели вимірювання оптичної густини та відповідні розрахунки концентрації досліджуваної речовини у зразках ЛЗ №1, ЛЗ №2 і ЛЗ №3 (Табл. 1).

Таблиця 1. Вміст індигокарміну у досліджуваних зразках, C (М)

№ зразка	Концентрація індигокарміну, М		
	Серія №1	Серія №2	Серія №3
ЛЗ №1			
Повторення №1	0.01015	0.00997	0.01009
Повторення №2	0.00986	0.00988	0.00992
Повторення №3	0.01007	0.01012	0.01005
ЛЗ №2			
Повторення №1	0.04971	0.05008	0.05076
Повторення №2	0.05092	0.04907	0.05088
Повторення №3	0.05097	0.04953	0.05081
ЛЗ №3			
Повторення №1	0.04056	0.04041	0.03983
Повторення №2	0.03991	0.03934	0.04081
Повторення №3	0.04007	0.04062	0.03984

За результатами відповідних розрахунків встановлено, що середня арифметична концентрація індигокарміну у ЛЗ №1 становить приблизно 0,01 М, у ЛЗ №2 – 0,05 М, а у ЛЗ №3 – 0,04 М.

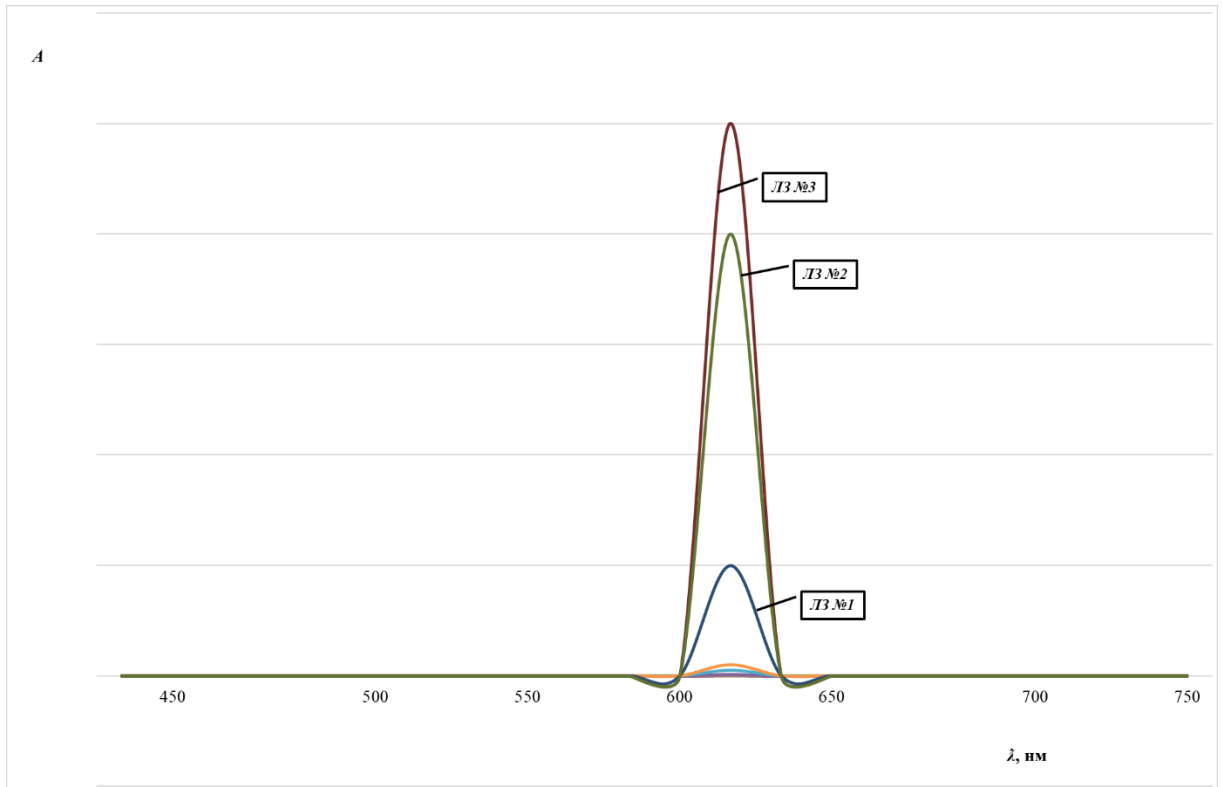


Рис. 4. Порівняльна спектрограма стандартних і досліджуваних розчинів

Оскільки вміст індигокарміну у досліджуваних лікарських засобах істотно перевищував її концентрацію у стандартних розчинах, то на спектрограмі піки для ЛЗ №1, ЛЗ №2 і ЛЗ №3 виявились значно більшими (Рис. 4), що є закономірною залежністю.

3.3. Валідація методики

Для підтвердження ефективності обраної методики і достовірності її результатів потрібно застосувати відповідні заходи валідації – перевірити специфічність методики, її лінійність, робастність і правильність [34, 35].

3.3.1. Перевірка специфічності методики

Здатність визначити досліджувану речовину у присутності інших компонентів характеризує її специфічність [34].

Методика випробовувалась безпосередньо на рідких лікарських формах, склад яких зазначений в інструкціях для медичного використання. Тому, перевірку результатів, отриманих за допомогою вищезазначеної методики кількісного визначення досліджуваної речовини, на специфічність методики ми порівнювали як з відомою концентрацією компонента у лікарських засобах, так і з результатами аналізу показників спектрального поглинання. Виявлено чіткій збіг за обома критеріями, що доводить специфічність аналізованої методики.

3.3.2. Перевірка лінійності методики

Здатність запропонованої методики підтримувати пряму пропорційну залежність значення оптичної густини від концентрації досліджуваної речовини є її лінійністю [34].

Аналіз досліджуваної методики кількісного визначення вказав на її однозначну лінійність (Рис. 2). Ознакою лінійності є значення коефіцієнту кореляції ($R^2 = 0.9982$, що задовольняє вимогам ДФУ) та лінійна функція, яка описується рівнянням наступним: $y = 0.3974x + 0.0381$.

3.3.3. Перевірка робасності методики

Порівняння між собою експериментальних результатів, котрі були отримані за допомогою різних методик, є типовою практикою у аналітичній практиці, у тому числі й у фармації. Таким чином оцінюються систематичні помилки порівняння результатів досліджуваних методик, якщо вони мають місце. Крім того, практикується перевірка методики у різних лабораторних умовах (робасність) – різне походження реагентів, відмінність у часі проведення вимірювання, виконання вимірювань відповідно до типового алгоритму різними виконавцями тощо [34]. У нашому випадку для перевірки робасності досліджуваної методики використали критерії застосування часової серійності вимірювань та різні партії досліджуваних лікарських засобів.

Результати кількісного визначення досліджуваної речовини у лікарських засобах наведено у таблиці 1. Порівняння вимірів концентрації досліджуваної речовини у різних серіях дослідження доводить коректність методики, оскільки різниця значень не перевищила 2%, що узгоджується із критеріями робастності.

3.3.4. Перевірка правильності методики

Перевірку правильності методики здійснювали за принципом «введено-знайдено» [34]. Отримані результати вимірювань корелюють із регламентованим вмістом досліджуваної речовини у відповідних лікарських засобах. За результатами порівняння експериментальних даних щодо вмісту аналізованого компонента у досліджуваних лікарських засобах виявлено достатній рівень точність (правильність) запропонованого методу.

3.4. Порівняльний аналіз методик кількісного визначення

Для визначення кількісного вмісту синтетичних барвників (у тому числі індигокарміну) переважно застосовують метод титрування, а з розвитком технологій все більшого поширення набуває метод високоефективної рідинної хроматографії. Проте, якщо метод титрування має низку недоліків (похибка титрування може коливатися від 5% до 10%; стандартизація титранту; присутність індикатора; часто відбувається порушення стехіометричності тощо), то метод високоефективної рідинної хроматографії потребує попереднього розділення складної суміші, застосування високого тиску, дрібнозернистих сорбентів та інших специфічних умов аналізу.

На противагу зазначеним методам, спектрофотометричний метод оцінки забарвлених та безбарвних розчинів хімічних сполук характеризується високою точністю отриманих результатів і простотою виконання (найскладніші етапи аналізу здійснюються комп'ютеризованим приладом), не зважаючи на вимогливість до умов аналізу.

ВИСНОВКИ

1. За результатами проведених досліджень було визначено кількісний вміст індигокарміну у досліджуваних лікарських засобах за допомогою методу спектрофотометрії. Було встановлено, що у лікарському засобі ЛЗ №1 кількість індигокарміну не перевищувала 0,01 М, у лікарському засобі ЛЗ №2 – 0,05 М, а у лікарському засобі ЛЗ №3 – 0,04 М.

2. Аналізована методика була перевірена за основними валідаційними критеріями (специфічність, лінійність, робастність та правильність). Виявлено, що валідаційна якість відповідає критеріям прийнятності згідно Державної фармакопеї України, а тому зазначену методику доцільно використовувати для кількісного визначення індигокарміну у таблетованих формах лікарських засобів.

3. Запропонована методика виявила достатню точність вимірювань, а тому її можна застосовувати як альтернативний метод.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Фармацевтична енциклопедія [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/>.
2. National Library of Medicine [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Indigo-carmine>.
3. Ataman chemicals [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: https://www.atamanchemicals.com/indigo-carmine_u25370/.
4. Carmin de indigo [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.scribd.com/doc/135685811/Carmin-de-indigo>.
5. Наказ МОЗ України від 19.06.2007 р. № 339 Про затвердження Переліків назв допоміжних речовин та барвників, що входять до складу лікарського засобу. [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0339282-07#Text>.
6. Bludigo-indigotindisulfonate sodium injection. DailyMed. 7 November 2022. Retrieved 21 January 2023. [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=73f246c4-b127-452e-856f-134b56cb8870>.
7. Craik JD, Khan D, Afifi R (January–February 2009). "The Safety of Intravenous Indigo Carmine to Assess Ureteric Patency During Transvaginal Uterosacral Suspension of the Vaginal Vault". *Journal of Pelvic Medicine & Surgery*. 15 (1): 11–15.
8. World Health Organization. Indigotine // Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives [Електронний ресурс]. – Режим доступу ресурсу: https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/Monograph1/Additive-234.pdf.
9. Scientific Opinion on the re-evaluation of Indigo Carmine (E 132) as a food additive. European Food Safety Authority [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3768>.

10. Євлаш В.В. Харчова хімія: Навчальний посібник / В.В. Євлаш, О.І. Торяник, В.О. Коваленко, О.Ф. Аксьонова, Н.О. Отрошко, Т.О. Кузнецова, Л.Ф. Павлоцька, Д.О. Торяник. – Х.: Світ книг, 2012. – 504 с.

11. Технічний аналіз харчових добавок та косметичних продуктів: підручник для студ. спеціальності 161 «Хімічні технології та інженерія», освітньо-професійної програми «Хімічні технології косметичних засобів та харчових добавок» / В.І. Воробйова, О.Е. Чигиринець, Т.М. Пилипенко, Л.А. Хрокало, В.Г. Єфімова. – Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2020. – 345 с.

12. Cameo chemicals [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/20520>.

13. Coelho M.G., de Lima G.M., Augusti R., Maria D.A., Ardisson J.D. New materials for photocatalytic degradation of Indigo Carmine – Synthesis, characterization and catalytic experiments of nanometric tin dioxide-based composites. Applied Catalysis B: Environmental. 2010. Vol. 96, № 1-2. P. 67–71.

14. Takeuchi K, Ibusuki T (March 1989). "Quantitative determination of aqueous-phase ozone by chemiluminescence using indigo-5,5'-disulfonate". Anal. Chem. 61 (6): 619–23.

15. Ластухін Ю.О. Харчові добавки. Е-коди. Будова. Одержання. Властивості / Ю.О. Ластухін. – Львів: Центр Європи, 2009. – 836 с.

16. Ластухін Ю.О., Воронов С.А. Органічна хімія. Підручник для вищих навчальних закладів. – Львів: Центр Європи, 2006. – 864 с.

17. Чирва В.Я., Ярмолюк С.М., Толкачова Н.В., Земляков О.Є. Органічна хімія. – Львів: БаК, 2009. – 996 с.

18. Методичні вказівки до лабораторних робіт з курсу «Хімічна інженерія харчових добавок», розділ «Ідентифікація харчових добавок» для студентів спеціальності 161 «Хімічні технології та інженерія» / Укладачі: А. П. Белінська, Т. О. Овсяннікова, Т. В. Школьнікова, В. С. Марченко, Т. В. Соколова - Харків: НТУ «ХПІ», 2021. – 37 с.

19. Окиснення індигокармину у присутності лаккази і Темпо• / Гордєєва І.О., Левченко О.М., Куц О.В., Шендрик О.М. // Хімічні проблеми

сьогодення (ХПС-2019): збірник ез доповідей II Міжнародної (XII Української) наукової конференції студентів, аспірантів і молодих учених, 19–21 березня 2019 р., м. Вінниця / Донецький національний університет імені Василя Стуса; редколегія: О. М. Шендрик (відп. ред.) [та ін.]. Вінниця, 2019. 248 с.

20. Скоробогатий Я.П. Хімія і методи дослідження сировини і матеріалів. Фізична і колоїдна хімія та фізико-хімічні методи дослідження / Я.П. Скоробогатий, В.Ф. Федорко. – Львів: Компакт-ЛВ, 2005. – 248 с.

21. Хімія та методи дослідження сировини і матеріалів. Розділ «Органічна хімія»: навчальний посібник / Я.П. Скоробогатий, Н.О. Петровська, А.В. Гузій. – Львів : Новий світ-2000, 2007. – 432 с.

22. Food, drug, and cosmetic dyes. Meyler's Side Effects of Drugs (Sixteenth Edition). The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions. 2016, Pages 433-436.

23. Summary of color additives for use in the United States in foods, drugs, cosmetics, and medical devices [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.fda.gov/industry/color-additive-inventories/summary-color-additives-use-united-states-foods-drugs-cosmetics-and-medical-devices>.

24. Indigo carmine. Sigma Aldrich. Retrieved 15 Feb 2022 [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/sds/SIAL/131164>.

25. Bludigo-indigotindisulfonate sodium injection. DailyMed. 7 November 2022. Retrieved 21 January 2023.

26. Jang JY (November 2015). The past, present and future of image-enhanced endoscopy. Clinical Endoscopy. 48 (6): 466–475.

27. Craik JD, Khan D, Afifi R (January–February 2009). "The Safety of Intravenous Indigo Carmine to Assess Ureteric Patency During Transvaginal Uterosacral Suspension of the Vaginal Vault". Journal of Pelvic Medicine & Surgery. 15 (1): 11–15.

28. Uma R. Lakshmi, Vimal Chandra Srivastava, Indra Deo Mall, Dilip H. Lataye. Rice husk ash as an effective adsorbent: Evaluation of adsorptive characteristics for Indigo Carmine dye. Journal of Environmental Management. 2009.

29. Indigo carmine. Structure, properties, uses & side effects. Macsen Labs [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.macsenlab.com/blog/what-is-indigo-carmine/>.

30. Reproductive Toxicology Center [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://reprotox.org/>.

31. Компендіум. Спеціалізоване медичне інтернет-видання для лікарів, провізорів, фармацевтів, студентів медичних і фармацевтичних вишів. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://compendium.com.ua/>

32. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – перше вид. – Доповнення 2. – Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.

33. UV-Vis spectrophotometers. What is a UV-Vis spectrophotometer? Principals & history of UV-Vis spectrophotometers. [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.implen.de/uv-vis-spectrophotometer/#history>.

34. Валідація аналітичних методик і випробувань. Державна Фармакопея України. Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е видання. Харків: РІРЕГ, 2001. С. 58-67. Доповнення 1. 2004. С. 2-4.

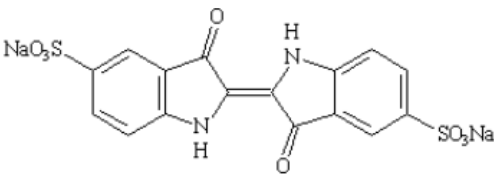
35. Георгіянц В.А. Валідація аналітичних методик у фармації : теорія, нормативні аспекти, проблеми практики / В.А. Георгіянц, О.А. Євтіфєєва. – *Фармацевтичний часопис*. – №2. – 2007. – С.13-18.

ДОДАТКИ

Витяг з World Health Organization [8]

INDIGOTINE

Prepared at the 28th JECFA (1984), published in FNP 31/1 (1984) and in FNP 52 (1992). Metals and arsenic specifications revised at the 59th JECFA (2002). An ADI of 0-5 mg/kg bw was established at the 18th JECFA (1974)

SYNONYMS	CI Food Blue 1, FD&C Blue No. 2, Indigo Carmine, CI (1975) No. 73015, INS No. 132
DEFINITION	Consists essentially of a mixture of disodium 3,3'-dioxo-[delta ^{2,2'} -biindoline]-5,5'-disulfonate, and disodium 3,3'-dioxo-[delta ^{2,2'} -biindoline]-5,7'-disulfonate and subsidiary colouring matters together with sodium chloride and/or sodium sulfate as the principal uncoloured components. May be converted to the corresponding aluminium lake in which case only the <i>General Specifications for Aluminium Lakes of Colouring Matters</i> apply.
Chemical names	Disodium 3,3'-dioxo-[delta ^{2,2'} -biindoline]-5,5'-disulfonate
C.A.S. number	860-22-0 (5,5' isomer)
Chemical formula	C ₁₆ H ₈ N ₂ Na ₂ O ₈ S ₂
Structural formula	
Formula weight	466.36
Assay	Not less than 85% total colouring matters. Not more than 18% of disodium 3,3'-dioxo-[delta ^{2,2'} -biindoline]-5,7'-disulfonate
DESCRIPTION	Blue powder or granules
FUNCTIONAL USES	Colour
CHARACTERISTICS	
IDENTIFICATION	
<u>Solubility</u> (Vol. 4)	Soluble in water; sparingly soluble in ethanol
<u>Identification of colouring matters</u> (Vol. 4)	Passes test
PURITY	

<u>Loss on drying at 135°</u>	Not more than 15% together with chloride and sulfate calculated as sodium salts
<u>Water insoluble matter</u> (Vol. 4)	Not more than 0.2%
<u>Lead</u> (Vol. 4)	Not more than 2 mg/kg Determine using an atomic absorption technique appropriate to the specified level. The selection of sample size and method of sample preparation may be based on the principles of the method described in Volume 4, "Instrumental Methods."
<u>Subsidiary colouring matters</u> (Vol. 4)	Not more than 1% (except disodium 3,3'-dioxo-[delta ^{2,2'} -biindoline]- 5,7'-disulfonate) Use the following conditions: Developing solvent: No. 3 Height of ascent of solvent front: approximately 17 cm Note 1. The 5,7' isomer is separated as a wide blue zone just in front of the main blue band. Do not include this zone in the subsidiary colouring matter zones which are cut out and measured. Note 2. The 15 ml sodium hydrogen carbonate solution used in the general procedure is replaced by 15 ml 0.05 N hydrochloric acid in order to avoid the decomposition which the sulfonated indigo undergoes in alkaline solution.
<u>Organic compounds other than colouring matters</u> (Vol. 4)	Not more than 0.5% of sum of isatin-5-sulfonic acid, 5-sulfoanthranilic acid and anthranilic acid Use <i>liquid chromatography</i> under the following conditions: HPLC elution gradient: 2 to 100% gradient followed by elution at 100%
<u>Un sulfonated primary aromatic amines</u> (Vol. 4)	Not more than 0.01% calculated as aniline
<u>Ether extractable matter</u> (Vol. 4)	Not more than 0.2% Weigh accurately about 2 g sample instead of the 5 g stated in the general methods
METHOD OF ASSAY	Proceed as directed under <i>Total Content by Titration with Titanous Chloride</i> in Volume 4, using the following: Weight of sample: 1.0-1.1 g Buffer: 15 g sodium hydrogen tartrate Weight (D) of colouring matters equivalent to 1.00 ml of 0.1 N TiCl ₃ : 0.02332 g <u>Isomer content by paper chromatography</u> Refer to the conditions for the determination of subsidiary colouring matters (above). Cut the isomer band from the chromatogram in the manner detailed for the subsidiary bands, extract into solvent and measure the absorbance at its S _{max} . Measure the absorbance of the corresponding blank at the same wavelength. As a standard use 0.1 ml of an 0.20% solution of the sample applied to the 18 cm x 0.7 cm rectangle.

Isomer expressed as a percentage of the sample =
 $[A/A_s] \times 20\% \times [D/100]$

where A and A_s are the net absorbances of the isomer and standard, respectively, and D is the total colouring matters content of the sample.

Isomer content by HPLC

The 5,7' isomer separates under the HPLC conditions detailed above for the separation of subsidiary colouring matters, and the amount present can be quantified.

Спектрофотометр ULAB 108 UV



Спектрофотометр ULAB 108 UV призначений для здійснення точних аналізів. Характеризується наступними відмінними рисами:

- низьким рівнем розсіяного світла;
- великий РК монітор (128×64 пікселів);
- відображає та зберігає 200 груп даних, по 5 груп на екран;
- відображає калібрувальну криву та кінетичну криву;
- автоматичне збереження даних внаслідок раптового відключення живлення;
- автоматичне встановлення довжини хвилі;
- окреме виключення/вмикання галогенної та дейтерієвої ламп (для збільшення терміну служби);
- додаткове програмне забезпечення здійснює повний контроль над спектрофотометром через вбудований USB-порт;
- можливий вимір у режимах: кількісний, кінетичний, сканування за довжиною хвилі та ДНК/протеїн тест;
- заміна лампи не порушує сумісність оптичної системи;
- великий кюветний відділ для 5-100 мм кювети з додатковими тримачами.

Прилад додано до Державного реєстру засобів вимірювальної техніки України за № У2869-09.

Робочий діапазон довжин хвиль, нм	190-1100
Спектральна ширина щілини, нм	$2,0 \pm 0,4$
Оптична система	однопроменева сітка 1200 ліній / мм
Похибка налаштувань довжини хвилі, нм	$\pm 0,8$
Відхилення налаштувань довжини хвилі, нм	0,5
Налаштування довжини хвилі	авто
Похибка вимірювання коефіцієнта прозорості, % T	до 800 нм, $\pm 0,5$; понад 800 нм, ± 1
Відхилення вимірювання коефіцієнта прозорості, % T	$\pm 0,3$
Діапазон вимірювання оптичної щільності та коефіцієнта прозорості	0 – 3,0 Б; 0,1 – 100 % T
Розсіяне світло	0,05
Стабільність	$\pm 0,002$ А/год – 500 нм
Шум	$\pm 0,002$ А (200 – 1000 нм)
Дисплей	графічний РК 128 × 64
Режим вимірювань	T, B, кількісний, кінетика
Монохроматор	дифракційна сітка 1200 л/мм
Детектор	кремнієвий фотодіод
Стандартний кюветотримач	4-х позиційний 10 мм у комплекті; 3-х позиційний (100 мм × 24 мм) стандарт КФК-3 8-ми позиційний автосемплер замовляється окремо
Джерело світла	галогенна дейтерієва лампа
Роз'єм	USB порт, паралельний порт (принтер)
Живлення, В/Гц	~ 220/50 або ~110/60
Розміри (Ш × Д × В), мм	430 × 370 × 180
Вага, кг	13

Ваги аналітичні Radwag AS 220.R2



Radwag AS 220.R2 – це аналітичні електронні ваги з рідкокристалічним дисплеєм. Вони призначені для точного вимірювання маси рідких і сипких матеріалів, предметів у лабораторних умовах.

Функції ваг:

- зважування;
- можливість зважування габаритних навісок із нижнього боку ваг;
- можливість вимірювання щільності твердих і рідких матеріалів;
- компенсація маси тари;
- автонуль;
- рахунок штук;
- контроль за відхиленням під час градування;
- звіт результатів калібрування;
- постійне передавання даних на комп'ютер;
- велика камера зважування;
- тарілка із системою проти перевантаження;
- пакет цифрових фільтрів — адаптація ваг до умов роботи на місці;
- можливість безперервної роботи.

Найбільша межа зважування, г	220
Дискретність, г	0,0001
Діаметр платформи, мм	100
Рівномірна температура, °С	+18 – +30
Градування	внутрішня (автоматична)
Індикатор	рідкокристалічний
Живлення	230 В 50 Гц / 11 В АС
Клас точності згідно ГОСТ 24104-88	2
Клас точності згідно ДСТУ EN 45501	1

Мірний посуд класу А









KyivLvivPharma-2023

CERTIFICATE

THIS IS TO CERTIFY THAT

Yulia Korotchenko

PARTICIPATED IN THE VI INTERNATIONAL SCIENTIFIC AND PRACTICAL
CONFERENCE

**"KYIVLVIVPHARMA-2023. PHARMACEUTICAL
TECHNOLOGY AND PHARMACOLOGY IN
ENSURING ACTIVE LONGEVITY"**

DURATION - 30 HOURS (1 ECTS CREDIT)

Held in Kyiv-Lviv, Ukraine, November 16-18, 2023

Kyiv-Lviv
November 16-18, 2023
UA N90198

Vladyslav STRASHNYI
Dr. Sci. (Pharm.), Professor, Co-chair
of the Organizing Committee of
conference

Volodymyr BESSARABOV
Dr. Sci. (Engin.), Professor,
Responsible secretary of
conference

SUMMARY

Korotchenko Yulia

QUANTITATIVE DETERMINATION OF INDIGO CARMINE IN
TABLETS FORMS BY SPECTROPHOTOMETRIC METHOD

Department of analytical, physical and colloidal chemistry

Scientific supervisor: Tymoshchuk Olga

Keywords: indigo carmine, tablet form, spectrophotometric method, quantitative analysis

Introduction. Indigo carmine is a blue dye that has been known since ancient times, was extremely valuable and was used for dyeing fabrics, and later its field of application extended to medicine, where it is used mainly for diagnostic purposes and as a component of medicines in pharmacy. Despite the wide use of indigo carmine, it can have a negative effect on human health, and therefore measures are taken to control its consumption. Therefore, it is extremely important to develop methods for efficient separation, rapid detection and quantitative assessment of indigo carmine content.

Materials and methods. The subject of research was indigo carmine, and the object of research was its quantitative content in the investigated medicinal products. Empirical (observation, comparison, measurement, experiment), complex (abstraction, analysis and synthesis) and theoretical methods were used to achieve the research goal.

Results. The determination of the studied drugs was carried out in the visible region of the spectrum. Measurements were performed in three series with a time interval of 7 days and in three repetitions. For each series, a new sample of the investigated medicinal product was used.

Determination of the concentration of indigo carmine in the studied solutions was carried out using a calibration graph of the dependence of the optical density of standard solutions on the concentration. Solutions of indigo carmine in distilled water with a concentration of 10^{-3} , 5×10^{-4} , 10^{-4} , 5×10^{-5} , 10^{-5} and 5×10^{-6} M were used as standards. Based on the results of the measurements, the optical density values were determined of each solution and calculated its dependence on the concentration of the substance under investigation in the solution. In addition, a spectrogram of standard solutions was constructed, which showed the dependence of the ability to transmit light rays on changes in the content of indigo carmine in the solution. The spectrogram clearly shows that an increase in the content of indigo carmine in the solution causes an increase in its optical density (weakens its ability to transmit light of the corresponding wavelength) and leads to the appearance of significant peaks.

Determination of the amount of indigo carmine in the studied solutions was carried out using a calibration graph. To do this, measurements of the optical density and corresponding calculations of the concentration of the substance under investigation in samples of medicinal products were carried out. According to the results of the relevant calculations, it was established that the average arithmetic concentration of indigo carmine in drug No. 1 is approximately 0.01 M, in drug No. 2 – 0.05 M, and in drug No. 3 – 0.04 M. Since the content of indigo carmine in the studied medicinal products significantly exceeded its concentration in standard solutions, their peaks were significantly larger on the spectrogram, which is a natural dependence.

Conclusions. It has been experimentally proven that spectrophotometry is an effective method of quantitative analysis of medicinal products. Validation of the studied methodology was carried out for specificity, linearity, reliability and correctness. It was established that the validation characteristics correspond to the acceptance criteria according to the State Pharmacopoeia of Ukraine, therefore it is advisable to use the specified method for the quantitative determination of indigo carmine in tableted medicinal products.