

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

Допущено до захисту
Протокол засідання кафедри
№ _____ від “ _____ ” 2022р.

Завідувачка кафедри
Аналітичної, фізичної та колоїдної
хімії
Кандидат хімічних наук, доцент
Зайцева Г.М.

КВАЛІФІКАЦІЙНА ВИПУСКНА РОБОТА
КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ФЕНОЛУ У РІДКИХ ЛІКАРСЬКИХ
ФОРМАХ СОРБЦІЙНО-ФОТОМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ

Виконала: студентка 5-го курсу, групи
8803 фармацевтичного факультету

Озерчук Вікторія Андріївна

Науковий керівник:

Завідувачка кафедри аналітичної,
фізичної та колоїдної хімії, кандидат
хімічних наук, доцент

Зайцева Галина Миколаївна

Рецензент:

Доцент кафедри ліків та лікарської
токсикології

Головченко Оксана Іванівна

Київ – 2023

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів.....	4
Вступ.....	5
Розділ 1. Фенол, методи визначення.....	
1.1. Застосування фенолу.....	7
1.2. Фізико-хімічні властивості фенолу.....	7
1.3. Механізм дії та метаболізм фенолу.....	9
1.4. Фармакологічна дія фенолу.....	9
1.5. Методи ідентифікації та кількісного визначення фенолу.....	10
1.6. Кремнезем з ковалентно закріпленими групами поліоксиетильованого ізооктилфенолу (TX-SiO ₂).....	13
Розділ 2. Експериментальна частина.....	14
2.1. Матеріали та методи.....	14
2.1.1. Мета дослідження.....	14
2.1.2. Об'єкти дослідження.....	15
2.1.3. Посуд та обладнання.....	15
2.1.4. Реактиви та адсорбент.....	16
2.1.5. Методика та умови сорбційно-фотометричного визначення...16	
2.1.5.1. Методика аналізу.....	16
2.1.5.2. Приготування стандартного розчину.....	17
2.1.5.3. Побудова градувального графіку.....	17
2.1.5.4. Приготування розчину зразка.....	19
2.1.5.5. Розрахунок.....	19
Розділ 3. Результати та їх обговорення.	20
3.1. Результати визначення вмісту фенолу у РЛФ.	23
3.2. Багаторазове застосування адсорбенту.....	23
3.3. Валідація методики.....	24
3.3.1. Перевірка специфічності методики.....	24

3.3.2. Перевірка лінійності методики.....	24
3.3.3. Перевірка робастності методики.....	25
3.3.4. Перевірка правильності методики.....	27
3.4. Порівняльний аналіз методик кількісного визначення фенолу...	28
Висновки.....	29
Список використаної літератури.....	30
Додатки.	34

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ДФУ - державна фармакопея України

Ph.Eur. – European Pharmacopoeia

РЛФ – рідка лікарська форма

ХМК – хімічно-модифікований кремнезем

TX-SiO₂ - кремнезем з ковалентно закріпленими групами
поліоксиетильованого ізооктилфенолу

4-НФД – 4-нітрофенілдіазоній

ІА – іонний асоціат

ПАР – поверхнево-активна речовина

Triton X-100 - поліетиленгліколю трет-октилфеніловий етер

НМУ – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

ГГ – градувальний графік

GLP- належна лабораторна практика

г – грам

мл – мілілітр

С⁰ – градуси Цельсія

Вступ.

Фенол є представником класу фенолів, це похідне ароматичних сполук[1]. У молекулі фенолу гідроксильна група зв'язується безпосередньо з атомом Карбону у ареновому кільці, що, відповідно відображається на його фізичних та хімічних властивостях. Фенол синтезується світовою промисловістю мільйонами тон щорічно і за обсягами всіх хімічних речовин посідає 33 місце. Вважається токсичною речовиною, відноситься до 2 класу небезпеки хімічних продуктів. При контакті зі шкірою не тільки приводить до хімічного опіку(якщо площа опіку більше ніж 30% можливий летальний кінець), але і всмоктується всередину, що приводить до отруєння головного мозку. Токсичний вплив фенолу приводить до ураження нервової системи, м'язової атрофії, виразкам[2]. Але це не означає, що фенол не можна використовувати в медицині та фармації, треба лише правильно контролювати цю речовину кількісно, розробляти нові методики, шукати перспективні методи дослідження.

Актуальність:пошук нових перспективних методик кількісного визначення фенолу.

Мета: розробити сорбційно-фотометричну методику кількісного визначення фенолу у рідких лікарських формах Фармасептик та Орасепт.

Завдання:

1. Проаналізувати літературні джерела щодо застосування фенолу, фізико-хімічні та фармакологічні властивості, механізм дії та метаболізм фенолу.
2. Проаналізувати фармакопейні та аналітичні методики ідентифікації та кількісного визначення фенолу.
3. На основі проведених систематичних досліджень розробити сорбційно-фотометричну методику кількісного визначення фенолу у рідких лікарських формах Фармасептик та Орасепт.
4. Провести валідацію методики.

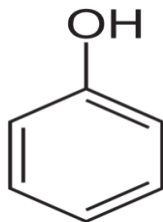
Предмет дослідження: сорбційно-фотометричний метод кількісного визначення фенолу.

Практичне значення отриманих результатів: завдяки дослідженню процесів адсорбції-десорбції збільшити чутливість кількісного визначення фенолу.

Наукове значення: результатом роботи є альтернативна методика кількісного визначення фенолу у рідких лікарських формах.

РОЗДІЛ 1. Фенол, методи визначення.

Фенол – похідний ароматичного вуглеводню, що містить у своїй молекулі одну групу **-ОН**, яка пов'язана з ароматичним ядром [1].



Фенол проявляє антисептичну та дезінфікуючу дію, має антимікробну дію відносно широкого кола мікроорганізмів (грампозитивних та грамнегативних), вірусів, бактерій деяких грибів, але проявляє менш ефективну активність проти спорових форм мікроорганізмів [3-6]. Водний розчин фенолу (у медицині та фармації використовують 1 % розчин) проявляє бактеріостатичну дію, більш концентрований розчин має бактерицидні властивості. Найбільша активність фенолу проявляється при збільшенні кислотності середовища та при зростанні температури [7].

1.1. Застосування фенолу.

У фармації фенол застосовують як антимікробний консервант у складі лікарських та косметичних засобів (концентрація до 0,5%). У медицині фенол використовують як анестетик (локально, 0,5-1,0% розчини). Більш концентровані розчини фенолу (концентрація 5% і більше) використовують як дезінфікуючі розчини [8-13].

1.2 . Фізико-хімічні властивості фенолу.

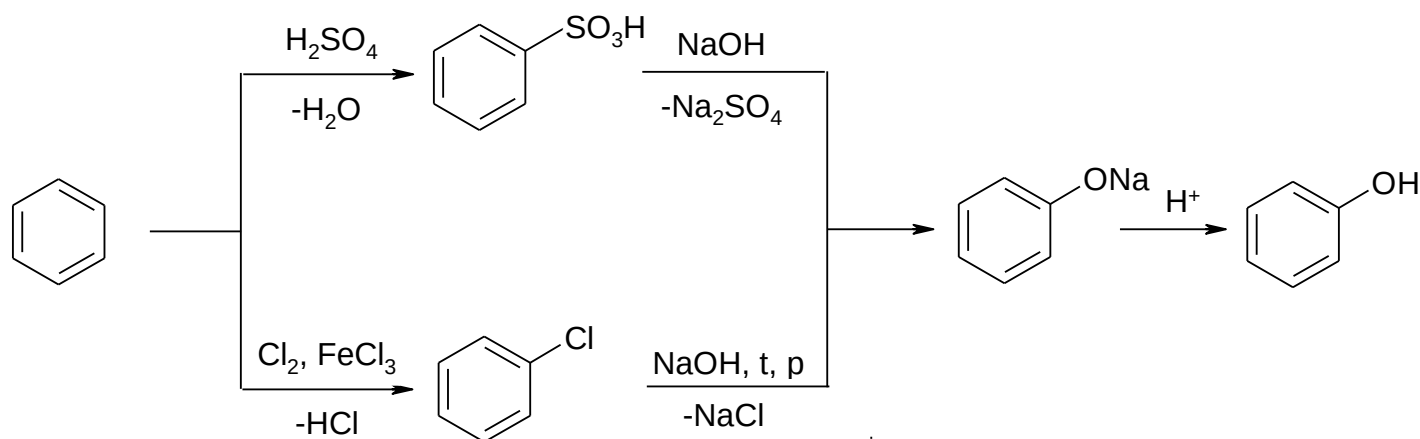
Міжнародна назва речовини Phenolum, формула C_6H_5O , Молекулярна маса 94,11.

За агрегатним станом це кристали безбарвного або світло-рожевого кольору, які добре розчиняються у воді та органічних розчинниках. Фенол легко окислюється, особливо у лужному середовищі.

Фенол проявляє слабкі кислотні властивості, певні фізико-хімічні характеристики речовини наведені нижче[14]:

- $\text{pH} = 6,0$ (насичений водний розчин);
- температура самозаймання : $715\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- температура спалювання: $79\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- температура кипіння : $181,84^{\circ}\text{C}$;
- температура замерзання: $40,9\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- щільність — $1,071\text{ г/см}^3$;
- константа дисоціації $\text{pK}_a: 10$ при $25\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- ізоосмотична концентрація $2,8\%$; $[\text{n}]^{41}_{\text{D}} = 1,5425$;
- відносна щільність пари — $3,24$ (повітря = 1);
- тиск пари 133 Па (1 мм рт. ст.) при $40\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- вологість $\leq 0,5\%$.

Промислово фенол синтезують з бензолу за схемою:



Фенол вступає у реакції електрофільного заміщення (галогенування, нітрування, сульфування), алкілювання та ацилювання. Як кислота може реагувати з лугами, здатний окислюватись та відновлюватись.

1.3 Механізм дії та метаболізм фенолу.

Фенол відносять до токсичних речовин, речовина подразнює слизові оболонки очей та дихальних шляхів, порушує діяльність нервової системи організму, негативно впливає на дихання та кровообіг. Летальна доза фенолу становить при пероральному вживанні 1,0 г. Сполука викликає хімічні опіки при попаданні на шкіру. В організмі здатен метаболізуватись до фенілпохідних (фенілглюкуроніду та фенілсульфату), виводиться з сечею. При збереженні проявляє стабільність лише у водному та олійному розчинах [13-14].

1.4. Фармакологічна дія фенолу.

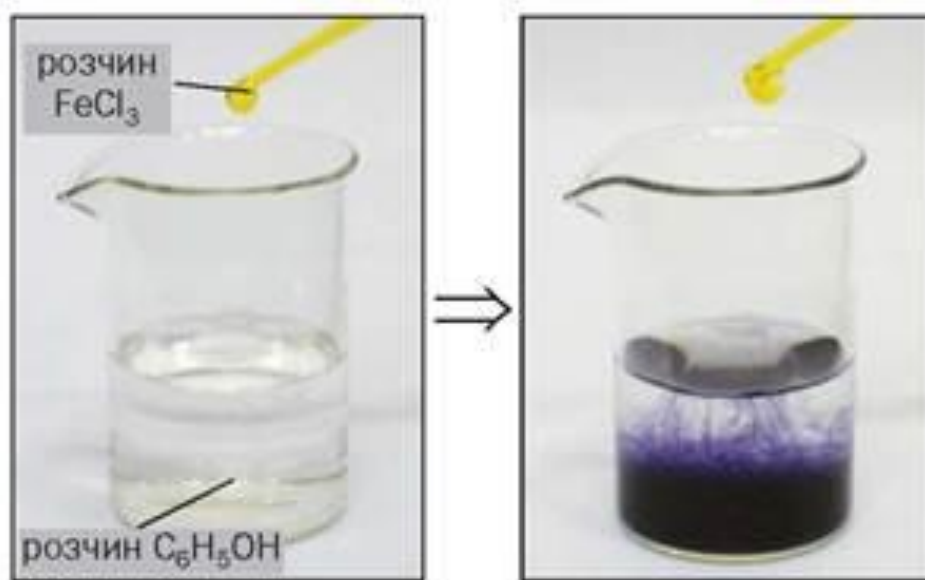
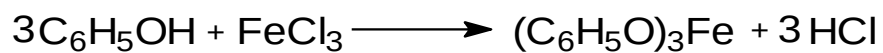
Завдяки прояву певних бактерицидних властивостей, сполука фенол є причиною денатурації білків певних мікроорганізмів, але, у присутності білків активність фенолу не зменшується. Яскраво виражена антибактеріальна активність фенолу може бути пояснена інгібуючою дією сполуки фенол на певні ферменти (переважно на дегідрогеназу). При збільшенні концентрації фенолу і при дії розчинів фенолу на епідерміс та слизові оболонки, може виникати хімічний опік. Завдяки цьому може проявлятися місцевий анестезуючий вплив після фази подразнення, але використовувати розчини фенолу як анестетик не рекомендується, оскільки після проникнення у тканини організму ця речовина проявляє токсичний ефект, і, у разі важкого отруєння, виникає параліч дихального центру. У свою чергу це призводить до летального ісходу. У стоматології нерідко використовують камфорно-фенольну та фенольно-формалінову суміші (суміші Є.Є. Платонова) для певних терапевтичних маніпуляцій, а саме: обробка каналів, твердих частин, пульпи, кукси пульпи, анестезії тощо [10,14].

1.5. Методи ідентифікації та кількісного визначення фенолу.

Відомо багато методів кількісного визначення фенолу та ідентифікації[1].

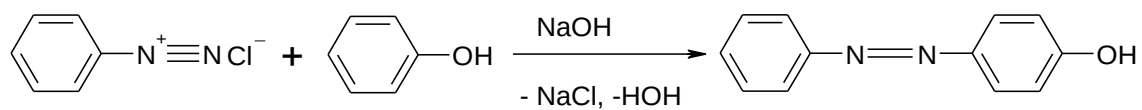
Справжність фенолу встановлюють кольоровими та осаджувальними реакціями.

- Реакція з Ферум (III) хлоридом:



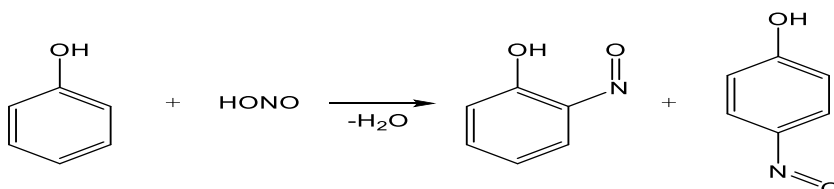
Забарвлення продукту у синій або фіолетовий колір залежить від концентрації реагуючих речовин та кислотності середовища;

- Реакція з солями діазонію:



Реакція заснована на утворенні забарвлених оксиазосполук при взаємодії фенолу з сіллю діазонію у лужному середовищі. Результатом взаємодії буде реакція утворення оксиазосполуки яскраво-червоного кольору;

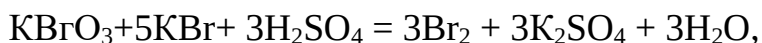
- реакція Лібермана:



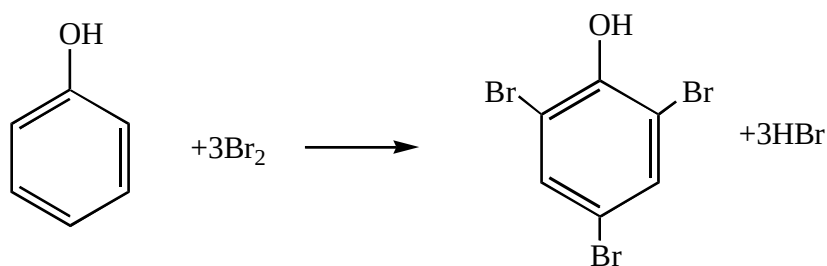
Реакція базується на взаємодії фенолу з аліфатичними та ароматичними нітросполуками. Реакцію виконують сухим шляхом (сплавленням), реакція відбувається у присутності концентрованої сульфатної кислоти. Суміш забарвлюється у вишнево-червоний колір, який після додавання надлишку NaOH переходить у темно-синій[1].

Кількісно фенол можна визначити з речовиною диметиламіноантипирин фотометричним способом у лужному середовищі. У присутності персульфату амонію продуктом реакції буде барвник червоного кольору. Оптичне вимірювання проводять при довжині хвилі 460 нм[1].

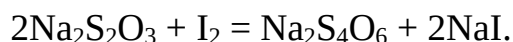
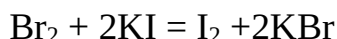
Згідно з ДФУ (Додаток 1) [15] та Ph.Eur (Додаток 2) [16] фенол визначають броматометрією зворотнім титруванням. До наважки визначуваної речовини додають надлишок стандартного розчину бромід-бромату, створюють кисле середовище шляхом додавання хлоридної кислоти, залишають на декілька хвилин:



Молекулярний бром, що виділяється у результаті цієї взаємодії вступає в реакцію з фенолом. Результатом електрофільного заміщення (бромовання) є утворення 2,4,6 – трибромфенолу:



Надлишок Br_2 , що з'являється у колбі для титрування у точці кінця титрування визначають методом йодометрії за допомогою крохмалю:



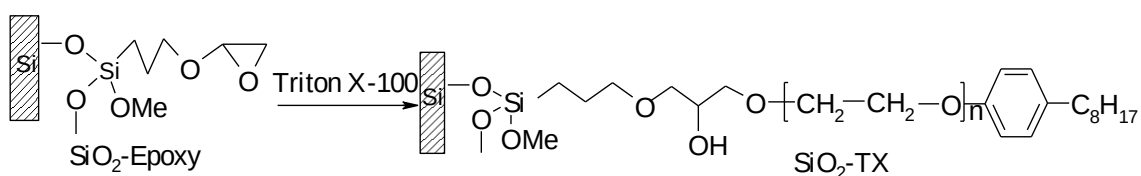
1.6 Кремнезем з ковалентно закріпленими групами поліоксиетильованого ізооктилфенолу (TX-SiO₂).

У літературних джерелах мають місце результати експериментів, де в якості твердофазних екстрагентів для адсорбції з наступним кількісним визначенням фенолів використовують пінополіуретани [17]. Але, враховуючи погані механічні, сорбційні та хімічні властивості вищезазначених адсорбентів, від дослідника вимагається пошук інших, більш технологічних шляхів вирішення поставлених задач з розробки нових методик [18-26].

Відомо, що фенол взаємодіє з сіллю 4-НФД з утворенням інтенсивно забарвленої азосполуки (п.1.5.), яка, у свою чергу, утворює іонний асоціат (ІА) на поверхні ХМК, наприклад на TX-SiO₂ (поверхня сорбенту при цьому забарвлюється у червоний колір). Селективність взаємодії фенолу з солями арилдіазонію та стабільність іонних асоціатів (ІА) на поверхні ХМК є передумовою для розробки методики кількісного аналізу фенолів, яка включає концентрування фенолу на поверхні кремнезему (адсорбцію), десорбцію (ІА легко десорбуються з поверхні TX-SiO₂ ацетонітрилом) з його наступним кількісним фотометричним визначенням [27].

Кремнезем з іммобілізованим поліоксидетильованим ізооктилфенолом ($\text{SiO}_2\text{-TX}$) є ефективним твердофазним адсорбентом для комбінованого сорбційно-фотометричного визначення фенольних сполук. Синтезують TX-SiO_2 за нижчезазначеною методикою: силохром марки С-120 прокалюють у муфельній печі при температурі 500°C протягом 6 годин, після цього додають до 10 г висушеного силохрому 50 мл толуолу, 4,53 ммоль (що відповідає 1 мл) 3-(2,3-епоксипропоксипропіл)-триметоксисилану.

Отриману суспензію кипятять протягом 10 годин постійно перемішуючи в інертній атмосфері (наприклад, аргону). Тверду фазу відділяють, промивають толуолом (приблизно 15 годин в апараті Сокслета), висушують у вакуумі. Потім зважують 2 г твердої фази, додають до наважки 20 мл толуолу та 5 мл розчину поліетилєнґліколю трет-октилфеніловий етеру (Triton X-100) і витримують при температурі 110°C протягом 10 годин. Тверду фазу відфільтровують, промивають ізопропіловим спиртом 15 годин в апараті Сокслета і висушують у сушильній шафі при температурі 100°C протягом 5 годин [28-30]:



Згідно з [30] синтезований за вищезазначеною методикою ХМК має амфіфільну (здатність проявляти одночасно гідрофобні та гідрофільні властивості) природу. Гідрофобність цього ХМК спостерігається завдяки присутності на поверхні ізооктилфенольних груп, гідрофільність – завдяки присутності оксидетильних та діольних.

Розділ 2. Експериментальна частина.

Робота була виконана на кафедрі аналітичної, фізичної та колоїдної хімії НМУ імені О.О. Богомольця.

2.1. Матеріали та методи.

2.1.1. Мета дослідження.

Нами була поставлена задача розробити альтернативну нову сорбційно-фотометричну методику кількісного визначення фенолу у рідких лікарських формах Фармасептик та Орасепт.

2.1.2. Об'єкти дослідження.

Для аналізу були обрані рідкі лікарські форми Фармасептик (Pharmaseptic) та Орасепт (Orasept):

Фармасептик. Діюча речовина рідкий фенол, 1 мл розчину містить 14 мг рідкого фенолу. Допоміжні речовини:

- гліцерин;
- сахарин натрію;
- натрію гідроксид;
- ароматизатор вишневий;
- барвник червоний FD&C Red № 40 (E 129);
- вода очищена.

Орасепт. Діюча речовина рідкий фенол, 1 мл розчину містить 14 мг рідкого фенолу. Допоміжні речовини:

- вода очищена;
- гліцерин;
- сахарин натрію;
- ароматизатор вишневий;
- барвник червоний FD&C Red № 40 (E129).



Фармасептик (Pharmaseptic)

Діюча речовина рідкий фенол, 1 мл розчину містить 14 мг рідкого фенолу. Допоміжні речовини:

- гліцерин;
- сахарин натрію;
- натрію гідроксид;
- ароматизатор вишневий;
- барвник червоний FD&C Red № 40 (E 129);
- вода очищена.



Орасепт (Orasept)

Діюча речовина рідкий фенол, 1 мл розчину містить 14 мг рідкого фенолу. Допоміжні речовини:

- вода очищена;
- гліцерин;
- сахарин натрію;
- ароматизатор вишневий;
- барвник червоний FD&C Red № 40 (E129).

Наявність у складі РЛФ фенолу та допоміжних речовин указана в інструкціях для медичного застосування.

В якості адсорбенту ми використовували кремнезем з ковалентно закріпленими групами поліоксиетильованого ізооктилфенолу (TX-SiO₂).

2.1.3. Посуд та обладнання.

Ваги лабораторні Mettler Toledo XS204 (Додаток 3).

Спектрофотометр Jenway 6305(Додаток 4).

pH-метр Metrohm 826 pHmobile (Додаток 5).

Мірні колби, циліндри і піпетки класу точності А (Додаток 6).

Перистальтичний насос Longer BT-100-2J з головкою DG-1(Додаток 7).

Хроматографічна колонка діаметром 2,5 мм і висотою $h = 40$ мм.

2.1.4. Реактиви та адсорбент.

Вода для хроматографії Р, отримана за допомогою установки SimplicityUV, Millipore, USA.

Ацетонітрил (для хроматографії).

Ацетонітрил (ЧДА).

Розчин натрій карбонату (х.ч.), 1,0 М.

Розчин цетилтриметиламонію броміду (ЦТАBr) 10^{-3} М, (Merck).

Розчин тетрафторборату 4-нітрофенілдіазонію (4-НФД), 0.02 М.

Розчин фенолу, 1 мг/мл.

Всі розчини готували розчиненням точних наважок реагентів у воді.

Кремнезем з ковалентно закріпленими групами поліоксидетильованого ізооктилфенолу TX-SiO₂ з концентрацією прищеплених груп $C_L = 25$ мкмоль/г, маса наважки 0,1 г.

2.1.5. Методика та умови сорбційно-фотометричного визначення.

2.1.5.1. Методика аналізу.

0,1 г TX-SiO₂ поміщали у хроматографічну колонку, пропускали через колонку 50 мл підготованого розчину йонного асоціату (ІА) фенолу у зразку за допомогою перистальтичного насосу зі швидкістю 1мл/хв. Десорбцію ІА фенолу здійснювали 3 мл ацетонітрилу та фотометрично визначали концентрацію фенолу у розчині за власним світлопоглинанням ІА при $\lambda = 540$ нм, $l = 1$ см.

2.1.5.2. Приготування стандартного розчину.

Для побудови градуювального графіку (ГГ) готували стандартний розчин за нижчезазначеною методикою:

Вихідний розчин фенолу концентрації 1 мг/мл, попередньо очищеного сублімацією, готували за наважкою реагенту. Зважували 0,5000 г фенолу і переносили у мірну колбу на 500 мл, доводили водою до позначки, ретельно перемішували. Розчини менших концентрацій отримували розведенням вихідного безпосередньо перед використанням.

2.1.5.3. Побудова градуювального графіка.

Для побудови градуювального графіку ГГ готували серію розчинів іонних асоціатів (ІА) фенолу.

У мірних колбах ємністю на 50 мл готували розчини фенолу зі стандартного розчину з вмістом 0, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 3,2, 6,4, 12,8 мкг. До кожної колби додавали 4-НФД, Na_2CO_3 ЦТАВr певних концентрацій (концентрація 4-НФД становила $4,8 \cdot 10^{-4}$ моль/л, концентрація Na_2CO_3 становила 0,04 моль/л, концентрація ЦТАВr становила $1,25 \cdot 10^{-4}$ моль/л) і проводили аналіз так, як описано вище у “Методиці аналізу”(п.2.1.5.1.).

Після визначення оптичної густини розчинів зазначених концентрацій ІА фенолу будували графічну залежність оптичної густини А від концентрації стандартних розчинів С (Рис.1.).

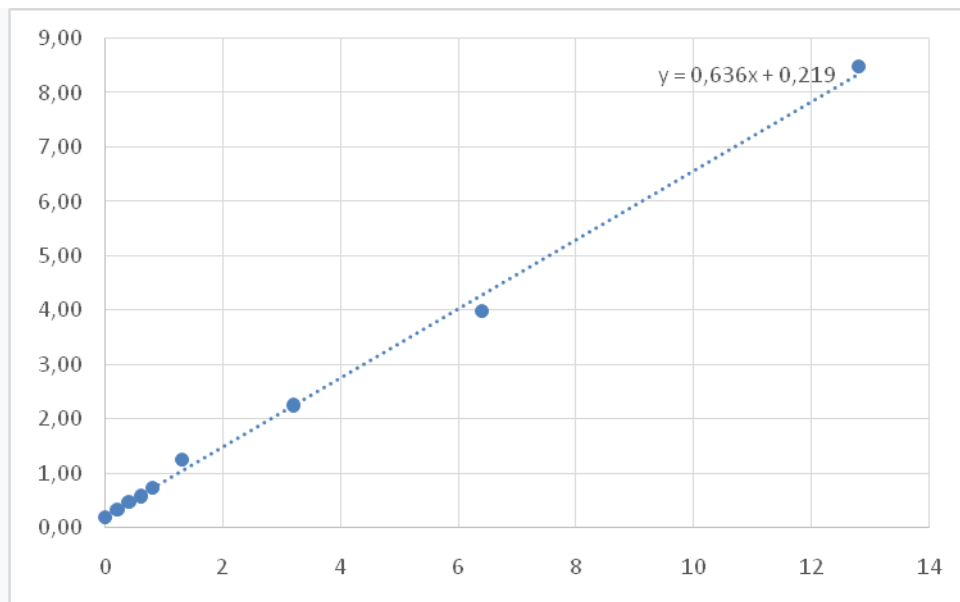


Рис.1. Графічна залежність оптичної густини А від концентрації стандартних розчинів С.

При використанні багатьох методик кількісного аналізу безпосередньому вимірюванню піддається деяка величина y (y нашому випадку оптична густина A), що є лінійною функцією концентрації x розчинів фенолу. Інакше кажучи, в основі лежить існування лінійної залежності:

$$y = ax + b$$

Для використання цієї залежності з подальшою метою валідації методики[15] (перевірка на лінійність), слід заздалегідь знайти числові значення констант b і a (коефіцієнтів регресії), тобто провести калібрування.

Для визначення коефіцієнтів регресії застосовується метод найменших квадратів:

$$a = \frac{\sum_{i=1}^n y_i \cdot \sum_{i=1}^n x_i^2 - \sum_{i=1}^n x_i \cdot \sum_{i=1}^n (x_i y_i)}{n \cdot \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2},$$

$$b = \frac{n \cdot \sum_{i=1}^n (x_i y_i) - \sum_{i=1}^n x_i \cdot \sum_{i=1}^n y_i}{n \cdot \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2}.$$

Якщо калібрування проведене і значення констант a і b визначені, величину x знаходять за виміряними значеннями y_i :

$$x_i = \frac{1}{b} \cdot y_i - \frac{a}{b}.$$

При калібруванні величину x розглядають як аргумент, а величину y – як функцію.

Наявність лінійної залежності між x і y не завжди є очевидною. Через ці причини експериментальні дані, одержані при калібруванні, у першу чергу використовують для оцінки жорсткості, тобто ступеня не випадковості лінійного зв'язку між x і y , і лише потім визначають значення констант a і b та їхні довірчі інтервали. У першому наближенні робити висновок про жорсткість лінійного зв'язку між величинами x і y можна за величиною коефіцієнта кореляції r , що обчислюють за формулою:

$$r = \frac{n \cdot \sum_{i=1}^n x_i y_i - \sum_{i=1}^n x_i \cdot \sum_{i=1}^n y_i}{\sqrt{\left[n \cdot \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2 \right] \cdot \left[n \cdot \sum_{i=1}^n y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n y_i \right)^2 \right]}}.$$

2.1.5.4. Приготування розчину зразка.

1 мл (кожної окремо) вищезазначеної рідкої лікарської форми (вміст фенолу згідно інструкції для медичного застосування 14 мг/мл) переносили у мірну колбу на 100 мл, додавали воду до позначки та ретельно перемішували. Концентрація антисептика становила 0,14 мг/мл. Після того 1мл приготованого розчину переносили у колбу на 50 мл і послідовно додавали 1,2 мл 0,02М розчину 4-НФД, 2 мл 1 М розчину Na_2CO_3 , 8 мл 10^{-3} М розчину ЦТАВr, воду до позначки 50 мл, ретельно перемішували.

2.1.5.5. Розрахунок.

Вміст фенолу визначають за градувальним графіком з урахуванням коефіцієнту розведення розчину рідкої лікарської форми.

Розділ 3. Результати та їх обговорення.

Перед тим, як опрацювати методику, ми враховували наступні аспекти, а саме:

- Фенолу притаманне швидке окиснення, тому методика повинна бути експресною;
- ГДК фенолу у воді становить 0,001 мг/л, тому методика визначення повинна бути високочутливою[31].

Відомо, що $\text{SiO}_2\text{-TX}$ проявляє вибірковість [28-30], тому, перед тим, як опрацювати методику, ми досліджували процес «адсорбція-десорбція» не тільки іонних асоціатів фенолу, а й фенолу.

Кількісною характеристикою величини адсорбції (мкмоль/г) на поверхні досліджуваного ХМК є залежність кількості адсорбованої речовини від концентрації при сталій температурі (Ізотерма Ленгмюра). Вигляд кривої дозволяє спрогнозувати напрямок протікання адсорбції на поверхні адсорбенту.

Для з'ясування можливості адсорбції хімічної речовини фенол на поверхні TX-SiO_2 ми готували серію стандартних розчинів фенолу з концентраціями від 0,01 до 0,04 ммоль/л та досліджували процес «адсорбція-десорбція» у динамічному режимі за нижчезазначеною методикою:

0,1 г TX-SiO_2 поміщали у хроматографічну колонку, пропускали через колонку 25 мл підготований розчин фенолу певної концентрації за допомогою перистальтичного насоса зі швидкістю 1мл/хв. Десорбцію фенолу здійснювали 3 мл ацетонітрилу та фотометрично визначали концентрацію фенолу в розчині за власним світлопоглинанням ІА при $\lambda = 540$ нм, $l=1$ см.

Як ми і прогнозували, фенол, на відміну від ІА фенолу, кількісно практично не адсорбується (Рис 2):

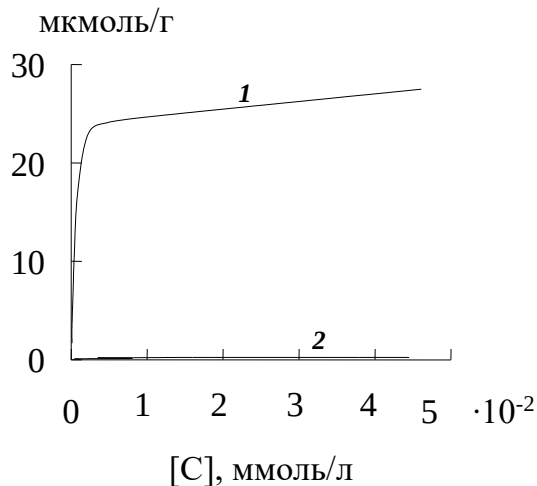


Рис. 2. Криві сорбції ІА 4-нітрофенілазофеноляту (1), та фенолу (2) на SiO₂-ТХ
(V_{фенолу}=25 мл, C_{K₂CO₃}=0.04 моль/л; C_{4-НФД}=4.8·10⁻⁴ моль/л, C_{ЦТАВr}=1.3·10⁻⁴ моль/л;
m=0,1 г.

3.1. Результати визначення вмісту фенолу у РЛФ.

Результати визначення вмісту ІА фенолу у рідких лікарських формах запропонованою методикою (п. 2.1.5.1.) наведено у таблиці 1.

Таблиця 1. Результати визначення вмісту фенолу у рідких лікарських формах Фармасептик та Орасепт сорбційно-фотометричним методом.

№ проби	Вміст діючої речовини, мг/мл	
	Фармасептик	Орасепт
1	13,98	14,03
2	13,92	13,87
3	14,15	14,12
4	13,76	14,01

3.2. Багаторазове застосування адсорбенту.

При аналітичному застосуванні адсорбентів виникає питання про можливість їх багаторазового використання, тобто про оборненість сорбційно-десорбційних процесів [32-33].

У цьому дослідженні ми з'ясовували можливість багаторазового використання ТХ-SiO₂ у сорбційно-десорбційних циклах його взаємодії з діючою речовиною фенол рідкого лікарського засобу. Стабільність адсорбенту визначали як функцію його ємності від кількості виконаних адсорбційно-десорбційних циклів, що здійснювали з одним зразком ТХ-SiO₂ у динамічному режимі. Динамічну адсорбційну ємність визначали для ІА фенолу РЛФ Орасепт.

РЛФ Орасепт була обрана тому, що у складі (на відміну від РЛФ Фармасептик) відсутній NaOH. Кислотність середовища рН постійно контролювали рН-метром.

Як видно з рисунку 3, в умовах дослідів повна динамічна адсорбційна ємність хроматографічної колонки за ІА фенолу (А) не змінюється навіть після 10 сорбційно-десорбційних циклів. Обрані умови забезпечують також кількісну десорбцію (Е) (значення А та Е співпадають у межах похибки). Після регенерації хроматографічна колонка з сорбентом повністю відновлює свої властивості:

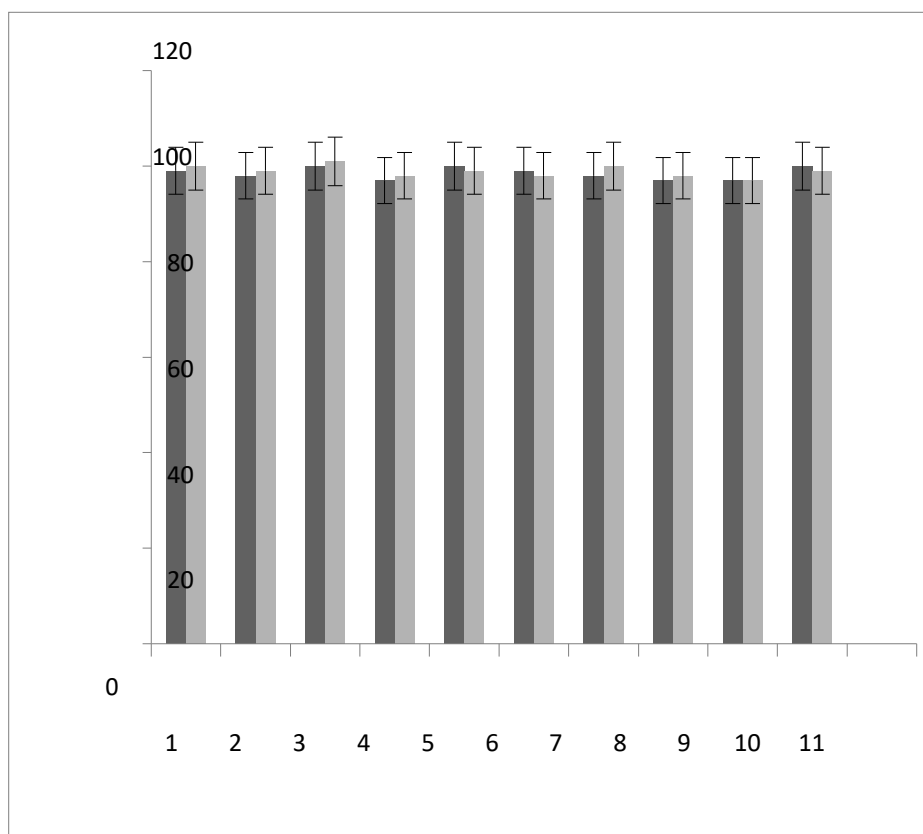


Рис 3. Відносна повна динамічна адсорбційна ємність (А) хроматографічної колонки з TX-SiO₂ до ІА фенолу РЛФ Орасепт та повнота десорбції ІА фенолу (Е) у 10 циклах сорбції-десорбції.

3.3. Валідація методики.

Валідацією називають експертну оцінку і докази у відповідності з принципами GMP, які з високим ступенем достовірності підтверджують, що методики кількісного визначення відповідають встановленим вимогам[34-35].

3.3.1. Перевірка специфічності методики.

Специфічністю називають здатність визначати аналізовану речовину у присутності інших[34].

Оскільки методику ми розробляли безпосередньо на рідких лікарських формах, склад яких зазначений в інструкціях для медичного використання, при перевірці запропонованої альтернативної методики кількісного визначення фенолу сорбційно-фотометичним методом на специфічність ми порівнювали результати, які були нами отримані, з концентрацією фенолу у РЛЗ.

Результати представлено у Таблиці 1.

3.3.2. Перевірка лінійності методики.

Однією з опцій перевірки методики на валідність є лінійність. Лінійністю називають здатність запропонованої методики підтримувати пряму пропорційну залежність аналітичного сигналу методу (у нашому випадку значення оптичної густини) від концентрації фенолу.

При побудові калібрувального графіку (Рис.1.) лінійність методики була продемонстрована нижчезазначеним:

1. Лінійна функція описується рівнянням $y=0,636a + 0,219$
2. Коефіцієнт кореляції $R^2 = 0,9999$, що задовольняє вимогам ДФУ.

Таким чином, запропонована методика задовольняє всім розрахованим критеріям.

3.3.3. Перевірка робастності методики.

У фармацевтичній або аналітичній практиці доводиться часто порівнювати між собою експериментальні результати, які отримують дослідники за допомогою різних методик. Порівняння результатів різних методик дозволяє оцінити систематичні помилки, якщо вони мають місце.

Крім того, процес валідації методики базується на перевірці методики у різних лабораторних умовах (робастність). У нашому випадку це різні лаборанти і різні партії ацетонітрилу.

Результати кількісного визначення фенолу у РЛФ Фармасептик та Орасепт наведено у таблиці 2, 3, 4, 5:

Таблиця 2 Кількісне визначення фенолу у РЛФ Фармасептик.

	Лаборант1	Лаборант 2	Критерій (різниця значень, %)
	Вміст діючої речовини, мг/мл		
1	14,03	14,11	Не більше 2,0
2	13,87	14,05	Не більше 2,0
3	14,12	13,95	Не більше 2,0
4	14,01	13,92	Не більше 2,0

Таблиця 3 Кількісне визначення фенолу РЛФ Орасепт

	Лаборант 1	Лаборант 2	Критерій (різниця значень,)
	Вміст діючої речовини, мг/мл		
1	13,98	14,05	Не більше 2,0
2	13,92	14,11	Не більше 2,0
3	14,15	14,04	Не більше 2,0
4	13,76	13,96	Не більше 2,0

Таблиця 4 Кількісне визначення фенолу у РЛФ Фармасептик.

	Ацетонітрил для хроматографії	Ацетонітрил ЧДА	Критерій (різниця значень, %)
	Вміст діючої речовини, мг/мл		
1	14,03	13,96	Не більше 2,0
2	13,87	14,02	Не більше 2,0
3	14,12	14,06	Не більше 2,0
4	14,01	13,93	Не більше 2,0

Таблиця 5 Кількісне визначення фенолу РЛФ Орасепт

	Ацетонітрил для хроматографії	Ацетонітрил ЧДА	Критерій (різниця значень, %)
	Вміст діючої речовини, мг/мл		
1	13,98	14,10	Не більше 2,0
2	13,92	14,06	Не більше 2,0
3	14,15	14,04	Не більше 2,0
4	13,76	14,01	Не більше 2,0

3.3.4. Перевірка правильності методики.

Правильність методики перевірено методом «введено-знайдено» (Таблиця 1-5). Отримані результати корелюють із регламентованим вмістом антисептику у рідких лікарських формах Фармасептик та Орасепт. Порівняння експериментальних даних щодо концентрації фенолу в обох лікарських препаратах свідчить про достатню точність запропонованого методу.

3.4. Порівняльний аналіз методик кількісного визначення фенолу.

Згідно з ДФУ [15] та Європейською фармакопеею [16] кількісно фенол у субстанції визначають методом броматометрії. Титриметричний метод визначення фенолу має низку недоліків, а саме:

- Помилки при проведенні титрування можуть досягати від 5% до 10% відсотків у визначенні;
- Стандартизація титранту, присутність індикатора;

- Вода, яка може бути присутньою у розчині при броматометричному визначенні, заважає аналізу, оскільки її присутність може провокувати виникнення небажаних процесів гідролізу;
- Нерідко реакція відбувається з порушенням стехіометричності.

Сорбційно-фотометричний метод є сучасним, високоефективним та перспективним методом кількісного визначення фенолу у РЛФ, який дозволяє визначати діючу речовину з мінімальним відсотком похибки при наявності побічних речовин. Запропонований метод має низку собівартість та не вимагає використання складної апаратури, екологічно безпечний.

ВИСНОВКИ.

1. На основі проведених досліджень було встановлено кількісний вміст фенолу у рідких лікарських формах Фармасептик та Орасепт та запропоновано нову альтернативну методику кількісного визначення фенолу сорбційно-фотометричним методом. Запропонована методика дозволяє значно знизити точність визначення, є високоточною, екологічною та простою у використанні з низкою собівартістю.

2. Проведено валідацію розробленої методики за специфічністю, лінійністю, робастністю та правильністю. Встановлено, що валідаційні характеристики відповідають критеріям прийнятності згідно ДФУ, що свідчить про те, що дану методику можна використовувати для кількісного визначення фенолу у рідких лікарських формах Фармасептик та Орасепт.

Результати роботи були представлені на IV Науково-практичній конференції з міжнародною участю «PLANTA+. НАУКА, ПРАКТИКА ТА ОСВІТА» (Додаток 8).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Фармацевтична хімія: Підручник. Ред. П.О. Безуглий. – Вінниця: Нова Книга, 2008 – 560с.
2. Фармацевтична енциклопедія [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/>
3. Довідник лікарських препаратів Компендіум [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <https://compendium.com.ua/>
4. Широбоков В. П. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник для студ. вищ. мед. навч. закл. / Видання 3-є, перероблене і доповнене / [Широбоков В.П. Климнюк С.І., Понятовський В.А. та ін.]. – Вінниця: Нова Книга, 2021. – 920 с.
5. Широбоков В.П., Климнюк С.І. Мікробіологія, вірусологія та імунологія в запитаннях і відповідях: навч. посіб. / [Широбоков В.П. Климнюк С.І., Корнійчук О.П. та ін.]. – Тернопіль: ТДМУ, 2019. – 564 с.
6. Широбоков В.П., Климнюк С.І. Практична мікробіологія: навчальний посібник / [Климнюк С.І., Ситник І.О., Широбоков В.П. та ін.]. – Вінниця: Нова Книга, 2018. – 576 с.
7. Фармакологія за Рангом і Дейлом, пер.9-го англ.вид. у 2-х томах Т.1/Джеймс М.Рітер, Род Флавер, Грем Гендерсон, Юн Конг Лоук, Девід Мак К'юн, Гемфрі П Ранг; наук.ред.перекл. Ганна Зайченко, Микола Хайтович.- К. ВСВ "Медицина", 2021-588 с.
8. Фармакологія з основами патології / Колесник Ю.М., Чекман І.С., Беленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Нагорна О.О., Бухтіярова Н.В., Моргунцова С.А., Зайченко Г.В. : підручник. Вінниця: Нова книга, 2021. – 572 с.
9. Побічна дія ліків: підручник для студентів вищих навчальних закладів медичної освіти/Беленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Бухтіярова Н.В., Самура Т.А., Бухтіярова Т.А., Нагорна О.О., Моргунцова С.А., Єгоров А.А., Риженко О.В., Тихоновський О.В. Запоріжський державний медичний Університет. Вінниця: Нова книга, 2021. – 360 с.

10. Фармакологія. Підручник для медичних і стоматологічного факультетів Вищих медичних навчальних закладів освіти. І.С.Чекман, В.М.Бобирьов, В.В.Кресюн, В.В.Годован, Н.О.Горчакова, Л.І.Казак, Т.В.Кава, Г.Ю.Островська Т.А.Петрова, Л.М.Рябушко Вінниця: Нова книга, 2020. – 472 с.
11. Довідник еквівалентності лікарських засобів Rx index Спеціалізоване медичне видання / за ред І.А. Зупанця, В.П. Черних 4 вид. Перероблене К.: Фармацевт практик- 2020. – 2033 с.
12. Pharmacology / [M. A. Clark, R. Finkel, J. A. Rey et al.]. – [7th ed.]. – Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins, 2018. – 638 p.
13. www.pharma-center.com.ua.веб-сайт ДЦФ МОЗ України [web-page] URL
14. Довідник лікарських препаратів Компендіум [Електронний ресурс]. - Режим доступу:<https://compendium.com.ua/>
15. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків, 2015. в 3 т. Т.1. 1128 с.
16. European Pharmacopoeia. 8.0.– P. 3003.
17. *Dmitrienko S.G., Myshak E.N., Runov V.K., Zolotov Yu. A.* // Chem. Anal. (Warsaw). -1995. -**40**. -P. 291—298.
18. *Shevchenko N.V., Khalaf V.A., Zaitsev V.N.*Test-method for detecting phenols by the means of silica grafted with *m*-aminophenylarsonic acid // The third joint scientific conference in chemistry Kyiv National Taras Shevchenko University and Paul Sabatier University (Toulouse): (18-22 May, 2005).– Kyiv.– 2005.– P. 94.
19. *Wuilloud R.G., de Wuilloud J.C.A., Vonderheide A.P., Caruso J.A.* // J. Analyt. Atom. Spectrometry. -2003. № 9. -P. 1119—1124.
20. *Bagheri H., Saraji M.* // J. Chromatography A. -2003. № 1. -P. 111—119.

21. *Fontanals N., Puig P., Galia M. et al. // Ibid. -2004. № 2. -P. 281—284.*
22. *Tsysin G.I., Kovalev I.A., Nesterenko P.N. et al. // Separation and Purification Technology. -2003. -P. 11—24.*
23. *Branyik T., Kuncova G., Paca J. // Appl. Microbiology and Biotechnology. -2000. - № 2. -P. 168—172.*
24. *Hu Y.L., Zheng Y.X., Li G.K. // Analyt. Sciences.-2004. № 4. - P. 667—671.*
25. *Pak V.N., Kasaritskaya O.V., Alekseeva N.V. et al.// Russian J. Phys. Chem. -2004. -78, № 11. -P.1734—1738.*
26. *Seetharam G.B., Saville B.A. // Water Research. -2003.-№ 2. -P. 436—440.*
27. Халаф В.А., Зайцев В.М., Зайцева Г.М. Методи концентрування та визначення фенольних сполук (Огляд)// Методи и объекты химического анализа, -2008, -ТЗ, -№1.- С. 4-21.
28. Zaitsev V.N., Khalaf V.A., Zaitseva G.M. Organosilica composite for preconcentration of phenolic compounds from aqueous solutions // Analytical and Bioanalytical Chemistry, -2008, -391 (4). P.1335-1342.
29. Зайцев В.Н., Халаф В.А., Зайцева Г.Н. Полиоксиэтилированный кремнезем для концентрирования фенола из водных растворов // Укр. хим. журнал.-2005.-71,-№ 9.-С. 59-64.
30. Зайцев В.Н., Халаф В.А., Зайцева Г.Н., Алексеев С.А. Полиоксиэтилированный кремнезем для концентрирования фенола из водных растворов // Укр. хим. журнал.-2005.-71,-№ 9.- С. 59-64.
31. Беспмятников Г.П., Кротов Ю.А. Предельно допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде. Справочник.— Львов:Химия, 1985.—528 с.
32. Рева Т.Д. 2,6-пиридинкарбоновая кислота, ковалентно связанная

с поверхностью силохрома: иммобилизация и сорбционные свойства/ Рева Т.Д., Зайцев В.Н., Алексеев С.А., Калибачук В.А. // Укр.хім.журн.–2004.–Т. 70, № 12. – С.74–80.

33. Т. Рева. Сорбційна здатність кремнеземів з прищепленими комплексоутворюючими групами до іонів Zn(II), Hg(II), Fe(III), Cu(II) та Pb(II) / Т. Рева, В. Зайцев, О.Трохименко // Методы и объекты химического анализа. – 2008. – Т. 3, № 2. –С. 202–206.

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*. 2007. №2. С.13 – 18.

Додаток 1 Витяг з ДФУ

Фенол

На лінію старту хроматографічної пластинки наносять 5 мкл (50 мкг) випробовуваного розчину (а), 5 мкл (1 мкг) випробовуваного розчину (б), 5 мкл (1 мкг) розчину порівняння (а), 5 мкл (0.25 мкг) розчину порівняння (б) і 5 мкл (2 мкг феніланіну і 2 мкг тирозину) розчину порівняння (с). Пластинку сушать на повітрі і помішають у камеру із сумішшю розчинників *кислота оцтова льодяна Р - вода Р - бутанол Р* (20:20:60). Коли фронт розчинників пройде 15 см від лінії старту, пластинку виймають із камери, сушать на повітрі й обприскують розчином *нінгідрину Р*. Пластинку нагрівають при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 15 хв.

На хроматограмі випробовуваного розчину (а) будь-яка пляма, крім основної, не має бути інтенсивнішою за пляму на хроматограмі розчину порівняння (б) (0.5 %).

Результати аналізу вважаються вірогідними, якщо на хроматограмі розчину порівняння (с) виявляються дві чітко розділені плями.

Хлориди (2.4.4). Не більше 0.02 % (200 ppm). 0.25 г субстанції розчиняють у 3 мл *кислоти азотної розведеної Р* і доводять об'єм розчину *водою Р* до 15 мл. Одержаний розчин має витримувати випробування на хлориди, без подальшого додавання *кислоти азотної розведеної Р*.

Сульфати (2.4.13). Не більше 0.03 % (300 ppm). 0.5 г субстанції розчиняють у суміші *кислота хлористоводнева розведена Р - вода дистильована Р* (5:25) і доводять об'єм розчину тією самою сумішшю розчинників до 15 мл. Одержаний розчин має витримувати випробування на сульфати.

Амонію солі. Не більше 0.02 % (200 ppm). Підготовляють комірку, що складається із двох годинникових стекол діаметром 60 мм, сполучених по краях. На внутрішню поверхню верхнього годинникового скла поміщають шматочок *червоного лакмусового паперу Р* розміром (5 x 5) мм, змочений декількома краплями *води Р*. 50 мг здрібненої субстанції помішають на нижнє годинникове скло і розчиняють у 0.5 мл *води Р*. До розчину додають 0.30 г *магнію оксиду важкого Р* і ретельно розтирають скляною паличкою. Нижнє годинникове скло відразу накривають верхнім і нагрівають при температурі 40 °С протягом 15 хв. Паралельно в аналогічних умовах готують еталон, використовуючи 0.1 мл *еталонного розчину амонію (100 ppm NH₄) Р*, 0.5 мл *води Р* і 0.30 г *магнію оксиду важкого Р*. Лакмусовий папір над випробовуваним розчином має бути забарвлений у синій колір не інтенсивніше, ніж над еталоном.

Залізо (2.4.9). Не більше 0.001 % (10 ppm). 1.0 г субстанції в ділільній лійці розчиняють у 10 мл *кислоти хлористоводневої розведеної Р* і витягають три рази *метилізобутилкетонам РІ*, порціями по 10 мл, струшуючи щоразу протягом 3 хв. До об'єднаних органічних витягів додають 10 мл *води Р* і струшують протягом 3 хв. Одержаний водний розчин має витримувати випробування на залізо.

Важкі метали (2.4.8, метод D). Не більше 0.001 % (10 ppm). 2.0 г субстанції мають витримувати випробування на важкі метали. Еталон готують із використанням 2 мл *еталонного розчину свинцю (10 ppm Pb) Р*.

Втрата в масі при висушуванні (2.2.32). Не більше 0.5 %. 1.000 г субстанції сушать при температурі від 100 °С до 105 °С.

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

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

0.100 г субстанції розчиняють у 3 мл *кислоти мурашиної безводної Р*, додають 30 мл *кислоти оцтової безводної Р* і титрують 0.1 М розчином *кислоти хлорної* до переходу забарвлення від жовтого до зеленого, використовуючи як індикатор 0.1 мл розчину *нафтол-бензєїну Р*.

1 мл 0.1 М розчину *кислоти хлорної* відповідає 16.52 мг C₉H₁₁NO₂.

ЗБЕРІГАННЯ

У щільно закупореному контейнері, у захищеному від світла місці.

N

pH (2.2.3). Від 5.3 до 6.3. 0.02 г субстанції розчиняють при нагріванні у 20 мл *води Р* і охолоджують.

Залишкові кількості органічних розчинників. Субстанція має витримувати вимоги статті (5.4).

Пірогени або бактеріальні ендотоксини. Якщо субстанція призначена для виробництва парентеральних лікарських засобів без подальшої процедури видалення пірогенів, вона має витримувати випробування "Пірогени" (2.6.8) або "Бактеріальні ендотоксини" (2.6.14).

ФЕНОЛ

Phenolum

PHENOL



C₆H₆O

М.м. 94.1

Фенол містить не менше 99.0 % і не більше 100.5 % C_6H_6O .

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Безбарвні або блідо-рожеві, або блідо-жовтуваті кристали або кристалічна маса, що розпливається на повітрі.

Розчинність. Розчинний у воді *P*, дуже легко розчинний у 96 % спирті *P*, гліцерині *P*, метиленхлориді *P*.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. 0.5 г субстанції розчиняють у 2 мл розчину аміаку концентрованого *P* і доводять об'єм розчину водою *P* до 100 мл. До 2 мл одержаного розчину додають 0.05 мл розчину натрію гіпохлориту концентрованого *P*; з'являється блакитне забарвлення, що згодом стає більш інтенсивним.

В. До 1 мл розчину *S*, приготованого як зазначено в розділі "Випробування на чистоту", додають 10 мл води *P* і 0.1 мл розчину заліза(III) хлориду *P*1; з'являється фіолетове забарвлення, що зникає при додаванні 5 мл 2-пропанолу *P*.

С. До 1 мл розчину *S* додають 10 мл води *P* і 1 мл бромної води *P*; випадає осад блідо-жовтого кольору.

ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

Розчин *S*. 1.0 г субстанції розчиняють у воді *P*, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 15 мл.

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

Кольоровість розчину (2.2.2, метод II). Забарвлення розчину *S* має бути не інтенсивнішим за еталон *B*₆.

Кислотність. До 2 мл розчину *S* додають 0.05 мл розчину метилового оранжевого *P*. Одержаний розчин має бути жовтим.

Температура тверднення (2.2.18). Не менше 39.5 °С.

Сухий залишок. Не більше 0.05 %. 5.000 г субстанції упарюють на водяній бані насухо, потім сушать при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 1 год.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

2.000 г субстанції розчиняють у воді *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 1000.0 мл. 25.0 мл одержаного розчину помішають у колбу із притертою скляною пробкою, додають 50.0 мл 0.0167 *M* розчину бромід-бромату і 5 мл кислоти хлористоводневої *P*, закривають пробкою, витримують протягом 30 хв, періодично перемішуючи, потім залишають на 15 хв.

Додають 5 мл розчину 200 г/л калію йодиду *P*, перемішують і титрують 0.1 *M* розчином натрію тіосульфату до появи слабо-жовтого забарвлення. Потім додають 0.5 мл розчину крохмалю *P*, 10 мл хлороформу *P* і продовжують титрування, енергійно перемішуючи до повного знебарвлення розчину.

Паралельно проводять контрольний дослід.

1 мл 0.0167 *M* розчину бромід-бромату відповідає 1.569 мг C_6H_6O .

ЗБЕРІГАННЯ

У повітронепроникному контейнері, у захищеному від світла місці.

N

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. На поверхні субстанції допускається наявність окремих або зрослених голчастих кристалів.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Перша ідентифікація: *D*.

Друга ідентифікація: *A*, *B*, *C*.

D. Інфрачервоний спектр поглинання (2.2.24) розчину 3 г/л субстанції у вуглеці тетрахлориді для хроматографії має відповідати еталонному спектру ДФУ фенолу.

ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

Крезолі та інші леткі домішки. Визначення проводять методом газової хроматографії (2.2.28), використовуючи тимол *P* як внутрішній стандарт.

Розчин внутрішнього стандарту. 50.0 мг тимолу *P* розчиняють у метанолі *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл.

Випробовуваний розчин. 1.000 г субстанції розчиняють у метанолі *P*, додають 2.0 мл розчину внутрішнього стандарту і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10.0 мл.

Розчин порівняння (а). 50.0 мг *o*-крезолу *P*, 50.0 мг *m*-крезолу, 50.0 мг *p*-крезолу розчиняють у метанолі *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50.0 мл.

Розчин порівняння (б). До 1.0 мл розчину порівняння (а) додають 2.0 мл розчину внутрішнього стандарту і доводять об'єм розчину метанолом *P* до 10.0 мл.

Розчин порівняння (с). 50.0 мг субстанції і 50.0 мг дифенілоксиду розчиняють у метанолі *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50.0 мл. До 1.0 мл одержаного розчину додають 1.0 мл розчину порівняння (а). 2.0 мл розчину внутрішнього стандарту і доводять об'єм розчину метанолом *P* до 10.0 мл.

Хроматографування проводять на газовому хроматографі з полум'яно-іонізаційним детектором за таких умов:

- колонка капілярна кварцова розміром 25 м x 0.35 мм із полі(диметил)(дифеніл)силоксаном Р, з товщиною шару 0.2 мкм;
- газ-носії гелій для хроматографії Р;
- швидкість газу-носія 1.5 мл/хв;
- температуру колонки програмують: 50 °С протягом 2 хв, підвищення температури зі швидкістю 7 °С/хв до 180 °С, при температурі 180 °С протягом 10 хв;
- температура детектора і блока вводу проб 220 °С;
- час хроматографування має на 10 % перевищувати час утримування дифенілоксида на хроматограмі розчину порівняння (b) і становити близько 20 хв.

Попеременно хроматографують по 2 мкл випробовуваного розчину, розчину порівняння (b), розчину порівняння (c), одержуючи не менше п'яти хроматограм кожного розчину. Порядок виходу піків на хроматограмі розчину порівняння (b) має бути: метанол, о-крезол, сумарний пік л- і м-крезолів, тимол (внутрішній стандарт).

Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються такі умови:

- ефективність хроматографічної колонки, розрахована за піком о-крезолу із хроматограм розчину порівняння (c), має бути не менше 6000 теоретичних тарілок;
- коефіцієнт розділення піків фенолу та о-крезолу, розрахований із хроматограм розчину порівняння (c), має бути не менше 4.7;
- коефіцієнт розділення піків тимолу (внутрішній стандарт) і дифенілоксида, розрахований із хроматограм розчину порівняння (c), має бути не менше 5.9;
- висота піка о-крезолу на хроматограмі розчину порівняння (b) має бути не менше 30 % шкали реєструючого пристрою.

Вміст суми крезолів (X), у відсотках, обчислюють за формулою:

$$X_1 = \frac{B_1 \cdot \sum_1^3 m_{0i} \cdot 10 \cdot 100}{B_0 \cdot m_1 \cdot 50 \cdot 10} = \frac{B_1 \cdot \sum_1^3 m_{0i} \cdot 2}{B_0 \cdot m_1}$$

де:

B_1 — середнє значення відношення суми площ піків усіх ізомерів крезолу до площі піка внутрішнього стандарту, обчислене із хроматограм випробовуваного розчину;

B_0 — середнє значення відношення суми площ піків усіх ізомерів крезолу до площі піка внутрішнього стандарту, обчислене із хроматограм розчину порівняння (b);

m_1 — маса наважки субстанції, у грамах;

m_{0i} — маса наважки о-крезолу, м-крезолу і л-крезолу, у грамах.

Вміст суми крезолів у субстанції має бути не більше 0.3 %.

Сума площ усіх інших додаткових піків на хроматограмах випробовуваного розчину не має перевищувати площу піка о-крезолу на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.1 %).

Хлориди (2.4.4). Не більше 0.01 % (100 ppm). 10 мл розчину S доводять водою Р до об'єму 20 мл. 15 мл одержаного розчину мають витримувати випробування на хлориди.

Важкі метали (2.4.8, метод А). Не більше 0.001 % (10 ppm). 12 мл розчину 100 г/л субстанції у воді Р мають витримувати випробування на важкі метали. Еталон готують із використанням еталонного розчину свинцю (1 ppm Pb) Р.

Вода (2.5.12). Не більше 0.5 %. Визначення проводять з 0.800 г субстанції напівмікрометодом.

ПРИМІТКА.

м-Крезол. C_7H_8O . (М.м. 108.1). 3-Метилфенол.

Безбарвна або червоного кольору прозора рідина. Швидко темніє при зберіганні. Не розчинний у воді, легко розчинний у спиртах, ефірі.

d_4^{20} : близько 1.03.

n_D^{20} : від 1.5395 до 1.5403

Температура кипіння: в межах 200 °С - 204 °С.

Температура тверднення (2.2.18): не нижче 10.5 °С.

л-Крезол. C_7H_8O . (М.м. 108.1). 4-Метилфенол.

Кристали безбарвні або злегка забарвлені, швидко темніють на повітрі. Легко розчинний у 96 % спирті.

Температура кипіння (при 760 мм.рт.ст.): в межах 200 °С - 202 °С.

Температура тверднення (2.2.18): не нижче 32.5 °С.

Дифенілоксид. $C_{12}H_{10}O$. (М.м. 170.2).

Безбарвні кристали. При температурі вище 26.5 °С рідина з запахом герані.

Практично не розчинний у воді, легко розчинний в органічних розчинниках. Не розчинний в мінеральних кислотах і розчинах гідроксидів лужних металів.

Температура кипіння: в межах 256-259 °С.

Температура тверднення (2.2.18): від 26.5 °С до 28 °С.

Вуглецю тетрахлорид для хроматографії. CCl_4 . (М.м. 153.8).

Безбарвна прозора рідина.

n_D^{20} : 1.4603±0.0002.

Вода: не більше 0.05 %.

- A. Acidify 10 mL of solution S (see Tests) with *dilute hydrochloric acid R* and shake with 20 mL of *ether R*. Separate the ether layer, wash with 10 mL of *water R*, dry over *anhydrous sodium sulfate R* and filter. Evaporate the filtrate to dryness and dry the residue at 100 °C to 105 °C. Determine the melting point (2.2.14) of the test residue. Mix equal parts of the residue and of *phenobarbital CRS* and determine the melting point of the mixture. The difference between the two melting points (which are about 176 °C) is not greater than 2 °C.
- B. Examine by infrared absorption spectrophotometry (2.2.24), comparing the residue obtained during identification test A with the spectrum obtained with *phenobarbital CRS*. If the spectra obtained in the solid state show differences, dissolve the test residue and the reference substance separately in *ethanol R*, evaporate to dryness and record the spectra again.
- C. Examine by thin-layer chromatography (2.2.27), using *silica gel GF₂₅₄ R* as the coating substance.
- Test solution.** Dissolve 0.10 g of the substance to be examined in *alcohol (50 per cent V/V) R* and dilute to 100 mL with the same solvent.
- Reference solution.** Dissolve 90 mg of *phenobarbital CRS* in *alcohol (50 per cent V/V) R* and dilute to 100 mL with the same solvent.
- Apply separately to the plate 10 µL of each solution. Develop over a path of 18 cm using the lower layer from a mixture of 5 volumes of *concentrated ammonia R*, 15 volumes of *alcohol R* and 80 volumes of *chloroform R*. Examine immediately in ultraviolet light at 254 nm. The principal spot in the chromatogram obtained with the test solution is similar in position and size to the principal spot in the chromatogram obtained with the reference solution.
- D. It gives the reaction of non-nitrogen substituted barbiturates (2.3.1).
- E. It gives reaction (a) of sodium (2.3.1).

TESTS

Solution S. Dissolve 5.0 g in *alcohol (50 per cent V/V) R* and dilute to 50 mL with the same solvent.

Appearance of solution. Solution S is clear (2.2.1) and not more intensely coloured than reference solution Y₇ (2.2.2, Method II).

pH (2.2.3). Dissolve 5.0 g as completely as possible in *carbon dioxide-free water R* and dilute to 50 mL with the same solvent. The pH of the solution is not greater than 10.2.

Related substances. Examine by thin-layer chromatography (2.2.27), using *silica gel GF₂₅₄ R* as the coating substance.

Test solution. Dissolve 1.0 g of the substance to be examined in *alcohol (50 per cent V/V) R* and dilute to 100 mL with the same solvent.

Reference solution. Dilute 0.5 mL of the test solution to 100 mL with *alcohol (50 per cent V/V) R*.

Apply separately to the plate 20 µL of each solution. Develop over a path of 15 cm using the lower layer from a mixture of 5 volumes of *concentrated ammonia R*, 15 volumes of *alcohol R* and 80 volumes of *chloroform R*. Examine immediately in ultraviolet light at 254 nm. Spray with *diphenylcarbazone mercuric reagent R*. Allow the plate to dry in air and spray with freshly prepared *alcoholic potassium hydroxide solution R* diluted 1 in 5 with *aldehyde-free alcohol R*. Heat at 100 °C to 105 °C for 5 min and examine immediately. When examined in ultraviolet light and after spraying, any spot in the chromatogram obtained with the test solution, apart from the principal spot, is not more intense than the spot in the chromatogram obtained with the reference solution (0.5 per cent). Disregard any spot at the point of application.

Loss on drying (2.2.32). Not more than 7.0 per cent, determined on 0.500 g by drying in an oven at 150 °C for 4 h.

ASSAY

Dissolve 0.150 g in 2 mL of *water R* and add 8 mL of 0.05 M *sulfuric acid*. Heat to boiling and cool. Add 30 mL of *methanol R* and shake until dissolution is complete. Carry out a potentiometric titration (2.2.20), using 0.1 M *sodium hydroxide*. After the first point of inflexion, interrupt the addition of sodium hydroxide, add 10 mL of *pyridine R*, mix and continue the titration. Read the volume added between the two points of inflexion.

1 mL of 0.1 M *sodium hydroxide* is equivalent to 25.42 mg of C₁₂H₁₁N₂NaO₃.

STORAGE

Store in an airtight container.

01/2008:0631
corrected 6.3

PHENOL

Phenolum



C₆H₆O
[108-95-2]

M_r 94.1

DEFINITION

Content: 99.0 per cent to 100.5 per cent.

CHARACTERS

Appearance: colourless or faintly pink or faintly yellowish, crystals or crystalline masses, deliquescent.

Solubility: soluble in water, very soluble in ethanol (96 per cent), in glycerol and in methylene chloride.

IDENTIFICATION

A. Dissolve 0.5 g in 2 mL of *concentrated ammonia R*. The substance dissolves completely. Dilute to about 100 mL with *water R*. To 2 mL of this solution add 0.05 mL of *strong sodium hypochlorite solution R*. A blue colour develops and becomes progressively more intense.

B. To 1 mL of solution S (see Tests) add 10 mL of *water R* and 0.1 mL of *ferric chloride solution R1*. A violet colour is produced which disappears on addition of 5 mL of *2-propanol R*.

C. To 1 mL of solution S add 10 mL of *water R* and 1 mL of *bromine water R*. A white precipitate is formed.

TESTS

Solution S. Dissolve 1.0 g in *water R* and dilute to 15 mL with the same solvent.

Appearance of solution. Solution S is clear (2.2.1) and not more intensely coloured than reference solution B₆ (2.2.2, Method II).

Acidity. To 2 mL of solution S add 0.05 mL of *methyl orange solution R*. The solution is yellow.

Freezing point (2.2.18): minimum 39.5 °C.

Residue on evaporation: maximum 0.05 per cent.

Evaporate 5.000 g to dryness on a water-bath and dry at 100-105 °C for 1 h. The residue weighs a maximum of 2.5 mg.

ASSAY

Dissolve 2.000 g in *water R* and dilute to 1000.0 mL with the same solvent. Transfer 25.0 mL of the solution to a ground-glass-stoppered flask and add 50.0 mL of 0.0167 M *bromide-bromate* and 5 mL of *hydrochloric acid R*, close the flask, allow to stand with occasional swirling for 30 min. Then allow to stand for 15 min. Add 5 mL of a 200 g/L solution of *potassium iodide R*, shake and titrate with 0.1 M *sodium*

thiosulfate until a faint yellow colour remains. Add 0.5 mL of starch solution R and 10 mL of chloroform R and continue the titration with vigorous shaking. Carry out a blank titration.

1 mL of 0.0167 M bromide-bromate is equivalent to 1.569 mg of $C_{20}H_{14}O_4$.

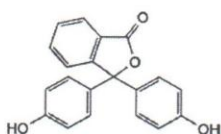
STORAGE

In an airtight container, protected from light.

01/2008:1584
corrected 6.0

PHENOLPHTHALEIN

Phenolphthaleinum



$C_{20}H_{14}O_4$
[77-09-8]

M_r 318.3

DEFINITION

Phenolphthalein contains not less than 98.0 per cent and not more than the equivalent of 101.0 per cent of 3,3-bis(4-hydroxyphenyl)isobenzofuran-1(3H)-one, calculated with reference to the dried substance.

CHARACTERS

A white or almost white powder, practically insoluble in water, soluble in alcohol.

It melts at about 260 °C.

IDENTIFICATION

- A. Dissolve 25.0 mg in alcohol R and dilute to 100.0 mL with the same solvent (solution A). To 2.0 mL of solution A add 5.0 mL of 1 M hydrochloric acid and dilute to 50.0 mL with alcohol R (solution A₁). To 10.0 mL of solution A add 5.0 mL of 1 M hydrochloric acid and dilute to 50.0 mL with alcohol R (solution A₂). To 2.0 mL of solution A add 5.0 mL of 1 M sodium hydroxide and dilute to 50.0 mL with alcohol R (solution B). Examined between 220 nm and 250 nm (2.2.25), solution A₁ shows an absorption maximum at 229 nm. The specific absorbance at the maximum at 229 nm is 922 to 1018. Examined between 250 nm and 300 nm, solution A₂ shows an absorption maximum at 276 nm. The specific absorbance at the maximum at 276 nm is 142 to 158. Examined between 230 nm and 270 nm, solution B shows an absorption maximum at 249 nm. The specific absorbance at the maximum at 249 nm is 744 to 822.
- B. Dissolve about 10 mg in alcohol R. Add 1 mL of dilute sodium hydroxide solution R. The solution is red. Add 5 mL of dilute sulfuric acid R. The colour disappears.

TESTS

Solution S. To 2.0 g add 40 mL of distilled water R and heat to boiling. Cool and filter.

Appearance of solution. Dissolve 0.20 g in 5 mL of alcohol R. The solution is clear (2.2.1) and not more intensely coloured than reference solution Y₇ (2.2.2, Method II).

Acidity or alkalinity. To 10 mL of solution S add 0.15 mL of bromothymol blue solution R1. Add 0.05 mL of 0.01 M hydrochloric acid, the solution is yellow. Add 0.10 mL of 0.01 M sodium hydroxide, the solution is blue.

Related substances. Examine by thin-layer chromatography (2.2.27), using a TLC silica gel F₂₅₄ plate R.

Test solution. Dissolve 0.5 g of the substance to be examined in alcohol R and dilute to 10 mL with the same solvent.

Reference solution (a). Dilute 1 mL of the test solution to 10 mL with alcohol R. Dilute 5 mL of this solution to 100 mL with alcohol R.

Reference solution (b). Dissolve 25 mg of fluorene R in alcohol R, add 0.5 mL of the test solution and dilute to 10 mL with alcohol R.

Apply to the plate 5 µL of the test solution and 5 µL of each of the reference solutions. Develop over a path corresponding to two-thirds of the plate height using a mixture of 50 volumes of acetone R and 50 volumes of methylene chloride R. Allow the plate to dry in air. Examine in ultraviolet light at 254 nm and re-examine after exposure to ammonia vapour. Any spot in the chromatogram obtained with the test solution, apart from the principal spot, is not more intense than the spot in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.5 per cent). The test is not valid unless the chromatogram obtained with reference solution (b) shows 2 clearly separated spots.

Chlorides (2.4.4). Dilute 10 mL of solution S to 15 mL with water R. The solution complies with the limit test for chlorides (100 ppm).

Sulfates (2.4.13). 15 mL of solution S complies with the limit test for sulfates (200 ppm).

Heavy metals (2.4.8). Heat 3 g with 50 mL of dilute hydrochloric acid R on a water-bath for 5 min and filter. Evaporate the filtrate almost to dryness and dissolve the residue in 30 mL of water R. 12 mL of this solution complies with limit test A for heavy metals (10 ppm). Prepare the standard using 10 mL of lead standard solution (1 ppm Pb) R.

Loss on drying (2.2.32). Not more than 0.5 per cent, determined on 1.000 g by drying in an oven at 105 °C.

Sulfated ash (2.4.14). Not more than 0.1 per cent, determined on 1.0 g.

ASSAY

Dissolve 0.100 g in 5 mL of dimethylformamide R. Add 5 mL of sodium carbonate solution R, 10 mL of sodium hydrogen carbonate solution R, 35 mL of water R and 50.0 mL of 0.05 M iodine. Add 10 mL of methylene chloride R and 20 mL of dilute sulfuric acid R. Titrate the excess of iodine with 0.1 M sodium thiosulfate, using 0.3 mL of starch solution R added towards the end of the titration, as indicator. Carry out a blank titration. 1 mL of 0.05 M iodine is equivalent to 3.979 mg of $C_{20}H_{14}O_4$.

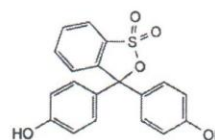
STORAGE

Store protected from light.

01/2008:0242
corrected 6.0

PHENOLSULFONPHTHALEIN

Phenolsulfonphthaleinum



$C_{20}H_{14}O_5S$
[143-74-8]

M_r 354.4

DEFINITION

Phenolsulfonphthalein (phenol red) contains not less than 98.0 per cent and not more than the equivalent of 102.0 per cent of 3,3-bis(4-hydroxyphenyl)-3H-2,1-benzoxathiole 1,1-dioxide, calculated with reference to the dried substance.

Додаток 3.

Ваги лабораторні Mettler Toledo XS204, допустиме навантаження становить 220 г, дискретність – 0,1 мг.



Додаток 4.

Спектрофотометр Jenway 6305 (Велика Британія).



Діапазон довжин хвиль	від 198 до 1000 нм
Дозвіл довжини хвилі	1 нм
Точність довжини хвилі	± 2 нм
Спектральна смуга пропускання	8 нм, 6 нм в діапазоні УФ
Коефіцієнт пропускання	від 0 до 199,9%
Поглинання	-0,300 до 1,999A
Точність	$\pm 1\%$ T, $\pm 0,01$ Abs при 1000 поглинання
Роздільна здатність	0,1% T, 0,001A
Стабільність	1% / год після 20-хвилинного нагрівання
Діапазон концентрацій	-300 до 1999
Дозвіл концентрації	1 / 0,1
Одиниці вимірювання	мг/м3, мг/л, г/л, моль/л, ед.

Потужність	<50 Вт
Розмір (Ш x Д x В)	365 x 272 x 160 мм
Вага	6 кг

Додаток 5.

pH-метр Metrohm 826 pH mobile.



Діапазон вимірювання	pH 0 ... 14 (-8 ... 22)
Потенціал U	$\pm 1200 \text{ mV}$
Температура	-150.0 ... +250.0 ° C (Pt 1000); -5.0 ... + 250 ° C (NTC)
Дозвіл pH	0.001
Дозвіл U	0.1 mV
Дозвіл T	0.1 °C

Додаток 6.

Мірний посуд класу А.



Додаток 7.

Перистальтичний насос Longer BT-100-2J з головою DG-1.



Швидкість потоку	0,1-100 обертів/хвилину
Крок регулювання	0,1 обертів/хвилину
Управління по зовнішньому сигналу	
Старт/стоп, прямий/зворотний хід	0-5, 0-10 В, 4-10 мА
Швидкість обертання	0-10 КГц
Споживча потужність	30 Вт, 220 В, IP 31
Температура в приміщенні	0-40 °С
Діапазон витрат	0,0002 – 32 мл/хв

Додаток 8.



CERTIFICATE №340

This is to certify that

Озерчук В.

participated in the Fourth Scientific and Practical Conference with International Participation «**PLANTA+. SCIENCE, PRACTICE AND EDUCATION**», dedicated to the 20th anniversary of Pharmacognosy and Botany Department Bogomolets National Medical University

20 February, 2023
Kyiv, Ukraine

The certificate confirms participation in the event, as well as the accrual of 5 points according to the Order of the Ministry of Health of Ukraine dated February 22, 2019 № 446.

Rector of the Bogomolets National Medical University, Dr (MedSc), Professor *Y. Kuchyn*

Head of the Department of Pharmacognosy and Botany of the Bogomolets NMU, Dr (BiolSc), Professor *V. Minarchenko*

The conference is in the Register of SSI Ukrainian Institute of Scientific and Technical Expertise and Information (UKRISTEI) certificate № 396 dated 9/09/2022.

SCIENCE, PRACTICE AND EDUCATION
PLANTA+

МІНІСТЕРСТВО
ОХОРОНИ
ЗДОРОВ'Я
УКРАЇНИ

МІНІСТЕРСТВО
ОСВІТИ І НАУКИ
УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ
БОГОМОЛЕТСЬКОЇ
МЕДИЧНОЇ АКАДЕМІЇ

НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ
БОГОМОЛЕТСЬКОЇ
МЕДИЧНОЇ АКАДЕМІЇ

НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ
БОГОМОЛЕТСЬКОЇ
МЕДИЧНОЇ АКАДЕМІЇ

НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ
БОГОМОЛЕТСЬКОЇ
МЕДИЧНОЇ АКАДЕМІЇ

НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ
БОГОМОЛЕТСЬКОЇ
МЕДИЧНОЇ АКАДЕМІЇ

НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ
БОГОМОЛЕТСЬКОЇ
МЕДИЧНОЇ АКАДЕМІЇ

НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ
БОГОМОЛЕТСЬКОЇ
МЕДИЧНОЇ АКАДЕМІЇ