

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 “ _____ ” 2023р.

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

ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**Кількісне визначення ізоніазиду у твердих лікарських формах методом
високоєфективної рідинної хроматографії**

Виконала: студентка 5-го курсу, групи
Ф1А фармацевтичного факультету

Бровко Наталія Вадимівна

Науковий керівник:

Професор кафедри аналітичної,
фізичної та колоїдної хімії, доктор
педагогічних наук,

Рева Тетяна Дмитрівна

Рецензент:

Доцент кафедри ліків та лікарської
токсикології

Головченко Оксана Іванівна

Київ – 2024

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів.	4
Вступ.	5
Розділ 1. Ізоніазид, методи визначення.	8
1.1. Застосування ізоніазиду.	8
1.2. Фізико-хімічні властивості ізоніазиду.	8
1.3. Механізм дії та метаболізм ізоніазиду.	9
1.4. Фармакологічні ефекти, побічні ефекти та передозування.	10
1.5. Методи ідентифікації та кількісного визначення.	13
1.6. Метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).	14
Розділ 2. Експериментальна частина.	16
2.1. Матеріали та методи.	16
2.1.1. Мета дослідження.	16
2.1.2. Об'єкти дослідження.	16
2.1.3. Посуд та обладнання.	17
2.1.4. Реактиви.	17
2.1.5. Методика та умови хроматографування.	18
2.1.6. Приготування стандартного розчину.	18
2.1.7. Приготування розчину досліджуваного зразка.	18
2.1.8. Розрахунок результатів.	19
2.2. Переваги хроматографа, за допомогою якого було здійснено дослідження.	20

2.3. Пробопідготовка.	21
2.4. Регенерація колонки.	21
2.5. Захист хроматографічної колонки.	22
Розділ 3. Результати та їх обговорення.	23
3.1. Вибір оптимального температурного режиму хроматографічної колонки.	23
3.2. Вибір довжини хвилі детектування.	24
3.3 Градувальна залежність площі піку від концентрації стандартного розчину для подальшого кількісного визначення ізоніазиду у лікарській формі.	24
3.4. Визначення ізоніазиду у твердих лікарських формах.	26
3.5. Проведення часткової валідації методики.	28
3.5.1. Перевірка специфічності методики.	28
3.5.2. Перевірка лінійності методики.	29
3.5.3. Перевірка внутрішньолабораторної прецизійності.	30
3.5.4. Перевірка правильності методики.	31
3.6. Аналіз методик кількісного визначення ізоніазиду.	32
Висновки.	33
Список використаних джерел.	34
Додатки.	37
Анотація (Summary).	42

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ВЕРХ –високоефективна рідинна хроматографія

ТШХ –тонкошарова хроматографія

ДФУ –державна фармакопея України

Ph.Eur. – European Pharmacopoeia

НМУ – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

HClO_4 –перхлоратна кислота

CO_2 – Карбону (II) оксид

GLP– належна лабораторна практика

GMP – належна виробнича практика

ISO– міжнародна організація зі стандартизації

ТЛФ – тверда лікарська форма

ЛЗ – лікарський засіб

г – грам

ІЧ спектр – інфрачервоний спектр

мкл – мікролітр

мл – мілілітр

нм – нанометр

Т. кип. – температура кипіння

Т. пл. – температура плавлення

УФ спектр – ультрафіолетовий спектр поглинання

$^{\circ}\text{C}$ – градуси Цельсія

ВСТУП

Туберкульоз – важка хвороба, яка переслідує людство багато віків, інфекція, яка передається повітряно-пиловими шляхами. За даними ВОЗ у 20 роках нашого століття на цю хворобу страждало майже 11 мільйонів людей і майже 2 мільйони хворих померли[1]. З цією хворобою людство веде сувору боротьбу і 75 мільйонів життів було врятовано[1]. Але, нажаль, за даними МОЗ України, наша держава віднесена до групи країн з одним із найвищих рівнів захворюваності (посідає сьоме місце) в Європейському регіоні.

Поширення туберкульозу виникає завдяки низки соціально-економічних, суспільних та побутових проблем. Серед них занепад сільськогосподарського та промислового виробництва, відсутність нових прогресивних технологій, збіднілість та десоціалізація населення, неконтрольована міграція, алкоголізм, наркоманія, неякісне харчування, криміналізація суспільства, відсутність досконалого соціального захисту тощо. Зрозуміло, що гуманітарна катастрофа, яка стала слідством війни з російською федерацією, тільки загострила проблему[2-3].

Але, однією з причин такого жахливого стану є і неналежне або неправильне використання ліків протитуберкульозного ряду.

Станом на сьогодні епідемію туберкульозу називають триединою, тобто розрізняють три різновиди цієї хвороби. Перший різновид є звичайним, який був до відкриття туберкульозних препаратів і майже 90 відсотків хворих на цю хворобу очікує позитивний прогноз. Другим видом (або другою складовою епідемії) називають епідемію хіміорезистентного туберкульозу, і, нажаль, позитивний прогноз чекає лише на 60 відсотків хворих. Третя складова- туберкульоз ВІЛ -інфікованих та хворих на СНІД. Нажаль, позитивний прогноз невтішний і вилікувати можна лише 40 відсотків людей[2-3].

Лікують туберкульоз базисними препаратами, такими як рифампіцин, піразинамід, етамбутол, стрептоміцин та ізоніазид. Хворі проходять курс, який, як правило, призначається протягом півроку, але слід пам'ятати, що деякі форми цієї хвороби стійкі до певних протитуберкульозних лікарських засобів.

Актуальність: Пошук нових методик кількісного визначення ізоніазиду, який входить до складу протитуберкульозних препаратів.

Мета: розробити методику кількісного визначення ізоніазиду у твердих лікарських формах високоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ).

Завдання:

1. Проаналізувати літературні джерела щодо застосування ізоніазиду, фізико-хімічні та фармакологічні властивості, механізм дії та метаболізм ізоніазиду.
2. Проаналізувати методики кількісного визначення ізоніазиду.
3. На основі проведеного бібліосемантичного дослідження розробити методику кількісного визначення ізоніазиду у твердих лікарських формах високоефективною рідинною хроматографією.
4. Провести часткову часткову валідацію методики кількісного визначення ізоніазиду.

Методи дослідження: Бібліосемантичний, високоефективна рідинна хроматографія.

Новизна та значення отриманих результатів: розробити чутливу, альтернативну, сучасну методику кількісного визначення ізоніазиду у таблетках.

Апробація результатів дослідження. Результати роботи були представлені на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Фармацевтична освіта, наука та практика: стан, проблеми, перспективи розвитку», присвячена 25-річчю фармацевтичного факультету, 19-20.12.2023.

Структура роботи. Робота представлена на 43 сторінках, додатків -4, рисунків- 4, таблиць- 2.

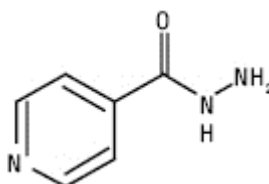
ОСНОВНА ЧАСТИНА. Розділ 1. Ізоніазид, методи визначення.

1.1 Застосування ізоніазиду.

За хімічною класифікацією ізоніазид є гідразидом ізонікотинової кислоти[4].

Ізоніазид застосовують при лікуванні та профілактики різних форм туберкульозу.

1.2. Фізико-хімічні властивості ізоніазиду.



Міжнародна назва речовини Isoniazidum, хімічна назва 3-Метокси-4-гідроксибензиліденгідразид ізонікотинової кислоти гідрат[4].

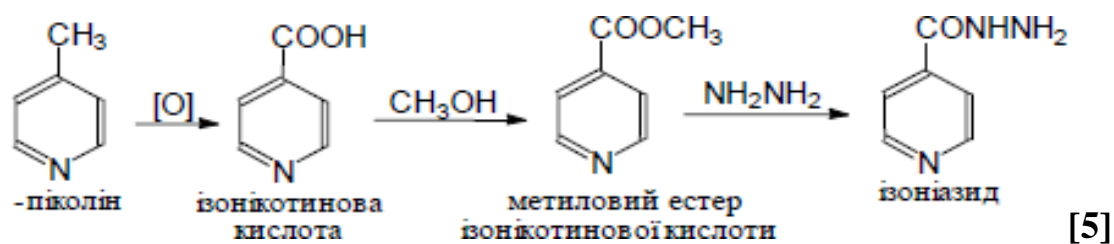
Молекулярна формула: $C_6H_7N_3O$, молекулярна маса 137,1 г/моль[4].

Ізоніазид є препаратом синтетичного походження. Це білий кристалічний порошок, гіркий на смак, добре розчиняється у воді, важкорозчинний у спирті і майже не розчинний в етерах. Деякі фізико-хімічні характеристики ізоніазиду наведено нижче:

$T_{пл} = 170-174$ °С. $pK_a = 1,8; 3,5; 10,8$ (20°), ТШХ у системі метанол-амонію розчин концентрований (100:1,5) $R_f = 0,47$; у системі хлороформ-метанол (90:10) $R_f = 0,11$; УФ-спектр $\lambda_{max} = 266$ нм, рН 7,4 (в октанолі), рН водного розчину від 5,5 до 6,5. [4]

Збереження ізоніазиду рекомендовано без доступу повітря у щільно закритому хімічному контейнері.

Одержують ізоніазид за нижчезазначеною схемою:



1.3. Механізм дії та метаболізм ізоніазиду.

Ізоніазид проявляє бактериостатичну активність до мікобактерій *Mycobacterium tuberculosis*, які активно розмножуються. Механізм його дії пов'язаний з пригніченням синтезу міколієвих кислот з довгим ланцюгом [6-8].



Рис.1. Колонії бактерії *Mycobacterium tuberculosis*.

Ця бактерія вперше була описана 24 березня 1882 р. біологом Робертом Кохом і відноситься до облігатних аеробів. За сприятливих умов бактерія

ділиться кожні 20 годин, тобто достатньо повільно, може витримувати дію слабких дезінфікуючих засобів і бути життєвостійкою в сухих умовах протягом кількох тижнів[6-8].

1.4. Фармакологічні ефекти ізоніазиду, побічні ефекти та передозування.

Фармакологічна група J04AC01.

Фармакотерапевтична група ATXJ04AC01.

Ізоніазид приймають у вигляді таблеток перорально. Він добре всмоктується і широко розподіляється у тканинах і рідинах організму, час досягнення максимальної концентрації у крові становить 1-5 годин. Об'єм розподілу становить 0,56-0,76л/кг. Туберкулостатична концентрація при прийомі у разовій дозі зберігається до 24 годин. У вагітних жінок може проникати у плаценту. Метаболізується у печінці ацетилюванням [2, 9-15].

Нажаль, препарат має низку протипоказань, його не можна призначати хворим з епілепсією, важким психозом, поліомієлітом(у тому числі і раніше перенесеним), гепатитом та печінковою недостатністю, атеросклерозом та пацієнтам, з підвищеною чутливістю до препарату. Не можна призначати препарат вагітним, дози для хворих, які страждають серцево-легеневою недостатністю, артеріальною гіпертензією, бронхіальною недостатністю, екземами, захворюваннями нирок не повинні бути більшими ніж 10 мг/кг маси тіла.

Взаємодія з іншими лікарськими засобами.

При взаємодії з антацидними засобами абсорбція ізоніазиду зменшується, тому інтервал між прийомами повинен бути не менше ніж 1,5-2 години. Ізоніазид потенціює ефекти непрямих коагулянтів, знижує печінковий метаболізм бензодіазепінів, що призводить до накопичення бензодіазепінів у плазмі крові. Одночасне застосування ізоніазиду з фенобарбіталом та парацетамолом, рифампіцином, призводить до зростання гепатотоксичності. Одночасний прийом зі ставудином підвищує ризик розвитку нейропатії. Для знижування побічних впливів ізоніазиду на організм, препарат приймають комбіновано з Вітаміном В6 та глютаміною кислотою, а для посилення ефективності терапевтичної дії ізоніазиду, останній приймають комбіновано з іншими протитуберкульозними засобами. Доказано, що ізоніазид при тривалому використанні може знижувати плазмовий кліренс та збільшувати тривалість дії діалфетаніну, глюкокортикостероїди підвищують метаболізм та елімінацію ізоніазиду. Одноразовий прийом ізоніазиду з дисульфірамом призводить до негативного впливу на ЦНС, спостерігається зменшення терапевтичного ефекту від препарату левадол, кетаконазол та ітраконазол, при застосуванні з ацетамінофеномом збільшується токсичність останнього, що може призвести до накопичення метаболітів у печінці, і, відповідно до зростання різних негативних побічних реакцій. Аміназин та хлорпромазин погіршують метаболізм ізоніазиду, галоперидол, енфлюран, теофілін підвищують у присутності ізоніазиду свій плазмовий рівень, антикоагулянти втрачають власні властивості, що призводить до кровотеч. Під час лікування хворих ізоніазидом рекомендується застосовувати кислотознижувальні речовини або антациди.

Ізоніазид не слід приймати під час прийому їжі та алкогольних напоїв оскільки біодоступність його при цьому значно знижується, крім цього

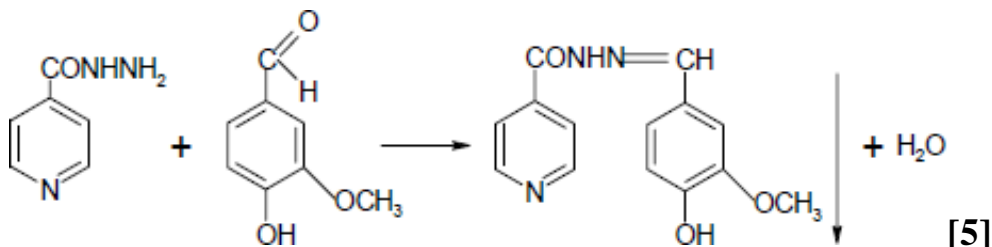
можлива взаємодія ізоніазиду з продуктами, що містять гістамін або тирамін (сир, червоне вино, тунець, тропічні риби), а це, у свою чергу, призводить до появи почервоніння, свербожу, відчуття печії, головному болю тощо.

Під час лікування необхідно проводити суворий лікарський контроль, особливо печінки, оскільки передозування ізоніазидом призводить до різноманітних негативних наслідків.

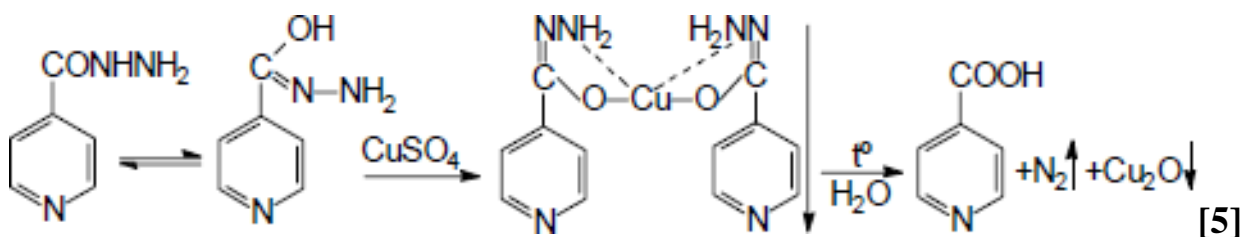
Найпоширенішим токсичним ефектом ізоніазиду є периферична невропатія[2, 9-15].

1.5. Методи ідентифікації та кількісного визначення ізоніазиду.

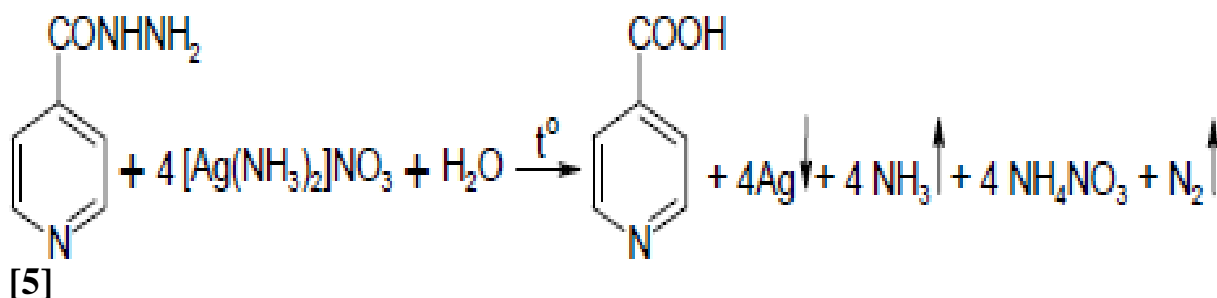
1. При взаємодії з ваніліном утворюється речовина жовтого кольору, нерозчинна у воді:



1. З сіллю CuSO_4 утворюється блакитний осад, який при нагріванні перетворюється спочатку на світло-зелений, а потім на жовто-зелений з виділенням бульбашок газу:

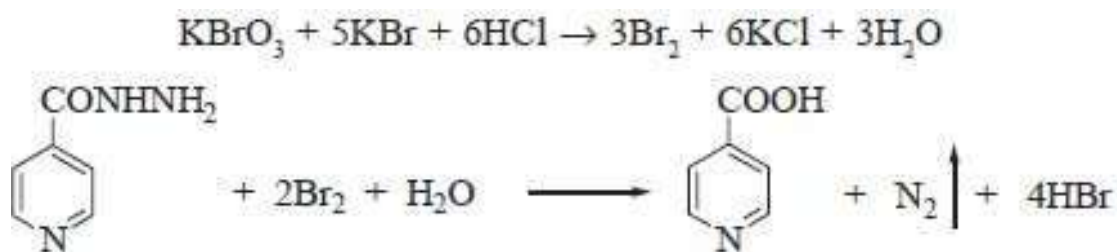


2. Ізоніазид вступає у реакцію «срібного дзеркала»:

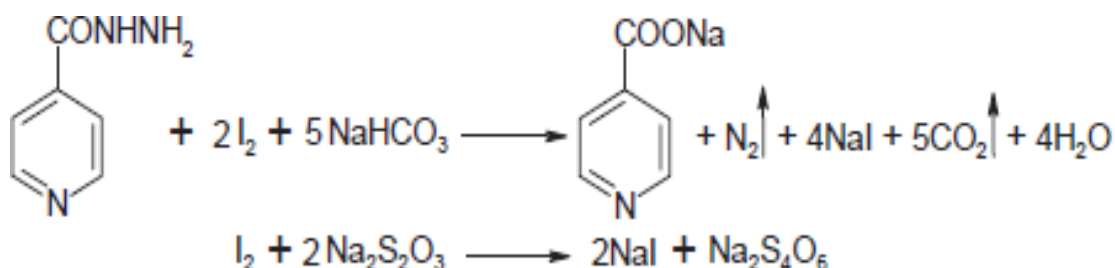


Кількісно ізоніазид визначають:

- За ДФУ та Європейською фармакопеею [16,17, Додаток 1,2] методом броматометрії з індикатором метиловим червоним, титрування пряме:



- Методом йодометрії зворотнім титруванням у присутності натрій гідрокарбонату:



- Фізико-хімічними методами (за певними фізичними константами)[5].

1.6. Метод ефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) є сучасним інструментальним методом ідентифікації та розділення речовин, який базується на теорії сорбції. У методі ВЕРХ розділяють рухому та нерухому фазу. Рухомою фазою виступає рідина, яку під високим тиском пропускають через хроматографічну колонку, яка заповнена нерухомою фазою[18-25]. Різноманітність нерухомої фази дозволяє проводити варіативні дослідження. Як правило, нерухомою фазою в аналізі виступають силікагелі, у тому числі хімічномодифіковані. Визначення концентрації аналізованої речовини (кількісний аналіз) проводять за методиками абсолютного калібрування або методом внутрішнього стандарту [18-25]. Метод абсолютного калібрування базується на визначенні залежності піків аналізованої речовини від концентрації аналізованої речовини. Іншими словами, дослідник буде

градувальний (калібрувальний) графік, використовуючи у своїй роботі серію стандартних розчинів (розчинів з відомою концентрацією). Для кожного стандартного розчину (або кожної серії стандартних розчинів) дослідник проводить серію визначень, математично визначає середнє значення площі піків кожної концентрації, будує залежність. Використовуючи калібрувальну залежність, дослідник визначає концентрацію аналізованої речовини. У хімічній, медичній та фармацевтичній практиці ВЕРХ дає можливість проводити дослідження на рівні міжнародних стандартів GLP, GMP та ISO[18-25].

Розділ 2. Експериментальна частина.

Практична частина роботи була виконана у лабораторії рідинної хроматографії Інституту гігієни та екології НМУ імені О.О. Богомольця.

2.1. Матеріали та методи.

2.1.1. Мета дослідження.

Метою дослідження була розробка та апробація кількісного визначення ізоніазиду у твердих лікарських формах методом високоефективної рідинної хроматографії.

2.1.2. Об'єкти дослідження.

Ізоніазид - Дарниця



Ізоніазид



Для розробки та апробації методики кількісного визначення хімічної речовини ізоніазид було обрано ТЛФ Ізоніазид-Дарниця та Ізоніазид. Тверді лікарські форми (таблетки) вищезазначених лікарських засобів мають склад:

- 1) ТЛФ Ізоніазид – Дарниця, зразок 1.

Склад: діюча речовина ізоніазид, 1 таблетка містить ізоніазиду 300 мг.

Допоміжні речовини:

- Целюлоза мікрокристалічна;
- Метилцелюлоза;
- Натрію кроскармелоза;
- Кальцію стеарат.

2) ТЛФ Ізоніазид, зразок 2.

Склад: діюча речовина ізоніазид, 1 таблетка містить ізоніазиду 200 мг.

Допоміжні речовини:

- Повідон;
- Крохмаль кукурудзяний;
- Кросповідон;
- Кальцію стеарат.

Наявність у складі лікарських форм ізоніазиду указана в інструкціях для медичного застосування[2].

2.1.3. Посуд та обладнання.

1. Хімічний мірний посуд точності А.
2. Ротаційний випарник для екстракції.
3. Водяна баня.
4. Хроматограф рідинний „Шимадзу” з УФ детектором, заводський № С20964330924CS, інвентарний №010466981, свідоцтво про калібрування № 3991 від 07.06.2019, Додаток 3.
5. Колонка хроматографічна сталева (250×4,6) мм, заповнена Нуклеосилом C₁₈ (100-5) та передколонка хроматографічна сталева (4×3) мм, заповнена Нуклеосилом C₁₈ (100-5).
6. Мікрошприц для ВЕРХ місткістю 25 мкл, виробництво Hamilton.
7. Ваги лабораторні аналітичні з похибкою вимірювання 0,0002 г Radwag® AS220.R2, заводський №502964, інвентарний №104769236, свідоцтво про калібрування № 3816 від 30.05.2019 р.
8. Фільтри паперові знезолені “червона стрічка”, діаметр 150 мм.

2.1.4. Реактиви.

1. Фармакопейний стандартний зразок ДФУ **Isoniazid** (Ізоніазид), каталожний номер **I0208**, реєстраційний номер **54-85-3**.
2. Ацетонітрил, х.ч., для рідинної хроматографії.
3. Вода дистильована.

2.1.5. Методика та умови хроматографування.

Як було зазначено вище, рухомою фазою виступає розчинна суміш ацетонітрил-вода. Готують рухому фазу змішуванням 60 мл ацетонітрилу та 40 мл дистильованої води. Зважують 0,1 г зразка та розчиняють наважку у

суміші, струшують, проводять хроматографічні визначення і визначають концентрацію ізоніазиду.

Умови хроматографічного визначення:

Температура термостату колонки: 35⁰С;

Об'єм петлі інжектора рідинного хроматографа – 20 мкл;

Склад рухомої фази: ацетонітрил+ бідистильована вода=60:40;

Довжина хвилі детектора: 210 нм;

Тиск у системі P = 140 Бар;

Час утримування: 7 хвилин;

Об'ємна витрата рухомої фази – 1 мл/хв.

2.1.6. Приготування стандартного розчину.

0,1 г фармакопейного стандартного зразка зважують на аналітичних лабораторних терезах та розчиняють у 100 мл суміші ацетонітрил-вода (60:40). Серію стандартних розчинів для побудови калібрувального графіка з концентраціями 80, 100, 120 мкг/мл готують за загальновідомими стандартними методиками розведення розчинів[18].

2.1.7. Приготування розчину досліджуваного зразка.

Після проведення процедури пробопідготовки зважують 0,1 г зразка, переносять у мірну колбу на 100 мл, розчиняють у суміші ацетонітрил-вода. Співвідношення ацетонітрилу до води 60:40.

2.1.8. Кількісне визначення.

Масу (вміст) ізоніазиду визначають за стандартною формулою, яка має місце при визначенні кількісних результатів у методі ВЕРХ[18-25]:

$$m, \text{мг} = R_2 \times m_1 \times A / R_1 \times m_2$$

де R_1 = середнє значення площі піку стандартного розчину;

R_2 = середнє значення площі піку зразка;

m_1 = маса наважки стандартної речовини;

m_2 = маса наважка ТЛФ;

A = чистота стандарту, вважається 1.

2.3. Пробопідготовка.

Таблетку зразка (кожну окремо, маса таблетки 500 мг) розчиняють у воді у мірній колбі на 500 мл, постійно перемішують. Після розчинення суспензію (кожну окремо) переносять у ділильну воронку місткістю 1 л. Проводять екстракцію етилацетатом (трьома порціями, кожна по 50 мл). Органічні фракції об'єднують у колбу на 250 мл, висушують безводним натрій сульфатом (маса осушувача приблизно 20г) 12 годин. Після висушування екстракт переносять у колбу для відгону і проводять процедуру концентрування до 0,1-0,3 мл. Сухі залишки зразків отримують остаточним випаровуванням на повітрі.

2.4. Регенерація хроматографічної колонки.

У процесі серії хроматографічних визначень іноді виникає питання щодо регенерації колонки. Кроки, які дозволяють відновити хроматографічну колонку є простими і не вимагають ряду зусиль, а саме:

1. Дослідник приєднує хроматографічну колонку у зворотному напрямку;
2. Після приєднання колонки дослідник включає зворотній струм води і пропускає 25 мл дистилату зі швидкістю 0,5 мл/хв;
3. Після промивки водою, колонку промивають органічними розчинниками, наприклад, ізопропанолом і метиленхлоридом зі швидкістю 0,5мл/хв; Після цього колонку промивають 25 мл гексану зі швидкістю 0,5 мл/хв і ще раз ізопропанолом і метиленхлоридом;
4. Після промивки колонку приєднують звичайним способом і приводять до рівноваги рухомою фазою[18-25].

2.5. Захист хроматографічної колонки.

Для збільшення терміну роботи будь якої хроматографічної колонки необхідно періодично позбавлятися від домішок, які можуть накопичуватись на твердій фазі і погіршувати роздільну здатність та викривлювати форму піків. Технічно найкращим захистом вважається встановлення передколонки у лінію між інжектором та основною колонкою. Як правило, передколонку наповнюють такою же твердою фазою, яку використовують у роботі[18-25].

Розділ 3. Результати та їх обговорення.

2.1. Вибір оптимального температурного режиму проведення хроматографування.

При опрацюванні методики кількісного визначення ізоніазиду методом ВЕРХ першочерговою задачею було вирішення питання щодо температурного хроматографічного режиму. Це завдання вирішується аналізом залежності тиску у колонці від температури. Для проведення у подальшому кількісного визначення ізоніазиду у ТЛФ ми обрали 35°C, оскільки при вказаній температурі знижується тиск, і, відповідно, відсутні ризики руйнування твердої фази у колонці в результаті гідролізу. Дослідження проводили на стандартному розчині з концентрацією 100 мкг/мл. Результати наведено на Рис.2.:

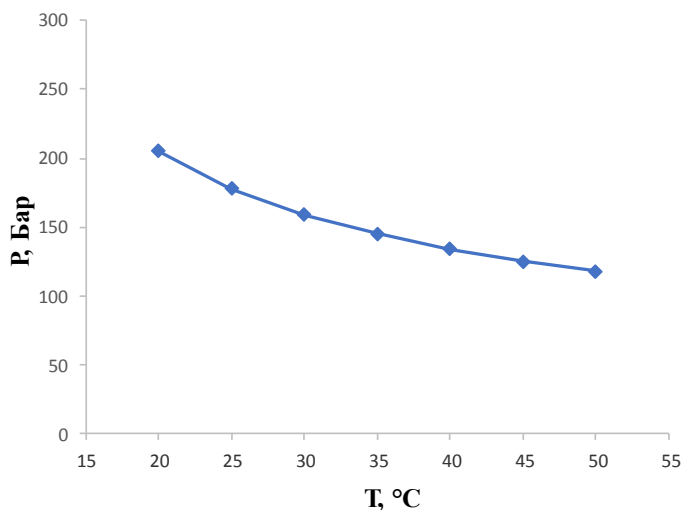


Рис. 2. Графічна залежність тиску у хроматографічній колонці від температури.

3.2. Вибір довжини хвилі детектування.

Аналізуючі літературні джерела обирали хвилю детектування. З літератури відомо, що 266 нм є максимумом спектру поглинання ізоніазиду[5].

3.3. Градувальна залежність площі піку від концентрації стандартних розчинів для подальшого кількісного визначення ізоніазиду у зразках 1 та 2.

Як було зазначено раніше (п. 2.1.6.), для кількісного визначення діючої речовини ізоніазид у ТЛФ необхідно було побудувати градувальний графік (залежність площі піків від концентрації стандартних розчинів). Хроматограми зразків стандартних розчинів для наочності представлені у Додатку 4, характеристики градувальної залежності наведено у Таблиці 1:

Таблиця 1. Характеристики градувальної залежності

Концентрація ізоніазиду, мкг/мл					
				n	6
x	80	100	120	x_{cp}	100,00
y_1	5745265	7231803	8608029	Σx	300
y_2	5880685	7301524	8824947	N	3
y_3	5668350	7330555	8764489		
y_4	5925991	7292339	8646157		
y_5	5846006	7438509	8685943		
y_6	5812284	7298994	8749792	y_{cp}	7280647,89
\bar{y}	5813096,83	7315620,67	8713226,17	$\Sigma \bar{y}$	21841943,67
x^2	6400	10000	14400	Σx^2	30800,00
x^3	512000	1000000	1728000	Σx^3	3240000,00
$(x^2)^2$	40960000	100000000	207360000	$\Sigma (x^2)^2$	348320000,00
$x\bar{y}$	465047746,7	731562066,7	1045587140	$\Sigma x\bar{y}$	2242196953,33
$x^2\bar{y}$	37203819733	73156206667	1,2547E+11	$\Sigma x^2\bar{y}$	235830483200,00
$(x-x_{cp})^2$	400	0	400	$\Sigma (x-x_{cp})^2$	800,00
S	93754,71	68362,53	80938,95	C	0,4392
$(\bar{y}-(a+bx))^2$	305773796,37	1223095185,49	305773796,37	Σ	1834642778,24
<i>min</i>	5668350	7231803	8608029		
<i>max</i>	5925991	7438509	8824947		
G_min	1,544	1,226	1,300		
G_max	1,204	1,798	1,380		

Критерій Грабса ($n=6$)

G_кр (5%)	1,887	G_кр (1%)	1,973
------------------	--------------	------------------	--------------

Критерій Кохрена ($n=6$,
 $N=3$)

C_кр (5%)	0,7071	C_кр (1%)	0,793
------------------	---------------	------------------	--------------

Коефіцієнти лінійної функції

b	30324,56
a	72503,23

Коефіцієнт кореляції

r	0,999782
----------	-----------------

$$y=a \cdot x+b$$

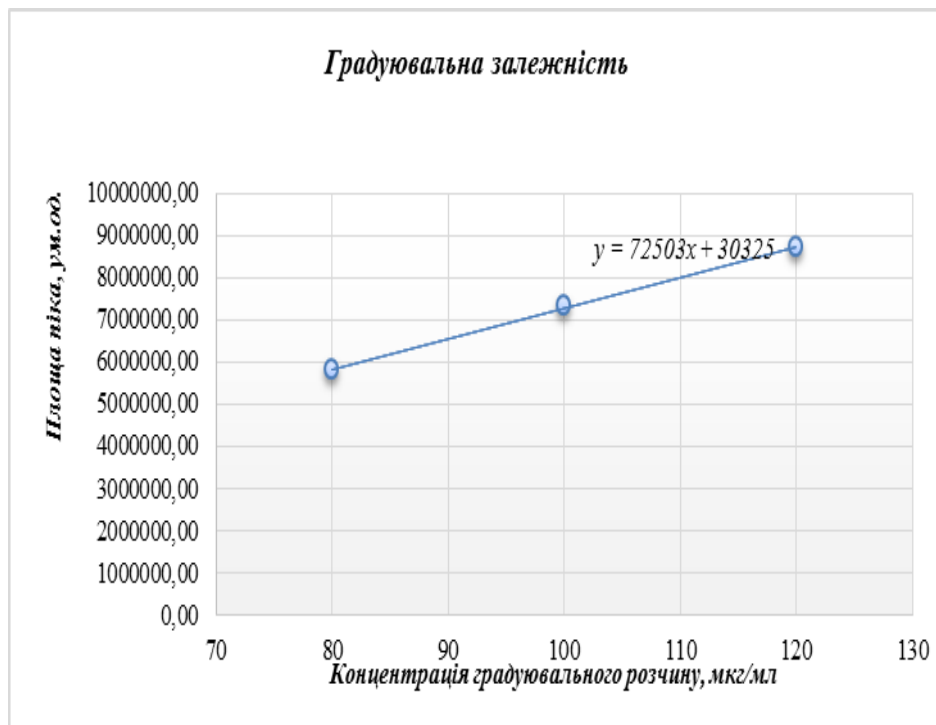


Рис. 3 Залежність площі хроматографічного піку ізоніазиду від концентрації ізоніазиду.

3.4. Визначення ізоніазиду у твердій лікарській формі.

Після побудови градувальної залежності площі піків стандартних розчинів від концентрації стандартних розчинів проводили визначення діючої речовини ізоніазид у ТЛФ так, як зазначено у пункті 2.1.5. Розчини досліджуваних зразків готували після процедури пробопідготовки, кількісне визначення концентрації ізоніазиду у ТЛФ визначали за градувальним графіком. У Таблиці 2 наведено кількісне визначення ізоніазиду у зразках 1 та 2:

Таблиця 2 . Кількісне визначення ізоніазиду у зразках 1 та 2.

Зразок	Площа піку, д.р., ум.од.	Вміст д.р., мкг
1	6628460	297,6
	6612708	296,5
	6722809	296,8
2	6292895	198,2
	6353763	198,8
	6158472	201,3

Для наочності на Рис.4 наведено хроматограми Зразків 1 та 2.

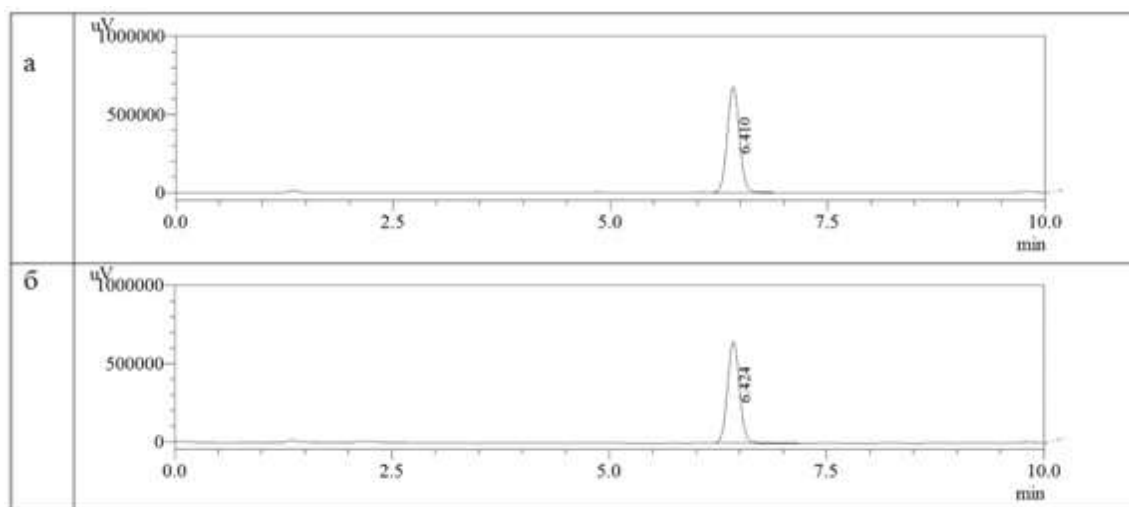


Рис. 4. Хроматограми Зразків 1 та 2: А) Площа піку Зразка 1, Б) Площа піку Зразка 2.

3.5. Проведення часткової валідації методики.

Валідацією називають процес проведення експертної оцінки методик, обладнання, продукції у відповідності з принципами належної виробничої практики [26-27]. Валідацією називають процес, який дозволяє з'ясувати підтвердження того, що аналітична методика, яка використовується для конкретного визначення, підходить для передбачуваного використання.

3.5.1. Перевірка специфічності методики.

Аналітичні методики повинні бути специфічними [26-27], тобто мають спроможність визначати аналіти (аналізовані речовини) у присутності інших.

Альтернативну методику кількісного визначення ізоніазиду у ТЛФ методом ВЕРХ ми розробляли безпосередньо на лікарських засобах, які реалізуються фармацевтичними закладами, тому результати, які ми отримували, безпосередньо були порівняні з концентрацією ізоніазиду, яка зазначена в інструкціях для медичного застосування. Результати представлено у Таблиці 2.

3.5.2. Перевірка лінійності методики.

Умови лінійності [26-27] виконуються при виконанні нижчезазначених критеріїв, а саме:

1. Вільний член у рівнянні лінійності $y=a \cdot x+b$ повинен статистично не відрізнятися від нульового значення;
2. Коефіцієнт кореляції має бути не меншим, ніж 0,9999.

Лінійність методики досліджували в діапазоні концентрацій від 80 до 120 мкг/мл.

Дослідження проводили для стандартних приготованих розчинів при кількості інжекцій $n = 6$.

Враховуючи вищезазначене, маємо висновки:

1. Лінійна функція описується рівнянням $y=72503,23x+ 30324,56$.
2. Коефіцієнт кореляції $R^2 = 0,999782$, що задовольняє вимогам ДФУ[17].

Таким чином, запропонована методика задовольняє всім розрахованим критеріям[26-27]. Методика лінійна в досліджуваному діапазоні концентрацій 70-130 мкг/мл.

3.5.3. Перевірка внутрішньолабораторної прецизійності.

Внутрішньолабораторна прецизійність характеризує вплив внутрішньолабораторних варіацій: різні дні, різні аналітики, різне обладнання тощо. Відтворюваність характеризує прецизійність у міжлабораторному експерименті. Зазвичай використовується для стандартизації методології [16-17].

Внутрішньолабораторну прецизійність оцінювали результатами досліджень, які проводили у різні дні. Оцінка збіжності проводили, спираючись на [16]:

$|x_1 - x_n| < L(P, n) \cdot s$, де x_1 – найменше значення вибірки, x_n – найбільше значення вибірки, s – стандартне відхилення, $L(P, n)$ – фактор, розрахований за Пірсоном при довірчій ймовірності $P = 0,95$ та відповідному обсязі вибірки n (значення фактору $L(95\%, n)$ наведені нижче):

Значення фактору $L(95\%, n)$ для різного обсягу вибірки

n	2	3	4
$L(P, n)$	2,77	3,31	3,65

Зразок 1

	День 1	День 2	Різниця у визначеннях, %
	Вміст діючої речовини, мкг		
1	297,6	298,2	Не більше 2,0
2	296,5	298,8	Не більше 2,0
3	296,8	295,9	Не більше 2,0
$ x_1 - x_n < L(P, n) \cdot s$	1,1	2,7	
Результати перевірки внутрішньолабораторної точності			
Об'єднане середнє	297,3		
Відносне стандартне відхилення (%)	0,37		
Коефіцієнт Стьюдента (95%, 5)	2,5706		
Відносний довірчий інтервал (%)	0,2		
Критичне значення	0,2 ≤ 2,0 %		

для збіжності результатів	
------------------------------	--

Результати для зразку 1 можна вважати збіжними.

Зразок 2

	День 1	День 2	Різниця у визначеннях, %
	Вміст діючої речовини, мкг		
1	198,2	200,6	Не більше 2,0
2	198,8	197,4	Не більше 2,0
3	201,3	198,8	Не більше 2,0
$ x_1 - x_n < L(P, n) \cdot s$	2,5	3,2	
Результати перевірки внутрішньолабораторної точності			
Об'єднане середнє	199,2		
Відносне стандартне відхилення (%)	0,74		
Коефіцієнт Стьюдента (95%, 5)	2,5706		
Відносний довірчий інтервал (%)	1,9		
Критичне значення для збіжності результатів	1,9 ≤ 2,0 %		

Результати для зразку 2 можна вважати збіжними.

3.5.4. Перевірка правильності методики.

Висновок щодо правильності методики може бути сформульовано після встановлення висновків про специфічність, лінійність та внутрішньолабораторну прецизійність запропонованої методики[26-27].

Враховуючи вищезазначені результати, методику кількісного визначення ізоніазиду у зразках 1 та 2 високоефективною рідинною хроматографією можна вважати правильною.

3.6. Аналіз методик кількісного визначення ізоніазиду.

Згідно з ДФУ (Додаток 1) та Європейською фармакопеею (Додаток 2) кількісно субстанцію ізоніазид визначають методом броматометрії.

Традиційно вважають, що броматометрія має низку недоліків, а саме:

- Високе значення помилки титрування (від 5 до 10 відсотків у визначенні);
- Стандартизація титранту, титрування у присутності індикатора;
- Присутність води;
- В окремих випадках порушення стехіометричності реакції.

Метод ВЕРХ є сучасним, екологічним, високоавтентичним методом і його перевагою можна вважати повну автоматизацію процесу, простоту у роботі та обробці результатів, автовалідацію системи відповідно до міжнародних вимог GLP/GMP або ISO.

ВИСНОВКИ

- Проаналізовано літературні джерела щодо застосування ізоніазиду, фізико-хімічні та фармакологічні властивості, механізм дії та метаболізм ізоніазиду.
- У ДФУ та Європейській фармакопеї наведено методики кількісного визначення субстанції ізоніазид методом броматометричного титрування, визначення ізоніазиду високоефективною рідинною хроматографією у ТЛФ не знайдено.
- На основі проведених досліджень було встановлено кількісний вміст ізоніазиду у ТЛФ альтернативною методикою ВЕРХ.
- Проведено часткову валідацію розробленої альтернативної 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 ізоніазиду у твердих лікарських формах.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Всесвітня організація охорони здоров'я <http://www.who.int/en>.
2. Довідник лікарських препаратів Компендіум [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <https://compendium.com.ua/>
3. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6089654/>
4. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3290/izoniazid>
5. Фармацевтична хімія: Підручник. Ред. П.О. Безуглий. – Вінниця: Нова Книга, 2008 – 560с.
6. Ширококов В. П. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник для студ. вищ. мед. навч. закл. / Видання 3-є, перероблене і доповнене / [Ширококов В.П. Климнюк С.І., Понятовський В.А. та ін.]. – Вінниця: Нова Книга, 2021. – 920 с.
7. Ширококов В.П., Климнюк С.І. Мікробіологія, вірусологія та імунологія в запитаннях і відповідях: навч. посіб. / [Ширококов В.П. Климнюк С.І., Корнійчук О.П. та ін.]. – Тернопіль: ТДМУ, 2019. – 564 с.
8. Ширококов В.П., Климнюк С.І. Практична мікробіологія: навчальний посібник / [Климнюк С.І., Ситник І.О., Ширококов В.П. та ін.]. – Вінниця: Нова Книга, 2018. – 576 с.
9. 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 Кюон, Гемфрі П Ранг; наук.ред.перекл. Ганна Зайченко, Микола Хайтович.- К.ВСВ "Медицина", 2021-588 с.
10. 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.
11. 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. Запорізький державний медичний Університет. Вінниця: Нова книга, 2021. – 360 с.

12. 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.

13. Довідник еквівалентності лікарських засобів Rxindex Спеціалізоване медичне видання / за ред І.А. Зупанця, В.П. Черних 4 вид. Перероблене К.: Фармацевт практик- 2020. – 2033 с.

14. Pharmacology / [M. A. Clark, R. Finkel, J. A. Rey et al.]. – [7th ed.]. – Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins, 2018. – 638 p.

15. www.pharma-center.com.ua. веб-сайт ДЦФ МОЗ України [web-page] URL

16. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків, 2015. в 3 т. Т.1. 1128 с.

17. European Pharmacopoeia. 7.0.– P. 2297 – 2299.

18. Аналітична хімія / В.В. Болотов, О.М. Свечнікова, С.В. Колісник та ін. — Х., 2004; ДФУ. — Х., 2001.

19. [Мала гірнича енциклопедія](#) : у 3 т. / за ред. [В. С. Білецького](#). — Д. : [Східний видавничий дім](#), 2013. — Т. 3 : С — Я. — 644 с

20. Дей, Р., Андервуд, А. (1989). *Кількісна аналітична хімія*. (п'яте видання). PEARSONPrenticeHall.

21. Буссі Хуан. (2007). Високопродуктивна рідинна хроматографія. [PDF]. Отримано з: fing.edu.uy.

22. Вікіпедія. (2019). Високоєфективна рідинна хроматографія. Відновлено з: en.wikipedia.org

23. Кларк Джим. (2007). Високоєфективна рідинна хроматографія. Отримано з: chemguide.co.uk

24. Матвій Баркович. (05 грудня 2019 р.). Високоєфективна рідинна хроматографія. ХіміяLibreTexts. Відновлено з: chem.libretexts.org
25. Г.П. Томас. (15 квітня 2013 р.). Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) - методи, переваги та застосування. Отримано з: azom.com
26. 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.
27. Георгіянц В.А. Валідація аналітичних методик у фармації : теорія, нормативні аспекти, проблеми практики. В.А. Георгіянц. О.А. Євтіфєєва. *Фармацевтичний часопис*. 2007. №2. С.13 – 18.

ДОДАТКИ

Додаток 1 Витяг з Державної фармакопеї України

Ізоніазид

Сульфатна кислота (2.4.14). Не більше 0,1 %. Визначення проводять з 1,0 г субстанції.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

0,100 г субстанції розчиняють у 3 мл муравьиної кислоти безводної *P*, додають 30 мл оцтової кислоти безводної *P* і титрують 0,1 *M* розчином хлорної кислоти потенціометрично (2.2.20).

1 мл 0,1 *M* розчину хлорної кислоти відповідає 13,12 мг $C_6H_7NO_2$.

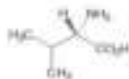
ЗБЕРІГАННЯ

У захищеному від світла місці.

ДОМІШКИ

Стероїдні домішки: А, С.

Інші домішки, що виявляються (дані домішки, якщо вони наявні у достатній кількості, можуть визначатися тим або іншим випробуванням монографії. Їх німк не порується загальноприйнятими критеріями для інших/неспецифікованих домішок. Тому немає необхідності їх ідентифікувати, щоб показати відповідність вимогам. Див. також 3.10 «Комп'ютерна обробка у субстанціях для фармацевтичного застосування»: В, D.



А. (2S)-2-аміно-3-метилбутанова кислота (валін).



В. (2S)-2-аміно-3-сульфилпропанова кислота (цистеїн).



С. (2S)-2-аміно-4-метилпентанова кислота (метіонін).

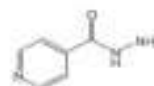


Д. (2S)-2-аміно-4-(метилсульфаміл)бутанова кислота (метіонін).

ІЗОНІАЗИД

Isoniazidum

ISONIAZID



$C_6H_7N_3O$

[54-85-3]

М.м. 137,1

Ізоніазид містить не менше 99,0 % і не більше 101,0 % піридин-4-карбогідрату, у перерахунку на суху речовину.

ВЛАСТИВОСТІ

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

Розчинність. Легко розчинний у воді *P*, помірно розчинний в етанолі (96 %) *P*.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Перше ідентифікацій: А, В.

Друге ідентифікацій: А, С.

А. Температура плавлення (2.2.14). Від 170 °С до 174 °С.

В. Інфрачервоний спектр (2.2.24) субстанції має відповідати спектру ФСЗ Ізоніазиду.

С. 0,1 г субстанції розчиняють у 2 мл води *P*. До одержаного розчину додають 10 мл того ж розчину 10 г/л

Ізопропіліміристат

квітіння *P*. Одержану суміш відстоюють, пітерючи стінку пробірки окисною паличкою; утворюється жовтий осад. Одержаний осад перекристалізують із 5 мл етанолу (70 %, об/об) *P*. Температура плавлення (2.2.14) висушеної при температурі від 100 °С до 105 °С кристали мас бути від 226 °С до 231 °С.

ВИПРОБУВАННЯ

Розчин S. 2,5 г субстанції розчиняють у воді, вільній від вуглецю діоксиду, *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50 мл.

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

Колориметр розчину (2.2.2, метод D). Забарвлення розчину S має бути не інтенсивнішим за етalon ВУ.

pH (2.2.3). Від 6,0 до 8,0. Вимірюють pH розчину S.

Гідрати і сульфатні домішки. Визначення проводять методом тонкошарової хроматографії (2.2.27), використовуючи як тонкий шар суміш *GF₂₅₄* *P*.

Випробуваний розчин. 1,0 г субстанції розчиняють у суміші рівних об'ємів ацетону *P* і води *P* і доводять об'єм розчину тією самою сумішшю розчинників до 10,0 мл.

Розчин порівняння. 50,0 мг зразку сульфату *P* розчиняють у 50 мл води *P* і доводять об'єм розчину ацетоном *P* до 100,0 мл. До 10,0 мл одержаного розчину додають 0,2 мл випробовуваного розчину і доводять об'єм розчину сумішшю рівних об'ємів ацетону *P* і води *P* до 100,0 мл.

На лінійку старту хроматографічної пластинки наносять 5 мкл кожного розчину. Пластинку поміщають у камеру із сумішшю розчинників вода *P* - ацетон *P* - метанол *P* - етанолом *P* (10:20:20:50). Коли фронт розчинника пройде 15 см від ліній старту, пластинку виймають із камери, сушать на повітрі та переслідують в УФ-світлі за дозовими знами 254 нм.

На хроматограмі випробовуваного розчину будь-яка пляма, крім основної, не має бути інтенсивнішою за пляму на хроматограмі розчину порівняння (0,2 %).

Пластинку обприскують диаметилсульфідом *P* і переслідують при денному світлі. На хроматограмі розчину порівняння виявляється додаткова пляма, відповідна гідрату.

На хроматограмі випробовуваного розчину пляма, відповідна гідрату, не має бути інтенсивнішою за пляму гідрату на хроматограмі розчину порівняння (0,05 %).

Важкі метали (2.4.6, метод С). Не більше 0,001 % (10 ppm).

2,0 г субстанції мають витримувати випробування на важкі метали. Етalon готують із використанням 2 мл етанолу еталонового розчину (10 ppm *P*) *P*.

Втрата в масі при висушуванні (2.2.32). Не більше 0,5 %. 1,00 г субстанції сушать при температурі 105 °С.

Сульфатні зливи (2.4.14). Не більше 0,1 %. Визначення проводять з 1,0 г субстанції.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

0,250 г субстанції розчиняють у воді *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100,0 мл. До 20,0 мл одержаного розчину додають 100 мл води *P*, 20 мл хлористоводневої кислоти *P*, 0,2 г калію бромату *P* і титрують краплями, при постійному перемішуванні 0,0167 *M* розчином калію бромату до зникнення червоного забарвлення, використовуючи як індикатор 0,05 мл метилового червоного розчину *P*.

1 мл 0,0167 *M* розчину калію бромату відповідає 3,429 мг $C_{17}H_{33}O_2$.

ІЗОПРОПІЛІМІРИСТАТ

Isopropylis myristas

ISOPROPYL MYRISTATE



$C_{17}H_{33}O_2$

М.к. 270,5

1-Метилетил тетрадеканат разом зі змінною кількістю інших ізопропілових ефірів жирних кислот.

Вміст: не менше 90,0 % $C_{17}H_{33}O_2$

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Прозора, безбарвна, масляниста рідина.

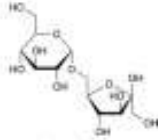
Розчинність. Не змішується з водою *P*, змішується з етанолом (90 %) *P*, метилепоксираном *P*, жирними оліями та азелановим маслом *P*.

Відносна густина становить близько 0,853.

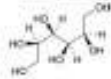
Додаток 2 Витяг з Європейської Фармакопеї

Isoniazid

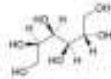
EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.0



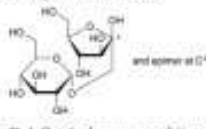
A. 4-O-α-D-glucopyranosyl-β-D-arabinofuranose-2-ulofuranose (isomaltulose).



B. D-mannitol.



C. D-glucitol (D-arabitol).

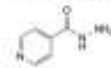


D. 1-O-α-D-glucopyranosyl-D-arabino-hex-2-ulofuranose (maltulose).

05/2008:0148
corrected 6.0

ISONIAZID

Isoniazidum



C₆H₅N₃O
[54-85-3]

M, 137.1

DEFINITION

Isoniazid contains not less than 99.0 per cent and not more than the equivalent of 101.0 per cent of pyridine-4-carboximidamide, calculated with reference to the dried substance.

CHARACTERS

A white or almost white, crystalline powder or colourless crystals, freely soluble in water, sparingly soluble in alcohol.

IDENTIFICATION

First identification: A, B.

Second identification: A, C.

A. Melting point (2.2.14): 170 °C to 174 °C.

B. Examine by infrared absorption spectrophotometry (2.2.24), comparing with the spectrum obtained with isoniazid CRS.

C. Dissolve 0.1 g in 2 mL of water R and add 10 mL of a warm 10 g/L solution of oxalic acid R. Allow to stand and scratch the wall of the test tube with a glass rod. A yellow precipitate is formed, which, after recrystallisation from 5 mL of alcohol (70 per cent V/V) R and drying at 100 °C to 105 °C, melts (2.2.14) at 226 °C to 231 °C.

TESTS

Solution S. Dissolve 2.5 g in carbon dioxide-free water 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 BY, (2.2.2, Method II).

pH (2.2.3). The pH of solution S is 6.0 to 6.8.

Hydrate and 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 a mixture of equal volumes of acetone R and water R and dilute to 10.0 mL with the same mixture of solvents.

Reference solution. Dissolve 50.0 mg of hydrate calcium R in 50 mL of water R and dilute to 100.0 mL with acetone R. To 10.0 mL of this solution add 0.2 mL of the test solution and dilute to 100.0 mL with a mixture of equal volumes of acetone R and water R.

Apply separately to the plate 5 µL of each solution and develop over a path of 15 cm using a mixture of 10 volumes of water R, 20 volumes of acetone R, 20 volumes of methanol R and 50 volumes of ethyl acetate R. Allow the plate to dry in air and examine in ultraviolet light at 254 nm. 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 (0.2 per cent). Spray the plate with dimethylaminooxycarbonylchloride solution RT. Examine in daylight. An additional spot, corresponding to hydrate, appears in the chromatogram obtained with the reference solution. Any corresponding spot in the chromatogram obtained with the test solution is not more intense than the spot corresponding to hydrate in the chromatogram obtained with the reference solution (0.05 per cent).

Heavy metals (2.4.8). 2.0 g complies with test C for heavy metals (10 ppm). Prepare the reference solution using 2 mL of lead standard solution (10 ppm Pb) R.

Loss on drying (2.2.32). Not more than 0.5 per cent,

determined on 1.00 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

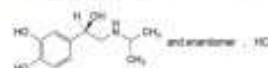
Dissolve 0.250 g in water R and dilute to 100.0 mL with the same solvent. To 20.0 mL of the solution add 100 mL of water R, 20 mL of hydrochloric acid R, 0.2 g of potassium bromate R and 0.05 mL of methyl red solution R. Titrate dropwise with 0.0167 M potassium bromate, shaking continuously, until the red colour disappears.

1 mL of 0.0167 M potassium bromate is equivalent to 3.429 mg of C₆H₅N₃O.

07/2013:1332

ISOPRENALINE HYDROCHLORIDE

Isoprenalini hydrochloridum



C₁₁H₁₇ClNO₃
[51-30-9]

M, 247.7

DEFINITION

(1R,3R)-1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-[(1-methylethyl)amino]ethanol hydrochloride.

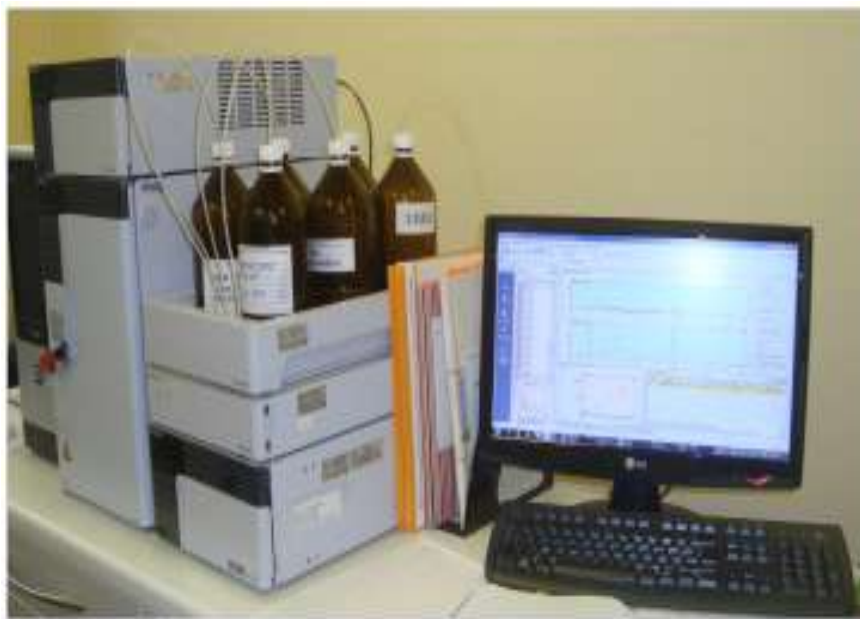
Content: 98.0 per cent to 101.5 per cent (dried substance).

2558

See the information section on general monographs (cover pages)

Додаток 3

Хроматограф рідинний „Шімадзу” з УФ детектором, заводський №С20964330924СS, інвентарний №010466981, свідоцтво про калібрування

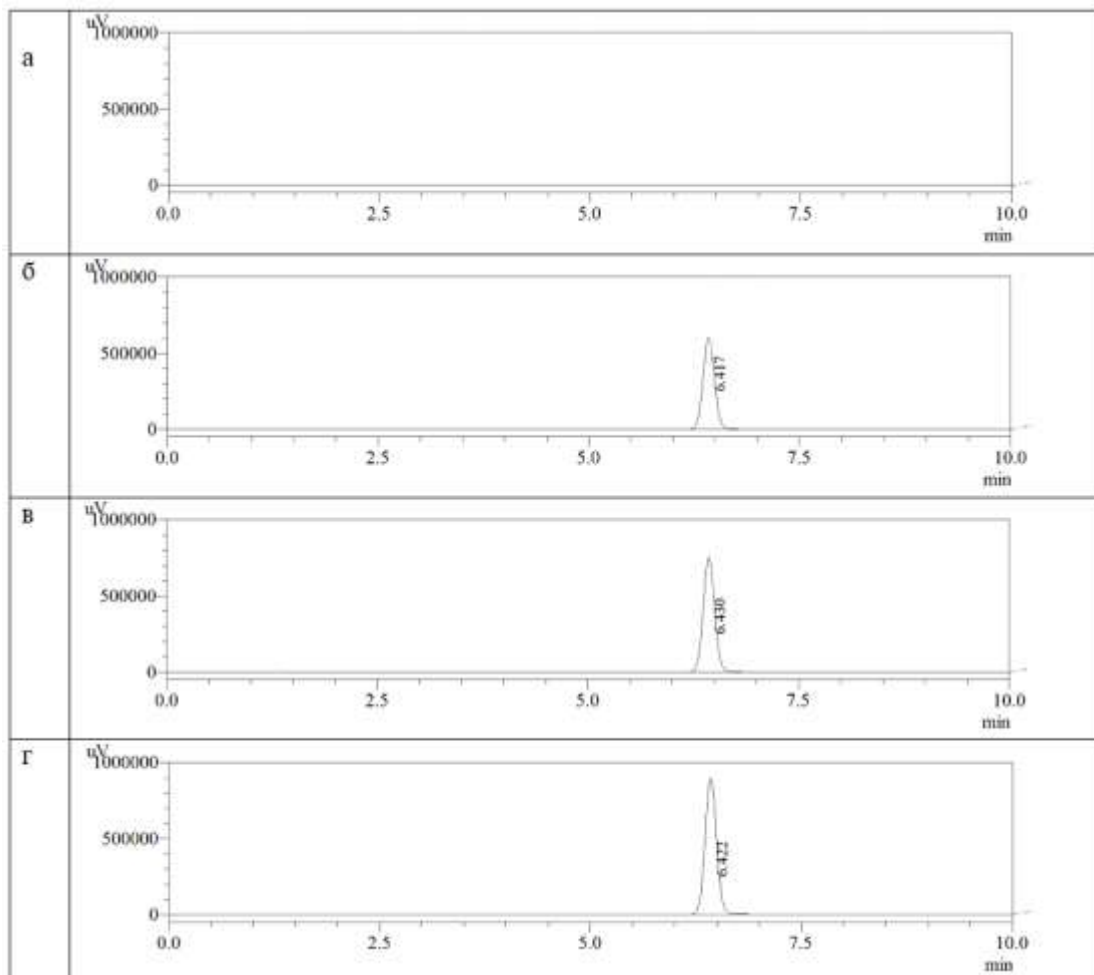


№ 3991 від 07.06.2019

Додаток 4.

Хроматограми стандартних розчинів

(концентрація ізоніазиду 80 (б), 100 (в), 120 (г) мкг/нм).



Анотація (Summary)

According to the Ministry of Health of Ukraine, our state belongs to the group of countries with the highest incidence of tuberculosis in Europe. The spread of this infectious disease is due to a number of social, economic, household problems and problems in society. One of the basic drugs in the treatment of tuberculosis is isoniazid, but the concentration of this active substance in the medicinal form must be controlled.

The aim of the study. The purpose of our work was to develop and test the determination of the concentration of isoniazid in tablets by a modern express method of high-performance liquid chromatography (HPLC). The objects of the study were solid dosage forms, which include isoniazid (sample 1 – 200 mg, sample 300 mg). Sample preparation for HPLC was standard, extraction of the active substance was carried out with ethyl acetate.

The results. As a result of the work, chromatographic conditions for the quantitative determination of isoniazid in the analyzed samples (1 and 2) were developed, namely: mobile phase acetonitrile-water (60:40), thermostat temperature 350C, injector loop volume 20 μ l, detector wavelength 210 nm, pressure 140 Bar, retention time 8 min. Quantitative determination of the analyzed substance was carried out using the method of the calibration graph.

Conclusions. On the basis of experimental data, an alternative technique for the quantitative determination of isoniazid in solid dosage forms by the HPLC method was modeled, and a partial validation of the technique was carried out.