

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О. О.
БОГОМОЛЬЦЯ
ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА АНАЛІТИЧНОЇ, ФІЗИЧНОЇ ТА КОЛОЇДНОЇ ХІМІЇ

ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему «Оптимізація кількісного визначення варфарину у таблетках
методом УФ - спектрофотометрії»**

Виконала: здобувач вищої освіти 5-го курсу, групи 9801
фармацевтичного напрямку підготовки 226 Фармація,
промислова фармація

Орлова Анна Максимівна

Керівник:

Доцент кафедри аналітичної, фізичної та колоїдної хімії,
кандидат хімічних наук,

Гождзінський Сергій Мартинович

Рецензент : завідувачка кафедри хімії ліків та лікарської
токсикології, д.мед.н., професор Ніженковська Ірина
Володимирівна

Київ – 2024

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів.	4
Вступ.	5
Основна частина. Розділ 1. Варфарин, методи визначення.	8
1.1. Застосування варфарину.	8
1.2. Фізико-хімічні властивості варфарину.	10
1.3. Механізм та метаболізм варфарину.	10
1.4. Фармакологічні ефекти, побічні ефекти та передозування.	10
1.5. Методи ідентифікації та кількісного визначення варфарину.	13
1.6. УФ-спектрофотометрія.	13
Розділ 2. Експериментальна частина.	15
2.1. Матеріали та методи.	15
2.1.1. Мета дослідження.	15
2.1.2. Об'єкти дослідження.	15
2.1.3. Посуд та обладнання.	16
2.1.4. Реактиви.	16
2.1.5. Методики та умови приготування розчинів.	17
2.1.6. Методики УФ-спектрофотометричного визначення.	18
2.1.7. Кількісне визначення варфарину.	18

Розділ 3. Результати та їх обговорення.	19
3.1. Часткова валідація методики.	26
3.1.1. Робастність.	26
3.1.2. Стабільність розчинів у часі.	27
3.1.3. Специфічність методики.	30
3.1.4. Перевірка методики на правильність.	30
Висновки.	31
Список використаних джерел.	32
Додатки.	34
Анотація (Summary).	40

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ВЕРХ –високоефективна рідинна хроматографія

УФ - ультрафіолетова спектрофотометрія

ЦНС – центральна нервова система

Ph.Eur. – European Pharmacopoeia

НМУ – Національний медичний університеті мені О.О. Богомольця

ТЛФ – тверда лікарська форма

ЛЗ – лікарський засіб

г – грам

д.р.- діюча речовина

ІЧ спектр – інфрачервоний спектр поглинання

мкл – мікролітр

мл – мілілітр

нм – нанометр

Т. кип. – температура кипіння

Т. пл. – температура плавлення

УФ спектр – ультрафіолетовий спектр поглинання

С⁰ – градуси Цельсія

ВСТУП

Антикоагулянтами називають лікарські препарати, які здатні гальмувати процеси згортання крові[1]. Класифікують ці препарати на дві групи. До першої відносяться антикоагулянти прямої дії, вони проявляють швидкий ефект (гепарин, гірудин, еноксапарин, надропарин, сулодексид).

Механізм дії антикоагулянтів першої групи полягає у тому, що ця сполука (наприклад, гепарин) діє на систему згортання крові оскільки утворює комплексні сполуки з багатьма факторами гемокоагуляції (додатково гепарин знижує агрегацію тромбоцитів і його антагоністом вважають протаміну сульфат).

Антикоагулянти другої групи (непрямої дії) цілеспрямовано гальмують редуктазу вітаміну К і цей процес, у свою чергу, призводить до гальмування активації вітаміну К в організмі (припиняється синтез К-вітамінзалежних плазмових факторів гемостазу). Враховуючи вищезазначене, можна казати, що у випадку передозування антикоагулянтами другої групи це передозування нейтралізують застосовуючи препарати вітаміну К.

Довготривалий ефект проявляють препарати, які проявляють антикоагуляційну властивість після латентного періоду. До антикоагулянтів другої групи відносять неодикумарин, феромарон, феніндіон, синкумар, етилбускумацетат, варфарин.

Антикоагулянти непрямої дії класифікують за походженням:

- Похідні індандіону (фенілін, омефін);
- Похідні кумарину (неодикумарин, синкумар, фепромарон, варфарин).

Сполуку, яка б мала функцію зниження згортання крові (антикоагулянт), вперше відкрили у 1940 році. Варфарин синтезували у 1948 році і одним з перших пацієнтів, кого лікували цим препаратом після інфаркту міокарду, був президент США Дуайт Ейзенхауер [1].

Актуальність теми: Оптимізація методики кількісного визначення варфарину у таблетках УФ - спектрофотометрією.

Мета: оптимізувати та апробувати методику кількісного визначення варфарину у таблетованих формах УФ - спектрофотометрією.

Завдання:

1. Провести бібліосемантичний аналіз щодо застосування препаратів з варфарином, визначити його властивості та фармакологію, механізм дії варфарину та метаболізм.

2. Спираючись на літературні джерела проаналізувати ідентифікацію та методику кількісного визначення варфарину.

3. Спираючись на сучасні наукові дослідження оптимізувати альтернативну методику кількісного визначення варфарину у таблетках ультрафіолетовою спектрофотометрією.

4. Провести апробацію та часткову валідацію методики ультрафіолетового спектрофотометричного визначення варфарину у таблетках.

Методи дослідження: бібліосемантичний, УФ - спектрофотометрія.

Новизна та значення одержаних результатів: результатом роботи є запропонована оптимізована альтернативна методика кількісного визначення варфарину у таблетках методом УФ - спектрофотометрії.

Апробація результатів дослідження. Результати дослідження були представлені на Міжнародній мультидисциплінарній науковій інтернет-конференції (м. Тернопіль, Україна, м. Ополе, Польща, 21-22 березня 2024 р.

Структура роботи. Робота представлена на 40 сторінках, додатків - 3 рисунків- 4, таблиць- 6.

ОСНОВНА ЧАСТИНА. Розділ 1. Варфарин, методи визначення.

1.1 Застосування варфарину.

Як правило, варфарин рекомендують при профілактиці післяопераційних тромбозів, терапії тромбозів та тромбоемболії легеневої артерії[2-3].

1.2. Фізико-хімічні властивості варфарину.

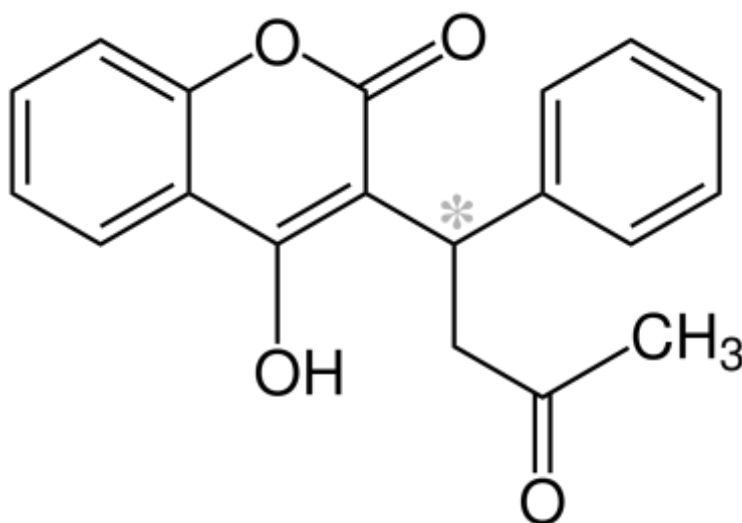


Рис. 1. Формула варфарину[1].

За IUPAC хімічна речовина має наступну назву: *(RS)*-4-hydroxy- 3-(3-oxo- 1-phenylbutyl)- 2*H*- chromen- 2-one[1].

Формула сполуки: $C_{19}H_{16}O_4$.

Молярна маса варфарину становить 308,23 г/моль (Додаток 1).

Варфарин є похідним кумарину, складається з двох енантіомерів, причому доведено, що *S* – енантіомер має у 2-5 разів більшу антикоагулянтну

активність, ніж R – енантіомер і S – енантіомер виводиться, переважно, з жовчу, а R – енантіомер - нирками [1]:

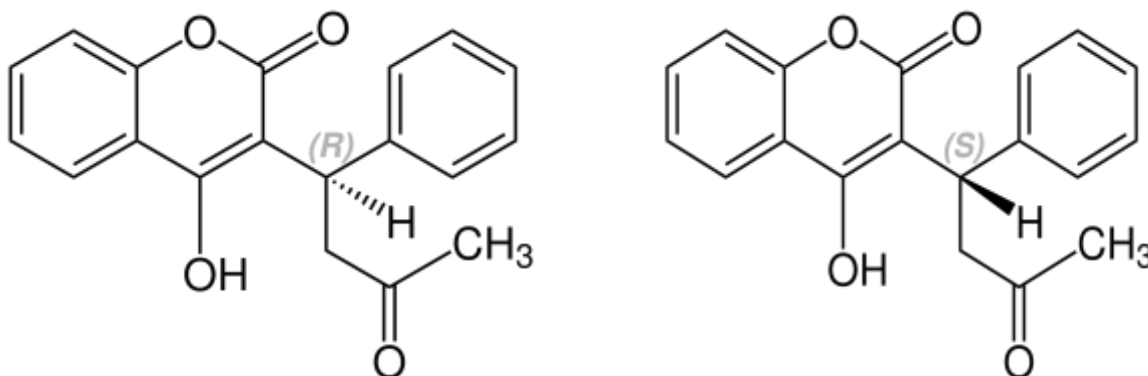


Рис.2. Енантіомери варфарину[1].

До кумаринів відносять біологічноактивні сполуки, із загальною формулою С6-С3. Ці сполуки відносяться до сполук фенольного ряду, в основі цих сполук знаходиться цикл цис-о-кумаринової кислоти. Однією з особливостей хімічних властивостей є відношення до лугів, а саме процес лужного гідролізу, результатом якого буде виділення жовтих солей кумаринової кислоти. Похідні кумарину вступають у реакцію азосполучення. При ідентифікації кумаринових похідних застосовують реакцію окислення йодоводневою або бромоводневою кислотою в середовищі рідкого фенолу. Продукти цього окислення ідентифікують блакитною флуоресценцією в ультрафіолетовому світлі. Часто похідні кумаринів виявляють методом тонкошарової хроматографії, хроматографічне виявлення проводять в ультрафіолетовому світлі на пластинці «Силуфол» у суміші розчинників бензол-ацетат або ацетон-гексан (Додаток 1).

1.3. Механізм дії та метаболізм варфарину.

Варфарин є антагоністом вітаміну К і його механізм дії полягає у блокуванні вітаміну К оскільки він інгібує фермент епоксидредуктазу. При терапії тромбозів варфарин зменшує швидкість фактору згортання крові до 50% шляхом знижування їх біологічної активності. Енантіомери варфарину розрізняються також часом періоду напіввиведення та взаємодією з іншими ліками[2-7].

1.4. Фармакологічні ефекти, побічні ефекти та передозування.

Препарат варфарин відмічається добрим всмоктуванням у шлунково-кишковому тракті та через шкіру. Біодоступність варфарину досягає 90%. Речовина добре зв'язується із білками крові і максимальна концентрація варфарину у крові досягається через 1,5 години. Варфарин має здатність проникати через плаценту, метабілізується у печінці, утворюючи неактивні метаболіти. Період напіввиведення S-рацемату досягає 40 годин, R-рацемату варіюється від 20 до 70 годин[2-7]. Нажаль, побічні ефекти при прийомі препарату нерідкі і різноманітні, а саме:

- Алергічні прояви у вигляді екземи, еритеми шкіри тощо;
- З боку шкірних покривів – некроз, васкуліт;
- З боку дихальної системи кальцинація трахеї;
- З боку нервової системи - головний біль, астенія, летаргія;
- З боку сечостатевої системи - нефрит, уролітаз;
- З боку травної системи - нудота, блювання, діарея, панкреатит, гепатит, жовтяниця, больові відчуття;
- Кровотечі. У пацієнтів, які приймали варфарин, спостерігали кишкові кровотечі, внутрішньочерепні гематоми та геморагічні інсульти. Як правило, подібні прояви негативного побічного характеру були у хворих, які

страждали на збільшений тиск. Ризик кровотеч зростає також у пацієнтів з поліморфізмом гену CYP2C9.

- Кумариновий некроз. Найчастіше цей синдром починає себе проявляти через припухлість та потемніння шкіри, яке може призводити до некротичних очагів. Найчастіше (до 90%) синдром спостерігається у жінок.
- Синдром пурпурових пальців. Страждають, переважно, чоловіки із атеросклеротичними ураженнями. Вважають, що варфарин спричиняє появу гемарагії атеросклерозних бляшок. Поява пурпурних уражень шкіри пальців супроводжується больовим відчуттям[2-7].

Лікарські засоби, які містять у своєму складі варфарин, протипоказані при гострих кровотечах (гемофілії, хворобі Віллебранта, тромбоцитопенії) та при індивідуальній підвищеній чутливості до препарату. Варфарин призначають при тяжких кровотечах, які є результатом пологів або операційних втручань, але якщо пацієнт страждає нирковою або печінковою недостатністю, цирозом печінки, неконтрольованою гіпертензією препарат слід призначати з обережністю. Категорично слід уникати призначення препарату при операціях на ЦНС або очах, при видаленні злоякісних пухлин, психічних захворюваннях та алкоголізмі пацієнта. Не призначають препарат при загрозах абортів. При застосуванні варфарину з іншими антитромботичними або гемостатичними засобами спостерігають посилення дії варфарину. Слід не використовувати одночасно варфарин з тромбіном, гепарином, ривароксабаном, ліками, які є інгібіторами серотоніну, з пероральними контрацептивами. Посилення ефекту варфарину спостерігається при одночасному прийомі з аспірином, дипіридамолом, тиклопідіном та більшістю нестероїдних препаратів. Протипоказано прийом з лікарськими засобами, до складу яких входить стрептокіназа та альтеплаза. Посилює ефект лактулоза, алопуринол, амоксицилін, азитроміцин, вітамін А та Е, протигрипозні вакцини, сульфамідні препарати тощо. Деякі

гомеопатичні препарати або препарати рослинного походження, до складу яких входить кумарин (наприклад, гінго, часник, папайя, женьшень, звіробій), підсилюють дію варфарину. Лікарські засоби, дієтичні добавки або їжа, до складу яких входить вітамін К, послаблюють дію варфарину[2-7].

Тривалість терапії.

Довічний прийом призначається хворим з діагнозом тромбофілія, артеріальним трансплантантом, ревматичним захворюванням серця. Як правило, терапія препаратом в інших випадках може досягати від 3 до 6 місяців.

Застереження.

Особливо уважними треба бути при призначенні препарату літнім людям, оскільки з віком збільшується чутливість літніх людей до дії антогоністів вітамінів групи К.

Зменшують дію коагулянтів барбітурати, карбамазепін, глутетімід, гризеофульвін. Зменшують абсорбцію препарату алюміній гідрохлорид, холестирамін, колестіпол. Деяка їжа (яйця, печінка, зелені овочі та чай) також знижують дію варфарину.

1.5. Методи ідентифікації та кількісного визначення варфарину.

Результатом проведеного бібліосемантичного аналізу нами був зроблений висновок, що кількісно варфарин у субстанції або лікарських засобах можна визначати методом ВЕРХ. У цьому випадку дослідники використовували колонку Zorbax CN, детектування проводили при довжині хвилі 260 нм[8], методом сенсibiliзуючої флуоресценції у біологічних рідинах визначали діючу речовину варфарин так, як описано у методиці [9], методом мас-спектрометрії визначають варфарин так, як описано у роботі [10].

Згідно з Європейською фармакопеею (Додаток 1) кількісно варфарин визначають методом УФ-спектрофотометрією при довжині хвилі 308 нм у середовищі NaOH [11], а саме:

Розчиняють 0,100 г субстанції у 100 мл 0,01 М. розчину NaOH. Потім розчин розводять у 10 разів лугом, вимірюють оптичну густину розчину.

Ідентифікацію варфарину проводять інфрачервоною абсорбційною спектрофотометрією [11], а саме:

Розчиняють 1 г субстанції у 10 мл води R, додають 5 мл кислоти нітратної R, фільтрують. До фільтрату додають 2 мл розчину дихромату калію R1 і струшують протягом 5 хв. Відстоюють 20 хв. Розчин має зеленувато-блакитний колір порівняно з холостою пробою.

1.6. УФ -Спектрофотометрія.

В аналітичній та фармацевтичній практиці при проведенні якісного та, переважно, кількісного аналізу широко використовують оптичні методи дослідження[13-14]. Вищезазначені методи базуються на вимірюванні ефектів взаємодії хімічної сполуки з електромагнітними хвилями оптичного

діапазону від 100 до 10000 нм. Ультрафіолетова область знаходиться у межах 100-380 нм. За механізмом УФ спектрофотометрія є абсорбційним методом, тобто заснована на вимірюванні випромінювання, яке поглинається досліджуваною речовиною.

Ультрафіолетову спектрофотометрію проводять у розчинах. Розчинниками можуть бути як органічні, так і неорганічні сполуки, але розчинник не повинен поглинатися в області, в якій поглинається досліджувана речовина. Кількісно процес поглинання підпорядковується закону світлопоглинання Бугера-Ламберта-Бера[13-14].

Розділ 2. Експериментальна частина.

Робота була виконана на кафедрі аналітичної, фізичної та колоїдної хімії Національного медичного університету імені О.О. Богомольця та у рамках Меморандуму про співпрацю на кафедрі аналітичної хімії Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

2.1. Матеріали та методи.

2.1.1. Мета дослідження.

В результаті проведеного літературного огляду було з'ясовано, що варфарин кількісно визначають різноманітними інструментальними методиками. Нам імponує дослідження [8], в якому автори пропонують кількісне визначення варфарину методом УФ – спектрофотометрії. На нашу думку, абсорбційний метод визначення є оптимальним, низковартісним, але у той же час не поступається точністю методу ВЕРХ.

2.1.2. Об'єкти дослідження.

Для кількісного визначення діючої речовини варфарин у лікарських препаратах ми обрали нижчезазначені таблетки:

- Варфарин Оніон (Зразок 1).

Таблетка містить варфарину натрію 3 мг;

Допоміжні речовини: лактози моногідрат, крохмаль кукурудзяний, желатин, магнію стеарат, індигокармін Е 132.

- Варфарин -ФС (Зразок 2).

Таблетка містить варфарину натрію клатрат у перерахуванні на 2,5 мг варфарину натрію або 3 мг варфарину натрію;

Допоміжні речовини: лактози моногідрат, крохмаль кукурудзяний, желатин, індигокармін (Е 132), магнію стеарат.

У нашій країні ці ТЛФ реалізуються аптечними закладами:

Зразок 1:

Варфарин Орион, Зразок 1



Варфарин-ФС, Зразок 2



2.1.3. Посуд та обладнання.

1. Хімічний мірний посуд для приготування розчинів класу точності А.
2. Ваги лабораторні MettlerToledo XS204 (Додаток 2).
3. Спектрофотометр SPECORD 200-222 U 214 (Додаток 3).

2.1.4. Реактиви.

У роботі використовували розчинники та реактиви марки х.ч.

1. Фармакопейний стандартний зразок ДФУ натрій варфарин, Warfarin sodium каталожний номер W0432;

2. Етанол, 95% (розчинник 1);

3. Ацетонітрил (розчинник 2).

2.1.5. Методики та умови приготування розчинів.

Приготування стандартного розчину варфарину у різних розчинниках (етанолі та ацетонітрилі).

Приготування стандартного розчину варфарину в етанолі (стандартний розчин А):

0,01г наважки стандартного зразка ДФУ зважували та вміщували у мірну колбу на 100 мл, додавали приблизно 70 мл етанолу, ретельно перемішували, доводили етанолом до риси.

Приготування стандартного розчину варфарину в ацетонітрилі (стандартний розчин В):

0,01 г наважки стандартного зразка ДФУ зважували та вміщували у мірну колбу на 100 мл, додавали приблизно 70 мл ацетонітрилу, ретельно перемішували, доводили ацетонітрилом до риси.

Приготування досліджуваного розчину в етанолі (досліджуваний розчин А):

Таблетку зразка 1 або 2 подрібнювали. Наважку 25 мг вміщували у мірну колбу на 100 мл, додавали 70 мл етанолу, ретельно перемішували. Додавали до риси етанол. Струшували. Фільтрували.

Приготування досліджуваного розчину в ацетонітрилі (досліджуваний розчин В):

Таблетку зразка 1 або 2 подрібнювали. Наважку 25 мг вміщували у мірну колбу на 100 мл, додавали 70 мл ацетонітрилу, ретельно перемішували. Додавали до риси ацетонітрил. Струшували. Фільтрували.

2.1.6. Методики УФ - спектрофотометричного визначення.

Піпеткою на 5 мл відбирали розчин (стандартний або досліджуваний) для УФ-вимірювань, вміщували у мірну колбу на 100 мл, доводили розчин до риси певним розчинником (етанолом або ацетонітрилом, в залежності від того, яку методику апробували), перемішували. Величину абсорбції вимірювали при використанні етанолу за 310 нм, при використанні ацетонітрилу за 320 нм у кюветах з шаром завтовшки $l = 1$ см. Як розчин порівняння використовували чистий розчинник: етанол або, відповідно, ацетонітрил.

Методику УФ-визначення оптимізували, спираючись на висновки авторів роботи [8].

2.1.7. Кількісне визначення варфарину.

Оскільки процес поглинання світла діючою речовиною підпорядковується закону світлопоглинання Бугера-Ламберта-Бера, концентрацію досліджуваної речовини (враховуючи розведення) визначали за нижчезазначеним співвідношенням:

$$C(x) = A_1 \cdot m_1 / A_0 \cdot m_0$$

де A_1 – абсорбція досліджуваного розчину при певній довжині хвилі, A_0 – абсорбція стандартного розчину при певній довжині хвилі, m_1 – маса наважки досліджуваної речовини, г, m_0 – маса наважки стандартного зразка, г.

Розділ 3. Результати та їх обговорення.

Спираючись на висновки авторів роботи [8] розчинниками при проведенні кількісного визначення варфарину у таблетованих формах ми обрали етиловий спирт(розчинник 1) та ацетонітрил (розчинник 2). У роботі над оптимізацією методики кількісного УФ -визначення однією з задач було вивчення на приготованих стандартних розчинах залежність абсорбції варфарину від довжини хвилі (побудувати спектр поглинання)[13].

Результати вивчення цієї залежності представлено у Таблицях 1 та 2 та для наочності на Рисунках 3 та 4.

Таблиця 1. Залежність величини абсорбції стандартного розчину А від довжини хвилі λ .

Довжина хвилі λ	220	250	300	305	310	325	400	420	460	500
Величина абсорбції А	0,043	0,048	0,081	0,082	0,084	0,05	0,042	0,031	0,021	0,01

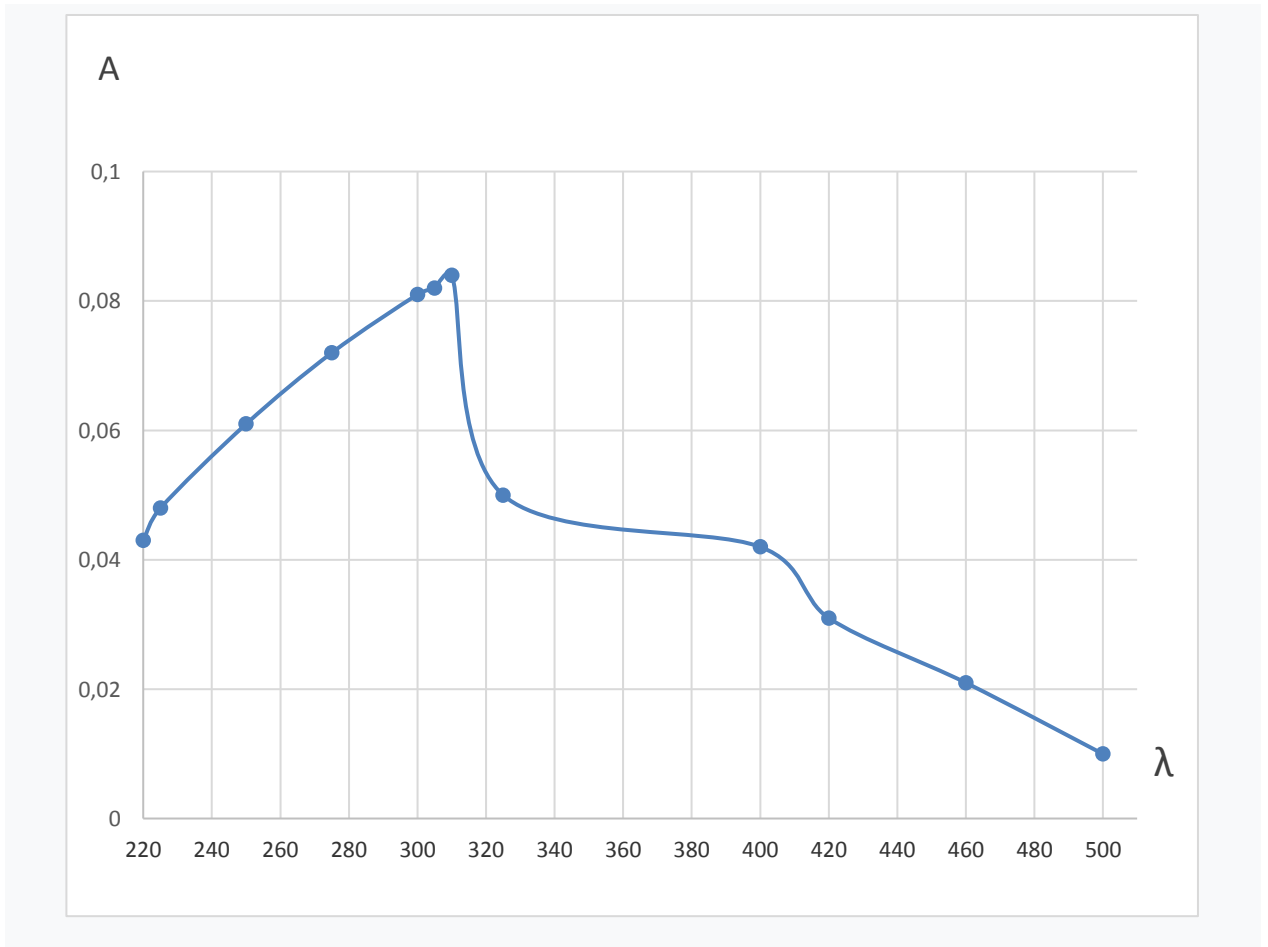


Рис.3. Графічна залежність величини абсорбції A стандартного розчину А від довжини хвилі λ (спектр поглинання).

Таблиця 2. Залежність величини абсорбції стандартного розчину В від довжини хвилі λ .

Довжина хвилі λ	220	250	300	305	320	325	340	350	360	380
Величина абсорбції А	0,041	0,059	0,084	0,085	0,091	0,05	0,040	0,020	0,018	0,01

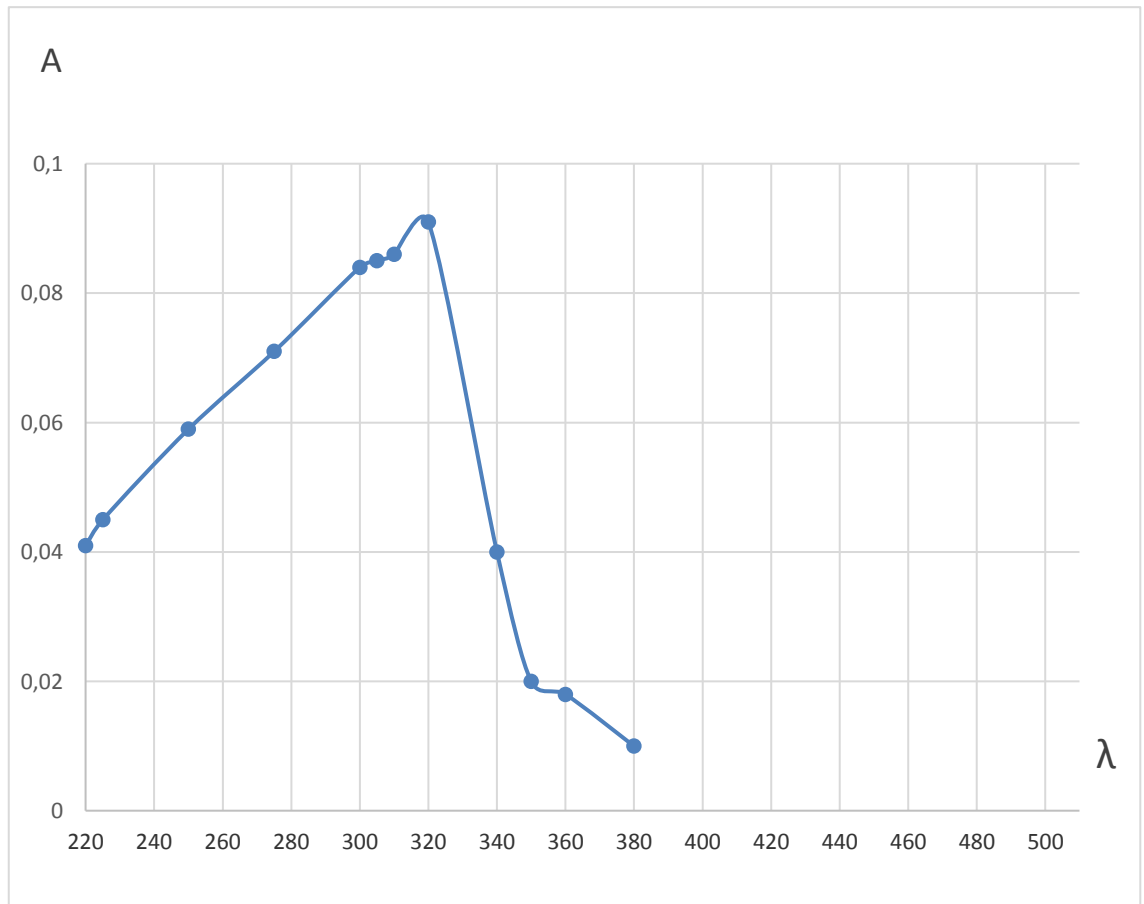


Рис.4. Графічна залежність величини абсорбції A стандартного розчину В від довжини хвилі λ (спектр поглинання).

З наведених спектрів поглинання можна зробити висновок, що подальше кількісне визначення варфарину у таблетованих формах у розчинниках етанол та ацетонітрил доцільно проводити при довжині хвилі 310 нм, і, відповідно, при 320 нм.

Після побудови спектрів поглинання ми проводили кількісне УФ-спектрофотометричне визначення варфарину у таблетках (Зразок 1 та Зразок 2) так, як описано у п. 2.1.5. та 2.1.6. Результати наведено у Таблицях 3 та 4.

Таблиця 3. Результати кількісного УФ-спектрофотометричного визначення варфарину у Зразку 1 у розчинниках етанол та ацетонітрил. Маса діючої речовини (згідно з інструкцією для медичного застосування) варфарину, 3 мг.

Розчинник	Маса знайденої діючої речовини, мг, враховуючи розведення
Етанол	3,05
	3,23
	3,12
	2,98
	2,95
	3,11
Ацетонітрил	3,14
	3,21
	3,11
	2,87
	2,95
	2,92

Статистична обробка результатів.

Для розчинника етанол:

- 1) середнє значення $\bar{x} = 3,07$
- 2) стандартне відхилення $s = 0,102$
- 3) дисперсія $s^2 = 0,0105$

4) відносне стандартне відхилення у відсотках $RSD = 3,34\%$

Відтворюваність результатів можна вважати хорошою.

5) визначення довірчого інтервалу:

коефіцієнт Стьюдента при $P=0,95$ та числі ступенів свободи 5 – 2,5706

$$\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}} = 3,07 \pm 0,11$$

Результати можна вважати правильними (не містять систематичну похибку), оскільки дійсне значення вмісту варфарину 3 мг потрапляє у довірчий інтервал.

б) відносна похибка середнього значення $\bar{\epsilon} = 3,50\%$

Для розчинника ацетонітрил:

1) середнє значення $\bar{x} = 3,03$

2) стандартне відхилення $s = 0,138$

3) дисперсія $s^2 = 0,0190$

4) відносне стандартне відхилення у відсотках $RSD = 4,54\%$

Відтворюваність результатів можна вважати хорошою.

5) визначення довірчого інтервалу:

коефіцієнт Стьюдента при $P=0,95$ та числі ступенів свободи 5 – 2,5706

$$\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}} = 3,03 \pm 0,14$$

Результати можна вважати правильними (не містять систематичну похибку), оскільки дійсне значення вмісту варфарину 3 мг потрапляє у довірчий інтервал.

б) відносна похибка середнього значення $\bar{\epsilon} = 4,77\%$

Таблиця 4. Результати кількісного УФ-спектрофотометричного визначення варфарину у Зразку 2 у розчинниках етанол та ацетонітрил. Маса діючої речовини (згідно з інструкцією для медичного застосування) варфарину, 3 мг.

Розчинник	Маса знайденої діючої речовини, мг, враховуючи розведення
Етанол	3,10
	3,15
	3,06
	2,94
	2,97
	2,89
Ацетонітрил	2,87
	3,23
	3,07
	2,88
	2,91
	2,94

Статистична обробка результатів.

Для розчинника етанол:

- 1) середнє значення $\bar{x} = 3,02$
- 2) стандартне відхилення $s = 0,101$
- 3) дисперсія $s^2 = 0,0101$
- 4) відносне стандартне відхилення у відсотках $RSD = 3,34\%$

Відтворюваність результатів можна вважати хорошою.

- 5) визначення довірчого інтервалу:

коефіцієнт Стьюдента при $P=0,95$ та числі ступенів свободи 5 – 2,5706

$$\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}} = 3,02 \pm 0,10$$

Результати можна вважати правильними (не містять систематичну похибку), оскільки дійсне значення вмісту варфарину 3 мг потрапляє у довірчий інтервал.

б) відносна похибка середнього значення $\bar{\varepsilon} = 3,50\%$

Для розчинника ацетонітрил:

1) середнє значення $\bar{x} = 2,98$

2) стандартне відхилення $s = 0,141$

3) дисперсія $s^2 = 0,01908$

4) відносне стандартне відхилення у відсотках $RSD = 4,72\%$

Відтворюваність результатів можна вважати хорошою.

5) визначення довірчого інтервалу:

коефіцієнт Стьюдента при $P=0,95$ та числі ступенів свободи 5 – 2,5706

$$\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}} = 2,98 \pm 0,15$$

Результати можна вважати правильними (не містять систематичну похибку), оскільки дійсне значення вмісту варфарину 3 мг потрапляє у довірчий інтервал.

б) відносна похибка середнього значення $\bar{\varepsilon} = 4,95\%$

3.1. Часткова валідація методики.

Стандартною процедурою при апробації методики є валідація запропонованих аналітичних дій. Ми провели часткову валідацію методики за робасністю, стабільністю та специфічністю так, як зазначено у нормативних документах[15-18].

3.1.1. Робасність.

Перевірку спроможності методики ми оцінювали через порівняння результатів, які були визначені нами у різні календарні дні оскільки несуттєві зміни (зміна температури приміщення, інші хімічні партії реактивів тощо) не повинні критично впливати на результати дослідження. Результати кількісного УФ-спектрофотометричного визначення варфарину у таблетках представлено у Таблиці 5.

Таблиця 5. Кількісне УФ – спектрофотометричне визначення варфарину у різні календарні дні.

	День 1	День 2
Зразок 1, маса визначеної діючої речовини, мг (враховуючи розведення)		
Етанол	3,07	3,09
Ацетонітрил	3,02	3,06
Зразок 2, маса визначеної діючої речовини, мг (враховуючи розведення)		
Етанол	3,02	3,12
Ацетонітрил	2,98	3,04

Наведені результати корелюють між собою і різниця у визначеннях не перебільшує 2%.

3.1.2. Стабільність розчинів у часі.

Однією з характеристик валідності методики є перевірка стабільності приготованих розчинів у часі. Ми вивчали стабільність розчинів на протязі 60 хвилин, вимірюючи кожні 10 хвилин величину абсорбції стандартних розчинів. Результати вивчення стабільності представлено у Таблиці 6.

Стабільність методики оцінювали за величинами:

а) Середнього значення:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n},$$

де n – обсяг вибірки.

б) RSD – відносного стандартного відхилення у відсотках:

$$RSD = s_r \cdot 100\%,$$

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}}, s - \text{стандартне відхилення.}$$

в) Визначеної дисперсії:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{v},$$

або

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - n \cdot \bar{x}^2}{v},$$

де v – число ступенів свободи, n – обсяг вибірки, \bar{x} – середнє значення, x_i – усі значення вибірки.

г) Визначення довірчого інтервалу:

$$\bar{x} \pm t_{p,v} \frac{s}{\sqrt{n}} = \bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}},$$

де \bar{x} – середнє значення вибірки, s – стандартне відхилення, n – обсяг вибірки, $t_{P,v}$ – коефіцієнт Стюдента або t -критерій, $\Delta_{\bar{x}}$ – напівширина довірчого інтервалу;

коефіцієнт Стюдента при $P=0,95$ та числі ступенів свободи $6 - 2,4469$.

е) Визначення відносної похибки середнього значення:

$$\bar{\varepsilon} = \frac{\Delta_{\bar{x}}}{\bar{x}} \cdot 100\% .$$

Результати, які представлені у Таблиці 6, дозволяють зробити висновок про стабільність етанольних та ацетонітрильних розчинів на протязі однієї години.

Таблиця 6.

Вивчення стабільності розчинів у часі.

№	Величина абсорбції, t, хв.							Середнє	RSD,%	Довірчий інтервал	Відносна похибка середнього значення	Дисперсія
	0	10	20	30	40	50	60					
Стандарт, розчин А $\lambda = 310$ нм	0,084	0,084	0,082	0,082	0,084	0,084	0,084	0,083	1,17	0,083±0,00090	1,08	9,52·10 ⁻⁷
Стандарт, розчин В $\lambda = 320$ нм	0,091	0,092	0,091	0,090	0,091	0,092	0,091	0,091	0,76	0,091±0,00064	0,70	4,76·10 ⁻⁷

3.1.3. Специфічність методики.

Апробування запропонованої методики безпосередньо на твердих лікарських формах дає можливість зробити висновок про специфічність методики [15-19] оскільки запропоновані аналітичні дії дозволяють кількісно визначати діючу речовину варфарин к присутності інших допоміжних речовин з мінімальною похибкою у визначенні.

3.1.4. Перевірка методики на правильність.

Висновок про правильність методики ми робили аналізуючи результати робасності методики та оцінку стабільності розчинів з часом. Враховуючи експериментальні дані та спираючись на нормативні документи [15-19], можна вважати методику правильною.

ВИСНОВКИ

1. Результатом проведеного бібліосемантичного аналізу було визначено застосування препаратів з варфарином, властивості варфарину та фармакологію, механізм дії та метаболізм.
2. Проаналізовано ідентифікацію та методики кількісного визначення варфарину.
3. Оптимізована альтернативна методика кількісного визначення варфарину у таблетках ультрафіолетовою спектрофотометрією.
4. Проведено апробацію та часткову валідацію методики ультрафіолетового спектрофотометричного визначення варфарину у твердих лікарських формах.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2823/antikoagulyanti>.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Pharmacology / [M. A. Clark, R. Finkel, J. A. Rey et al.]. – [7th ed.]. – Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins, 2018. – 638 p.
7. www.pharma-center.com.ua.веб-сайт ДЦФ МОЗ України [web-page] URL
8. Gechanaya, O. V. (2019). Спектрофотометричний метод кількісного визначення варфарину натрію клатрату в субстанції та таблетках. *Фармацевтичний журнал*, (5), 84-91.
9. Smirnova T.D., Nevryueva NV, Shytykov SM, and others. Determination of warfarin by sensitized fluorescence method with the use of organized media // *Zh. analyte ximia* - 2009. - Т. 64, No. 11. - P. 1114-1119.

10. Tkacheva N.A. Investigation of influence of Vkorc 1c1173T genotype on pharmacokinetic parameters of warfarin metabolism // Rus. honey. journ - 2005. - No. 1. - P. 15-17.
11. European Pharmacopoeia 9.8. Schisandra fruit. European directorate for the quality of medicines. Strasburg. – 2019. P. 3553-3555.
12. Державна фармакопея України: Доп. 1. — Х.: РІРЕГ, 2004. — С. 85—100.
13. Аналітична хімія / В.В. Болотов, О.М. Свєчнікова, С.В. Колісник та ін. — Х., 2004; ДФУ. — Х., 2001.
14. Фармацевтична хімія: Підручник. Ред. П.О. Безуглий. – Вінниця: Нова Книга, 2008 – 560с.
15. 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.
16. 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.
17. Гризодуб А.И. Валидация спектофотометрических методик количественного анализа лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ. *Фармаком*. 2002. №3. С.42 – 50.
18. Гризодуб А.И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств – Харьков: Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств, 2016. – 396 с.

ДОДАТКИ

Додаток 1 Витяг з Європейської Фармакопеї.

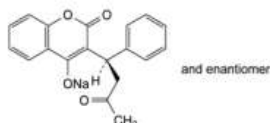
EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.0

Warfarin sodium

01/2008:0698 Run time: twice the retention time of warfarin.

WARFARIN SODIUM

Warfarinum natriicum

C₁₉H₁₅NaO₄
[129-06-6]M_r 330.3

DEFINITION

Sodium 2-oxo-3-[(1R)-3-oxo-1-phenylbutyl]-2H-1-benzopyran-4-olate.

Content: 98.0 per cent to 102.0 per cent (anhydrous substance).

CHARACTERS

Appearance: white or almost white, hygroscopic, amorphous powder.**Solubility:** very soluble in water and in ethanol (96 per cent), soluble in acetone, very slightly soluble in methylene chloride.

IDENTIFICATION

A. Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

Comparison: warfarin sodium CRS.

B. Dissolve 1 g in 10 mL of water R, add 5 mL of nitric acid R and filter. To the filtrate add 2 mL of potassium dichromate solution R1 and shake for 5 min. Allow to stand for 20 min. The solution is not greenish-blue when compared with a blank.

C. It gives reaction (b) of sodium (2.3.1).

TESTS

Appearance of solution. The solution is clear (2.2.1) and colourless (2.2.2, Method II).

Dissolve 1.0 g in water R and dilute to 20 mL with the same solvent.

pH (2.2.3): 7.6 to 8.6.

Dissolve 1.0 g in carbon dioxide-free water R and dilute to 100 mL with the same solvent.

Related substances. Liquid chromatography (2.2.29).*Solvent mixture:* methanol R, water R (25:75 V/V).*Test solution.* Dissolve 40.0 mg of the substance to be examined in the solvent mixture and dilute to 50.0 mL with the solvent mixture.*Reference solution (a).* Dissolve 2 mg of 4-hydroxycoumarin R (impurity B) and 2 mg of benzalacetone R (impurity C) in 25 mL of methanol R and dilute to 100 mL with water R.*Reference solution (b).* Dilute 1.0 mL of the test solution to 100.0 mL with the solvent mixture. Dilute 1.0 mL of this solution to 10.0 mL with the solvent mixture.**Column:**– size: $l = 0.25$ m, $\varnothing = 4.0$ mm;– stationary phase: spherical nitrile silica gel for chromatography R (5 μ m);

– temperature: 30 °C.

Mobile phase: glacial acetic acid R, acetonitrile R, water R (1:25:75 V/V/V).*Flow rate:* 1.5 mL/min.*Detection:* spectrophotometer at 260 nm.*Injection:* 20 μ L.**Relative retention** with reference to warfarin (retention time = about 9 min): impurity B = about 0.4; impurity C = about 0.6.**System suitability:** reference solution (a):

– resolution: minimum 2.0 between the peaks due to impurities B and C.

Limits:

– correction factors: for the calculation of content, multiply the peak areas of the following impurities by the corresponding correction factor: impurity B = 0.5; impurity C = 0.4;

– impurities B, C: for each impurity, not more than the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.1 per cent);

– unspecified impurities: for each impurity, not more than the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.10 per cent);

– total: not more than 3 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.3 per cent);

– disregard limit: 0.5 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.05 per cent).

Phenolic ketones. Dissolve 1.25 g in a 20 g/L solution of sodium hydroxide R and dilute to 10.0 mL with the same solvent. The absorbance (2.2.25) is maximum 0.20 measured at 385 nm within 15 min of preparing the solution.**Water** (2.5.12): maximum 4.0 per cent, determined on 0.750 g.

ASSAY

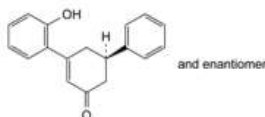
Dissolve 0.100 g in 0.01 M sodium hydroxide and dilute to 100.0 mL with the same solvent. Dilute 10.0 mL of the solution to 100.0 mL with 0.01 M sodium hydroxide. Dilute 10.0 mL of this solution to 100.0 mL with 0.01 M sodium hydroxide. Measure the absorbance (2.2.25) at the absorption maximum at 308 nm.

Calculate the percentage content of C₁₉H₁₅NaO₄ taking the specific absorbance to be 431.

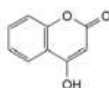
STORAGE

In an airtight container, protected from light.

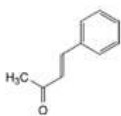
IMPURITIES

Specified impurities: B, C.**Other detectable impurities** (the following substances would, if present at a sufficient level, be detected by one or other of the tests in the monograph. They are limited by the general acceptance criterion for other/unspecified impurities and/or by the general monograph *Substances for pharmaceutical use* (2034). It is therefore not necessary to identify these impurities for demonstration of compliance. See also 5.10. **Control of impurities in substances for pharmaceutical use:** A.

A. (5R)-3-(2-hydroxyphenyl)-5-phenylcyclohex-2-enone,



B. 4-hydroxy-2H-1-benzopyran-2-one (4-hydroxycoumarin),

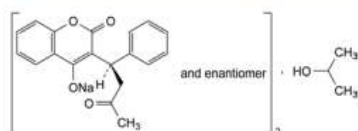


C. (3E)-4-phenylbut-3-en-2-one (benzalacetone).

01/2008:0699

WARFARIN SODIUM CLATHRATE

Warfarinum natriicum clathratum



DEFINITION

Mixture, in the form of a clathrate, of warfarin sodium (sodium 2-oxo-3-[(1R)-3-oxo-1-phenylbutyl]-2H-1-benzopyran-4-olate) and propan-2-ol in molecular proportions 2:1 (equivalent to about 92 per cent of warfarin sodium).

Content:

- warfarin sodium: 98.0 per cent to 102.0 per cent (anhydrous and propan-2-ol-free substance);
- propan-2-ol: 8.0 per cent to 8.5 per cent.

CHARACTERS

Appearance: white or almost white, crystalline powder.

Solubility: very soluble in water, freely soluble in ethanol (96 per cent), soluble in acetone, very slightly soluble in methylene chloride.

IDENTIFICATION

A. Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

Comparison: warfarin sodium clathrate CRS.

B. Dissolve 1 g in 10 mL of water R, add 5 mL of nitric acid R and filter. To the filtrate add 2 mL of potassium dichromate solution R1 and shake for 5 min. Allow to stand for 20 min. The solution is greenish-blue when compared with a blank.

C. It gives reaction (b) of sodium (2.3.1).

TESTS

Appearance of solution. The solution is clear (2.2.1) and colourless (2.2.2, Method II).

Dissolve 1.0 g in water R and dilute to 20 mL with the same solvent.

pH (2.2.3): 7.6 to 8.6.

Dissolve 1.0 g in carbon dioxide-free water R and dilute to 100 mL with the same solvent.

Related substances. Liquid chromatography (2.2.29).

Solvent mixture: methanol R, water R (25:75 V/V).

Test solution. Dissolve 40.0 mg of the substance to be examined in the solvent mixture and dilute to 50.0 mL with the solvent mixture.

Reference solution (a). Dissolve 2 mg of 4-hydroxycoumarin R (warfarin impurity B) and 2 mg of benzalacetone R (warfarin impurity C) in 25 mL of methanol R and dilute to 100 mL with water R.

Reference solution (b). Dilute 1.0 mL of the test solution to 100.0 mL with the solvent mixture. Dilute 1.0 mL of this solution to 10.0 mL with the solvent mixture.

Column:

- size: $l = 0.25$ m, $\varnothing = 4.0$ mm;

- stationary phase: spherical nitrile silica gel for chromatography R (5 μ m);
- temperature: 30 °C.

Mobile phase: glacial acetic acid R, acetonitrile R, water R (1:25:75 V/V/V).

Flow rate: 1.5 mL/min.

Detection: spectrophotometer at 260 nm.

Injection: 20 μ L.

Run time: twice the retention time of warfarin.

Relative retention with reference to warfarin (retention time = about 9 min): impurity B = about 0.4; impurity C = about 0.6.

System suitability: reference solution (a):

- resolution: minimum 2.0 between the peaks due to impurities B and C.

Limits:

- correction factors: for the calculation of content, multiply the peak areas of the following impurities by the corresponding correction factor: impurity B = 0.5; impurity C = 0.4;
- impurities B, C: for each impurity, not more than the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.1 per cent);
- unspecified impurities: for each impurity, not more than the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.10 per cent);
- total: not more than 3 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.3 per cent);
- disregard limit: 0.5 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.05 per cent).

Phenolic ketones: the absorbance (2.2.25) is maximum 0.20 measured at 385 nm within 15 min of preparing the solution. Dissolve 1.25 g in a 20 g/L solution of sodium hydroxide R and dilute to 10.0 mL with the same solvent.

Propan-2-ol. Gas chromatography (2.2.28).

Internal standard solution. Dilute 1.0 mL of propanol R to 200.0 mL with water R.

Test solution (a). Dissolve 0.250 g of the substance to be examined in water R and dilute to 5.0 mL with the same solvent.

Test solution (b). Dissolve 0.50 g of the substance to be examined in the internal standard solution and dilute to 10.0 mL with the internal standard solution.

Reference solution. Dilute 0.50 mL of 2-propanol R to 100.0 mL with the internal standard solution.

Column:

- size: $l = 1.5$ m, $\varnothing = 4$ mm;
- stationary phase: ethylvinylbenzene-divinylbenzene copolymer R (125–150 μ m).

Carrier gas: nitrogen for chromatography R.

Flow rate: 40 mL/min.

Temperature:

- column: 150 °C;
- injection port: 180 °C;
- detector: 200 °C.

Detection: flame ionisation.

Injection: the chosen volume of the test solutions and the reference solution.

Calculate the content of propan-2-ol taking its density at 20 °C to be 0.785 g/mL.

Limit:

- propan-2-ol: 8.0 per cent to 8.5 per cent.

Water (2.5.12): maximum 0.3 per cent, determined on 2.500 g.

ASSAY

Dissolve 0.100 g in 0.01 M sodium hydroxide and dilute to 100.0 mL with the same solvent. Dilute 10.0 mL of the solution to 100.0 mL with 0.01 M sodium hydroxide. Dilute 10.0 mL of this solution to 100.0 mL with 0.01 M sodium hydroxide. Measure the absorbance (2.2.25) at the absorption maximum at 308 nm.

Calculate the percentage content of warfarin sodium ($C_{19}H_{15}NaO_4$) taking the specific absorbance to be 431.

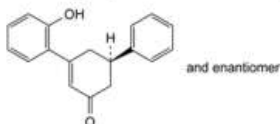
STORAGE

In an airtight container, protected from light.

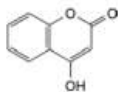
IMPURITIES

Specified impurities: B, C.

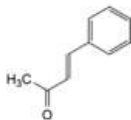
Other detectable impurities (the following substances would, if present at a sufficient level, be detected by one or other of the tests in the monograph. They are limited by the general acceptance criterion for other/unspecified impurities and/or by the general monograph *Substances for pharmaceutical use* (2034). It is therefore not necessary to identify these impurities for demonstration of compliance. See also 5.10. *Control of impurities in substances for pharmaceutical use*): A.



A. (5R)-3-(2-hydroxyphenyl)-5-phenylcyclohex-2-enone,



B. 4-hydroxy-2H-1-benzopyran-2-one (4-hydroxycoumarin),



C. (3E)-4-phenylbut-3-en-2-one (benzalacetone).

01/2009:0169

WATER FOR INJECTIONS

Aqua ad iniectabile

H₂O

M, 18.02

DEFINITION

Water for the preparation of medicines for parenteral administration when water is used as vehicle (water for injections in bulk) and for dissolving or diluting substances or preparations for parenteral administration (sterilised water for injections).

Water for injections in bulk

PRODUCTION

Water for injections in bulk is obtained from water that complies with the regulations on water intended for human consumption laid down by the competent authority or from

purified water by distillation in an apparatus of which the parts in contact with the water are of neutral glass, quartz or a suitable metal and which is fitted with an effective device to prevent the entrainment of droplets. The correct maintenance of the apparatus is essential. The first portion of the distillate obtained when the apparatus begins to function is discarded and the distillate is collected.

In order to ensure the appropriate quality of the water, validated procedures and in-process-monitoring of the electrical conductivity and regular microbial monitoring are applied.

Water for injections in bulk is stored and distributed in conditions designed to prevent growth of micro-organisms and to avoid any other contamination.

Microbiological monitoring. During production and subsequent storage, appropriate measures are taken to ensure that the microbial count is adequately controlled and monitored. Appropriate alert and action levels are set so as to detect adverse trends. Under normal conditions, an appropriate action level is a microbial count of 10 CFU per 100 mL when determined by filtration through a membrane with a nominal pore size not greater than 0.45 µm, using R2A agar, using at least 200 mL of water for injections in bulk and incubating at 30-35 °C for not less than 5 days. For aseptic processing, stricter alert levels may need to be applied.

R2A agar

Yeast extract	0.5 g
Proteose peptone	0.5 g
Casein hydrolysate	0.5 g
Glucose	0.5 g
Starch	0.5 g
Dipotassium hydrogen phosphate	0.3 g
Magnesium sulfate, anhydrous	0.024 g
Sodium pyruvate	0.3 g
Agar	15.0 g
Purified water	to 1000 mL

Adjust the pH so that after sterilisation it is 7.2 ± 0.2. Sterilise by heating in an autoclave at 121 °C for 15 min.

Growth promotion of R2A agar

– *Preparation of test strains.* Use standardised stable suspensions of test strains or prepare them as stated in Table 0169.-1. Seed lot culture maintenance techniques (seed-lot systems) are used so that the viable micro-organisms used for inoculation are not more than 5 passages removed from the original master seed-lot. Grow each of the bacterial strains separately as described in Table 0169.-1. Use buffered sodium chloride-peptone solution pH 7.0 or phosphate buffer solution pH 7.2 to make test suspensions. Use the suspensions within 2 h, or within 24 h if stored at 2-8 °C. As an alternative to preparing and then diluting a fresh suspension of vegetative cells of *Bacillus subtilis*, a stable spore suspension is prepared and then an appropriate volume of the spore suspension is used for test inoculation. The stable spore suspension may be maintained at 2-8 °C for a validated period of time.

– *Growth promotion.* Test each batch of ready-prepared medium and each batch of medium, prepared either from dehydrated medium or from the ingredients described. Inoculate plates of R2A agar separately with a small number (not more than 100 CFU) of the micro-organisms indicated in Table 0169.-1. Incubate under the conditions described in the table. Growth obtained must not differ by a factor greater than 2 from the calculated value for a standardised inoculum. For a freshly prepared inoculum, growth of the micro-organisms must be comparable to that obtained with a previously tested and approved batch of medium.

Додаток 2.

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



Додаток 3.

Спектрофотометр Jenway 6305 (Велика Британія).





АНОТАЦІЯ (SUMMARY)

Warfarin belongs to anticoagulants of indirect action, it is an antagonist of vitamin K and, from a chemical point of view, is a derivative of coumarin.

Warfarin is recommended by doctors for the prevention of various thrombosis, it is well absorbed and its bioavailability reaches 90 percent.

Unfortunately, when taken therapeutically, warfarin causes side effects: hemorrhages, diarrhea, an increase in the concentration of liver enzymes, necrosis, and rashes, therefore, control of the concentration of the active substance in the dosage form is one of the most important tasks of pharmaceutical chemistry.

The aim of our work was to optimize the method of UV spectrophotometric determination of warfarin in solid dosage form and to carry out partial validation of the method.

As a result of carrying out certain scientific investigations, we found out that enough methods of quantitative determination of warfarin in tablets by HPLC, sensitizing fluorescence and mass spectrometry methods have been proposed and tested. In our opinion, the UV spectrophotometry method is the most optimal, as it is not expensive, but at the same time, it is accurate, modern and easy to perform. UV - spectrophotometric determination was carried out at a wavelength of 310 nm (solvent ethyl alcohol) and at a wavelength of 320 nm (solvent acetonitrile) in cuvettes with a solution layer thickness $l = 1.0$ cm, the concentration of the investigated solution was determined according to the Law of light absorption by the standard method.

Conclusion. The method of quantitative determination of warfarin in tablets by UV-spectrophotometry was optimized, the method was partially validated.