

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 німодипіну у твердих лікарських формах

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

Васюхнова Анастасія Геннадіївна

Науковий керівник:

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

Рева Тетяна Дмитрівна

Київ – 2024

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів.	4
Вступ.	5
Основна частина. Розділ 1. Німодипін, методи визначення.	7
1.1. Застосування німодипіну.	7
1.2. Фізико-хімічні властивості німодипіну.	7
1.3. Механізм та метаболізм німодипіну.	8
1.4. Фармакологічні ефекти, побічні ефекти та передозування.	9
1.5. Методи ідентифікації та кількісного визначення.	11
1.6. Спектрофотометричні методи дослідження.	11
Розділ 2. Експериментальна частина.	13
2.1. Матеріали та методи.	13
2.1.1. Мета дослідження.	13
2.1.2. Об'єкти дослідження.	13
2.1.3. Посуд та обладнання.	15
2.1.4. Реактиви.	15
2.1.5. Методика та умови приготування розчинів.	16
2.1.6. Методика спектрофотометричного визначення.	16
2.1.7. Кількісне визначення.	17
Розділ 3. Результати та обговорення.	18

3.1.	Часткова валідація методики.	22
3.1.1.	Робасність.	23
3.1.2.	Стабільність розчинів у часі.	23
3.1.3.	Лінійність методики.	28
3.1.4.	Специфічність методики.	29
3.1.5.	Перевірка методики на правильність.	29
	Висновки.	30
	Список використаних джерел.	31
	Додатки.	34
	Анотація (Summary).	

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

ДМФА - N,N - диметилформаїд

ДФУ - державна фармакопея України

Ph.Eur. – European Pharmacopoeia

НМУ – Національний медичний університет імені 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

Німодипін є препаратом другого покоління дигідропіридинових антогоністів катіонів Кальцію, який діє лише на судини головного мозку і призначається пацієнтам з субарахноїдальним крововиливом [1,2].

Субарахноїдальний крововилив є гострим порушенням мозкового кровообігу, супроводжується структурними і морфологічними змінами у тканинах мозку і здебільшого виникає внаслідок фізичного або емоційного перенапруження (Рис.1, [2]):



Рис 1. Субарахноїдальний крововилив.

Симптомами є раптовий інтенсивний головний біль, який супроводжується втратою свідомості, блюванням, вегетативними порушеннями тощо.

Актуальність теми: Пошук альтернативних методик кількісного визначення німодипіну.

Мета: розробити та апробувати методику кількісного визначення німодипіну у таблетках спектрофотометричним методом.

Завдання:

1. Провести бібліосемантичний аналіз щодо застосування препаратів з німодипіном, проаналізувати його фізико-хімічні та фармакологічні властивості, механізм дії препарату та метаболізм.

2. Проаналізувати ідентифікацію та методики кількісного визначення німодипіну.

3. На основі виконаного бібліосемантичного аналізу розробити альтернативну методику кількісного визначення німодипіну з таблетованих форм методом спектрофотометрії.

4. Провести апробацію та часткову валідацію методики спектрофотометричного визначення німодипіну у твердих лікарських формах.

Методи дослідження: бібліосемантичний, спектрофотометричний.

Новизна та значення одержаних результатів: Запропонована альтернативна методика кількісного визначення німодипіну у твердих лікарських формах спектрофотометричним методом.

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.

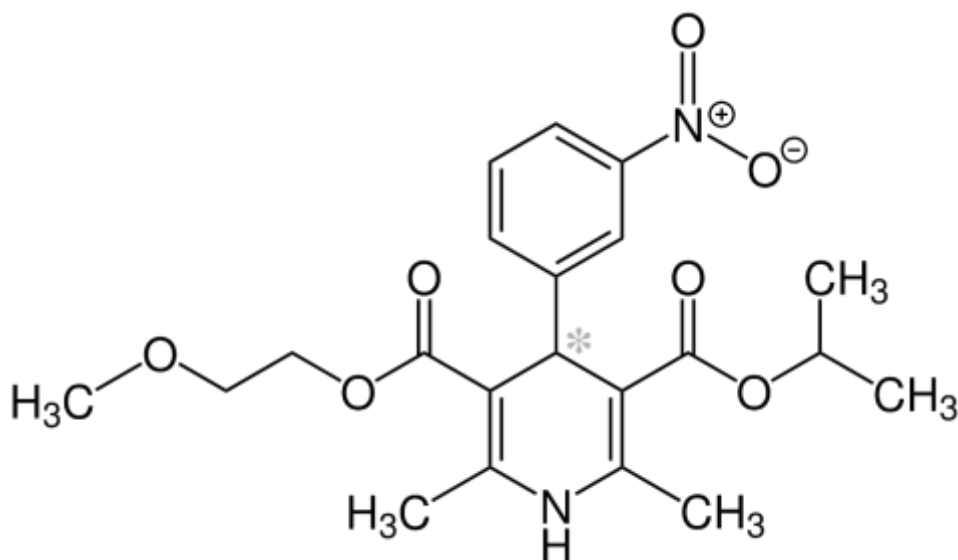
Структура роботи. Робота представлена на 43 сторінках, додатків -4, рисунків- 3, таблиць- 3.

ОСНОВНА ЧАСТИНА. Розділ 1. Німодипін, методи визначення.

1.1 Застосування німодипіну.

Лікарські засоби з німодипіном застосовують при порушеннях мозгового кровообігу, спазмах судин головного мозку, хворобі Альцгеймера [2,3].

1.2. Фізико-хімічні властивості німодипіну.



За IUPAC хімічна речовина має наступну назву: 3-(2-methoxyethyl) 5-propan-2-yl 2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate [3].

Формула сполуки: $C_{21}H_{26}N_2O_7$.

Молярна маса німодипіну становить 418,44 г/моль.

Це сполука синтетичного походження, за агрегатним станом це жовтий кристалічний порошок, у воді майже нерозчинний. Розчиняється у

етилацетаті, незначно у етиловому спирті. Деякі фізико-хімічні характеристики наведені нижче:

$T_{пл} — 125\text{ }^{\circ}\text{C. (+)}$, $[\alpha]_D^{20} = +7,9^{\circ}$ ($c=0,439$ у діоксані).

$[\alpha]_D^{20} = -7,93^{\circ}$ ($c=0,374$ у діоксані) [3].

Зберігають речовину у хімічному посуді з темного скла без доступу світла і повітря.

1.3. Механізм дії та метаболізм німодипіну.

Німодипін є селективним блокатором кальцієвих каналів L-типу, тобто є антагоністом катіонів Ca^{2+} . Німодипін проявляє судинорозширюючу дію по відношенню до судин головного мозку, є спазмолітиком, збільшує перфузію в уражених ділянках мозку. Терапевтичний ефект німодипіну заключається у зменшенні виявів різних патологічних станів неврології і стабілізації функціонального стану нейронів головного мозку. При прийомі препарату спочатку 50% активної діючої речовини всмоктується з шлунково-кишкового тракту і через 10-15 хвилин метаболіти цієї речовини вже можна виявити у плазмі крові. Максимум концентрації препарату у крові досягається через 60 хвилин і в середньому має значення 30 мг/мл. Німодипін відрізняється низькою біодоступністю, інтенсивний метаболізм спостерігається у печінці, виводиться з організму у вигляді неактивних метаболітів нирками (50%) та жовчу (30%)[3-4].

1.4. Фармакологічні ефекти, побічні ефекти та передозування.

Німодипін відноситься до фармакологічної групи C08CA06, посилює гіпотензивну дію антигіпертензивних препаратів, тому, у поєднанні з іншими антагоністами катіонів Ca^{2+} можливе взаємне посилення фармакологічних ефектів з ніфедипіном, верапомілом тощо. Побічними ефектами при використанні препарату може бути зниження артеріального тиску, брадикардія або тахікардія, нудота, пітливість, збудження, депресія, безсоння [4-11].

Одночасно з німодипіном доцільно призначати гепапротектори, протипоказано прийом при важких порушеннях функції печінки, набряку тканин головного мозку, у період вагітності та лактації.

Взаємодія з іншими препаратами при одночасному прийомі.

Лікарські засоби, які впливають на ферментативну систему P450 3A4 при пероральному застосуванні з німодипіном змінюють метаболізм німодипіну.

Одночасний прийом флуоксетину з німодипіном призводить до збільшення концентрації у плазмі крові останнього на 50% у хворих пацієнтів літнього віку.

Рифампіцин підсилює метаболізм німодипіну, тобто знижує ефективність німодипіну. Одночасний прийом рифампіцину та німодипіну протипоказан.

Одночасний прийом німодипіну з протиепілептичними засобами (фенобарбітал, карбамазепін тощо) зменшує біодоступність та ефективність німодипіну. Одночасний прийом з протиепілептичними засобами не рекомендується.

Макролідні антибіотики (кларитроміцин, телітроміцин), інгібітори HIV-протеаз та HCV-протеаз (індинавір, нелфінавір, саквінавір, боцепревір), азольні антимікотики (кетоназол, ітраконазол тощо) впливають на терапевтичний ефект німодипіну оскільки є інгібіторами цитохрому P450, і, при одночасному прийомі з ним, пацієнту необхідно контролювати артеріальний тиск.

Гіпотензивні препарати при одночасному прийомі з німодипіном посилюють гіпотензивний ефект.

Не рекомендується одночасне вживання німодипіну з напоями, які містять грейпфрутовий сік [4-11].

1.5. Методи ідентифікації та кількісного визначення німодипіну.

Субстанцію Німодипін ідентифікують фізико-хімічним методом за ІЧ-спектром поглинання [12]. Кількісно німодипін визначають цериметричним титруванням у неводному середовищі з індикатором фероїном [12].

За Європейською фармакопеєю [13] (Додаток 1) субстанцію визначають методом рідинної хроматографії. При цьому використовують, як нерухому фазу, колонку розміром 0,125 м на 4,6 мм наповнену октадецилсилікагелем для хроматографії при температурі 40⁰С, рухомою фазою обирають суміш метанол – тетрагідрофуран -вода у співвідношенні 20:20:60. Швидкість потоку 2 мл/хв., інжекція 20 мкл. Детектування спектрофотометричне при довжині хвилі 235 нм.

1.6. Спектрофотометричні методи дослідження.

Спектрофотометричні методи дослідження (далі – спектрофотометрія, Додаток 2) це група методів, які відносяться до оптичних методів аналізу [14]. Спектрофотометрія заснована на визначенні фізико-хімічних величин (аналізі аналітичного сигналу, який виникає при взаємодії електромагнітного випромінювання з речовиною) при вивченні спектрів поглинання твердих та рідких сполук в УФ-, ІЧ – та видимій області. При кількісному визначенні аналізованої речовини, як правило, дослідник використовує кольорові реакції, тобто, якщо речовина безбарвна, однією з методичних задач є пошук переводу аналізованої речовини у забарвлену сполуку (проведення попередньої фотометричної реакції).

Оптичні методи засновані на головному законі світлопоглинання Бугера-Ламберта-Бера, який пов'язує прямою залежністю оптичну густину розчину (якщо речовина у розчині однорідна) з певною товщиною речовини та його концентрацією.

Кількісний спектрофотометричний аналіз речовини проводять при сталій довжині хвилі монохроматичного світла. У роботах при визначенні концентрації аналізованої речовини використовують метод добавок, метод стандарту або концентрацію діючої (аналізованої) речовини визначають за градувальним (калібрувальним) графіком [14].

Розділ 2. Експериментальна частина.

Робота була виконана на кафедрі аналітичної, фізичної та колоїдної хімії Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

2.1. Матеріали та методи.

2.1.1. Мета дослідження.

В результаті бібліосемантичного аналізу було з'ясовано, що кількісне визначення німодипіну, який входить до складу лікарських препаратів можна проводити різноманітними хроматографічними методами [15-19]. Ми згодні з авторами [20], які роблять наголос на тому, що хроматографічні методи є точними і сучасними, але, одночасно, дорогі. Тому постійно треба розробляти нові альтернативні методики кількісного визначення діючої речовини саме у лікарських засобах [20].

Експериментально доведено, що розчин німодипіну у ДМФА взаємодіє з натрій гідроксидом з утворенням комплексної сполуки жовтого кольору. Максимум поглинання цього комплексу знаходиться у межах 440-450 нм [20].

2.1.2. Об'єкти дослідження.

Для кількісного визначення німодипіну ми обрали нижчезазначені тверді лікарські форми:

- препарат Німодипін виробництва ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ» (Зразок 1)
- препарат Немотан виробництва MedochemieLtd., Cyprus, Europe (Зразок 2).

Ці тверді лікарські форми реалізуються аптечними закладами та мають склад:

Зразок 1:

- 1 таблетка містить 30 мг німодипіну (у перерахуванні на 100 % сухої речовини);

Допоміжні речовини:

- Повідон;
- Целюлоза мікрокристалічна;
- Крохмаль кукурудзяний;
- Лактози моногідрат;
- Кросповідон;
- Магнію стеарат;
- Плівкове покриття (гідроксипропілметилцелюлоза, коповідон, поліетиленгліколь, тригліцериди середнього ланцюга, полідекстроза, титану діоксид (E171), заліза оксид червоний (E172), заліза оксид жовтий (E172)).

Зразок 2:

- 1 таблетка містить німодипіну 30 мг;

Допоміжні речовини:

- Повідон K25;
- Целюлоза мікрокристалічна;
- Крохмаль кукурудзяний;
- Кросповідон;
- Магнію стеарат;
- Оболонка: тальк, Opadrywhite OY-28920 (спирт полівініловий, титану діоксид (E 171), тальк, лецитин (E 322), ксантановакамідь (E 415)).

Німодипін виробництва ПАТ НВЦ Немотан виробництва
«Борщагівський ХФЗ», Зразок 1 MedochemieLtd., Cyprus, Europe,
Зразок 2



2.1.3. Посуд та обладнання.

1. Хімічний мірний посуд для приготування розчинів класу точності А.
2. Ваги лабораторні MettlerToledo XS204 (Додаток 3).
3. Спектрофотометр Jenway 6305(Додаток 4).
4. Порцелянова ступка з товкачиком.

2.1.4. Реактиви.

- 1.Розчин ДМФА.
2. Вода дистильована.
3. Натрію гідроксид марки ЧДА.

2.1.5. Методика та умови приготування розчинів.

Приготування стандартного розчину.

Точну наважку субстанції (0,0150 г) переносять у мірну колбу на 25 мл і розчиняють у ДМФА, при необхідності фільтрують. Далі 2 мл приготованого розчину відбирають у мірну колбу на 25 мл, додають 0,5 мл 5% розчину NaOH і доводять ДМФА до риси. Вимірюють оптичну густина. Концентрація розчину становить 0,0024 г на 100мл [20].

Приготування досліджуваних розчинів.

Таблетки Зразків (кожну окремо, маса наважки від 0,1-0,2 г) розтирають у порцеляновій ступці. Наважку розчиняють у ДМФА у мірній колбі на 25 мл, при необхідності фільтрують. Далі 2 мл приготованого розчину відбирають у мірну колбу на 25 мл, додають 0,5 мл 5% розчину NaOH і доводять ДМФА до риси. Вимірюють оптичну густина. Використовують стандартні кювети з товщиною шару 1 см.

Приготування 5% розчину NaOH.

Зважують 25 г кристалічного NaOH і розчиняють у мірній колбі на 500 мл. Вважають, що густина розчину дорівнює 1.

2.1.6. Методика спектрофотометричного визначення.

Оптичну густина приготованих розчинів вимірюють за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 445 нм у кюветах з кварцу з шаром

$l = 1$ см [21].

2.1.7. Кількісне визначення.

Масу діючої речовини німодипін визначають за загальновідомими формулами розрахунків за методом стандарту [21]:

$$M = A \cdot C_0 \cdot M_{cp} \cdot 25 \cdot 25 / A_0 \cdot a \cdot l \cdot 2 \cdot 100$$

A – оптична густина аналізованого розчину

A_0 – оптична густина стандартного розчину

C_0 - концентрація стандартного розчину

M_{cp} - середня маса таблеток, г

a – наважка таблетованої маси, г

l – товщина шару, см

Розділ 3. Результати та їх обговорення.

Перед проведенням спектрофотометричних визначень дослідником вирішується питання щодо умов детектування (вибір довжини хвилі дослідження).

З метою вирішення цього питання дослідник будує спектр поглинання, тобто вивчає залежність оптичної густини від довжини хвилі λ .

Для побудови цієї залежності ми використовували стандартний розчин. Результати представлені у Таблиці 1 та на Рисунку 2.

Таблиця 1. Залежність оптичної густини стандартного розчину А від довжини хвилі λ .

Довжина хвилі λ	349	380	400	420	445	475	520	535	550	565
Оптична густина А	0.056	0.060	0.071	0.081	0.084	0.078	0.042	0.040	0.037	0.031

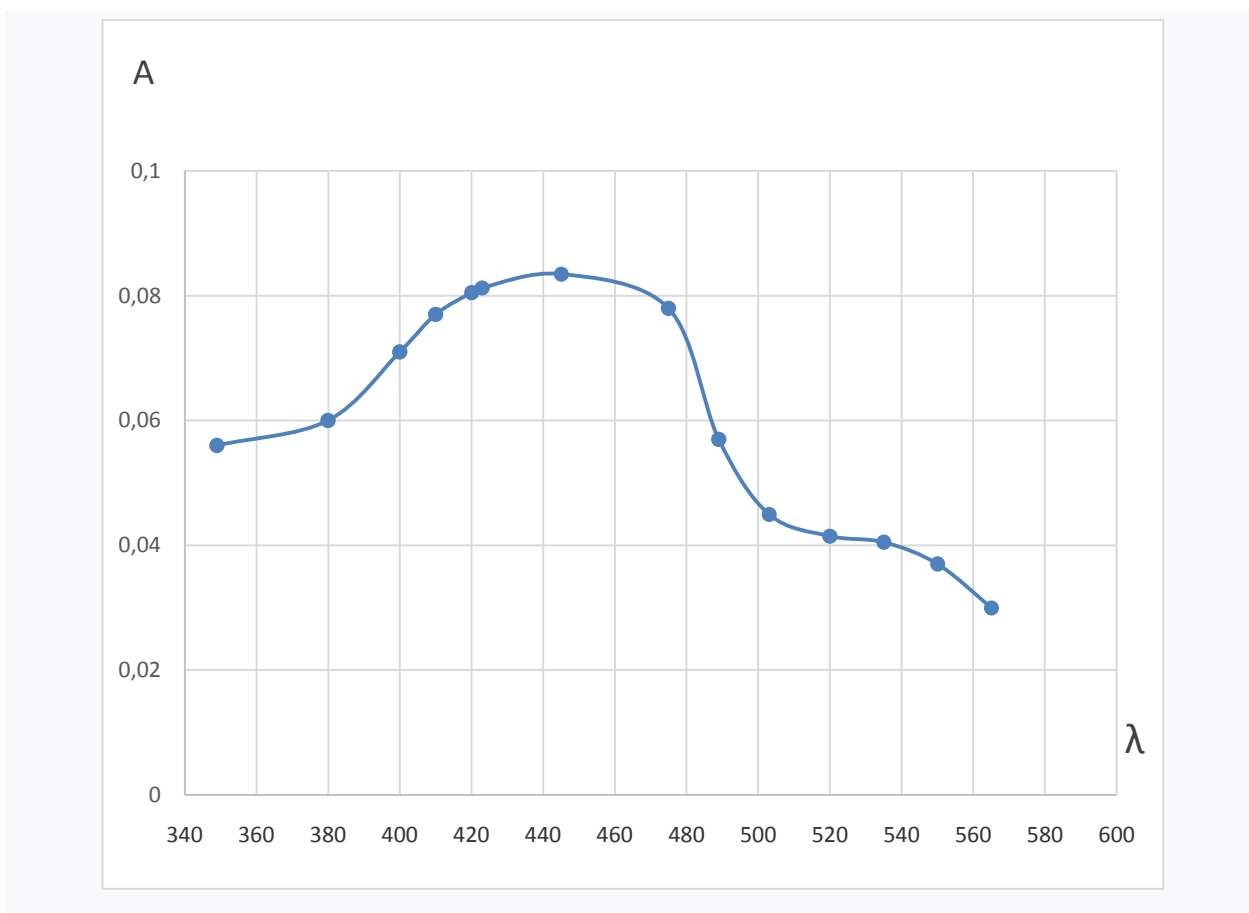


Рис.2. Графічна залежність оптичної густини A від довжини хвилі λ (спектр поглинання).

З наведених експериментальних даних можна зробити висновок, що кількісні вимірювання діючої речовини Німодипін, який входить до складу ТЛФ, доцільно проводити при довжині хвилі 445 нм. Після визначення оптимальної довжини хвилі проводили кількісне визначення німодипіну у таблетках. Результати кількісного визначення наведено у Таблиці 2.

Таблиця 2. Результати кількісного визначення німодипіну у твердих лікарських формах (Зразок 1 та Зразок 2).

ТЛФ	Маса наважки таблетованої форми, г	Маса знайденої діючої речовини, г, в перерахунку на середню масу таблетки
Зразок 1	0,1010	0,0287
		0,0291
		0,0295
		0,0310
		0,0301
Зразок 2	0,1008	0,0279
		0,0302
		0,0289
		0,0305
		0,0303
Вміст німодипіну згідно з ДФУ 0,027-0,033 г, довжина хвилі 445 нм.		

Статистична обробка одержаних результатів:

1) перевірка на наявність грубих похибок.

Перевірка на наявність однорідності вибірок визначали за критерієм Q , який розраховували виходячи з розмаху варіювання R . Для $n = 5$ (кількість вимірювань) R визначали так:

$$R = |x_1 - x_n|, \text{ відповідно, } Q = |x_1 - x_n|/R.$$

Розрахований критерій R порівнювався з контрольним значенням для даній довірчої імовірності $Q_{\text{табл}}(0,95; 5) = 0,64$.

За ДФУ вибірка є однорідною якщо критерій Q не перевищує $Q_{\text{табл}}$, це означає, що вибірка не обтяжена грубими похибками:

Для Зразку 1:

0,0287; 0,0291; 0,0295; 0,0301; 0,0310

$$Q_1 = \frac{0,0291 - 0,0287}{0,0310 - 0,0287} = \frac{0,0004}{0,0023} = 0,174$$

$$Q_2 = \frac{0,0310 - 0,0301}{0,0310 - 0,0287} = \frac{0,0009}{0,0023} = 0,391$$

Для Зразку 2:

0,0279; 0,0289; 0,0302; 0,0303; 0,0305

$$Q_1 = \frac{0,0289 - 0,0279}{0,0305 - 0,0279} = \frac{0,001}{0,0026} = 0,385$$

$$Q_2 = \frac{0,0305 - 0,0303}{0,0305 - 0,0279} = \frac{0,0002}{0,0026} = 0,0769$$

Отже, вибірка однорідна.

2) середнє значення результатів становить для Зразка 1 та 2, відповідно, 0,0297 та 0,0296.

Вміст німодипіну згідно з ДФУ 0,027-0,033 г.

Середнє значення знаходиться в допустимих межах згідно з ДФУ, що свідчить про придатність запропонованої методики.

3) розрахунок метрологічних характеристик середнього результату згідно з ДФУ:

– s – стандартне відхилення

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

$$s = \sqrt{s^2},$$

$$v = n - 1,$$

де v – число ступенів свободи.

$$s \text{ (Зразок 1)} = 0,000901$$

$$s \text{ (Зразок 2)} = 0,001122$$

– $s_{\bar{x}}$ стандартне відхилення середнього результату

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$s_{\bar{x}} (\text{Зразок 1}) = 0,000403$$

$$s_{\bar{x}} (\text{Зразок 2}) = 0,0000502$$

– напівширина довірчого інтервалу середнього результату

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

$$t_{0,95,4} = 2,7764$$

$$\Delta_{\bar{x}} (\text{Зразок 1}) = 0,001119 \approx 0,00112$$

$$\Delta_{\bar{x}} (\text{Зразок 2}) = 0,001393 \approx 0,00139$$

– довірчий інтервал середнього значення

$$\text{для Зразку 1: } 0,0297 \pm 0,00112$$

$$\text{для Зразку 2: } 0,0296 \pm 0,00139$$

– відносна похибка середнього значення:

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

$$\bar{\varepsilon} (\text{Зразок 1}) = 3,77\%$$

$$\bar{\varepsilon} (\text{Зразок 2}) = 4,71\%$$

3.1. Часткова валідація методики.

Нами була проведена часткова валідація запропонованої альтернативної методики кількісного визначення німодипіну у ТЛФ (Зразок 1 та Зразок 2) за робасністю, стабільністю, лінійністю та специфічністю[22-24].

3.1.1. Робасність.

Робасністю називають ступінь нечутливості аналітичної методики до зміни різних умов виконання практикуму, реакції, аналізу тощо. Несуттєві зміни (хімічні реактиви різних партій, температура, людський ресурс тощо) не повинні впливати на напрямок протікання аналітичного процесу. При перевірці запропонованої методики ми аналізували результати роботи Дослідника у різні лабораторні дні. Нижченаведено результати кількісного визначення німодипіну у ТЛФ у різні дати:

	Маса наважки таблетованої форми,г	Маса діючої речовини, г, в перерахунку на середню масу таблетки
Дата 1		
Зразок 1	0,1010	0,0287
Зразок 2	0,1008	0,0279
Дата 2		
Зразок 1	0,1000	0,0291
Зразок 2	0,1000	0,0286

Як видно з наведених даних різниця у визначенні кількісного вмісту Зразка 1 та Зразка 2 не перевищує 2%.

3.1.2. Стабільність розчинів у часі.

Стабільність розчинів у часі вважають однією з цінніших характеристик валідності. Стабільність вивчали як залежність оптичної густини від часу у стані спокою, результати наведено у Таблиці 3.

Стабільність методики визначали за критеріями:

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:

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

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

При RSD від 1% до 5% відтворюваність результатів вимірювання вважають хорошою.

с) 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.

д) 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) відносної похибки середнього значення:

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

Отримані результати дають можливість стверджувати, що розчини є стабільними протягом 60 хвилин.

Таблиця 3.

Вивчення стабільності розчинів у часі.

№	Оптична густина, t, хв.							Середнє	RSD,%	Довірчий інтервал	Відносна похибка середнього значення	Дисперсія
	0	10	20	30	40	50	60					
Стандар	0,08 4	0,084	0,083	0,083	0,083	0,084	0,084	0,0836	0,64	0,0836±0,00 0494	0,59	2,86 * 10 ⁻⁷
Зразок 1	0,08 2	0,086	0,085	0,081	0,083	0,086	0,085	0,084	2,38	0,084±0,001 8	2,20	4,0*10 ⁻⁶
Зразок 2	0,08 1	0,081	0,084	0,084	0,085	0,085	0,085	0,0836	2,17	0,0836±0,00 168	2,01	3,28*10 ⁻⁶

3.1.3. Лінійність методики.

Для визначення параметрів лінійності готували серію стандартних розчинів з концентраціями німодипіну 2,50; 2,75; 3,0; 3,25; 3,50; 3,75; 4,00 мг/100 мл. У контактні колби додавали 0,5 мл 5% розчину NaOH та ДМФА. Вимірювали оптичну густину розчинів А при довжині 445 нм та аналізували отриману лінійну залежність (Рис.3):

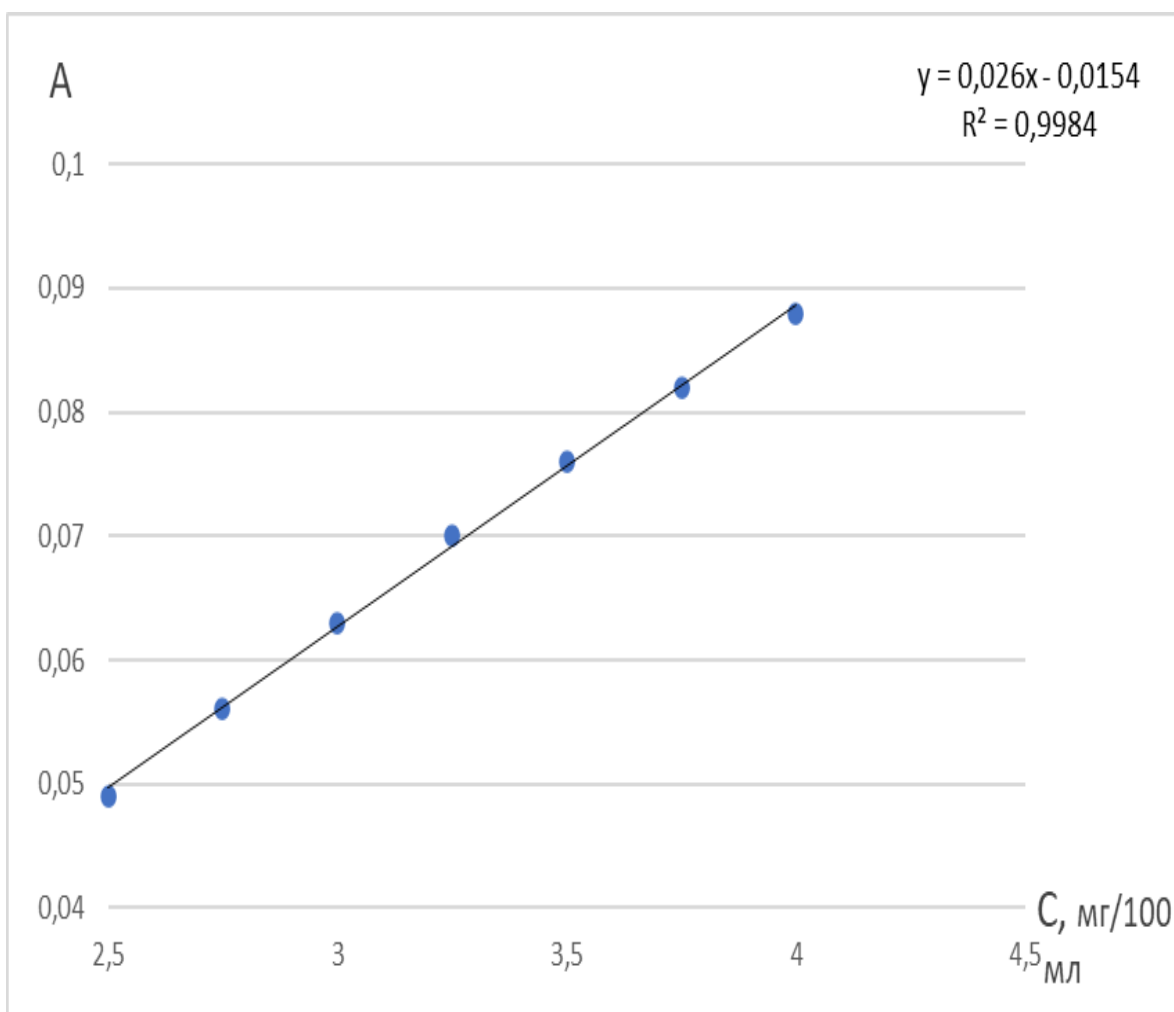


Рис.3. Лінійна залежність оптичної густини А від концентрації німодипіну у стандартних розчинах.

Враховуючи константи у рівнянні прямої ($a = 0,026$, $b = -0,0154$) а також величину стандартного квадратичного відхилення $R^2 = 0,9984$ запропоновану спектрофотометричну методику кількісного визначення німодипіну з ТЛФ можна вважати лінійною.

3.1.4. Специфічність методики.

Специфічністю методики називають валідаційну характеристику, яка дозволяє зробити висновок про спроможність роботи методики у присутності інших іонів, молекул функціональних груп тощо.

Оскільки апробація методики була проведена безпосередньо на твердих лікарських формах, можна зробити висновок про специфічність запропонованої методики.

3.1.5. Перевірка методики на правильність.

Висновок про правильність альтернативної спектрофотометричної методики кількісного визначення німодипіну у ТЛФ ми встановлювали після визначення специфічності, лінійності, робастності та стійкості [22-24]. Враховуючи вищенаведені результати запропоновану спектрофотометричну методику кількісного визначення німодипіну у твердих лікарських формах можна вважати правильною.

ВИСНОВКИ

1. У результаті проведеного дослідження проаналізовано фізико-хімічні властивості, фармакологічні властивості німодипіну, механізм дії препаратів з німодипіном та метаболізм.
2. Проаналізовані методики кількісного визначення німодипіну.
3. Розроблена та апробована альтернативна методика кількісного визначення німодипіну у таблетках методом спектрофотометрії.
4. Проведена часткова валідація методики спектрофотометричного визначення німодипіну у твердих лікарських формах.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Віничук С.М. Нервові хвороби. — К., 2001.
2. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/677/subarachnoidalnij-krovoviliv>.
3. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1249/nimodipin>.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.ОстровськаТ.А.Петрова, Л.М.Рябушко Вінниця: Нова книга, 2020. – 472 с.
8. Pharmacology / [M. A. Clark, R. Finkel, J. A. Rey et al.]. – [7th ed.]. – Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins, 2018. – 638 p.
9. www.pharma-center.com.ua. веб-сайт ДЦФ МОЗ України [web-page] URL
10. Гризодуб А. И., Леонтьев Д.А., Денисенко Н.В. и др. // Фармаком. — 2004. — № 3. — С. 1—15.

11. Харкевич Д.А. Фармакологія. — 8-е изд., перераб. доп. и исправл. — М.: «ГЕОТАР-МЕД», 2004. — 298 с.
12. Державна фармакопея України: Доп. 1. — Х.: РІРЕГ, 2004. — С. 85—100.
13. European Pharmacopoeia 5;
14. Аналітична хімія / В.В. Болотов, О.М. Свечнікова, С.В. Колісник та ін. — Х., 2004; ДФУ. — Х., 2001.
15. G. Ragno, M. Veronico and C. // International J. of Pharmaceutics. — 1995. — Vol. 119. — P. 115—119.
16. Kowalczyk D, Wawrzyszka M.B., Haratym Maj A. // J. AOAC Int. 2006. — Vol. 89(1). — P. 71—7.
17. 6. Muck W., Bode H. // Pharmazie. — 1994. — Vol. 49(2-3). — P. 130—139.
18. Nirogi RV, Kandikere VN, Maurya S, Mudigonda K, Boosi R. // Ibid. — 2006. — Vol. 61(10). — P. 828—34.
18. Qin F., Ma Y., Wang Y, Chen L, Wang D., Li F. // J. Pharm Biomed Anal. — 2008. — Vol. 13; 46(3). — P. 557—62.
19. 9. Yang X., Ke W., Zi P., Liu F., Yu L. // J. Pharm Sei. 2008. - Vol. 97(7). - P. 2702-19.
20. Timoshik, J., & Petrenko, V. (2020). Спектрофотометричне визначення німодипіну за його реакцією з гідроксидом натрію та валідаційна характеристика методики. *Фармацевтичний журнал*, (2), 45-49.
21. Фармацевтична хімія: Підручник. Ред. П.О. Безуглий. — Вінниця: Нова Книга, 2008 — 560с.
22. 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.

23. 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.
24. Haynes W.M. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 94th Edition. CRC Press LLC, Boca Raton. 2013-2014. P. 3–90.

ДОДАТКИ

Додаток 1 Витяг з Європейської Фармакопеї

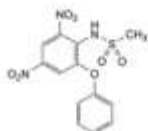
EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.0

Nimodipine

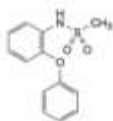
IMPURITIES

Specified impurities: A, B, C, D, E, F.

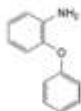
Other detectable impurities (the following substances would, if present at a sufficient level, be detected by one or other of the tests in the monograph. They are limited by the general acceptance criterion for other/unspecified impurities and/or by the general monograph *Substances for pharmaceutical use* (2.0.34). 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*): G.



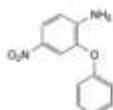
A. N-(2,4-dinitro-6-phenoxyphenyl)methanesulfonamide,



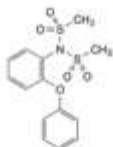
B. N-(2-phenoxyphenyl)methanesulfonamide,



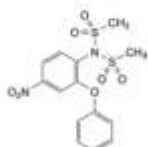
C. 2-phenoxyaniline,



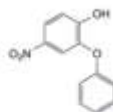
D. 4-nitro-2-phenoxyaniline,



E. N,N-bis(methylsulfonyl)-2-phenoxyaniline,



F. N,N-bis(methylsulfonyl)-4-nitro-2-phenoxyaniline,

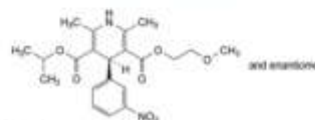


G. 4-nitro-2-phenoxyphenol.

01/2008:1245
corrected 6.0

NIMODIPINE

Nimodipinum

C₂₇H₃₅N₃O₇
[68085-59-4]M_r 418.4

DEFINITION

2-Methoxyethyl 1-methylethyl (4*RS*)-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate.
Content: 98.5 per cent to 101.5 per cent (dried substance).

CHARACTERS

Appearance: light yellow or yellow, crystalline powder.

Solubility: practically insoluble in water, freely soluble in ethyl acetate, sparingly soluble in anhydrous ethanol.

It shows polymorphism (5.9).

Exposure to ultraviolet light leads to the formation of a nitrophenylpyridine derivative.

Prepare solutions immediately before use either protected from light or under long-wavelength light (> 420 nm).

IDENTIFICATION

Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

Comparison: nimodipine CRS.

If the spectra obtained in the solid state show differences, record new spectra using 20 g/L solutions in methylene chloride R and a 0.2 mm cell.

TESTS

Solution S. Dissolve 1.0 g in acetone R and dilute to 20.0 mL with the same solvent.

Appearance of solution. Solution S is clear (2.2.1).

Optical rotation (2.2.7): -0.10° to $+0.10^{\circ}$, determined on solution S.

Related substances. Liquid chromatography (2.2.29).

Test solution. Dissolve 40.0 mg of the substance to be examined in 2.5 mL of tetrahydrofuran R and dilute to 25.0 mL with the mobile phase.

Reference solution (a). Dilute 1.0 mL of the test solution to 100.0 mL with the mobile phase. Dilute 2.0 mL of this solution to 10.0 mL with the mobile phase.

Reference solution (b). Nimodipine impurity A CRS.

Reference solution (c). Dilute the test solution as described in the leaflet accompanying nimodipine impurity A CRS.

Reference solution (d). Mix reference solution (b) and reference solution (c) as described in the leaflet accompanying nimodipine impurity A CRS.

Column:

- size: $l = 0.125$ m, $\varnothing = 4.6$ mm;

Nitrazepam

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.0

- stationary phase: octadecylsilyl silica gel for chromatography R (5 µm);
 - temperature: 40 °C.
- Mobile phase: methanol R, tetrahydrofuran R, water R (20:20:60 V/V/V).
- Flow rate: 2.0 mL/min.
- Detection: spectrophotometer at 235 nm.
- Injection: 20 µL of the test solution and reference solutions (a) and (d).
- Run time: 4 times the retention time of nimodipine.
- Retention time: impurity A = about 7 min; nimodipine = about 8 min.
- System suitability: reference solution (d):
- resolution: minimum 1.5 between the peaks due to impurity A and nimodipine.
- Limits:
- impurity A: not more than the area of the corresponding peak in the chromatogram obtained with reference solution (d) (0.1 per cent);
 - impurities B, C: for each impurity, not more than the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.2 per cent);
 - total: not more than 2.5 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.5 per cent);
 - disregard limit: 0.5 times the area of the peak due to nimodipine in the chromatogram obtained with reference solution (d) (0.05 per cent).

Loss on drying (2.2.32): maximum 0.5 per cent, determined on 1.000 g by drying in an oven at 105 °C.

Sulfated ash (2.4.14): maximum 0.1 per cent, determined on 1.0 g.

ASSAY

Dissolve with gentle heating 0.180 g in a mixture of 25 mL of 2-methyl-2-propanol R and 25 mL of perchloric acid solution R. Add 0.1 mL of ferricin R. Titrate with 0.1 M cerium sulfate. Titrate slowly towards the end of the titration. Carry out a blank titration.

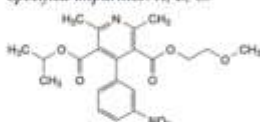
1 mL of 0.1 M cerium sulfate is equivalent to 20.92 mg of C₁₅H₁₀N₂O₃.

STORAGE

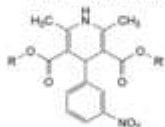
Protected from light.

IMPURITIES

Specified impurities: A, B, C.



A. 2-methoxyethyl 1-methylethyl 2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)pyridine-3,5-dicarboxylate.



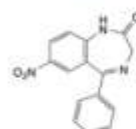
B. R = CH(CH₃)₂; bis(1-methylethyl) 2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate.

C. R = CH₂-CH₂-OCH₃; bis(2-methoxyethyl) 2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate.

04/2010:0415

NITRAZEPAM

Nitrazepamum



C₁₅H₁₀N₂O₃
[146-22-5]

M, 281.3

DEFINITION

7-Nitro-5-phenyl-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-one.
Content: 99.0 per cent to 101.0 per cent (dried substance).

CHARACTERS

Appearance: white or yellow, crystalline powder.

Solubility: practically insoluble in water, slightly soluble in ethanol (96 per cent).

IDENTIFICATION

Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

Comparison: nitrazepam CRS.

TESTS

Related substances. Liquid chromatography (2.2.29). Carry out the test protected from light.

Test solution. Dissolve 50 mg of the substance to be examined in acetonitrile R and dilute to 20.0 mL with the same solvent.

Reference solution (a). Dilute 1.0 mL of the test solution to 100.0 mL with acetonitrile R. Dilute 1.0 mL of this solution to 10.0 mL with acetonitrile R.

Reference solution (b). Dissolve 2 mg of clonazepam CRS in acetonitrile R and dilute to 100.0 mL with the same solvent.

Dilute 1.0 mL of this solution to 10.0 mL with the test solution.

Column:

- size: l = 0.25 m, Ø = 4.0 mm;
- stationary phase: octylsilyl silica gel for chromatography R (5 µm);
- temperature: 40 °C.

Mobile phase:

- mobile phase A: 7.8 g/L solution of sodium dihydrogen phosphate R adjusted to pH 3.0 with phosphoric acid R;
- mobile phase B: acetonitrile R;

Time (min)	Mobile phase A (per cent V/V)	Mobile phase B (per cent V/V)
0 - 3	65	35
3 - 10	65 → 50	35 → 50
10 - 20	50	50

Flow rate: 1 mL/min.

Detection: spectrophotometer at 270 nm.

Injection: 10 µL.

Relative retention with reference to nitrazepam (retention time = about 9 min): clonazepam = about 1.1.

System suitability: reference solution (b):

- peak-to-valley ratio: minimum 4.0, where H_p = height above the baseline of the peak due to clonazepam and H_v = height above the baseline of the lowest point of the curve separating this peak from the peak due to nitrazepam.

Додаток 2. Витяг з Європейської фармакопеї.

2.2.24. Absorption spectrophotometry, infrared

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.0

Operate an atomic absorption spectrometer in accordance with the manufacturer's instructions at the prescribed wavelength. Introduce a blank solution into the atomic generator and adjust the instrument reading so that it indicates maximum transmission. The blank value may be determined by using solvent to zero the apparatus. Introduce the most concentrated reference solution and adjust the sensitivity to obtain a maximum absorbance reading. Rinse in order to avoid contamination and memory effects. After completing the analysis, rinse with *water R* or acidified water.

If a solid sampling technique is applied, full details of the procedure are provided in the monograph.

Ensure that the concentrations to be determined fall preferably within the linear part of the calibration curve. If this is not possible, the calibration plots may also be curved and are then to be applied with appropriate calibration software.

Determinations are made by comparison with reference solutions with known concentrations of the element to be determined either by the method of direct calibration (Method I) or the method of standard additions (Method II).

METHOD I - DIRECT CALIBRATION

For routine measurements 3 reference solutions and a blank solution are prepared and examined.

Prepare the solution of the substance to be examined (test solution) as prescribed in the monograph. Prepare not fewer than 3 reference solutions of the element to be determined, the concentrations of which span the expected value in the test solution. For assay purposes, optimal calibration levels are between 0.7 and 1.3 times the expected content of the element to be determined or the limit prescribed in the monograph. For purity determination, calibration levels are the limit of detection and 1.2 times the limit specified for the element to be determined. Any reagents used in the preparation of the test solution are added to the reference and blank solutions at the same concentration.

Introduce each of the solutions into the instrument using the same number of replicates for each of the solutions to obtain a steady reading.

Calculation. Prepare a calibration curve from the mean of the readings obtained with the reference solutions by plotting the means as a function of concentration. Determine the concentration of the element in the test solution from the curve obtained.

METHOD II - STANDARD ADDITIONS

Add to at least 3 similar volumetric flasks equal volumes of the solution of the substance to be examined (test solution) prepared as prescribed. Add to all but 1 of the flasks progressively larger volumes of a reference solution containing a known concentration of the element to be determined to produce a series of solutions containing steadily increasing concentrations of that element known to give responses in the linear part of the curve, if possible. Dilute the contents of each flask to volume with solvent.

Introduce each of the solutions into the instrument, using the same number of replicates for each of the solutions, to obtain a steady reading.

Calculation. Calculate the linear equation of the graph using a least-squares fit and derive from it the concentration of the element to be determined in the test solution.

VALIDATION OF THE METHOD

Satisfactory performance of methods prescribed in monographs is verified at suitable time intervals.

LINEARITY

Prepare and analyse not fewer than 4 reference solutions over the calibration range and a blank solution. Perform not fewer than 5 replicates.

The calibration curve is calculated by least-square regression from all measured data. The regression curve, the means, the measured data and the confidence interval of the calibration curve are plotted. The operating method is valid when:

- the correlation coefficient is at least 0.99,
- the residuals of each calibration level are randomly distributed around the calibration curve.

Calculate the mean and relative standard deviation for the lowest and highest calibration level.

When the ratio of the estimated standard deviation of the lowest and the highest calibration level is less than 0.5 or greater than 2.0, a more precise estimation of the calibration curve may be obtained using weighted linear regression. Both linear and quadratic weighting functions are applied to the data to find the most appropriate weighting function to be employed. If the means compared to the calibration curve show a deviation from linearity, two-dimensional linear regression is used.

ACCURACY

Verify the accuracy preferably by using a certified reference material (CRM). Where this is not possible, perform a test for recovery.

Recovery. For assay determinations a recovery of 90 per cent to 110 per cent is to be obtained. For other determinations, for example, for trace element determination the test is not valid if recovery is outside of the range 80 per cent to 120 per cent at the theoretical value. Recovery may be determined on a suitable reference solution (matrix solution) which is spiked with a known quantity of analyte (middle concentration of the calibration range).

REPEATABILITY

The repeatability is not greater than 3 per cent for an assay and not greater than 5 per cent for an impurity test.

LIMIT OF QUANTIFICATION

Verify that the limit of quantification (for example, determined using the 10 σ approach) is below the value to be measured.

01/2008:20224

2.2.24. ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY, INFRARED

Infrared spectrophotometers are used for recording spectra in the region of 4000-650 cm^{-1} (2.5-15.4 μm) or in some cases down to 200 cm^{-1} (50 μm).

APPARATUS

Spectrophotometers for recording spectra consist of a suitable light source, monochromator or interferometer and detector.

Fourier transform spectrophotometers use polychromatic radiation and calculate the spectrum in the frequency domain from the original data by Fourier transformation. Spectrophotometers fitted with an optical system capable of producing monochromatic radiation in the measurement region may also be used. Normally the spectrum is given as a function of transmittance, the quotient of the intensity of the transmitted radiation and the incident radiation. It may also be given in absorbance.

The absorbance (A) is defined as the logarithm to base 10 of the reciprocal of the transmittance (T):

$$A = \log_{10} \left(\frac{1}{T} \right) = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

$$T = \frac{I}{I_0}$$

I_0 = intensity of incident radiation,

I = intensity of transmitted radiation.

PREPARATION OF THE SAMPLE

FOR RECORDING BY TRANSMISSION OR ABSORPTION
Prepare the substance by one of the following methods.

Liquids. Examine a liquid either in the form of a film between 2 plates transparent to infrared radiation, or in a cell of suitable path length, also transparent to infrared radiation.

Liquids or solids in solution. Prepare a solution in a suitable solvent. Choose a concentration and a path length of the cell which give a satisfactory spectrum. Generally, good results are obtained with concentrations of 10-100 g/L for a path length of 0.5-0.1 mm. Absorption due to the solvent is compensated by placing in the reference beam a similar cell containing the solvent used. If an FT-IR instrument is used, the absorption is compensated by recording the spectra for the solvent and the sample successively. The solvent absorbance, corrected by a compensation factor, is subtracted using calculation software.

Solids. Examine solids dispersed in a suitable liquid (mull) or in a solid (halide disc), as appropriate. If prescribed in the monograph, make a film of a molten mass between 2 plates transparent to infrared radiation.

A. Mull

Triturate a small quantity of the substance to be examined with the minimum quantity of *liquid paraffin R* or other suitable liquid; 5-10 mg of the substance to be examined is usually sufficient to make an adequate mull using one drop of *liquid paraffin R*. Compress the mull between 2 plates transparent to infrared radiation.

B. Disc

Triturate 1-2 mg of the substance to be examined with 300-400 mg, unless otherwise specified, of finely powdered and dried *potassium bromide R* or *potassium chloride R*. These quantities are usually sufficient to give a disc of 10-15 mm diameter and a spectrum of suitable intensity. If the substance is a hydrochloride, it is recommended to use *potassium chloride R*. Carefully grind the mixture, spread it uniformly in a suitable die, and submit it to a pressure of about 800 MPa (8 t·cm⁻²). For substances that are unstable under normal atmospheric conditions or are hygroscopic, the disc is pressed *in vacuo*. Several factors may cause the formation of faulty discs, such as insufficient or excessive grinding, humidity or other impurities in the dispersion medium or an insufficient reduction of particle size. A disc is rejected if visual examination shows lack of uniform transparency or when transmittance at about 2000 cm⁻¹ (5 μm) in the absence of a specific absorption band is less than 60 per cent without compensation, unless otherwise prescribed.

Gases. Examine gases in a cell transparent to infrared radiation and having an optical path length of about 100 mm. Evacuate the cell and fill to the desired pressure through a stopcock or needle valve using a suitable gas transfer line between the cell and the container of the gas to be examined. If necessary adjust the pressure in the cell to atmospheric pressure using a gas transparent to infrared radiation (for example *nitrogen R* and *argon R*). To avoid absorption interferences due to water, carbon dioxide or other atmospheric gases, place in the reference beam, if possible, an identical cell that is either evacuated or filled with the gas transparent to infrared radiation.

FOR RECORDING BY DIFFUSE REFLECTANCE

Solids. Triturate a mixture of the substance to be examined with finely powdered and dried *potassium bromide R* or *potassium chloride R*. Use a mixture containing approximately 5 per cent of the substance, unless otherwise specified. Grind the mixture, place it in a sample cup and examine the reflectance spectrum.

The spectrum of the sample in absorbance mode may be obtained after mathematical treatment of the spectra by the Kubelka-Munk function.

FOR RECORDING BY ATTENUATED TOTAL REFLECTION

Attenuated total reflection (including multiple reflection) involves light being reflected internally by a transmitting medium, typically for a number of reflections. However, several accessories exist where only one reflection occurs. Prepare the substance as follows. Place the substance to be examined in close contact with an internal reflection element (IRE) such as diamond, germanium, zinc selenide, thallium bromide-thallium iodide (KRS-5) or another suitable material of high refractive index. Ensure close and uniform contact between the substance and the whole crystal surface of the internal reflection element, either by applying pressure or by dissolving the substance in an appropriate solvent, then covering the IRE with the obtained solution and evaporating to dryness. Examine the attenuated total reflectance (ATR) spectrum.

IDENTIFICATION USING REFERENCE SUBSTANCES

Prepare the substance to be examined and the reference substance by the same procedure and record the spectra between 4000-650 cm⁻¹ (2.5-15.4 μm) under the same operational conditions. The transmission minima (absorption maxima) in the spectrum obtained with the substance to be examined correspond in position and relative size to those in the spectrum obtained with the reference substance (CRS).

When the spectra recorded in the solid state show differences in the positions of the transmission minima (absorption maxima), treat the substance to be examined and the reference substance in the same manner so that they crystallise or are produced in the same form, or proceed as prescribed in the monograph, then record the spectra.

IDENTIFICATION USING REFERENCE SPECTRA

Control of resolution performance. For instruments having a monochromator, record the spectrum of a polystyrene film approximately 35 μm in thickness. The difference *x* (see Figure 2.2.24.-1) between the percentage transmittance at the transmission maximum *A* at 2870 cm⁻¹ (3.48 μm) and that at the transmission minimum *B* at 2849.5 cm⁻¹ (3.51 μm) must be greater than 18. The difference *y* between the percentage transmittance at the transmission maximum *C* at 1589 cm⁻¹ (6.29 μm) and that at the transmission minimum *D* at 1583 cm⁻¹ (6.32 μm) must be greater than 10.

For Fourier-transform instruments, use suitable instrument resolution with the appropriate apodisation prescribed by the manufacturer. The resolution is checked by suitable means, for example by recording the spectrum of a polystyrene film approximately 35 μm in thickness. The difference between the absorbances at the absorption minimum at 2870 cm⁻¹ and the absorption maximum at 2849.5 cm⁻¹ is greater than 0.33. The difference between the absorbances at the absorption

minimum at 1589 cm^{-1} and the absorption maximum at 1583 cm^{-1} is greater than 0.08.

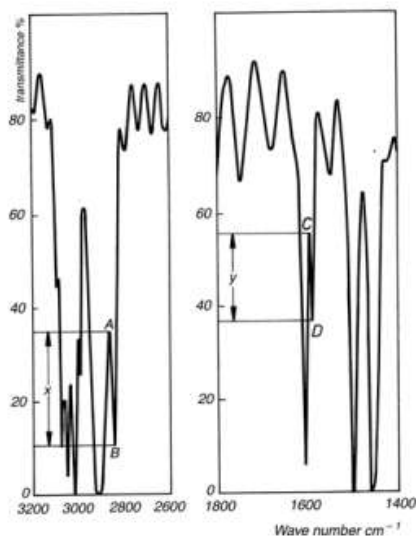


Figure 2.2.24.-1. – Typical spectrum of polystyrene used to verify the resolution performance

Verification of the wave-number scale. The wave-number scale may be verified using a polystyrene film, which has transmission minima (absorption maxima) at the wave numbers (in cm^{-1}) shown in Table 2.2.24.-1.

Table 2.2.24.-1. – Transmission minima and acceptable tolerances of a polystyrene film

Transmission minima (cm^{-1})	Acceptable tolerance (cm^{-1})	
	Monochromator instruments	Fourier-transform instruments
3060.0	± 1.5	± 1.0
2849.5	± 2.0	± 1.0
1942.9	± 1.5	± 1.0
1601.2	± 1.0	± 1.0
1583.0	± 1.0	± 1.0
1154.5	± 1.0	± 1.0
1028.3	± 1.0	± 1.0

Method. Prepare the substance to be examined according to the instructions accompanying the reference spectrum/reference substance. Using the operating conditions that were used to obtain the reference spectrum, which will usually be the same as those for verifying the resolution performance, record the spectrum of the substance to be examined.

The positions and the relative sizes of the bands in the spectrum of the substance to be examined and the reference spectrum are concordant in the 2 spectra.

Compensation for water vapour and atmospheric carbon dioxide. For Fourier-transform instruments, spectral interference from water vapour and carbon dioxide is compensated using suitable algorithms according to the manufacturer's instructions. Alternatively, spectra can be

acquired using suitable purged instruments or ensuring that sample and background single beam spectra are acquired under exactly the same conditions.

IMPURITIES IN GASES

For the analysis of impurities, use a cell transparent to infrared radiation and of suitable optical path length (for example, 1-20 m). Fill the cell as prescribed under Gases. For detection and quantification of the impurities, proceed as prescribed in the monograph.

01/2008:20225

2.2.25. ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY, ULTRAVIOLET AND VISIBLE

Determination of absorbance. The absorbance (A) of a solution is defined as the logarithm to base 10 of the reciprocal of the transmittance (T) for monochromatic radiation:

$$A = \log_{10} \left(\frac{1}{T} \right) = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

$$T = I/I_0;$$

I_0 = intensity of incident monochromatic radiation;

I = intensity of transmitted monochromatic radiation.

In the absence of other physico-chemical factors, the absorbance (A) is proportional to the path length (b) through which the radiation passes and to the concentration (c) of the substance in solution in accordance with the equation:

$$A = \epsilon cb$$

ϵ = molar absorptivity, if b is expressed in centimetres and c in moles per litre.

The expression $A_{1\text{ cm}}^{1\text{ per cent}}$ representing the specific absorbance of a dissolved substance refers to the absorbance of a 10 g/L solution in a 1 cm cell and measured at a defined wavelength so that:

$$A_{1\text{ cm}}^{1\text{ per cent}} = \frac{10\epsilon}{M_r}$$

Unless otherwise prescribed, measure the absorbance at the prescribed wavelength using a path length of 1 cm. Unless otherwise prescribed, the measurements are carried out with reference to the same solvent or the same mixture of solvents. The absorbance of the solvent measured against air and at the prescribed wavelength shall not exceed 0.4 and is preferably less than 0.2. Plot the absorption spectrum with absorbance or function of absorbance as ordinate against wavelength or function of wavelength as abscissa.

Where a monograph gives a single value for the position of an absorption maximum, it is understood that the value obtained may differ by not more than $\pm 2\text{ nm}$.

Apparatus. Spectrophotometers suitable for measuring in the ultraviolet and visible range of the spectrum consist of an optical system capable of producing monochromatic radiation in the range of 200-800 nm and a device suitable for measuring the absorbance.

Control of wavelengths. Verify the wavelength scale using the absorption maxima of holmium perchlorate solution R, the line of a hydrogen or deuterium discharge lamp or the lines of a mercury vapour arc shown in Table 2.2.25.-1. The permitted

tolerance is ± 1 nm for the ultraviolet range and ± 3 nm for the visible range. Suitable certified reference materials may also be used.

Table 2.2.25.-1. – Absorption maxima for control of wavelength scale

241.15 nm (Ho)	404.66 nm (Hg)
253.7 nm (Hg)	435.83 nm (Hg)
287.15 nm (Ho)	486.0 nm (D β)
302.25 nm (Hg)	486.1 nm (H β)
313.16 nm (Hg)	536.3 nm (Ho)
334.15 nm (Hg)	546.07 nm (Hg)
361.5 nm (Ho)	576.96 nm (Hg)
365.48 nm (Hg)	579.07 nm (Hg)

Control of absorbance. Check the absorbance using suitable filters or a solution of *potassium dichromate R* at the wavelengths indicated in Table 2.2.25.-2, which gives for each wavelength the exact value and the permitted limits of the specific absorbance. The table is based on a tolerance for the absorbance of ± 0.01 .

For the control of absorbance, use solutions of *potassium dichromate R* that has been previously dried to constant mass at 130 °C. For the control of absorbance at 235 nm, 257 nm, 313 nm and 350 nm, dissolve 57.0-63.0 mg of *potassium dichromate R* in 0.005 M *sulfuric acid* and dilute to 1000.0 mL with the same acid. For the control of absorbance at 430 nm, dissolve 57.0-63.0 mg of *potassium dichromate R* in 0.005 M *sulfuric acid* and dilute to 100.0 mL with the same acid. Suitable certified reference materials may also be used.

Table 2.2.25.-2

Wavelength (nm)	Specific absorbance $A_{1\text{ cm}}^{1\text{ per cent}}$	Maximum tolerance
235	124.5	122.9 to 126.2
257	144.5	142.8 to 146.2
313	48.6	47.0 to 50.3
350	107.3	105.6 to 109.0
430	15.9	15.7 to 16.1

Limit of stray light. Stray light may be detected at a given wavelength with suitable filters or solutions: for example, the absorbance of a 12 g/L solution of *potassium chloride R* in a 1 cm cell increases steeply between 220 nm and 200 nm and is greater than 2.0 at 198 nm when compared with water as compensation liquid. Suitable certified reference materials may also be used.

Resolution (for qualitative analysis). When prescribed in a monograph, measure the resolution of the apparatus as follows: record the spectrum of a 0.02 per cent V/V solution of *toluene R* in *hexane R*. The minimum ratio of the absorbance at the maximum at 269 nm to that at the minimum at 266 nm is stated in the monograph. Suitable certified reference materials may also be used.

Spectral slit-width (for quantitative analysis). To avoid errors due to spectral slit-width, when using an instrument on which the slit-width is variable at the selected wavelength, the slit-width must be small compared with the half-width of the absorption band but it must be as large as possible to obtain a high value of I_0 . Therefore, a slit-width is chosen such that further reduction does not result in a change in absorbance reading.

Cells. The tolerance on the path length of the cells used is ± 0.005 cm. When filled with the same solvent, the cells intended to contain the solution to be examined and the compensation liquid must have the same transmittance. If this is not the case, an appropriate correction must be applied. The cells must be cleaned and handled with care.

DERIVATIVE SPECTROPHOTOMETRY

Derivative spectrophotometry involves the transformation of absorption spectra (zero-order) into first-, second- or higher-order-derivative spectra.

A *first-order-derivative spectrum* is a plot of the gradient of the absorption curve (rate of change of the absorbance with wavelength, $dA/d\lambda$) against wavelength.

A *second-order-derivative spectrum* is a plot of the curvature of the absorption spectrum against wavelength ($d^2A/d\lambda^2$). The second-order-derivative spectrum at any wavelength λ is related to concentration by the following equation:

$$\frac{d^2A}{d\lambda^2} = \frac{d^2A_{1\text{ cm}}^{1\text{ per cent}}}{d\lambda^2} \times \frac{c'b}{10} = \frac{d^2A\epsilon}{d\lambda^2} \times \frac{cb}{10}$$

c' = concentration of the absorbing solute, in grams per litre.

Apparatus. Use a spectrophotometer complying with the requirements prescribed above and equipped with an analogue resistance-capacitance differentiation module or a digital differentiator or other means of producing derivative spectra. Some methods of producing second-order-derivative spectra produce a wavelength shift relative to the zero-order spectrum and this is to be taken into account where applicable.

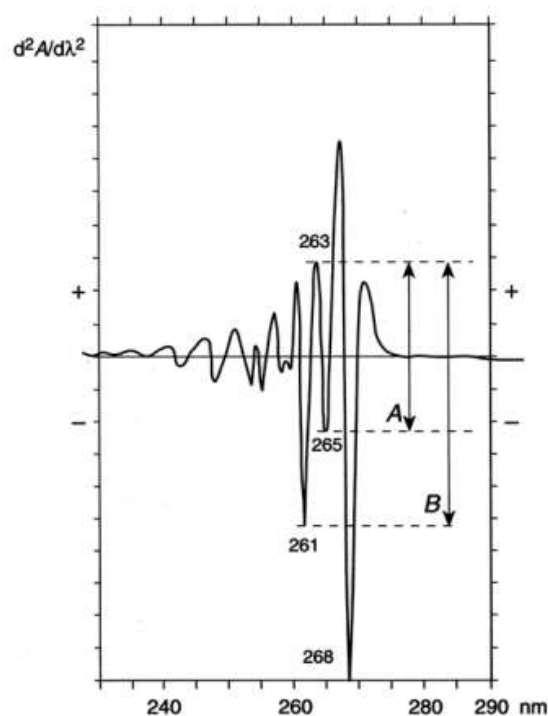


Figure 2.2.25.-1

Resolution power. When prescribed in a monograph, record the second-order-derivative spectrum of a 0.02 per cent V/V solution of *toluene R* in *methanol R*, using *methanol R* as the compensation liquid. The spectrum shows a small negative extremum located between 2 large negative extrema at 261 nm

and 268 nm, respectively, as shown in Figure 2.2.25.-1. Unless otherwise prescribed in the monograph, the ratio A/B (see Figure 2.2.25.-1) is not less than 0.2.

Procedure. Prepare the solution of the substance to be examined, adjust the various instrument settings according to the manufacturer's instructions, and calculate the amount of the substance to be determined as prescribed in the monograph.

01/2008:20226

2.2.26. PAPER CHROMATOGRAPHY

ASCENDING PAPER CHROMATOGRAPHY

Apparatus. The apparatus consists of a glass tank of suitable size for the chromatographic paper used, ground at the top to take a closely fitting lid. In the top of the tank is a device which suspends the chromatographic paper and is capable of being lowered without opening the chamber. In the bottom of the tank is a dish to contain the mobile phase into which the paper may be lowered. The chromatographic paper consists of suitable filter paper, cut into strips of sufficient length and not less than 2.5 cm wide; the paper is cut so that the mobile phase runs in the direction of the grain of the paper.

Method. Place in the dish a layer 2.5 cm deep of the mobile phase prescribed in the monograph. If prescribed in the monograph, pour the stationary phase between the walls of the tank and the dish. Close the tank and allow to stand for 24 h at 20 °C to 25 °C. Maintain the tank at this temperature throughout the subsequent procedure. Draw a fine pencil line horizontally across the paper 3 cm from one end. Using a micro pipette, apply to a spot on the pencil line the volume of the solution prescribed in the monograph. If the total volume to be applied would produce a spot more than 10 mm in diameter, apply the solution in portions allowing each to dry before the next application. When more than one chromatogram is to be run on the same strip of paper, space the solutions along the pencil line at points not less than 3 cm apart. Insert the paper into the tank, close the lid and allow to stand for 1 h 30 min. Lower the paper into the mobile phase and allow elution to proceed for the prescribed distance or time. Remove the paper from the tank and allow to dry in air. Protect the paper from bright light during the elution process.

DESCENDING PAPER CHROMATOGRAPHY

Apparatus. The apparatus consists of a glass tank of suitable size for the chromatographic paper used, ground at the top to take a closely fitting glass lid. The lid has a central hole about 1.5 cm in diameter closed by a heavy glass plate or a stopper. In the upper part of the tank is suspended a solvent trough with a device for holding the chromatographic paper. On each side of the trough, parallel to and slightly above its upper edges, are two glass guide rods to support the paper in such a manner that no part of it is in contact with the walls of the tank. The chromatographic paper consists of suitable filter paper, cut into strips of sufficient length, and of any convenient width between 2.5 cm and the length of the trough; the paper is cut so that the mobile phase runs in the direction of the grain of the paper.

Method. Place in the bottom of the tank a layer 2.5 cm deep of the solvent prescribed in the monograph, close the tank and allow to stand for 24 h at 20 °C to 25 °C. Maintain the tank at this temperature throughout the subsequent procedure. Draw a fine pencil line horizontally across the paper at such a distance from one end that when this end is secured in the solvent trough and the remainder of the paper is hanging freely over the guide rod, the line is a few centimetres below the guide rod and parallel with it. Using a micro-pipette, apply on the pencil line the volume of the solution prescribed in the monograph. If the total volume to be applied would produce a spot more than 10 mm in diameter, apply the solution in

portions, allowing each to dry before the next application. When more than one chromatogram is to be run on the same strip of paper, space the solutions along the pencil line at points not less than 3 cm apart. Insert the paper in the tank, close the lid, and allow to stand for 1 h 30 min. Introduce into the solvent trough, through the hole in the lid, a sufficient quantity of the mobile phase, close the tank and allow elution to proceed for the prescribed distance or time. Remove the paper from the tank and allow to dry in air. The paper should be protected from bright light during the elution process.

01/2008:20227

2.2.27. THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY

Thin-layer chromatography is a separation technique in which a stationary phase consisting of an appropriate material is spread in a uniform thin layer on a support (plate) of glass, metal or plastic. Solutions of analytes are deposited on the plate prior to development. The separation is based on adsorption, partition, ion-exchange or on combinations of these mechanisms and is carried out by migration (development) of solutes (solutions of analytes) in a solvent or a suitable mixture of solvents (mobile phase) through the thin-layer (stationary phase).

APPARATUS

Plates. The chromatography is carried out using pre-coated plates as described under *Reagents (4.1.1)*.

Pre-treatment of the plates. It may be necessary to wash the plates prior to separation. This can be done by migration of an appropriate solvent. The plates may also be impregnated by procedures such as development, immersion or spraying. At the time of use, the plates may be activated, if necessary, by heating in an oven at 120 °C for 20 min.

Chromatographic tank with a flat bottom or twin trough, of inert, transparent material, of a size suitable for the plates used and provided with a tightly fitting lid. For horizontal development the tank is provided with a trough for the mobile phase and it additionally contains a device for directing the mobile phase to the stationary phase.

Micropipettes, microsyringes, calibrated disposable capillaries or other application devices suitable for the proper application of the solutions.

Fluorescence detection device to measure direct fluorescence or the inhibition of fluorescence.

Visualisation devices and reagents. Suitable devices are used for derivatisation to transfer to the plate reagents by spraying, immersion or exposure to vapour and, where applicable, to facilitate heating for visualisation of separated components.

Documentation. A device may be used to provide documentation of the visualised chromatogram, for example a photograph or a computer file.

METHOD

Sample application. Apply the prescribed volume of the solutions at a suitable distance from the lower edge and from the sides of the plate and on a line parallel to the lower edge; allow an interval of at least 10 mm (5 mm on high-performance plates) between the centres of circular spots and 5 mm (2 mm on high-performance plates) between the edges of bands. Apply the solutions in sufficiently small portions to obtain circular spots 2-5 mm in diameter (1-2 mm on high-performance plates) or bands 10-20 mm (5-10 mm on high-performance plates) by 1-2 mm.

In a monograph, where both normal and high-performance plates may be used, the working conditions for high-performance plates are given in the brackets [] after those for normal plates.

Додаток 3.

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



Додаток 4.

Спектрофотометр Jenway 6305 (Велика Британія).



АНОТАЦІЯ (SUMMARY)

Nimodipine is prescribed to patients with subarachnoid hemorrhage. The patient has an acute headache, vegetative disorders, vomiting. Nimodipine is an antagonist of calcium ions. Quantitatively according to the European Pharmacopoeia, nimodipine is determined with ferroin by cerimetry and liquid chromatography. To develop and test a new alternative method for the quantitative determination of nimodipine in medicinal products. We chose solid dosage forms, the active substance of which is nimodipine, as the objects of the study (sample 1 and sample 2). The concentration of nimodipine in each tablet was 30 mg (specified in the instructions for medical use). A standard solution with a concentration of 0.0024 g per 100 ml was prepared from an exact weight of the substance, DMF was used as a solvent. For further studies (determining the linearity of the method, stability of solutions over time, etc.), more diluted solutions were prepared using well-known dilution methods. The studied solutions were prepared directly from tablet forms. For this, the tablet (each sample separately) was ground in a porcelain mortar. An exact weight (up to 0.2 g) was dissolved in 25 ml of solvent. An aliquot of 2 ml was taken and transferred to a 25 ml volumetric flask, NaOH solution was added and brought to the mark with the organic solvent DMF. When modeling the spectrophotometric method of quantitative determination of nimodipine, it was taken into account that nimodipine in DMF with sodium hydroxide solution forms a yellow complex compound with a light absorption maximum at a wavelength of 440-450 nm. The mass of the active substance was determined according to the standard calculation formulas of the standard method. According to the obtained results, the masses of the active substance nimodipine in tablets (sample 1 and sample 2) were determined, which are 0.0293g and 0.0288g, respectively, and correlate with the content of nimodipine specified in the instructions for medical use.