

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 натрій диклофенаку у твердих лікарських формах
методом екстракційно-фотометричного визначення**

Виконав: студент 5-го курсу, групи
Ф1А фармацевтичного факультету

Хоменко Олег Юрійович

Науковий керівник:

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

Рева Тетяна Дмитрівна

Рецензент:

Доцент кафедри ліків та лікарської
токсикології

Головченко Оксана Іванівна

Київ – 2024

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів.	4
Вступ.	5
ОСНОВНА ЧАСТИНА. Розділ 1. Натрій диклофенак, методи визначення.	7
1.1. Застосування натрій диклофенаку.	7
1.2. Фізико-хімічні властивості натрій диклофенаку.	7
1.3. Механізм дії та метаболізм натрій диклофенаку.	8
1.4. Фармакологічні ефекти, побічні ефекти та передозування.	9
1.5. Методи ідентифікації та кількісного визначення.	12
1.6. Метод екстракційно-фотометричного визначення (МЕФВ).	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.	17
2.1.4. Реактиви.	17
2.1.5. Методика та умови кількісного визначення натрій диклофенаку у ТЛФ.	17
2.1.6. Приготування розчинів.	18
Розділ 3. Результати та їх обговорення.	20
3.1. Вибір довжини хвилі детектування.	20

3.2. Регулювання іонної сили розчинів.	20
3.3. Лінійність.	20
3.4. Визначення натрій диклофенаку у досліджуваних зразках.	22
3.5. Часткова валідація методики.	25
3.5.1. Перевірка специфічності методики.	25
3.5.2. Перевірка лінійності методики.	26
3.5.3. Перевірка правильності методики.	26
3.6. Порівняльний аналіз методик кількісного визначення натрій диклофенаку.	28
Висновки.	29
Список використаних джерел.	30
Додатки.	33
Анотація (Summary).	41

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

МЕФВ – метод екстракційно-фотометричного визначення

ДФУ – державна фармакопея України

Ph.Eur. – European Pharmacopoeia

ДІДК - барвник диіндодикарбоціанін

НМУ – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

CO₂ – Карбону (II) оксид

GLP – належна лабораторна практика

GMP – належна виробнича практика

ISO – міжнародна організація зі стандартизації

ІА – іонний асоціат

ТЛФ – тверда лікарська форма

ЛЗ – лікарський засіб

г – грам

ІЧ спектр – інфрачервоний спектр

мкл – мікролітр

мл – мілілітр

нм – нанометр

Т. кип. – температура кипіння

Т. пл. – температура плавлення

УФ спектр – ультрафіолетовий спектр поглинання

С⁰ – градуси Цельсія

ВСТУП

Біль є неприємним відчуттям, яке, безумовно, негативно впливає на життя людини. Ступінь болю може коливатись від слабкого до нестерпного, від короткочасного до тривалого і може носити хронічний характер[1]. Біль є складним процесом, контролюється нервовою системою людини, іноді може супроводжуватись нудотою, слабкістю, запамороченням тощо. Біль терпіти не можна, лікарські засоби, які усувають больові симптоми є різноманітними, як правило це нестероїдні протизапальні препарати та кортикостероїди. Натрію диклофенак є нестероїдним препаратом, який проявляє протизапальну та протибольову дію.

Актуальність: Пошук нових методик кількісного визначення натрій диклофенаку у твердих лікарських формах (ТЛФ).

Мета: розробити методику кількісного визначення натрій диклофенаку у твердих лікарських формах методом екстракційно-фотометричного визначення.

Завдання:

1. Проаналізувати літературні джерела щодо застосування натрій диклофенаку, фізико-хімічні та фармакологічні властивості, механізм дії та метаболізм натрію диклофенаку.
2. Проаналізувати методики кількісного визначення натрій диклофенаку.
3. На основі проведених бібліосемантичних дослідженнях розробити методику кількісного визначення натрій диклофенаку у твердих лікарських формах методом екстракційно-фотометричного визначення.
4. Провести часткову валідацію методики.

Методи дослідження: екстракція, спектрофотометрія.

Новизна та значення одержаних результатів: Результатом роботи є нова сучасна методика кількісного визначення натрій диклофенаку у твердих лікарських формах.

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 42 сторінках, рисунок -1, додатки -4.

ОСНОВНА ЧАСТИНА. Розділ 1. Натрій диклофенак, методи визначення.

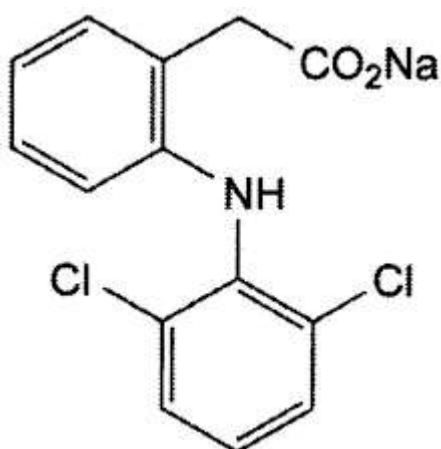
1.1 Застосування натрій диклофенаку.

Натрій диклофенак є нестероїдним лікарським препаратом, який має яскраво виражену знеболюючу, протизапальну та жарознижуючу активність[2].

Лікарські засоби з натрій диклофенаком призначає лікар за наявності нижченаведених патологій [2-8]:

- запалювальні форми ревматоїдного артрити;
- остеоартроз;
- ревматичні захворювання м'яких тканин;
- подагра;
- посттравматичні та післяопераційні больові прояви;
- первинна дисменорея;
- ЛОР захворювання (отит, фарингит, тонзилит).

1.2. Фізико-хімічні властивості натрій диклофенаку.



За IUPAC хімічна речовина має наступну назву: натрієва сіль[2-(2,6-дихлораніліно) феніл] оцтової кислоти).

Міжнародна назва Diclofenacum natricum;

Молекулярна формула: $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$;

Молекулярна маса становить 318,1 г/моль.

Натрій диклофенак є препаратом синтетичного походження. За зовнішнім виглядом це білі або біло-жовті кристали, малогігроскопічні та важкорозчинні у воді, але легко розчиняється у органічних спиртах (метанолі, етанолі), натрій диклофенак слабкорозчинний в ацетоні.

Деякі фізико-хімічні характеристики наведено нижче:

$T_{пл}=280^{\circ}C$, УФ-спектр: $\lambda_{max}=282$ нм (=425) у метанолі, $\lambda_{max}=274$ нм (=288) у 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої, $\lambda_{max}=275$ нм (=327) у 0,1 М розчині натрію гідроксиду.

Натрій диклофенак треба зберігати у посуді з темного скла[2].

1.3. Механізм дії та метаболізм натрій диклофенаку.

Знеболююча дія. Нестероїдні препарати (у нашому випадку натрій диклофенак) проявляють знеболюючу дію оскільки гальмують активність ферментів (циклооксигенази, ЦОГ-1), під впливом яких утворюються простагландини. Простагландини беруть участь у процесах виникнення болю (є стимуляторами больових рецепторів), ненаркотичні анальгетичні лікарські засоби підвищують чутливість нервових закінчень до брадикініну (пептиду, який вважають стимулятором болю)[3-8].

Протизапальна дія. Протизапальна дія обумовлена тим, що натрій диклофенак пригнічує активність ЦОГ, стабілізує мембрани клітини лізом, проявляє антипроферативну дію, і, відповідно, усуває (або значно зменшує) симптоми запалення[3-8].

Жарознижуюча дія. Натрію диклофенак знижує температуру тільки у разі її зростання. Взагалі ненаркотичні анальгетики зменшують кількість простагландинів у спинномозковій рідині та гіпоталамусі і знижують активізуючий вплив пірогенів на клітини гіпоталамуса. Це процес екзотермічний, тому він призводить, у свою чергу, до збільшення тепловіддачі й посилення потовиділення, наслідком чого є зниження температури[3-8].

Фармакокінетика. Абсорбція препарату відбувається кількісно, але характеризується спочатку невеликою швидкістю. Впливає на це прийом їжі. Середньопікові плазмові концентрації у значеннях 1,5-2,0 мкг/мл досягаються протягом 2 годин після прийому 50 мг ТЛФ. Метабілізується натрій диклофенак печінкою, накопичення не відбувається, зв'язується препарат з білками сироватки крові на 99,6 %, з альбуміном – на 99,4%[3-8].

Період напіввиведення від 3 до 6 годин. Препарат частково метабілізується шляхом глюкоронізації молекули, головним чином шляхом гідроксилування. Цей процес призводить до утворення фенольних метаболітів, більшість з яких утворює кон'юганти з глюкуроновою кислотою, деякі з них так само мають біологічну активність, але ступінь цієї активності значно менша [3-8].

1.4. Фармакологічні ефекти, побічні ефекти та передозування.

Нажаль, натрій диклофенак має низку протипоказань. Препарати з обережністю призначають при:

- Гіперчутливості пацієнта до діючої речовини;
- Активних та гострих виразках шлунка, кишківника та внутрішніх кровотечах;
- Перфорації шлунково-кишкового тракту;
- Вагітності;
- Хвороби Крона та колітах;

- Хворобах печінки;
- Хворобах міокарду;
- Захворюваннях артерій;
- Алергічних захворюваннях.

Взаємодія з іншими лікарськими засобами. Натрій диклофенак збільшує концентрацію катіонів Літію та дигоксину у плазмі. Тому рекомендується постійний моніторинг концентрації катіонів Літію.

Одночасний прийом діуретичних та антигіпертензивних препаратів з натрій диклофенаком може привести до зниженню антигіпертензивного ефекту шляхом інгібування синтезу судинорозширюючих простагландинів. Відповідно, таку комбінацію треба використовувати з обережністю, особливо пацієнтам похилого віку[3-8].

Одночасний прийом натрій диклофенаку з антикоагулянтами та антитромботичними засобами збільшує ризик кровотечі. При неконтрольованому прийомі натрій диклофенаку пригнічується агрегація тромбоцитів.

В окремих випадках при одночасному прийомі натрій диклофенаку з антидіабетичними препаратами фіксували розвиток гіпоглікемії.

Взаємодія з метотрексатом. Натрію диклофенак пригнічує кліренс метатриксату у ниркових каналцях, внаслідок чого збільшується рівень метатриксату.

Взаємодія з циклоспорином. Вплив натрій диклофенаку на синтез простагландинів у нирках посилює нефротоксичність циклоспорину.

Взаємодія з такролимусом. Доведено, що у таких випадках зростає ризик нефротоксичності.

Взаємодія з антибактеріальними хінолонами. Фіксували розвиток судом у пацієнтів, які одночасно лікувалися похідними хінолону та натрій диклофенаком.

Взаємодія з колестиполом та холестираміном. Ці препарати викликають затримку або зменшення всмоктування натрій диклофенаку. За рекомендаціями лікарів проміжок часу між прийомами цих ліків повинен бути не нижче 60 хвилин.

Взаємодія з серцевими глікозидами. Одночасний прийом натрій диклофенаку з серцевими глікозидами приводить до посилення серцевої недостатності.

Взаємодія з мифепристоном. Натрій диклофенак зменшує ефект мифепристоні.

Натрій диклофенак може маскувати симптоми інфекції.

Передозування. Передозування може визивати головний біль, шлунково-кишкову кровотечу, діарею, кому, збудження або сонливість, судоми, важку інтоксикацію, порушення зору, анемію, тремор, вертиго, екзему, імпотенцію, тобто порушення функцій майже всіх систем організму[3-8].

Враховуючи вищезазначене, актуальним є контроль та кількісне визначення натрій диклофенаку у ТЛФ.

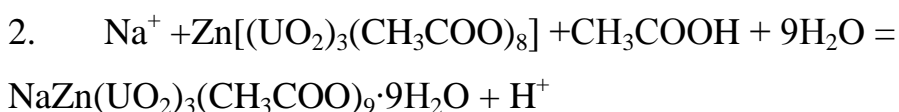
1.5. Методи ідентифікації та кількісного визначення.

За ДФУ [9] натрій диклофенак ідентифікують фізико-хімічними методами:

- за ІЧ-спектром поглинання субстанції;
 - визначають $T_{пл}$ методом тонкошарової хроматографії (ТШХ);
 - з сіллю калій феріціанід у присутності солі трьохвалентного заліза у середовищі хлоридної кислоти поступово з'являється блакитне забарвлення і утворюється синій осад;
 - якісними реакціями на Натрій-катіон:

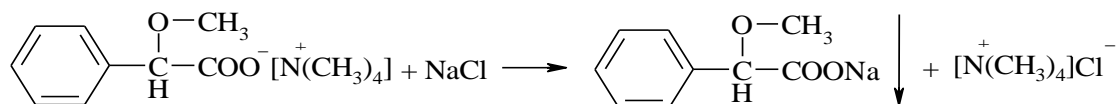


При додаванні до розчину, який містить катіони Натрію, солі гексагідроксостібату утворюється білий кристалічний осад.



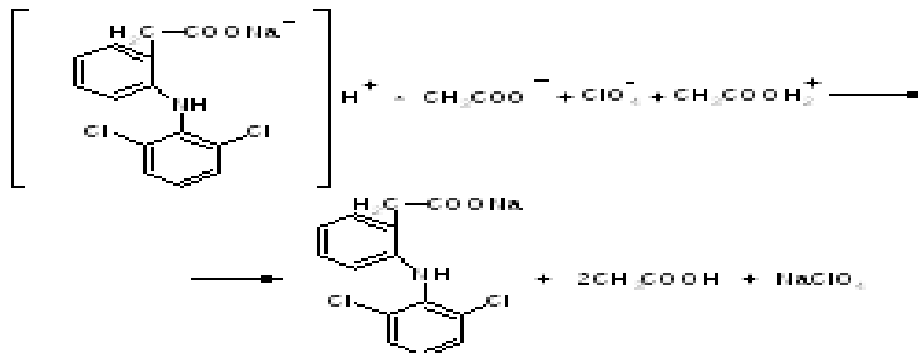
При додаванні до розчину, який містить катіони Натрію, речовини цинкуранілацетат у присутності незначної кількості ацетатної кислоти спостерігають утворення кристалічного осаду жовтого кольору.

3.



При додаванні до розчину, який містить катіони Натрію, сіль тетраметиламоній метоксифенілацетату, утворюється осад білого кольору.

Кількісно за Європейською фармакопесю[10] та ДФУ[9] натрій диклофенак можна визначити методом неводного потенціометричного ацидометричного титрування розчином HClO_4 у середовищі концентрованої етанової кислоти:



Приблизно 0,25 г субстанції розчиняють у 30 мл безводної етанової кислоти і титрують розчином перхлоратної кислоти концентрації 0,1М. Точку еквівалентності визначають потенціометрично використовуючи платиновий електрод як електрод визначення.

Метод потенціометричного титрування має низку недоліків. Як правило, при титруванні необхідні заходи щодо захисту розчину від атмосферного CO_2 , тому процес ацидометричного кількісного визначення захищають інертною атмосферою (атмосферою гелію, азоту тощо).

1.6. Метод екстракційно-фотометричного визначення (МЕФВ).

Метод екстракційно-фотометричного визначення (МЕФВ) заснований на попередній екстракції аналізованої речовини з наступним кроком фотометричного визначення певного компонента. Метод рекомендовано використовувати при нижчезазначених труднощах, які можуть виникати при проведенні оптичних методів дослідження:

- концентрація аналізованої речовини знаходиться на межі чутливості метода, тобто дослідник перед визначенням компонентів проводить кількісне концентрування аналізованої речовини екстракцією;

- домішки у розчині вступають у хімічні реакції так само, як і основні компоненти, тому для здійснення процесу маскування домішок дослідник проводить екстракцію аналізованої речовини.

В основі фотометричних методів дослідження лежить закон Бугера-Ламберта-Бера (основний закон світлопоглинання), математичний вираз якого можна представити так:

$$\bullet \quad A = \lg \frac{I_0}{I} = K \cdot C \cdot l \quad \text{або} \quad A = K \cdot C \cdot l$$

- де: K — коефіцієнт пропорційності;
- C — концентрація аналізованої речовини;
- l — товщина шару розчину, через який проходить світло[11].

Перевагами методу вважається те, що визначення можна проводити у достатньо широкому діапазоні концентрацій (10^{-6} – 10^{-2} М.), собівартість аналізу вважається невисокою, методики кількісного визначення є простими у використанні[11].

Розділ 2. Експериментальна частина.

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

2.1. Матеріали та методи.

2.1.1. Мета дослідження.

Після проведеного бібліосемантичного аналізу методик кількісного визначення натрій диклофенаку у субстанціях (ДФУ, Європейська фармакопея Додаток 1,2) та рідких лікарських формах[12-21] нами була поставлена задача розробити та опрацювати методику кількісного визначення натрій диклофенаку у твердих лікарських формах екстракційно-фотометричним методом.

2.1.2. Об'єкти дослідження.

Для розробки методики нами були обрані тверді лікарські форми Натрію диклофенак- КВ (Зразок 1) та Диклобер ретард (Зразок 2):

Зразок 1



Зразок 2



Тверді лікарські форми реалізуються аптеками у капсулах та мають склад:

Зразок 1.

Діюча речовина натрій диклофенак, 1 капсула містить 25 мг натрій диклофенаку.

Допоміжні речовини: Лактоза, моногідрат. Склад оболонки желатин, індигокармін, титану діоксид.

Зразок 2.

Діюча речовина натрій диклофенак, 1 капсула містить 100 мг натрій диклофенаку.

Допоміжні речовини: Сахароза, крохмаль кукурудзяний, тальк, шелак, амонійно-метакрилатий сополімер (тип А), натрій гідроксид, желатин, титан діоксид.

Наявність у складі лікарських форм натрій диклофенаку указана в інструкціях для медичного застосування.

2.1.3. Посуд та обладнання.

1. Мірні колби і піпетки класу точності А.
2. Ділильна лійка місткістю 250 мл.
3. Спектрофотометр Jenway 6305(Додаток 3).
4. рН-метр Metrohm 826 pHmobile (Додаток 4).
5. Центрифуга.
6. Ваги лабораторні електронні аналітичні RADWAG AS 220.R2, зав. № 502964, свідоцтво про калібрування № 3816 від 03.06.2019 ТОВ «МЕТРОЛОДЖІ СЕРВІС».

2.1.4. Реактиви.

1. Фармакопейний стандартний зразок ДФУ натрій диклофенак, Diclofenac sodium каталожний номер D0128, реєстраційний номер 15307-79-6.
2. Вода дистильована.
3. Толуен для екстрації (клас HPLC).
4. Амонійний буферний розчин.
5. Натрію сульфат безводний марки ХЧ.
6. Барвник диіндодикарбоціанін (ДІДК).

2.1.5. Методика та умови кількісного визначення натрій диклофенаку у ТЛФ.

У контактні колби (пробірки) вносили аналізовану речовину, що прогнозовано містить 10-50 мкг натрій диклофенаку, додавали 1мл амонійного буферного розчину з рН = 8,8, приготованого так, як зазначено у п.2.1.6., 2 мл розчину ДІДК, 2 мл розчину натрій сульфату, перемішували. Після струшування проводили екстракцію одержаної суміші толуеном (5 мл). Екстракт відділяли, центрифугували та вимірювали оптичну густину розчину

на спектрофотометрі при довжині хвилі 642 нм. Вміст діючої речовини натрій диклофенак визначали за калібрувальним графіком.

2.1.6. Приготування розчинів.

Приготування амонійного буферного розчину з рН = 8,8.

Для приготування 50 мл амонійного буферного розчину змішували 13,24 мл розчину NH_4OH та 36,76 мл розчину NH_4Cl (у рівних концентраціях, наприклад, 0,1 М)[22].

Приготування вихідного стандартного розчину.

Готували розчин концентрації 0,01 М (3,181 мг/мл). Для цього на аналітичних терезах зважували 3,181г стандартного фармакопейного зразка і розчиняли у літрі дистильованої води, струшували. Для побудови калібрувального графіка готували серію розчинів концентрації 1-120 мкг шляхом розведення вихідного стандартного розчину. Нижчезазначено аліквоти вихідного стандартного розчину для приготування 100 мл розчинів зазначених концентрацій:

Концентрація стандартних розчинів, мкг	V аліквоти (мл)
30	0,94
60	1,88
90	2,83
120	3,77

Приготування розчину ДІДК.

Розчин ДІДК концентрації 0,001 М готували шляхом розчинення точної наважки 0,4185 г кристалічної речовини у 1 літрі водно-етанольної суміші (99:1).

Приготування розчинів досліджуваних зразків.

Капсули ТЛФ розкривали.

- ТЛФ Натрію диклофенак – КВ.

Вміст 4 капсул розчиняли у 100 мл води.

- ТЛФ Диклоберл ретард.

Вміст 1 капсули розчиняли у 100 мл води.

Концентрація діючої речовини натрій диклофенак становила 1 мг/мл.

Після розчинення вмісту капсул проводили екстракцію нижчезазначеним способом:

У пробірку на 10 мл додавали 0,5 мл буферного розчину, 0,1 мл досліджуваного розчину, 0,5 мл розчину барвника, 1 мл розчину натрій сульфату та доводили водою об'єм водної фази до 5 мл. Додавали до суміші 5 мл толуену, струшували і проводили екстракцію. Після закінчення процесу екстракції фази розділяли, вимірювали оптичну густину розчину та проводили розрахунки.

Розділ 3. Результати та їх обговорення.

3.1. Вибір довжини хвилі детектування.

З аналізу літературних джерел обрано хвилю детектування 642 нм, яка є максимумом спектру поглинання іонних асоціатів ДІДК з натрій диклофенаком [12,23].

3.2. Регулювання іонної сили розчину.

При аналізі літературних джерел була визначена необхідність регулювати та збільшувати іонну силу розчину. Це пов'язано із тим, що вилучення іонних асоціатів (ІА) барвника ДІДК з натрій диклофенаком значно покращується у присутності невеликої кількості висолювача. Враховуючи результати [12-21] екстракцію ІА натрій диклофенаку та барвника ДІДК збільшували додаванням до проби 2 М натрій сульфату.

3.3. Лінійність.

Лінійність методики аналізували при побудові калібрувального графіка у діапазоні концентрацій натрій диклофенаку 0-120 мкг. Для оцінювання і підтвердження лінійності повинні виконуватися нижчезазначені умови:

1. Вільний член **a** у рівнянні повинен статистично наближатись до нуля.
2. Критерій статистичної незначущості – константа **a** не повинен перевищувати свій довірчий інтервал.
3. Коефіцієнт кореляції (R^2) має бути не менше 0,999.
4. Значення $a/st100\%$ не більше 3,15 %.

За результатами визначення оптичної густини будували калібрувальний графік у нормалізованій системі координат (Рис.1.):

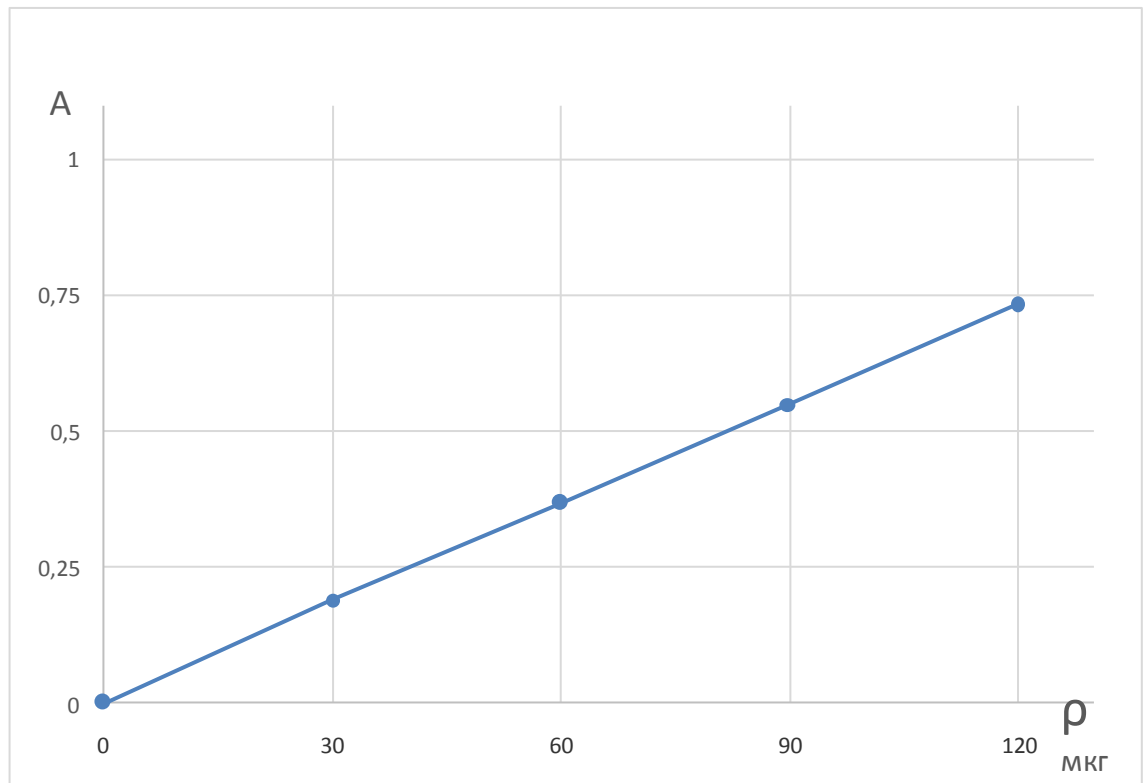


Рис 1. Калібрувальна залежність оптичної густини А від концентрації стандартних розчинів.

№	А, значення оптичної густини	Концентрація розчину, мкг
1	0,191	30
2	0,368	60
3	0,551	90
4	0,733	120

Враховуючи вищезазначене (Рис.1), маємо висновки:

1. Перевірка за допомогою критерію Q
2. Q_1 (розраховане) = $(30-0)/120 = 0,25$
3. Q_2 (розраховане) = $(120-90)/120 = 0,25$
4. Q (табличне) при $P=0.95$ складає 0,64.

5. Промахів немає, оскільки розраховані значення Q менші за табличне значення Q .
6. Дисперсії однорідні, оскільки $f = 0,0228$, що менше за критичне значення $f_{2,306}$.
7. Залишкова сума квадратів становить 9000.
8. Коефіцієнт варіації $a/st100\%$ становить 0,066691
9. Стандартне відхилення для вільного члена = 0.9938
10. Практична незначущість вільного члена = 1,88
11. Лінійна функція описується $y = 0,0061x + 0,003$
12. Коефіцієнт кореляції $R^2 = 0,9999$, що задовольняє вимогам ДФУ [17].

Таким чином, запропонована методика задовольняє всім розрахованим критеріям. Методика лінійна в досліджуваному діапазоні концентрацій 0-120 мкг.

3.4. Визначення натрій диклофенаку у досліджуваних зразках.

Після побудови калібрувального графіку проводили визначення натрій диклофенаку у зразках 1 та 2 за нижчезазначеною методикою:

У пробірки вносили 1 мл розчину зразка, додавали 0,5 мл амонійного буферного розчину з $pH = 8,8$, додавали 1,5 мл розчину барвника ДІДК з концентрацією 0,001 М, 1 мл натрій сульфату і доводили водою до 5 мл. Струшували. Проводили екстракцію толуеном (5 мл). Визначали оптичну густину при довжині хвилі 642 нм і визначали концентрацію аналізованої речовини за калібрувальним графіком враховуючи ступінь розведення.

Аналіз проводили тричі, результати усереднювали.

На перший погляд, може здатися, що результати різко відрізняються один від одного, тому перевіримо чи немає грубих похибок, тобто чи є результати однорідними.

Перевірка однорідності вибірок, малих за обсягом ($n \leq 10$), здійснюється без попереднього обчислення статистичних характеристик.

Крайні варіанти вибірки (мінімальне і максимальне значення) передбачаються такими, що випадають, тобто промахами. Для них розраховують критерій Q . Якщо крайні варіанти вибірки не є грубими похибками, то і значення, що знаходяться між ними, теж не є грубими похибками.

Значення критерію Q розраховують виходячи зі значення розмаху варіювання R :

$$R = \begin{cases} |x_1 - x_n| & \text{для } n = 3 \dots 7 \\ |x_1 - x_{n-1}| & \text{для } n = 8 \dots 10 \end{cases}$$

$$Q_1 = \frac{|x_1 - x_2|}{R},$$

$$Q_n = \frac{|x_n - x_{n-1}|}{R},$$

де Q_1 – значення критерію Q для найменшого значення вибірки, Q_n – значення критерію Q для найбільшого значення вибірки.

Розрахована величина Q порівнюється з контрольним значенням критерію при даній довірчій ймовірності. Табличне значення Q при $P = 0,95$ та $n = 3$ складає 0,94.

Розраховані значення Q (це 0,60 та 0,40) менші за табличне значення Q (це 0,94). Тому результати однорідні, грубих похибок немає.

Вибірка вважається однорідною, якщо розраховані значення Q_1 та Q_n не перевищують табличне значення критерію. Це свідчить про те, що вибірка не обтяжена грубими похибками.

Зразок 1

№ проби	A, значення оптичної густини	Концентрація розчину, мг
1	0,53	95,1
2	0,52	93,5
3	0,51	97,5
Q1	0,60	

Оскільки грубих похибок немає, можемо розраховувати статистичні параметри:

Середнє значення	95,4
RSD,%	2,1
s^2	4,05
довірчий інтервал	$\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}} = 95,4 \pm 5,0$
Відносна похибка середнього значення,%	5,24
$ x_1 - x_n < L(P, n) \cdot s$	97,5 – 93,5 < 2,01 * 3,31 4,0 < 6,6

Результати можна вважати збіжними.

Зразок 2

№ проби	A, значення оптичної густини	Концентрація розчину, мг
1	0,55	97,3
2	0,56	97,8
3	0,53	95,0
Q2	0,40	

Оскільки грубих похибок немає, можемо розраховувати статистичні параметри:

Середнє значення	96,7
RSD,%	1,5
s^2	2,23
довірчий інтервал	$\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}} = 96,7 \pm 3,7$
Відносна похибка середнього значення,%	3,84
$ x_1 - x_n < L(P, n) \cdot s$	$97,8 - 95,0 < 1,49 * 3,31$ $2,8 < 4,9$

Результати можна вважати збіжними.

3.5. Часткова валідація методики.

Валідація[24-26] є оцінкою експериментальних даних, яка ґрунтується на принципах належної виробничої практики. Це документально представлені докази, які з високим ступенем достовірності підтверджують відповідність використання методик, процесів, обладнання тощо.

Оцінюють валідацію перевіркою специфічності, лінійності, робастності тощо[24-26].

3.5.1. Перевірка специфічності методики.

Специфічністю є перевірка здатності методики кількісно визначати аналізовану речовину у присутності інших катіонів, аніонів, молекул, функціональних груп.

Запропонована альтернативна екстракційно-фотометрична методика була опрацьована безпосередньо на твердих лікарських формах, тому ми порівнювали результати визначення натрій диклофенаку у зразках 1 та 2 з

концентрацією діючої речовини, яка зазначена в інструкціях для медичного застосування.

Результати, які представлені у п. 3.4. свідчать, що концентрація натрій диклофенаку, яка була визначена за МЕФВ, відповідає концентрації діючої речовини, що зазначена в інструкціях для медичного застосування.

3.5.2. Перевірка лінійності методики.

У процесі кількісного визначення аналізованої речовини екстракційно-фотометричним методом дослідник працює з калібрувальним графіком.

При аналізі залежності оптичної густини від концентрації було зазначено, що статистичні величини калібрувального графіка відповідають вимогам ДФУ, лінійність була продемонстрована на Рис. 1.

3.5.3. Перевірка правильності методики.

Висновок про правильність запропонованої методики робиться після оцінки специфічності, лінійності та робасності методики. Робасність методики перевіряли проводячи дослідження у різні дні. Нижченаведено результати визначення натрій диклофенаку у Зразках 1 та 2 у різні дні:

Зразок 1

	День 1	День 2
	Вміст знайденої діючої речовини, мг	
1	95,1	96,2
2	93,5	94,1
3	97,5	97,7

Зразок 2

	День 1	День 2
	Вміст знайденої діючої речовини, мг	
1	97,3	98,7
2	97,8	99,3
3	95,0	96,4

З наведених даних можна бачити, що результати кількісного вмісту натрій диклофенаку корелюють з заявленим вмістом діючої речовини у ТЛФ та між собою.

Враховуючи вищенаведені результати методики екстракційно фотометричного визначення натрій диклофенаку у твердих лікарських формах можна вважати правильною[24-26].

3.6. Порівняльний аналіз методик кількісного визначення натрій диклофенаку.

Згідно з протоколами та нормативними документами (ДФУ, Європейська фармакопея тощо) кількісно у субстанції натрій диклофенак визначають методом ацидометричного неводного титрування з потенціометричним визначенням точки еквівалентності (Додатки 1,2). Відомо, що потенціометричний метод має низку недоліків[11], а саме:

- титрування проводять у інертній атмосфері;
- попереднім кроком є стандартизація титранту;
- стандартизація електродів визначення та порівняння;
- трудомісткість процесу.

Запропонована методика не вимагає стандартизації робочого розчину у дослідженні, результати мають високий ступінь автентичності, пробопідготовка та обробка результату не є складним процесом.

ВИСНОВКИ

- Проаналізовано літературні джерела щодо застосування натрій диклофенаку, фізико-хімічні та фармакологічні властивості, механізм дії та метаболізм натрій диклофенаку.
- На основі проведених аналітичних дій було визначено кількісний вміст діючої речовини натрій диклофенак у твердих лікарських формах та запропоновано нову альтернативну методику кількісного визначення діючої речовини натрій диклофенак екстракційно-фотометричним методом.
- Проведено часткову валідацію запропонованої методики за специфічністю, лінійністю та робастністю. Встановлено, що валідаційні характеристики відповідають критеріям прийнятності згідно ДФУ, що свідчить про те, що дану методику можна використовувати для кількісного визначення натрій диклофенаку у твердих лікарських формах.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Глобальний індекс болю 2014: дослідження за підтримки компанії GSK, звіт, с. 9
2. Довідник лікарських препаратів Компендіум [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <https://compendium.com.ua/>
3. Фармакологія за Рангом і Дейлом, пер.9-го англ.вид. у 2-х томах Т.1/Джеймс М.Рітер, Род Флавер, ГремГендерсон, Юн Конг Лоук, Девід Мак К,юн, Гемфрі П Ранг; наук.ред.перекл. Ганна Зайченко, Микола Хайтович.- К. ВСВ "Медицина", 2021-588 с.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Pharmacology / [M. A. Clark, R. Finkel, J. A. Rey et al.]. – [7th ed.]. – Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins, 2018. – 638 p.
9. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків, 2015. в 3 т. Т.1. 1128 с.

10. European Pharmacopoeia. 7.0.– P. 2297 – 2299.
11. Аналітична хімія / В.В. Болотов, О.М. Свєчнікова, С.В. Колісник та ін. — Х., 2004; ДФУ. — Х., 2001.
12. Кормош Ж.О., Гунька І.П., Бабаць К.С., Базель Я.Р., Кормош Н.М. Екстракційно-фотометричне визначення диклофенаку із основним барвником. Вісник Уж.НУ. Серія Хімія, випуск 15, 2006, с.41-45.
13. Гунька І.П., Кормош Ж.О., Бабаць К.С. Нові аналітичні форми на основі іонних асоціатів для визначення диклофенаку// Сьома Всеукраїнська конференція студентів та аспірантів „Сучасні проблеми хімії”: Київ, 18 – 19 травня 2006 р. -К.: ВПЦ Київський університет, - 2006. – С. 235. 25.
14. Гунька І.П., Кормош Ж.О. Екстракційно-фотометричне визначення диклофенаку у вигляді іонного асоціату із основним барвником// Third International Workshop „Relaxed, nonlinear and acoustic optical processes; Materials – Growth and optical properties” – RNAOPM 2005. September 06-10, 2006, Lutsk–Shatsk Lakes: Materials. – Lutsk: Volyn University Press „Vezha”, 2006.- P. 143- 144.
15. Cinzia Arcelloni, Roberto Lanzi, Silvia Pedercini, Giulia Molteny, Isabella Fermo, Antonio Rontiroli, Rita Paroni. High performance liquid chromatographic determination of diclofenac in human plasma after solid-phase extraction// Journal of Chromatography B. – 2001. V. 763. P. 195 – 200.
16. Robert Roškar, Vojko Kmetec. Liquid chromatographic determination of diclofenac in human synovial fluid// Journal of chromatography B. – 2003. V. 788. P. 57-64.
17. Matthieu Tubino and Rafael L. de Souza. Gravimetric method for the determination of diclofenac in pharmaceutical preparations// Journal of AOAC International. – 2005. V. 88, № 6. P.1684-1687.
18. Juan A. Arancibia, Mariela A. Boldrini, Graciela M. Escandar. Spectrofluorimetric determination of diclofenac in the presence of α -cyclodextrin // Talanta. – 2000. V. 52. P. 261-268.

19. 11. Patricia C. Damiani, Mariela Bearzotti, Miguel A. Cabezón, Alejandro C. Olivieri. Spectrofluorimetric determination of diclofenac in tablets and ointment// *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 1999. V. 20. P. 587-590.
20. N.M. El. Kousy. Spectrophotometric and spectrofluorometric determination of etodolac and aceclofenac// *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 1999. V. 20. P. 185-194.
21. L.A. Carreira, M. Rizk, Y. El-Shabrawy, N.A. Zakhari, S.S. Toubar. Europium(III) ion probe spectrofluorometric determination of diclofenac sodium// *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 1995. V. 13. P. 1331- 1337.
22. Лурье Ю. Ю. Справочник по аналитической химии. 5-е изд., перераб. и доп. – М.: Химия, 1979. – 480 с.
23. Фармацевтична хімія: Підручник. Ред. П.О. Безуглий. – Вінниця: Нова Книга, 2008 – 560с.
24. 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.
25. 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.
26. 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 ДФУ

Диклофенак натрію

Втрата в масі при висушуванні (2.2.32). Не більше 2.0 %. 1.000 г субстанції сушать при температурі (125-130) °С.

Бактеріальні ендотоксини (2.6.14). Менше 1.1 МО/мг, якщо субстанція призначена для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування без подальшої процедури видалення бактеріальних ендотоксинів.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

0.800 г (*m*) субстанції розчиняють у 40 мл води, відомої від вуглецю діоксиду, *P*, додають 10.0 мл 1 *M* розчину хлористоводневої кислоти і титрують 1 *M* розчином натрію гідроксиду потенціометрично (2.2.20) до першого стрибка потенціалів на кривій титрування (*n*, мл). Продовжують титрування до другого стрибка потенціалів на кривій титрування (*n*, - загальний об'єм 1 *M* розчину натрію гідроксиду, витраченого при титруванні, мл).

Вміст K_2HPO_4 , у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{1742 \times (10 - n_1)}{m \times (100 - d)}$$

де:

d — втрата в масі при висушуванні, у відсотках.

ЗБЕРІГАННЯ

У повітронепроникному контейнері.

МАРКУВАННЯ

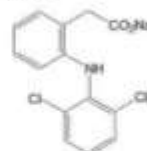
Де застосовно, зазначають:

— субстанція придатна для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування.

ДИКЛОФЕНАК НАТРІЮ

Diclofenacum natricum

DICLOFENAC SODIUM



$C_{14}H_{11}Cl_2NNaO_2$
[15307-79-6]

М.м. 318.1

Натрію 2-[(2,6-дихлорфеніл)аміно]феніл]ацетат.

Вміст: не менше 99.0 % і не більше 101 %, у перерахунку на суху речовину.

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Кристалічний порошок білого або злегка жовтого кольору. Слабо гігроскопічний.

Розчинність. Помірно розчинний у воді *P*, легко розчинний у метанолі *P*, розчинний в етанолі (96 %) *P*, мало розчинний в ацетоні *P*.

Плавиться при температурі близько 280 °С з розкладанням.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Перша ідентифікація: А, D.

Друга ідентифікація: В, С, D.

А. Абсорбційна спектроскопія в інфрачервоній області (2.2.24).

Підготування зразка: субстанцію досліджують у дисках.

Відповідність спектру ФСЗ диклофенаку натрію.

В. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Випробовуваний розчин. 25 мг субстанції розчиняють у метанолі *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 5 мл.

Розчин порівняння (а). 25 мг ФСЗ диклофенаку натрію розчиняють у метанолі *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 5 мл.

Розчин порівняння (б). 10 мг індометацину *P* розчиняють у розчині порівняння (а) і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 2 мл.

Пластика: ТШХ пластинка із шаром силікагелю GF₂₅₄ *P*.

Диклофенак натрію

Рухома фаза: аміаку розчин концентрований Р-метанол Р - етилацетат Р (10:10:80).

Об'єм проб: 5 мкл.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 10 см від лінії старту.

Висушування: на повітрі.

Виявлення: переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (b);
— на хроматограмі мають виявитися дві чітко розділені плями.

Результати: на хроматограмі випробовуваного розчину має виявитися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння (a), відповідна їй за розміром.

С. Близько 10 мг субстанції розчиняють в 10 мл етанолу (96 %) Р. До 1 мл одержаного розчину додають 0.2 мл свіжоприготованої суміші рівних об'ємів розчину 6 г/л калію ферціаніду Р і розчину 9 г/л заліза(III) хлориду Р. Розчин витримують протягом 5 хв у захищеному від світла місці, додають 3 мл розчину 10 г/л хлористоводневої кислоти Р і витримують протягом 15 хв у захищеному від світла місці; розчин поступово забарвлюється у синій колір і утворюється осад.

Д. 60 мг субстанції розчиняють в 0.5 мл метанолу Р і додають 0.5 мл води Р. Розчин дає реакцію (b) на натрій (2.3.1).

ВИПРОБУВАННЯ

Прозорість розчину (2.2.1). 1.25 г субстанції розчиняють у метанолі Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 25.0 мл. Одержаний розчин має бути прозорим.

Кольоровість розчину. Оптична густина (2.2.25) розчину, приготованого для випробування «Прозорість розчину», виміряна за довжини хвилі 440 нм, не має перевищувати 0.05.

Супровідні домішки. Рідинна хроматографія (2.2.29).

Випробовуваний розчин. 50.0 мг субстанції розчиняють в метанолі Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50.0 мл.

Розчин порівняння (a). 2.0 мл випробовуваного розчину доводять метанолом Р до об'єму 100.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять метанолом Р до об'єму 10.0 мл.

Розчин порівняння (b). 1.0 мл випробовуваного розчину доводять метанолом Р до об'єму 200.0 мл. Вміст віалі ФСЗ диклофенаку домішки А розчиняють в 1.0 мл одержаного розчину.

Колонка:

— розмір: 0.25 м × 4.6 мм;

— рухома фаза: силікагель для хроматографії, октилсилільний, ендкетований Р (5 мкм).

Рухома фаза: розчин, що містить 0.5 г/л фосфорної кислоти Р і 0.8 г/л натрію дигідрофосфату Р, рН якого доведено до 2.5 фосфорною кислотою Р, — метанол Р (34; 66).

Швидкість рухомої фази: 1 мл/хв.

Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 254 нм.

Інжекції: 20 мкл.

Час хроматографування: у 1.5 рази більший часу утримування диклофенаку.

Часи утримування: домішки А — близько 12 хв; диклофенаку — близько 25 хв.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (b);

— ступінь розділення: не менше 6.5 між піками домішки А та диклофенаку.

Нормування:

— домішки А, В, С, D, E: площа піка кожної домішки не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) (0.2 %);
— сума домішок: сума площ піків не має перевищувати 2.5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) (0.5 %);
— не враховують: піки, площа яких менше 0.25 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) (0.05 %).

Важкі метали (2.4.8 метод С). Не більше 0.001 % (10 ppm).

2.0 г субстанції мають витримувати випробування на важкі метали. Використовують кварцевий тигель. Еталон готують із використанням 2 мл свіжої еталонного розчину (10 ppm Pb) Р.

Втрата в масі при висушуванні (2.2.32). Не більше 0.5 %. 1.000 г субстанції сушать при температурі 105 °С протягом 3 год.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

0.250 г субстанції розчиняють у 30 мл оцтової кислоти безводної Р і титрують 0.1 М розчином хлорної кислоти потенціометрично (2.2.20).

1 мл 0.1 М розчину хлорної кислоти відповідає 31.81 мг $C_{14}H_{11}Cl_2NNaO_2$.

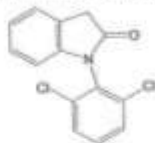
ЗБЕРІГАННЯ

У повітронепроникному контейнері, в захищеному від світла місці.

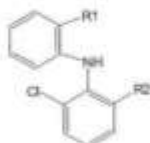
Дилтіазему гідрохлорид

ДОМІШКИ

Специфіковані домішки: А, В, С, D, Е.



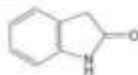
А. 1-(2,6-дихлорфеніл)-1,3-дигідро-2H-індол-2-он,



В. R1 = CHO, R2 = Cl: 2-((2,6-дихлорфеніл)аміно)бензальдегід,

С. R1 = CH₂OH, R2 = Cl: 2-((2,6-дихлорфеніл)аміно)фенілметанол,

D. R1 = CH₂-CO₂H, R2 = Br: 2-((2-бром-6-хлорфеніл)аміно)феніл оцтова кислота,

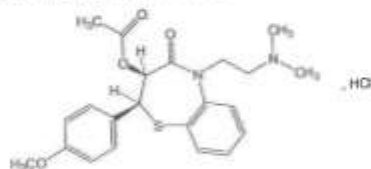


Е. 1,3-дигідро-2H-індол-2-он.

ДИЛТІАЗЕМУ ГІДРОХЛОРИД

Diltiazemi hydrochloridum

DILTIAZEM HYDROCHLORIDE



C₁₂H₁₀ClN₂O₂S
[33286-22-5]

М.м. 451,0

Гідрохлорид (2S,3S)-5-[2-(диметиламіно)етил]-2-(4-метоксифеніл)-4-оксо-2,3,4,5-тетрагідро-1,5-бензотіазепін-3-іл ацетату.

Вміст: не менше 98,5 % і не більше 101,0 %, у пере-
рахунку на суху речовину.

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Кристалічний порошок білого або майже бі-
лого кольору.

Розчинність. Легко розчинний у воді Р, метанолі Р і
метилевохлориді Р, мало розчинний в етанолі Р.

Плавиться при температурі близько 213 °С із роз-
кладанням.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Перша ідентифікація: А, D.

Друга ідентифікація: В, С, D.

А. Абсорбційна спектроскопометрія в інфрачервоній
області (2.2.24).

Відповідність: спектру ФСЗ дилтіазему гідрохлори-
ду.

В. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Випробовуваний розчин. 50 мг субстанції розчиняють
у метилевохлориді Р і доводять об'єм розчину тим са-
мим розчинником до 5 мл.

Розчин порівняння. 50 мг ФСЗ дилтіазему гідрохлориду
розчиняють у метилевохлориді Р і доводять об'єм роз-
чину тим самим розчинником до 5 мл.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікаге-
лю F₂₅₄ Р.

Рухова фаза: оцтова кислота Р - вода Р - метиле-
вохлорид Р - етанол Р (1:3:10:12).

Об'єм проб: 10 мкл.

Відстань, що має пройти рухова фаза: 2/3 довжини
пластинки.

Висушування: на повітрі.

Виявлення: переглядають в УФ-світлі за довжиною
хвилі 254 нм.

Результат: на хроматограмі випробовуваного роз-
чину має виявитися основна пляма на рівні осно-
вної плями на хроматограмі розчину порівняння,
відповідна їй за розміром.

С. 50 мг субстанції розчиняють у 5 мл води Р, дода-
ють 1 мл амонію рейнекату розчину Р, утворюється
рожевий осад.

D. Субстанція дає реакцію (а) на хлориди (2.3.1).

ВИПРОБУВАННЯ

Розчин S. 1,00 г субстанції розчиняють у воді, вільній
від вуглецю діоксиду, Р і доводять об'єм розчину тим
самим розчинником до 20,0 мл.

Додаток 2 Витяг з Європейської Фармакопеї

Diclofenac sodium

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.0

Development: over a path of 10 cm.

Drying: in air.

Detection: examine in ultraviolet light at 254 nm.

System suitability: reference solution (b):

– the chromatogram shows 2 clearly separated spots.

Results: the principal spot in the chromatogram obtained with the test solution is similar in position and size to the principal spot in the chromatogram obtained with reference solution (a).

- C. Dissolve about 10 mg in 10 mL of *ethanol* (96 per cent) R. To 1 mL of this solution add 0.2 mL of a mixture, prepared immediately before use, of equal volumes of a 6 g/L solution of *potassium ferricyanide* R and a 9 g/L solution of *ferric chloride* R. Allow to stand protected from light for 5 min. Add 3 mL of a 10 g/L solution of *hydrochloric acid* R. Allow to stand protected from light for 15 min. A blue colour develops and a precipitate is formed.
- D. Suspend 0.5 g in 10 mL of *water* R. Stir and add *water* R until the substance is dissolved. Add 2 mL of *hydrochloric acid* R, stir for 1 h and filter with the aid of vacuum. Neutralise with *sodium hydroxide solution* R. The solution gives reaction (b) of *potassium* (2.3.1).

TESTS

Appearance of solution. The solution is clear (2.2.1) and its absorbance (2.2.25) at 440 nm is not greater than 0.05.

Dissolve 1.25 g in *methanol* R and dilute to 25.0 mL with the same solvent.

Related substances. Liquid chromatography (2.2.29).

Test solution. Dissolve 50.0 mg of the substance to be examined in *methanol* R and dilute to 50.0 mL with the same solvent.

Reference solution (a). Dilute 2.0 mL of the test solution to 100.0 mL with *methanol* R. Dilute 1.0 mL of this solution to 10.0 mL with *methanol* R.

Reference solution (b). Dilute 1.0 mL of the test solution to 200.0 mL with *methanol* R. In 1.0 mL of this solution dissolve the contents of a vial of *diclofenac impurity A CRS*.

Column:

- size: $l = 0.25$ m, $\varnothing = 4.6$ mm;
- stationary phase: end-capped octylsilyl silica gel for chromatography R (5 μ m).

Mobile phase: mix 34 volumes of a solution containing 0.5 g/L of *phosphoric acid* R and 0.8 g/L of *sodium dihydrogen phosphate* R, adjusted to pH 2.5 with *phosphoric acid* R, and 66 volumes of *methanol* R.

Flow rate: 1 mL/min.

Detection: spectrophotometer at 254 nm.

Injection: 20 μ L.

Run time: 1.5 times the retention time of diclofenac.

Retention time: impurity A – about 12 min; diclofenac – about 25 min.

System suitability: reference solution (b):

- resolution: minimum 6.5 between the peaks due to impurity A and diclofenac.

Limits:

- impurities A, B, C, D, E: 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: 0.25 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.05 per cent).

Heavy metals (2.4.8): maximum 10 ppm.

2.0 g complies with test C. Use a quartz crucible. Prepare the reference solution using 2 mL of *lead standard solution* (10 ppm Pb) R.

Loss on drying (2.2.32): maximum 0.5 per cent, determined on 1.000 g by drying in an oven at 105 °C for 3 h.

ASSAY

Dissolve 0.250 g in 30 mL of *anhydrous acetic acid* R. Titrate with 0.1 M *perchloric acid*, determining the end-point potentiometrically (2.2.20).

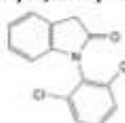
1 mL of 0.1 M *perchloric acid* is equivalent to 33.42 mg of $C_{14}H_{11}Cl_2KNO_2$.

STORAGE

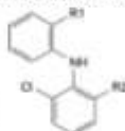
In an airtight container, protected from light.

IMPURITIES

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



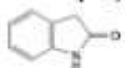
A. 1-(2,6-dichlorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-one.



B. R1 – CHO, R2 – Cl: 2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]benzaldehyde.

C. R1 – CH₂OH, R2 – Cl: 2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]phenyl]methanol.

D. R1 – CH₂-CO₂H, R2 – Br: 2-[(2-bromo-6-chlorophenyl)amino]phenyl]acetic acid.

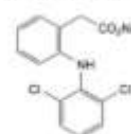


E. 1,3-dihydro-2H-indol-2-one.

01/2008:1002

DICLOFENAC SODIUM

Diclofenacum natrium



$C_{14}H_{11}Cl_2NNaO_2$
[15307-79-6]

M_r 318.1

DEFINITION

Sodium 2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]phenyl]acetate.

Content: 99.0 per cent to 101.0 per cent (dried substance).

CHARACTERS

Appearance: white or slightly yellowish, slightly hygroscopic, crystalline powder.

Solubility: sparingly soluble in water, freely soluble in methanol, soluble in ethanol (96 per cent), slightly soluble in acetone.

mp: about 280 °C, with decomposition.

IDENTIFICATION

First identification: A, D.

Second identification: B, C, D.

A. Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

Preparation: discs.

Comparison: diclofenac sodium CRS.

B. Thin-layer chromatography (2.2.27).

Test solution. Dissolve 25 mg of the substance to be examined in methanol R and dilute to 5 mL with the same solvent.

Reference solution (a). Dissolve 25 mg of diclofenac sodium CRS in methanol R and dilute to 5 mL with the same solvent.

Reference solution (b). Dissolve 10 mg of indometacin R in reference solution (a) and dilute to 2 mL with the same solution.

Plate: TLC silica gel GF₂₅₄ plate R.

Mobile phase: concentrated ammonia R, methanol R, ethyl acetate R (10:10:80 V/V/V).

Application: 5 µL.

Development: over a path of 10 cm.

Drying: in air.

Detection: examine in ultraviolet light at 254 nm.

System suitability: reference solution (b):

– the chromatogram shows 2 clearly separated spots.

Results: the principal spot in the chromatogram obtained with the test solution is similar in position and size to the principal spot in the chromatogram obtained with reference solution (a).

- C. Dissolve about 10 mg in 10 mL of ethanol (96 per cent) R. To 1 mL of this solution add 0.2 mL of a mixture, prepared immediately before use, of equal volumes of a 6 g/L solution of potassium ferricyanide R and a 9 g/L solution of ferric chloride R. Allow to stand protected from light for 5 min. Add 3 mL of a 10 g/L solution of hydrochloric acid R. Allow to stand, protected from light, for 15 min. A blue colour develops and a precipitate is formed.

- D. Dissolve 60 mg in 0.5 mL of methanol R and add 0.5 mL of water R. The solution gives reaction (b) of sodium (2.3.1).

TESTS

Appearance of solution. The solution is clear (2.2.1) and its absorbance (2.2.25) at 440 nm is not greater than 0.05.

Dissolve 1.25 g in methanol R and dilute to 25.0 mL with the same solvent.

Related substances. Liquid chromatography (2.2.29).

Test solution. Dissolve 50.0 mg of the substance to be examined in methanol R and dilute to 50.0 mL with the same solvent.

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

Reference solution (b). Dilute 1.0 mL of the test solution to 200.0 mL with methanol R. In 1.0 mL of this solution dissolve the contents of a vial of diclofenac impurity A CRS.

Column:

- size: 1 – 0.25 m, Ø – 4.6 mm;
- stationary phase: end-capped octylsilyl silica gel for chromatography R (5 µm).

Mobile phase: mix 34 volumes of a solution containing 0.5 g/L of phosphoric acid R and 0.8 g/L of sodium dihydrogen phosphate R, adjusted to pH 2.5 with phosphoric acid R, and 66 volumes of methanol R.

Flow rate: 1 mL/min.

Detection: spectrophotometer at 254 nm.

Injection: 20 µL.

Run time: 1.5 times the retention time of diclofenac.

Retention times: impurity A – about 12 min; diclofenac – about 25 min.

System suitability: reference solution (b):

– resolution: minimum 6.5 between the peaks due to impurity A and diclofenac.

Limits:

- impurities A, B, C, D, E: 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: 0.25 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.05 per cent).

Heavy metals (2.4.8): maximum 10 ppm.

2.0 g complies with test C. Use a quartz crucible. Prepare the reference solution using 2 mL of lead standard solution (10 ppm Pb) R.

Loss on drying (2.2.32): maximum 0.5 per cent, determined on 1.000 g by drying in an oven at 105 °C for 3 h.

ASSAY

Dissolve 0.250 g in 30 mL of anhydrous acetic acid R. Titrate with 0.1 M perchloric acid, determining the end-point potentiometrically (2.2.20).

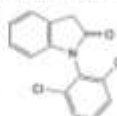
1 mL of 0.1 M perchloric acid is equivalent to 31.81 mg of C₁₅H₁₁Cl₂NNaO₂.

STORAGE

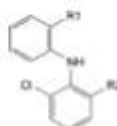
In an airtight container, protected from light.

IMPURITIES

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



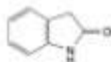
A. 1-(2,6-dichlorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-one,



B. R1 = CHO, R2 = Cl: 2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]benzaldehyde,

C. R1 = CH₂OH, R2 = Cl: [2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]phenyl]methanol,

D. R1 = CH₂CO₂H, R2 = Br: 2-[2-(2-bromo-6-chlorophenyl)amino]phenyl]acetic acid,

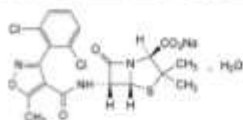


E. 1,3-dihydro-2H-indol-2-one.

01/2008:0663
corrected 6.0

DICLOXACILLIN SODIUM

Dicloxacillinum natrium


 $C_{16}H_{15}Cl_2N_3NaO_5 \cdot H_2O$
[13412-64-1]
 M_r 510.3

DEFINITION

Sodium (2S,5R,6R) 6-[[[3-(2,6-dichlorophenyl)-5-methylisoxazol-4-yl]carbonyl]amino]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylate monohydrate. Semi-synthetic product derived from a fermentation product. Content: 95.0 per cent to 102.0 per cent (anhydrous substance).

CHARACTERS

Appearance: white or almost white, hygroscopic, crystalline powder.

Solubility: freely soluble in water, soluble in ethanol (96 per cent) and in methanol.

IDENTIFICATION

First identification: A, D.

Second identification: B, C, D.

A. Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

Preparation: discs.

Comparison: dicloxacillin sodium CRS.

B. Thin-layer chromatography (2.2.27).

Test solution: Dissolve 25 mg of the substance to be examined in 5 mL of water R.

Reference solution (a): Dissolve 25 mg of dicloxacillin sodium CRS in 5 mL of water R.

Reference solution (b): Dissolve 25 mg of cloxacillin sodium CRS, 25 mg of dicloxacillin sodium CRS and 25 mg of flucloxacillin sodium CRS in 5 mL of water R.

Plate: TLC silanised silica gel plate R.

Mobile phase: mix 30 volumes of acetone R and 70 volumes of a 154 g/L solution of ammonium acetate R adjusted to pH 5.0 with glacial acetic acid R.

Application: 1 µL.

Development: over a path of 15 cm.

Drying: in air.

Detection: expose to iodine vapour until the spots appear and examine in daylight.

System suitability: reference solution (b):

– the chromatogram shows 3 clearly separated spots.

Results: the principal spot in the chromatogram obtained with the test solution is similar in position, colour and size to the principal spot in the chromatogram obtained with reference solution (a).

C. Place about 2 mg in a test-tube about 150 mm long and about 15 mm in diameter. Moisten with 0.05 mL of water R and add 2 mL of sulfuric acid-formaldehyde reagent R. Mix

the contents of the tube by swirling; the solution is slightly greenish-yellow. Place the test-tube in a water-bath for 1 min; a yellow colour develops.

D. It gives reaction (a) of sodium (2.3.1).

TESTS

Solution S: Dissolve 2.50 g in carbon dioxide-free water R and dilute to 25.0 mL with the same solvent.

Appearance of solution: Solution S is clear (2.2.1) and its absorbance (2.2.25) at 430 nm is not greater than 0.04.

pH (2.2.3): 5.0 to 7.0 for solution S.

Specific optical rotation (2.2.7): + 128 to + 143 (anhydrous substance).

Dissolve 0.250 g in water R and dilute to 25.0 mL with the same solvent.

Related substances. Liquid chromatography (2.2.29).

Test solution (a): Dissolve 50.0 mg of the substance to be examined in the mobile phase and dilute to 50.0 mL with the mobile phase.

Test solution (b): Dilute 5.0 mL of test solution (a) to 50.0 mL with the mobile phase.

Reference solution (a): Dissolve 50.0 mg of dicloxacillin sodium CRS in the mobile phase and dilute to 50.0 mL with the mobile phase. Dilute 5.0 mL of this solution to 50.0 mL with the mobile phase.

Reference solution (b): Dilute 5.0 mL of test solution (b) to 50.0 mL with the mobile phase.

Reference solution (c): Dissolve 5 mg of flucloxacillin sodium CRS and 5 mg of dicloxacillin sodium CRS in the mobile phase, then dilute to 50.0 mL with the mobile phase.

Column:

– **size:** 1 – 0.25 m, Ø – 4 mm;

– **stationary phase:** octadecylsilyl silica gel for chromatography R (5 µm).

Mobile phase: mix 25 volumes of acetonitrile R and 75 volumes of a 2.7 g/L solution of potassium dihydrogen phosphate R adjusted to pH 5.0 with dilute sodium hydroxide solution R.

Flow rate: 1.0 mL/min.

Detection: spectrophotometer at 225 nm.

Injection: 20 µL of test solution (a) and reference solutions (b) and (c).

Run time: 5 times the retention time of dicloxacillin.

Retention time: dicloxacillin – about 10 min.

System suitability: reference solution (c):

– **resolution:** minimum 2.5 between the peaks due to flucloxacillin (1st peak) and dicloxacillin (2nd peak).

Limits:

– **any impurity:** for each impurity, not more than the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (1 per cent);

– **total:** not more than 5 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (5 per cent);

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

N,N-Dimethylaniline (2.4.26, Method B): maximum 20 ppm.

2-Ethylhexanoic acid (2.4.28): maximum 0.8 per cent m/m.

Water (2.5.12): 3.0 per cent to 4.5 per cent, determined on 0.300 g.

Pyrogens (2.6.8). If intended for use in the manufacture of parenteral preparations without a further appropriate procedure for the removal of pyrogens, it complies with the test for pyrogens. Inject per kilogram of the rabbit's mass 1 mL of a solution in water for injections R containing 20 mg of the substance to be examined per millilitre.

Додаток 3.

Спектрофотометр Jenway 6305 (Велика Британія).



Діапазон довжин хвиль	від 198 до 1000 нм
Дозвіл довжини хвилі	1 нм
Точність довжини хвилі	± 2 нм
Спектральна смуга пропускання	8 нм, 6 нм в діапазоні УФ
Коефіцієнт пропускання	від 0 до 199,9%
Поглинання	-0,300 до 1,999А
Точність	± 1% Т, ± 0,01Abs при 1000 поглинання
Роздільна здатність	0,1% Т, 0,001А
Стабільність	1% / год після 20-хвилинного нагрівання
Діапазон концентрацій	-300 до 1999
Дозвіл концентрації	1 / 0,1
Одиниці вимірювання	мг/м3, мг/л, г/л, моль/л, ед.
Потужність	<50 Вт
Розмір (Ш x Д x В)	365 x 272 x 160 мм
Вага	6 кг

Додаток 4.

pH-метр Metrohm 826 pH mobile.



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

Анотація (Summary)

Introduction. Diclofenac sodium is a non-steroidal drug that exhibits anti-inflammatory and analgesic effects and is prescribed by a doctor for inflammatory forms of rheumatoid arthritis, osteoarthritis, gout, rheumatic diseases, etc.

The aim of the study. To develop and test a new method of quantitative determination of diclofenac sodium, which is part of solid dosage forms by the extraction-photometric method.

Research methods. Extraction. Spectrophotometry.

The results. The extraction-photometric method is based on the extraction of a certain substance followed by its photometric determination. The determination can be carried out in a wide range of concentrations (10^{-6} – 10^{-2} M), the methods are quick, simple and inexpensive. The analyzed substance, which contains approximately up to 50 μg of the drug (the diluted solution was prepared by well-known methods), was transferred to a chemical beaker, an ammonium buffer with $\text{pH} = 8.8$ was added, diindodicarbocyanine dye, sodium sulfate solution were added, and after mixing, extraction with toluene was carried out. The content of the active substance sodium diclofenac was determined according to the calibration graph at a wavelength of 642 nm.

Conclusions. As a result of the work, a new alternative method of quantitative diclofenac sodium content in solid dosage forms was developed and tested. Partial validation of the methodology was carried out.