

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 сечовини у м'яких лікарських формах методом
високоефективної рідинної хроматографії**

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

Тюпін Анастасія Іванівна

Науковий керівник:

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

Рева Тетяна Дмитрівна

Київ – 2023

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів.	4
Вступ.	5
Основна частина. Розділ 1. Сечовина, методи визначення.	7
1.1. Застосування сечовини.	7
1.2. Фізико-хімічні властивості сечовини.	7
1.3. Механізм дії та метаболізм сечовини.	8
1.4. Фармакологічні ефекти, побічні ефекти та передозування.	9
1.5. Методи ідентифікації та кількісного визначення сечовини у лікарських формах.	10
1.6. Метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).	12
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.	16
2.1.4. Реактиви.	16
2.1.5. Методика та умови хроматографування.	16
2.1.6. Приготування стандартного розчину.	17
2.1.7. Приготування розчину досліджуваного зразка.	17
2.1.8. Кількісне визначення.	18

2.2. Пробопідготовка.	19
2.3. Відновлення хроматографічної колонки.	19
2.4. Захист хроматографічної колонки.	19
Розділ 3. Результати та їх обговорення.	21
3.1. Вибір оптимального температурного режиму хроматографічної колонки.	21
3.2. Вибір довжини хвилі детектування.	22
3.3 Побудова градувальної залежності.	22
3.3.1. Лінійність.	22
3.4. Визначення сечовини у м'якій лікарській формі.	25
3.5. Часткова валідація методики.	27
3.5.1. Перевірка специфічності методики.	27
3.5.2. Перевірка лінійності методики.	28
3.5.3. Перевірка робастності методики.	30
3.5.4. Перевірка правильності методики.	30
3.6. Порівняльний аналіз методик кількісного визначення сечовини.	30
Висновки.	
Список використаних джерел.	
Додатки.	
Анотація (Summary).	

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ВЕРХ –високоефективна рідинна хроматографія

ДФУ –державна фармакопея України

Ph.Eur. – European Pharmacopoeia

NMF- натуральний зволожувальний фактор

ВПР – високомолекулярні полімерні речовини

НМУ – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

GLP– належна лабораторна практика

GMP – належна виробнича практика

ISO– міжнародна організація зі стандартизації

ТЛФ – тверда лікарська форма

МЛФ – м'яка 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

Сечовина є речовиною органічної природи, синтезується природньо організмом людини, знаходиться у кожній клітині, входить до складу NMF (натурального зволожувального фактору). NMF є найважливішим елементом дерми, який відповідає за її красу та здоров'я [1], тому нестача його призводить до різних проявів дерматологічних захворювань.

Сечовину відкрили у 1773 р., вперше ця речовина була синтезована Ф. Вьолером у 1828 р[2].

М'які лікарські форми (МЛФ), до складу яких входить сечовина, широко розповсюджені у медичній, фармацевтичній практиці та косметології. Лікарські засоби, до складу яких входить сечовина, застосовуються при лікуванні псоріазів, себореї, іхтіозу, різних форм екземи тощо[3].

Актуальність: Пошук нових методик кількісного визначення сечовини у м'яких лікарських формах.

Мета: Розробити методику кількісного визначення сечовини у м'яких лікарських формах методом високоефективної рідинної хроматографії.

Завдання:

1. Проаналізувати літературні джерела щодо застосування сечовини, фізико-хімічні та фармакологічні властивості, механізм дії та метаболізм сечовини.
2. Проаналізувати методики кількісного визначення сечовини.
3. На основі проведених бібліосемантичних досліджень розробити методику кількісного визначення сечовини у м'яких лікарських формах методом високоефективної рідинної хроматографії.
4. Провести часткову валідацію методики кількісного визначення сечовини методом високоефективної рідинної хроматографії.

Методи дослідження: метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), який все ширше використовується у медичній та фармацевтичній практиці для кількісного визначення діючої речовини у м'яких лікарських формах.

Новизна та значення отриманих результатів: завдяки дослідженню процесів адсорбції-десорбції розроблена альтернативна методика кількісного визначення сечовини у м'яких лікарських формах з більшою чутливістю.

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, кількість рисунків – 3, таблиць – 2, додатків – 5.

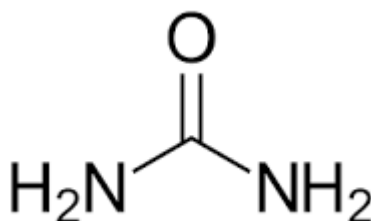
Розділ 1. Сечовина, методи визначення.

1.1 Застосування сечовини.

Сечовину відносять до фармакологічної групи D02AE01[3-4].

У фармацевтичній, медичній та косметологічній практиці сечовину та її похідні широко використовують як у чистому вигляді, так і як вихідну сполуку для синтезу різних лікарських засобів (фенобарбіталу, бромуралу, ветроналу тощо), гігієнічних зубних паст, при виробництві косметичних препаратів тощо [5]. Речовину використовують при виготовленні добрива, у тваринництві, при виготовленні гербіцидів, у хімічній промисловості. Похідні сечовини мають певну токсичність[5-6].

1.2. Фізико-хімічні властивості сечовини.



За IUPAC хімічна речовина сечовина має наступну назву: carbamide.

Молекулярна формула: $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$.

Молярна маса становить 60,1 г/моль [3].

За зовнішнім виглядом це білі кристали голчастої або круглої форми, без запаху та смаку, добре розчиняються у воді, органічних спиртах, у

розчині амоніаку та у розчині SO_3 , але нерозчинні у хлороформі та органічних етерах. Температура плавлення сечовини $T_{\text{пл}}$ $132,7^\circ\text{C}$, щільність 1,335; n_D^{25} 1,484. З окисниками речовина не реагує, у реакції нейтралізації проявляє основні властивості і з сильними кислотами утворює солі. Може як ліганд приймати участь у реакціях комплексоутворення [3,7].

У промислових масштабах для різного роду потреб сечовину синтезують взаємодією амоніаку з CO_2 :



Проміжним продуктом цієї взаємодії є карбонат амонію. Реакція синтезу є зворотною реакцією і залежить від багатьох факторів (температури, тиску, концентрації реагуючих речовин тощо)[7].

1.3. Механізм дії та метаболізм сечовини.

Хімічна речовина сечовина проявляє, у першу чергу, захисну та пом'якшувальну дію[3]. Лікарські засоби, до складу яких входить сечовина, мають протигрибкову, антибактеріальну, протисвірбіжну та гідратуючу дію. Результатом лікування препаратами з сечовиною є зменшення порушення шкірного епітелію. Хімічна речовина сечовина має протипоказання у випадку певних індивідуальних чутливостей або дерматозах, які можуть бути супроводжені яскраво вираженою ексудацією[8]. Як правило, до складу лікарських засобів з сечовиною входять високомолекулярні полімерні речовини (ВІР) і ці, у свою чергу, утримують діючу речовину на поверхні ураження ділянки шкіри, тобто запобігають трансдермональному всмоктуванню сечовини. Для лікування пошкоджених ділянок шкіри лікар призначає, як правило, різноманітні лікарські форми (мазі, креми). В інструкціях для медичного застосування зазначено, що не рекомендується

одночасно застосовувати для лікування лікарські засоби, до складу яких входять похідні сечовини або коркостероїди.

Побочні ефекти лікарські засоби (ЛЗ), до складу яких входить сечовина, як правило, не проявляють, тільки у поодиноких випадках спостерігається свербіж, подразнення шкіри тощо, але це пов'язано, скоріше за все, з допоміжними речовинами, які входять до складу м'яких лікарських форм.

1.4. Фармакологічні ефекти, побічні ефекти та передозування.

Фармакологічний ефект сечовини, у першу чергу, заключається у тому, що вона проявляє кератопластичний та кератолітичний ефект, тому, використання її у дерматологічній практиці є перспективним. Сечовина є природним зволожувачем оскільки зв'язує воду у верхніх шарах шкіри та зменшує втрату води епідермісом. Оскільки ця сполука має малу молекулярну масу, процес всмоктування її відбувається дуже швидко[3-4].

1.5. Методи ідентифікації та кількісного визначення сечовини у лікарських засобах.

Як правило, сечовина є єдиним гідрофільним (розчинним у воді) компонентом, який входить до складу мазей та кремів на її основі, тому ідентифікацію та кількісне визначення цієї речовини у складі м'яких лікарських форм проводять через певні стадії пробопідготовки, а саме:

1. Вилучення сечовини з емульсії;
2. Відокремлення її від інших компонентів.

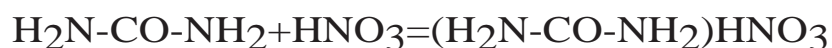
Враховуючи вищезазначене, перед ідентифікацією дослідник готує водний витяг сечовини з лікарського засобу, використовуючи процес екстракції (висолювання).

Постадійно висолювання може бути наступним. Точну наважку м'якої лікарської форми (наприклад, крему) розчиняють у певній кількості води, струшують, додають KBr і ретельно перемішують. Екстрагують нижній шар розчином метилен хлориду, верхній шар – гексаном. Водну фазу досліджують на предмет виявлення сечовини.

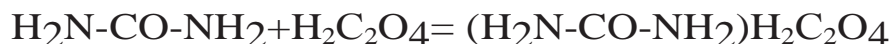
Для підтвердження ідентифікації, як правило, використовують фізико-хімічні показники (температуру плавлення, результати ІЧ-спектроскопії тощо)[7].

Для проведення реакцій якісного аналізу використовують відому реакцію взаємодії сечовини з концентрованою HNO_3 та біуретову реакцію[7].

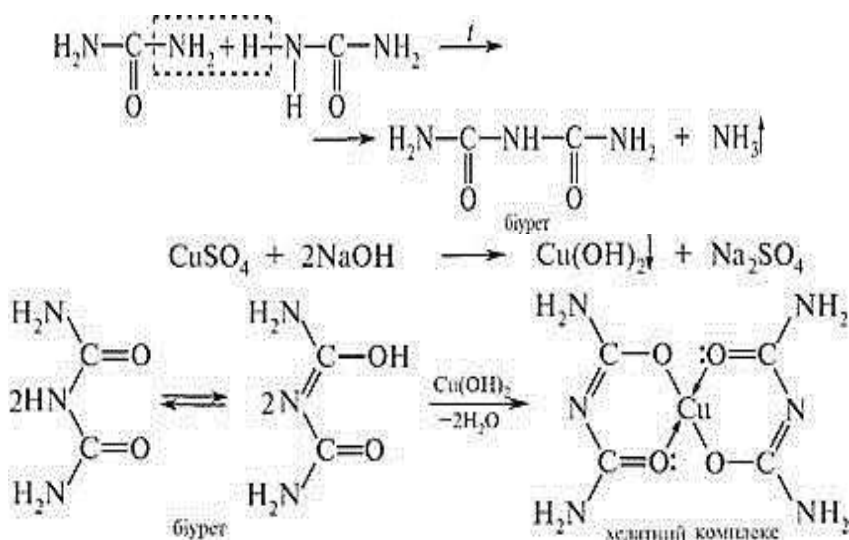
У першому випадку до водної фази розчину сечовини додають певну кількість концентрованої HNO_3 . Результатом цієї взаємодії є утворення кристалічного нерозчинного у воді білого осаду (нітрат сечовини):



Подібна реакція може бути проведена з оксалатною кислотою:



Для проведення біуретової реакції попередньо розчин сечовини випарюють, залишок нагрівають у полум'ї газового пальника і через деякий час спостерігають виділення газу з характерним запахом NH_3 , але плав з часом густіє завдяки утворенню біурету. Після охолодження плав розчиняють у суміші вода - NaOH і після додавання до суміші 0,05 М розчину купрум сульфату спостерігають появу червоно-фіолетового забарвлення:



Кількісно визначення сечовини у лікарських формах згідно з вимогами ДФУ[9, Додаток 1] та Європейською фармакопеєю [10, Додаток 2] можна провести декількома способами:

1. Колориметричним. У кислому середовищі при додаванні діацетилмонооксиму у присутності тіосемікарбазиду та солі Fe^{3+} утворюється забарвлена сполука, інтенсивність якої прямо пропорційна концентрації сечовини у досліджуваному розчині. До чутливих методів колориметрію не відносять, тому використання цього методу не є розповсюдженим.

2. Метод окисно-відновного титрування (броматометрія).

Броматометричне визначення сечовини у м'яких лікарських засобах проводять за нижчезазначеною методикою:

Водну витяжку з МЛФ аліквотно відбирають у мірну колбу, додають дистильовану воду до певного об'єму, ретельно перемішують і охолоджують, при необхідності, до 20⁰С. Відбирають певний об'єм розведеного розчину у конічну колбу для титрування, додають певну кількість калій бромату та калій броміду, підкислюють розчин сульфатною кислотою. Йод, який виділяється, титрують натрій тіосульфатом при присутності специфічного індикатору крохмалю.

1.6. Метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Сучасний, екологічний та високочутливий метод високоефективної рідинної хроматографії на даному етапі широко знаходить місце в усіх міжнародних практиках[11-18]. Це метод ідентифікації та кількісного визначення речовин, який заснований на теорії сорбції речовини на твердій поверхні іншої. Розділення відбувається у хроматографічній колонці, яка заповнюється нерухомою фазою (хімічно-модифікованими силікагелями різної природи, алюмогелями тощо). Колонка для розділення (хроматографічна колонка) може бути як промислового, так і лабораторного виготовлення. Рухомою фазою є рідина органічної природи, яка подається у колонку під високим тиском. Методика проведення аналізу може бути різноманітною, у роботі використовують метод внутрішнього стандарту або метод калібрування [11-18].

Розділ 2. Експериментальна частина.

Випускна кваліфікаційна робота була виконана у лабораторії рідинної хроматографії Інституту гігієни та екології та на кафедрі аналітичної, фізичної та колоїдної хімії НМУ імені О.О. Богомольця.

2.1. Матеріали та методи.

2.1.1. Мета дослідження.

Після ознайомлення та опрацювання різноманітних методик кількісного визначення сечовини у м'яких лікарських формах та субстанції, нами була поставлена задача розробити та протестувати методику кількісного визначення сечовини високоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ) у м'яких лікарських формах.

2.1.2. Об'єкти дослідження.

Для розробки та апробації методики було обрано м'які лікарські форми Карбодерм-Дарниця та Уреотоп. Зазначені м'які лікарські форми реалізуються аптечними мережами та мають склад:

1) Карбодерм-Дарниця(Зразок 1). До складу крему входить:

- Сечовина (1 г крему містить 100 мг діючої речовини);
- Цетиліридиній хлорид;
- Пропіленгліколь;
- Олія мінеральна;
- Спирт цетостеариловий;
- Вода очищена.

2) Уреотоп(Зразок 2). До складу мазі входить:

- Сечовина (1 г мазі містить 120 мг сечовини);
- Парафін білий м'який;

- Пропіленгліколь;
- Альфатокоферолу ацетат;
- Сорбітансесквіолеат;
- Гліцерин;
- Ретинолу пальмітат;
- Ізопропілміристат;
- Олія рицинова поліетоксильована гідрогенізована;
- Крохмаль пшеничний;
- Віск мікрокрісталічний;
- Кислота молочна.

Наявність сечовини та концентрація цієї сполуки у складі МЛФ указана в інструкціях для медичного застосування.

Карбодерм-Дарниця, Зразок 1



Уреотоп, Зразок 2



Рис. 1. М'які лікарські форми, які були використані у дослідженні.

До м'яких лікарських форм відносять гелі, мазі та креми. Суттєвої відмінності між ними немає оскільки усі вони є гетерогенними дисперсними системами. Нашими об'єктами дослідження були лікарські засоби мазь та крем. Мазь – це гетерогенна система, в якій дисперсійне середовище є жиром. До складу мазей взагалі не входить вода. Крем – це гетерогенна система, в якій дисперсійне середовище є сумішшю водорозчинних речовин та жирів.

2.1.3. Посуд та обладнання.

1. Мірні піпетки і колби класу точності А.
2. Ділильна лійка місткістю 100 мл для екстракції.
3. Ваги лабораторні аналітичні з похибкою вимірювання 0,0002 г Radwag[®] AS220.R2, заводський №502964, інвентарний №104769236, свідоцтво про калібрування № 3816 від 30.05.2019 р.
4. Колонка хроматографічна сталева (250×4,6) мм, заповнена Нуклеосилом C₁₈ (100-5) та передколонка хроматографічна сталева (4×3) мм, заповнена Нуклеосилом C₁₈ (100-5).
5. Хроматограф рідинний „Шимадзу” з УФ детектором, заводський №С20964330924СS, інвентарний №010466981, свідоцтво про калібрування № 3991 від 07.06.2019, Додаток 3.
6. Мікрошприц місткістю 25 мкл, фірма Hamilton.

2.1.4. Реактиви.

1. Фармакопейний стандартний зразок ДФУ Сечовина (карбамід), каталожний номер U0423, реєстраційний номер 57-13-6.
2. Ацетонітрил, х.ч., для рідинної хроматографії.
3. Ацетонітрил (клас HPLC).
4. Вода для хроматографії Р.
5. Фільтри паперові знезолені “червона стрічка”, діаметр 150 мм.
6. Калію бромід х.ч.
7. Метилен хлорид.

2.1.5. Методика та умови хроматографування.

Після приготування розчинної суміші ацетонітрил-вода, яка є рухомою фазою при хроматографічному визначенні, на лабораторних терезах

після пробопідготовки (п.2.2.) зважували 0,1 г зразка та розчиняли наважку у цієї суміші. Струшували протягом 10 хвилин. Потім проводили хроматографію і визначали вміст сечовини.

Умови хроматографічного визначення:

- рухома фаза – суміш ацетонітрил + бідистильована вода (70:30), 50 мл;
- об'ємна витрата рухомої фази – 1 мл/хв;
- довжина хвилі УФ детектора – 260 нм;
- температура термостата колонки – 30 С;
- об'єм петлі інжектора рідинного хроматографа – 20 мкл.

Час утримування за даних умов сечовини – $(8,1 \pm 0,1)$ хвилини.

2.1.6. Приготування стандартного розчину.

Фармакопейний стандартний зразок ДФУ Сечовина (карбамід) (маса наважки 0,1 г) розчиняли у 50 мл суміші ацетонітрил- бідистильована вода(70:30). Струшували протягом 15 хвилин, охолоджували при необхідності до кімнатної температури. Розчини більш розведених концентрацій (80, 100, 120 мкг/мл) для подальших досліджень готували загальновідомими методиками розведення.

2.1.7. Приготування розчину досліджуваного зразка.

Після процедури пробопідготовки (п.2.2.) 0,1 г досліджуваного зразка переносили у мірну колбу на 50 мл, додавали 50 мл суміші ацетонітрил- бідистильована вода(70:30) та при ретельному струшуванні розчиняли наважку, при необхідності охолоджували до кімнатної температури.

2.1.8. Кількісне визначення.

Масу аналізованої речовини сечовина визначали за стандартною математичною залежністю:

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

де R_1 = площа піку стандартного розчину (середнє значення);

R_2 = площа піку зразка (середнє значення);

m_1 = маса стандарту;

m_2 = маса зразка;

A = чистота стандарту, вважається 1.

2.2. Пробопідготовка.

1г аналізованої м'якої лікарської форми розчиняли у 50 мл води, ретельно перемішували 60 хвилин, додавали 0,5 г KBr і знов ретельно перемішували 120 хвилин. Проводили екстракцію водної фази розчином метилен хлориду (об'єм метилен хлориду 50 мл).

2.3. Відновлення хроматографічної колонки.

В результаті хроматографічних досліджень інколи на порядку денному ставиться питання щодо регенерації хроматографічної колонки. Як правило, дії, які розробляє інженер-дослідник для регенерації, є дуже простими, а саме:

1. Колонка приєднується до приладу у протилежному напрямку.
2. Колонка промивається дистильованою водою (100 мл) у режимі зворотного руху зі швидкістю 1 мл/хв.
3. Після промивки водою колонка промивається декілька разів органічними розчинниками (ізопропанолом, гексаном, метиленхлоридом, ацетонітрилом тощо) зі швидкістю 1 мл/хв.
4. Колонка приєднується до системи звичайним способом і готується до роботи.

2.4. Захист хроматографічної колонки.

При апробації методики, у процесі роботи виникає питання щодо захисту хроматографічної колонки для збільшення терміну її технічної експлуатації оскільки домішки різної природи, які накопичуються на часточках нерухомої фази, можуть суттєво знизити розподільчу здатність нерухомої фази, і, відповідно, збільшити похибки вимірювань. Для покращення роботи колонки і обережного ставлення до неї найкращим

засобом є встановлення передколони між інжектором та аналітичною хроматографічною колонкою.

Як правило, передколони наповнюються таким же адсорбентом, як і нерухома фаза в основній аналітичній колонці. Однією з кількісних характеристик передколони є мертвий об'єм, змінний картридж дозволяє зменшити величину мертвого об'єму до нульового значення.

Розділ 3. Результати та їх обговорення.

При опрацюванні методики кількісного визначення досліджуваної речовини методом ВЕРХ (поетапної розробки методики) завжди виникає питання щодо визначення оптимального температурного режиму та вибору хвилі детектування проби.

3.1. Вибір оптимального температурного режиму хроматографічної колонки.

Для встановлення залежності тиску у колонці від зміни температури та встановлення оптимальної величини тиску використовували модельний стандартний розчин сечовини з концентрацією 100 мкг/мл. Розчин з цією концентрацією готували за стандартними вищезазначеними методиками (п.2.1.6.). Графічна залежність тиску у колонці від температури наведена на Рис.2. При аналізі цієї залежності визначили, що температура, про якій оптимально рекомендовано проводити дослідження, дорівнює 30⁰С (відсутні ризики небажаного процесу гідролізу твердої фази):

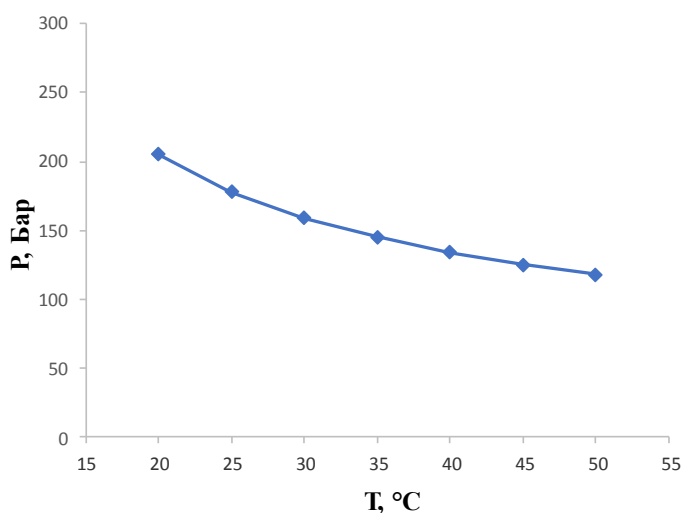


Рис. 2. Графічна залежність тиску у хроматографічній колонці від температури.

3.2. Вибір довжини хвилі детектування.

З аналізу літературних джерел при проведенні бібліосемантичного аналізу з'ясовано, що оптимальною хвилею детектування є довжина хвилі 260 нм, оскільки ця довжина відповідає максимуму спектра поглинання сечовини [7].

3.3. Побудова градуовальної залежності.

Для аналізу градуовальної залежності (ГГ) площі піку від концентрації стандартного розчину та використання її у роботі для подальшого кількісного визначення сечовини у МЛФ готували серію стандартів сечовини з концентраціями 80, 100 та 120 мкг/мл шляхом розведення попередньо приготованого стандартного розчину (п.2.1.6). Після процедури приготування розчинів проводили кількісний хроматографічний аналіз, тобто фіксували висоту піків стандартних розчинів та будували градуовальну залежність площі піку від концентрації (ГГ).

У Додатку 4 представлені хроматограми стандартних розчинів.

3.3.1. Лінійність.

Градуовальна залежність площі піків досліджуваних розчинів від концентрації повинна бути лінійною, що і було підтверджено в результаті експерименту (Рис.3), а саме:

1. Коефіцієнт лінійної функції $b = -496718,53$
2. Коефіцієнт лінійної функції $a = 42889,45$
3. Коефіцієнт кореляції $R = 0,999859$.

Таким чином, запропонована методика лінійна у досліджуваному діапазоні концентрацій 80-120 мкг/мл та виконує вимоги ДФУ:

Побудова градувальної залежності				Сечовина	
				<i>n</i>	6
<i>x</i>	80 мкг/мл	100 мкг/мл	120 мкг/мл	x_{cp}	100,00
<i>y1</i>	2997583	3734525	4925440	Σx	300
<i>y2</i>	2812836	3829845	4700591	<i>N</i>	3
<i>y3</i>	3068232	3767385	4453884		
<i>y4</i>	2828922	3928282	4646564		
<i>y5</i>	3043684	3767232	4503887		
<i>y6</i>	2805543	3825746	4619903	y_{cp}	3792226,89
\bar{y}	2926133,33	3808835,83	4641711,50	$\Sigma \bar{y}$	11376680,67
x^2	6400	10000	14400	Σx^2	30800,00
x^3	512000	1000000	1728000	Σx^3	3240000,00
$(x^2)^2$	40960000	100000000	207360000	$\Sigma (x^2)^2$	348320000,00
$x\bar{y}$	234090666,7	380883583,3	557005380	$\Sigma x\bar{y}$	1171979630,00
$x^2\bar{y}$	18727253333	38088358333	66840645600	$\Sigma x^2\bar{y}$	123656257266,67
$(x-x_{cp})^2$	400	0	400	$\Sigma (x-x_{cp})^2$	800,00
<i>S</i>	123242,53	69232,76	166578,86	<i>C</i>	0,5814
$(\bar{y}-(a+bx))^2$	68964258,89	275857035,56	68964258,89	Σ	413785553,34
<i>min</i>	2805543	3734525	4453884		
<i>max</i>	3068232	3928282	4925440		
<i>G_min</i>	0,978	1,073	1,128		
<i>G_max</i>	1,153	1,725	1,703		

Критерій Грабса ($n=6$)	$G_{кр} (5\%)$	1,887
Критерій Кохрена ($n=6, N=3$)	$C_{кр} (5\%)$	0,7071
Лінійної функції S_y	S_y (лін)	20341,72
Коефіцієнт варіації ГЗ $V_{x_0}, \%$	$S_{x_0} * 100 / x_{cp}$	0,47

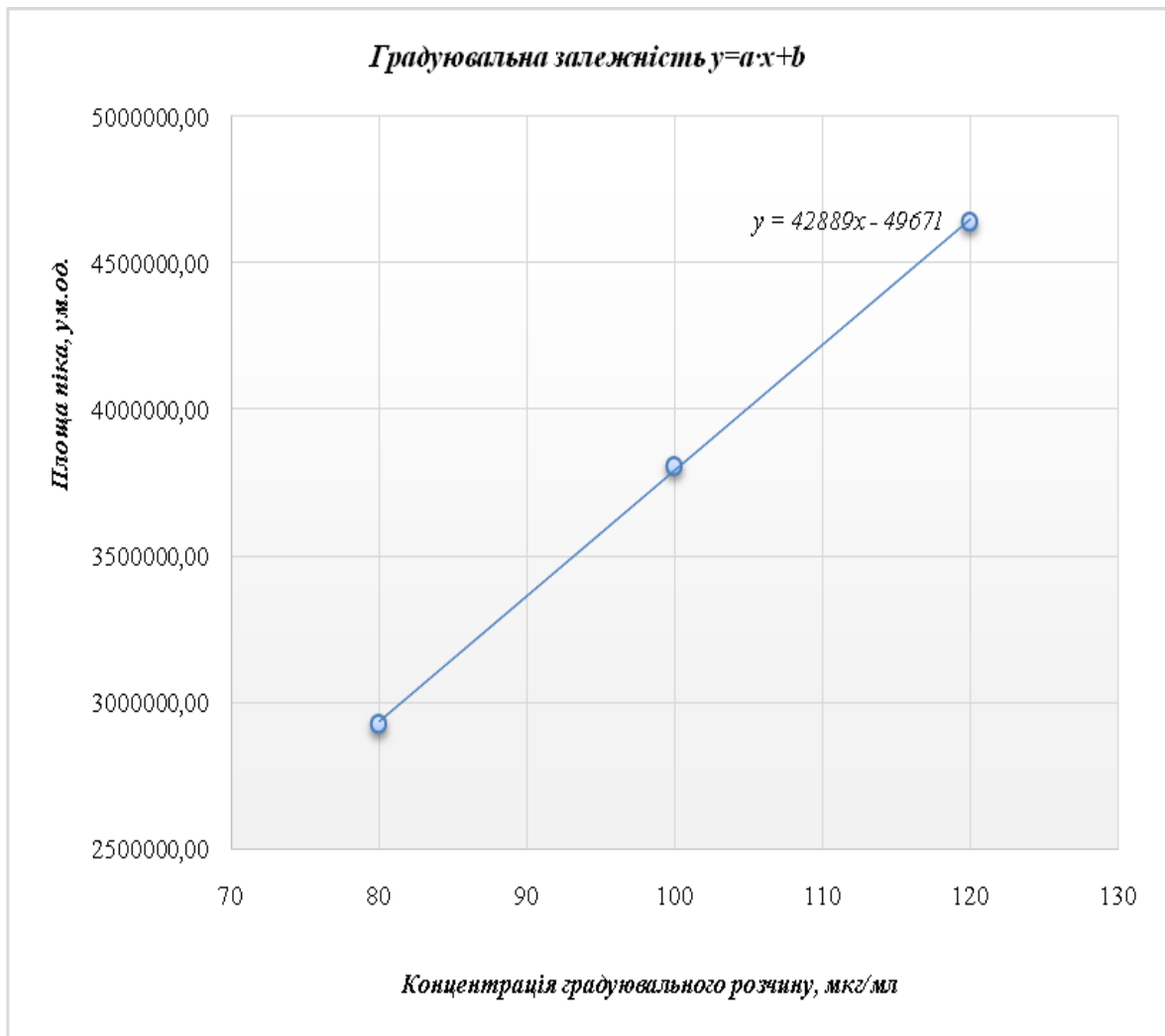


Рис 3. Градувальна залежність площі піку від концентрації стандартних розчинів в нормалізованій системі координат.

3.4. Визначення сечовини у м'якій лікарській формі.

Після побудови градуєвальної залежності визначали концентрацію сечовини у м'якій лікарській формі (МЛФ) методом ВЕРХ за вищезазначеною методикою (п.2.1.5.).

Для цього, після процедури пробопідготовки (п. 2.2.), відбирали аліквотну частину (10 мл) приготованого досліджуваного розчину, розчиняли ацетонітрилом у колбі на 0,2 л та проводили хроматографічні визначення.

Концентрацію сечовини у МЛФ визначали за допомогою градуєвального графіка (ГГ). Для наочності у Додатку 5 представлені хроматограми визначення сечовини у зразках, у Таблиці 1 представлено Дані щодо кількісного визначення сечовини у м'яких лікарських формах.

Таблиця 1. Дані щодо кількісного визначення сечовини у м'яких лікарських формах.

№	<i>Зразок №1</i>		<i>Зразок №2</i>	
	Площа піка д.р., ум. од.	Вміст* д.р., %	Площа піка д.р., ум. од.	Вміст* д.р., %
1	3975003	9,02	3898993	11,88
2	3913399	8,89	3861947	12,81
3	3838032	8,74	3927918	11,94
<i>t (f=n-1;P=0,95)</i>				
<i>*Вміст діючої речовини визначався враховуючи розведення</i>				

3.5. Часткова валідація методики.

Термін «Валідація» означає експертну оцінку і надані докази або експериментальні дані (які відповідають принципам GMP, GLP та ISO), та які констатують, що запропоновані методики, процеси, обладнання, продукція тощо дійсно відповідають власному призначенню і встановленим вимогам [19-21] та здатні до відтворюваності та передбачуваного використання.

3.5.1. Перевірка специфічності методики.

Специфічністю називають можливість визначати та аналізувати речовину у присутності інших речовин, молекул, іонів, функціональних груп [19-21].

Альтернативна методика ВЕРХ безпосередньо була розроблена та опрацьована безпосередньо на м'яких лікарських формах (зразках). При визначенні ступеня специфічності методики ми порівнювали результати, які були нами отримані в ході хроматографічних досліджень з концентрацією діючої речовини сечовина у МЛФ, склад якої зазначено в інструкціях для медичного застосування. Аналізуючи Таблицю 1 можна зробити висновок про специфічність методики, оскільки вміст сечовини у МЛФ методом ВЕРХ відрізняється від концентрацій, які зазначені в інструкціях для медичного застосування не більше ніж на 1,5%.

3.5.2. Перевірка лінійності методики.

Лінійність є критерієм[19-21], який характеризує здатність методики, що опрацьовується, підтримувати пряму пропорційну залежність площі піку від концентрації речовини. Градууювальний графік (ГГ) на Рис. 3 та статистична обробка результатів наочно демонструє лінійність методики.

3.5.3. Перевірка робасності методики.

При тестуванні нової методики дослідник вивчає робасність, тобто можливість запропонованих аналітичних дій з прогнозованим результатом у різних лабораторних умовах (при цьому зразки, які досліджують, повинні бути ідентичними, а умови проведення дещо відрізняться. Наприклад, використовується різне обладнання, реагенти різних виробників, різні температурні режими фармацевтичних або хімічних лабораторій тощо).

Робасність методики була опрацьована на об'єктах дослідження у різні календарні дні. Як можна бачити з нижченаведених даних, різниця у кількісних визначеннях, які були виконані у різні дати не перебільшує 2 %, результати можна вважати збіжними:

Зразок 1

	День 1	День 2
	Вміст діючої речовини, %	
1	9,02	9,81
2	9,49	9,13
3	8,74	9,40
\bar{x}	9,08	9,45
RSD,%	4,2	3,6
Дисперсія S^2	0,14	0,12

$\bar{x} \pm t_{p,v} \frac{s}{\sqrt{n}} = \bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}}$	9,08 ± 0,94	9,45 ± 0,85
---	-------------	-------------

Зразок 2

	День 1	День 2
	Вміст діючої речовини, %	
1	11,88	12,25
2	12,81	12,56
3	11,94	12,34
\bar{x}	12,21	12,38
RSD, %	4,3	1,3
Дисперсія S^2	0,27	0,025
$\bar{x} \pm t_{p,v} \frac{s}{\sqrt{n}} = \bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}}$	12,21 ± 1,29	12,38 ± 0,40

3.5.4. Перевірка правильності методики.

Правильністю аналітичної методики називають критерій, який характеризує ступінь відповідності отриманих даних відомим значенням. У нашому дослідженні отримані дані щодо кількісного вмісту сечовини у МЛФ методом ВЕРХ ми порівнювали з концентрацією діючої речовини, яка зазначена в інструкції для медичного застосування.

Висновок про правильність методики оцінюється після встановлення специфічності, лінійності та робастності[19-21].

Враховуючи вищенаведені результати, методику кількісного визначення сечовини у м'яких лікарських формах методом високоефективної рідинної хроматографії можна вважати правильною.

3.6. Порівняльний аналіз методик кількісного визначення сечовини.

Паралельно ми провели кількісне визначення сечовини у кремі (Зразок 1) броматометричним титруванням за методикою[22]:

Водну витяжку сечовини зі Зразку 1 перенесли у мірну колбу на 100 мл, довели водою до риси, ретельно перемішали та охолодили до температури 20⁰С. Піпеткою на 10 мл відібрали аліквоту приготованого розчину та перенесли у конічну колбу для титрування, додали 20 мл розчину калій бромату з концентрацією 0,1 М, 2г кристалічного калій броміду та підкислили розчин сульфатною кислотою до рН = 2, ретельно перемішали, нагріли на водяній бані до 40⁰С, витримали 20 хвилин. Після охолодження до кімнатної температури до отриманої суміші додали 10 мл 1 М розчину натрій гідроксиду, знов перемішали 20 хвилин при температурі 40⁰С. Після охолодження додали 2г кристалічного калій йодиду, підкислили розчин

сульфатною кислотою, струсили та відтитрували йод, який виділився, 0,1 М розчином натрій тіосульфатом зі специфічним індикатором крохмалем. Вміст сечовини розраховували за стандартними формулами об'ємного кількісного визначення. Результати наведено у Таблиці 2:

Таблиця 2. Результати кількісного визначення сечовини у Зразку 1.

№ досліду	Масова частка, %
1	9,80
2	9,84
3	9,78
4	9,75

Результати не перевантажені систематичною похибкою, тому, можна вважати, що дана методика забезпечує необхідну точність та відтворюваність результатів. Броматометрію, як метод оксидиметрії, часто використовують у загальній фармацевтичній практиці, але, на нашу думку, метод має незначні недоліки, які знижують точність визначення, а саме:

- помилки досягають десяти відсотків;
- титрант є вторинним стандартом, тому вимагає постійної стандартизації;
- присутність води приводить до небажаних процесів гідролізу;
- трудомісткість процесу;
- використання індикатора.

Метод ВЕРХ відповідає усім стандартам GLP/GMP та ISO, високоефективна рідинна хроматографія дозволяє проводити найточніші хімічні, фармацевтичні та медичні дослідження. Результати ВЕРХ відрізняються високим рівнем автентичності, тому метод ВЕРХ, як альтернативний, можна використовувати для кількісного визначення сечовини у м'яких лікарських формах. Безумовно, перевагами високоефективної рідинної хроматографії вважають високу продуктивність, повну та автоматичну валідацію системи відповідно до вимог GLP/GMP або ISO, простоту у використанні та обробці результатів, але необхідно констатувати, що собівартість аналізу є значною.

ВИСНОВКИ

- Проаналізовано літературні джерела щодо фізико-хімічних та фармакологічних властивостей сечовини, метаболізм дії сечовини.
- У ДФУ та Європейській фармакопеї наведено методики кількісного визначення субстанції сечовина різноманітними фізичними та хімічними методами. Визначення сечовини, яка входить до складу МЛФ методом ВЕРХ не знайдено.
- На основі проведених досліджень було встановлено кількісний вміст сечовини у м'яких лікарських формах альтернативною методикою ВЕРХ.
- Проведено часткову валідацію розробленої методики.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. <http://delavcosmetics.com/uk/library/articles/mochevina-pochemu-ee-ljubit-kozha>.
2. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/520/sechovina>.
3. Довідник лікарських препаратів Компендіум [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <https://compendium.com.ua/>
4. [Державний реєстр лікарських засобів України \(drlz.com.ua\)](http://drlz.com.ua)
5. http://esparma.com.ua/uploads/Bals_NMiF_062013.pdf
6. Надлежащая производственная практика лекарственных средств. Активные фармацевтические ингредиенты. Готовые лекарственные средства. Руководства по качеству. Рекомендации PIC/S / Под ред. Н.А. Ляпунова, В.А. Загория, В.П. Георгиевского, Е.П. Безуглой. – Киев: Морион, 2001. – 472 с.
7. Фармацевтичний аналіз / [П.О. Безуглий, В.О. Грудько, С.Г. Леоновата ін.; за заг. ред. П. О. Безуглого]. - Харків: Вид-во НФАУ, Золоті сторінки, 2001. - 240 с.
8. Vogel A.I. Practical organic chemistry including qualitative organicanal-ysis/ A.I. Vogel. - [3ded.]. - London: Longman, 1974. – 1188 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. European Pharmacopoeia. 7.0. – P. 585 – 586.
10. European Pharmacopoeia. 8.0. – P. 3003.
11. Дей, Р., Андервуд, А. (1989). Кількісна аналітична хімія. (п'яте видання). PEARSON Prentice Hall.
12. Буссі Хуан. (2007). Високопродуктивна рідинна хроматографія. [PDF]. Отримано з: fing.edu.uy.
13. Вікіпедія. (2019). Високоєфективна рідинна хроматографія. Відновлено з: en.wikipedia.org

14. Кларк Джим. (2007). Високоєфективна рідинна хроматографія. Отримано з: chemguide.co.uk
15. Матвій Баркович. (05 грудня 2019 р.). Високоєфективна рідинна хроматографія. Хімія LibreTexts. Відновлено з: chem.libretexts.org
16. Г.П. Томас. (15 квітня 2013 р.). Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) - методи, переваги та застосування. Отримано з: azom.com
17. Аналітична хімія / В.В. Болотов, О.М. Свєчнікова, С.В. Колісник та ін. — Х., 2004; ДФУ. — Х., 2001.
18. [Мала гірнича енциклопедія](#) : у 3 т. / за ред. [В. С. Білецького](#). — Д. : [Східний видавничий дім](#), 2013. — Т. 3 : С — Я. — 644 с
19. 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.
20. 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.
21. Haynes W.M.CRC Handbook of Chemistry and Physics. 94th Edition. CRC Press LLC, Boca Raton. 2013-2014. P. 3–90.
- 22.** Гончарова А.А., Баранова І.І., Блажеєвський М.Є. Ідентифікація та кількісне визначення сечовини в кремі для застосування при синдромі діабетичної стопи. Актуальні проблеми фармації та фармакотерапії с. 147-153

ДОДАТКИ

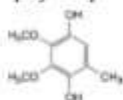
Додаток 1 Витяг з Європейської Фармакопеї

Undecylenic acid

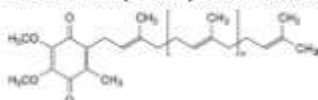
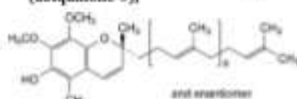
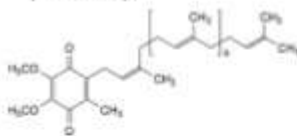
EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.0

IMPURITIES

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



A. 2,3-dimethoxy-5-methylbenzene-1,4-diol.

B. $n = 5$: 2-[(all-*E*)-3,7,11,15,19,23,27-heptamethyloctadecosa-2,6,10,14,18,22,26-heptaenyl]-5,6-dimethoxy-3-methylbenzene-1,4-dione (ubiquinone-7).C. $n = 6$: 5,6-dimethoxy-3-methyl-2-[(all-*E*)-3,7,11,15,19,23,27,31-octamethyldotriacontane-2,6,10,14,18,22,26,30-octaenyl]benzene-1,4-dione (ubiquinone-8).D. $n = 7$: 5,6-dimethoxy-3-methyl-2-[(all-*E*)-3,7,11,15,19,23,27,31,35-nonamethylhexatriacontane-2,6,10,14,18,22,26,30,34-nonaenyl]benzene-1,4-dione (ubiquinone-9).E. (2*RS*)-7,8-dimethoxy-2,5-dimethyl-2-[(all-*E*)-4,8,12,16,20,24,28,32,36-nonamethylheptatriacontane-3,7,11,15,19,23,27,31,35-nonaenyl]-2*H*-1-benzopyran-6-ol (ubiquinol).F. 2-[(2*Z*,6*E*,10*E*,14*E*,18*E*,22*E*,26*E*,30*E*,34*E*,38*E*)-3,7,11,15,19,23,27,31,35-decamethyl-2,6,10,14,18,22,26,30,34,38-tetracontadecaenyl]-5,6-dimethoxy-3-methylbenzene-1,4-dione (ubidecarenone (*Z*)-isomer).

IDENTIFICATION

A. Refractive index (2.2.6): 1.447 to 1.450, determined at 25 ± 0.5 °C.

B. Freezing point (2.2.18): 21 °C to 24 °C.

C. To 2.0 g add 2 mL of freshly distilled aniline *R* and boil under a reflux condenser for 10 min. Allow to cool and add 30 mL of ether *R*. Shake with 3 quantities, each of 20 mL, of dilute hydrochloric acid *R* and then with 20 mL of water *R*. Evaporate the organic layer to dryness on a water-bath. After recrystallising twice from ethanol (70 per cent V/V) *R* and drying in vacuo for 3 h, the residue melts (2.2.14) at 66 °C to 68 °C.D. Dissolve 0.1 g in a mixture of 2 mL of dilute sulfuric acid *R* and 5 mL of glacial acetic acid *R*. Add dropwise 0.25 mL of potassium permanganate solution *R*. The colour of the potassium permanganate is discharged.

TESTS

Peroxide value (2.5.5, Method A): maximum 10.

Fixed and mineral oils. To 1.0 g add 5 mL of sodium carbonate solution *R* and 25 mL of water *R* and boil for 3 min. The hot solution is not more opalescent than reference suspension II (2.2.1).Water-soluble acids. To 1.0 g add 20 mL of water *R* heated to 35–45 °C and shake for 2 min. Cool and filter the aqueous layer through a moistened filter. To 10 mL of the filtrate add 0.1 mL of phenolphthalein solution *R*. Not more than 0.1 mL of 0.1 M sodium hydroxide is required to change the colour of the indicator.Degree of unsaturation. Dissolve 85.0 mg in a mixture of 5 mL of dilute hydrochloric acid *R* and 30 mL of glacial acetic acid *R*. Using 0.05 mL of indigo carmine solution *R1* as indicator, added towards the end of the titration, titrate with 0.0167 M bromide-bromate until the colour changes from blue to yellow. 8.9 mL to 9.4 mL of 0.0167 M bromide-bromate is required. Carry out a blank titration.

Sulfated ash (2.4.14): maximum 0.1 per cent, determined on 0.50 g.

ASSAY

Dissolve 0.750 g in 10 mL of ethanol (96 per cent) *R*. Titrate with 0.5 M sodium hydroxide using 0.1 mL of phenolphthalein solution *R* as indicator, until a pink colour is obtained.1 mL of 0.5 M sodium hydroxide is equivalent to 92.14 mg of $C_{11}H_{20}O_2$.

STORAGE

In a non-metallic container, protected from light.

01/2008:0461

01/2008:0743
corrected 8.0

UNDECYLENIC ACID

Acidum undecylenicum

 $C_{11}H_{20}O_2$
[112-38-9] M_r 184.3

DEFINITION

Undec-10-enoic acid.

Content: 97.0 per cent to 102.0 per cent.

CHARACTERS

Appearance: white or very pale yellow, crystalline mass or colourless or pale yellow liquid.

Solubility: practically insoluble in water, freely soluble in ethanol (96 per cent) and in fatty and essential oils.

UREA

Ureum

 M_r 60.1 CH_4N_2O
[57-13-6]

DEFINITION

Carbamide.

Content: 98.5 per cent to 101.5 per cent (dried substance).

CHARACTERS

Appearance: white or almost white, crystalline powder or transparent crystals, slightly hygroscopic.

3508

See the information section on general monographs (cover pages)

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

IDENTIFICATION

First identification: A, B.

Second identification: A, C, D.

A. Melting point (2.2.14): 132 °C to 135 °C.

B. Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

Comparison: urea CRS.

C. Dissolve 0.1 g in 1 mL of water R. Add 1 mL of nitric acid R. A white, crystalline precipitate is formed.

D. Heat 0.5 g in a test tube until it liquefies and the liquid becomes turbid. Cool, dissolve in a mixture of 1 mL of dilute sodium hydroxide solution R and 10 mL of water R and add 0.05 mL of copper sulfate solution R. A reddish-violet colour is produced.

TESTS

Solution S. Dissolve 10.0 g in water R and dilute to 50 mL with the same solvent.

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

To 2.5 mL of solution S add 7.5 mL of water R.

Alkalinity. To 2.5 mL of solution S add 7.5 mL of water R, 0.1 mL of methyl red solution R and 0.4 mL of 0.01 M hydrochloric acid. The solution is red to orange.

Buret: maximum 0.1 per cent.

To 10 mL of solution S add 5 mL of water R, 0.5 mL of a 5 g/L solution of copper sulfate R and 0.5 mL of strong sodium hydroxide solution R. Allow to stand for 5 min. Any reddish-violet colour in the solution is not more intense than that in a standard prepared at the same time in the same manner using 10 mL of a 0.2 g/L solution of buret R.

Ammonium (2.4.1): maximum 500 ppm, determined on 0.1 mL of solution S.

Heavy metals (2.4.8): maximum 10 ppm.

Dilute 10 mL of solution S to 20 mL with water R. 12 mL of the solution complies with test A. Prepare the reference solution using lead standard solution (1 ppm Pb) R.

Loss on drying (2.2.32): maximum 1.0 per cent, determined on 1.000 g by drying in an oven at 105 °C for 1 h.

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

ASSAY

Dissolve 0.2000 g in water R and dilute to 50.0 mL with the same solvent. Introduce 1.0 mL of the solution into a combustion flask. Add 4 g of a powdered mixture of 100 g of dipotassium sulfate R, 5 g of copper sulfate R and 2.5 g of selenium R, and 3 glass beads. Wash any adhering particles from the neck into the flask with 5 mL of sulfuric acid R, allowing it to run down the sides of the flask, and mix the contents by rotation. Close the mouth of the flask loosely, for example by means of a glass bulb with a short stem, to avoid excessive loss of sulfuric acid. Heat gradually at first, then increase the temperature until there is vigorous boiling with condensation of sulfuric acid in the neck of the flask; take precautions to prevent the upper part of the flask from becoming overheated. Continue the heating for 30 min. Cool, dissolve the solid material by cautiously adding to the mixture 25 mL of water R, cool again and place in a steam-distillation apparatus. Add 30 mL of strong sodium hydroxide solution R and distil immediately by passing steam through the mixture. Collect the distillate in 15 mL of a 40 g/L solution of boric acid R to which has been added 0.2 mL of methyl red mixed solution R and enough water R to cover the tip of the condenser. Towards the end of the distillation, lower the receiver so that the tip of the condenser is above the

surface of the acid. Take precautions to prevent any water on the outer surface of the condenser from reaching the contents of the receiver. Titrate the distillate with 0.01 M sulfuric acid. 1 mL of 0.01 M sulfuric acid is equivalent to 0.6006 mg of $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$.

STORAGE

In an airtight container.

01/2008:0958

UROFOLLITROPIN

Urofollitropinum

[97048-13-0]

DEFINITION

Urofollitropin is a dry preparation containing menopausal gonadotrophin obtained from the urine of post-menopausal women. It has follicle-stimulating activity and no or virtually no luteinising activity. The potency is not less than 90 International Units of follicle-stimulating hormone (hFSH) per milligram. The ratio of units of luteinising hormone (interstitial-cell-stimulating hormone) [hLH(ICSH)] to units of follicle-stimulating hormone is not more than 1/60.

PRODUCTION

It may be prepared by a suitable fractionation procedure followed by immunoaffinity chromatography.

CHARACTERS

Appearance: almost white or slightly yellowish powder.

Solubility: soluble in water.

IDENTIFICATION

When administered as prescribed in the assay it causes enlargement of the ovaries of immature female rats.

TESTS

Hepatitis virus antigens. Examined by a suitably sensitive immunochemical method (2.7.1), hepatitis virus antigens are not detected.

HIV antigen. Examined by a suitably sensitive immunochemical method (2.7.1), HIV antigen is not detected.

Residual luteinising activity. The International Units of FSH and LH are the activities contained in stated amounts of the International Standard of human urinary follicle-stimulating hormone and luteinising hormone (interstitial-cell-stimulating hormone) which consists of a mixture of a freeze-dried extract of urine of post-menopausal women with lactose.

The equivalence in International Units of the International Standard is stated by the World Health Organization. Use immature female rats approximately 21 days old and having masses such that the difference between the heaviest and the lightest rat is not more than 10 g. Assign the rats at random to 4 equal groups of at least 6 animals. If sets of 4 litter mates are available, assign one litter mate at random from each set to each group and mark according to litter.

Inject subcutaneously into each rat 50 IU of serum gonadotrophin R on the first day and 25 IU of chorionic gonadotrophin R on the fourth day, each in 0.5 mL of phosphate-albumin buffered saline pH 7.2 R.

Choose 3 doses of the reference preparation such that the smallest dose produces a depletion of the ovarian ascorbic acid content in all the rats and the largest dose does not produce a maximal depletion in all the rats. Use doses in geometric progression; as an initial approximation, total doses of 0.5 IU, 1.0 IU and 2.0 IU may be tried although the dose to be used will depend on the sensitivity of the animals.

Додаток 2. Витяг з ДФУ

Сечовина

СЕЧОВИНА

Ureum

UREA

H₂CH₂N₂O
[57-13-6]

М.м. 60.1

Карбамід.

Вміст: не менше 98.5 % і не більше 101.5 %, у перерахунку на суху речовину.

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Кристалічний порошок білого або майже білого кольору або прозорі кристали. Слабо гігроскопічна.*Розчинність.* Дуже легко розчинна у воді *P*, розчинна в етанолі (96 %) *P*, практично не розчинна у метилехлориді *P*.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Перша ідентифікація: А, В.*Друга ідентифікація:* А, С, D.**А.** Температура плавлення (2.2.14). Від 132 °С до 135 °С.**В.** Абсорбційна спектроскопія в інфрачервоній області (2.2.24).*Відповідність:* спектру ФСЗ сечовини.**С.** 0.1 г субстанції розчиняють в 1 мл води *P*, додають 1 мл азотної кислоти *P*; утворюється білий кристалічний осад.**D.** 0.5 г субстанції нагрівають у пробірці до розплавлення та помутніння рідини, охолоджують і розчиняють у суміші 1 мл натрію гідроксиду розчину розведеного *P* і 10 мл води *P*. До одержаного розчину додають 0.05 мл міді(II) сульфату розчину *P*; з'являється червонувато-фіолетове забарвлення.

ВИПРОБУВАННЯ

Розчин S. 10.0 г субстанції розчиняють у воді *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50 мл.**Прозорість розчину (2.2.1).** До 2.5 мл розчину *S* додають 7.5 мл води *P*. Одержаний розчин має бути прозорим.**Кольоровість розчину (2.2.2, метод II).** Розчин, приготований для випробування «Прозорість розчину», має бути безбарвним.**Лужність.** До 2.5 мл розчину *S* додають 7.5 мл води *P*, 0.1 мл метилового червоного розчину *P* і 0.4 мл 0.01 *M* розчину хлористоводневої кислоти; з'являється від червоного до оранжевого забарвлення.**Біурет.** Не більше 0.1 %.До 10 мл розчину *S* додають 5 мл води *P*, 0.5 мл розчину 5 г/л міді(II) сульфату *P*, 0.5 мл натрію гідроксиду розчину концентрованого *P* і витримують протягом 5 хв. Червонувато-фіолетове забарвлення розчину має бути не інтенсивнішим за еталон, приготований паралельно з випробовуваним розчином із використанням 10 мл розчину 0.2 г/л біурету *P*.**Амонію солі (2.4.1).** Не більше 0.05 % (500 ppm). 0.1 мл розчину *S* мають витримувати випробування на амонію солі.**Важкі метали (2.4.8, метод А).** Не більше 0.001 % (10 ppm).10 мл розчину *S* доводять водою *P* до об'єму 20 мл. 12 мл одержаного розчину мають витримувати випробування на важкі метали. Еталон готують із використанням свинцю еталонного розчину (1 ppm Pb) *P*.**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 1.0 %. 1.000 г субстанції сушать при температурі 105 °С протягом 1 год.**Сульфатна зола (2.4.14).** Не більше 0.1 %. Визначення проводять з 1.0 г субстанції.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

0.2000 г субстанції розчиняють у воді *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину поміщають у колбу для спалювання, додають 4 г здрібненої суміші, що складається зі 100 г дикалію сульфату *P*, 5 г міді(II) сульфату *P* і 2.5 г селену *P*, і три скляні кульки. Додають 5 мл сірчаної кислоти *P* таким чином, щоб вона змивала всі частинки, що прилипли до шийки колби, і стікала по стінках колби. Вміст колби перемішують коловими рухами. Щоб уникнути великих втрат сірчаної кислоти, шийку колби закривають нещільно, наприклад скляною грушоподібною пробкою з коротким запаєм відростком. Колбу нагрівають, поступово доводячи до кипіння з конденсацією пари сірчаної кислоти у шийці колби; при цьому слід стежити за тим, щоб верхня частина колби не перегрівалася. Нагрівання продовжують

Силденафілу цитрат

протягом 30 хв. Охолоджують, розчиняють твердий залишок, додаючи до суміші обережно 25 мл води Р, знову охолоджують і приєднують до приладу для перегонки з водяною паром. Додають 30 мл натрію гідроксиду розчину концентрованого Р і відразу починають перегонку, пропускаючи пару крізь суміш. Відгін збирають у приймач, що містить 15 мл розчину 40 г/л борної кислоти Р, до якого попередньо додають 0,2 мл метилового червоного розчину змішаного Р і достатню кількість води Р для того, щоб кінець холодильника був занурений. Наприкінці перегонки приймач опускають таким чином, щоб кінець холодильника знаходився над поверхнею кислоти. Не слід допускати, щоб на зовнішній поверхні холодильника залишалася рідина зі вмісту приймача. Відгін титрують 0,01 М розчином сірчаної кислоти.

1 мл 0,01 М розчину сірчаної кислоти відповідає 0,6006 мг $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_6$.

ЗБЕРІГАННЯ

У повітронепроникному контейнері.

СИЛДЕНАФІЛУ ЦИТРАТ**Sildenafil citras****SILDENAFIL CITRATE**

$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$
[171599-83-0]

М.м. 667

1-іл)
гідро-
роген

Вміст: не менше 98,0 % і не більше 102,0 %, у перерахунку на безводну речовину.

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Кристалічний порошок білого або майже білого кольору. Слабо гігроскопічний.

Розчинність. Мало розчинний у воді Р і метанолі Р, практично не розчинний у гексані Р.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Абсорбційна спектрофотометрія в інфрачервоній області (2.2.24).

Відповідність: ФСЗ силденафілу цитрату.

ВИПРОБУВАННЯ

Домішка Е. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Суміш розчинників. Аміаку розчин концентрований Р - вода Р - метанол Р (5:25:75).

Випробовуваний розчин. 35,0 мг субстанції, якщо необхідно, за допомогою ультразвуку розчиняють у 2,0 суміші розчинників.

Розчин порівняння (а). 7,0 мг ФСЗ імідазолу (домішка Е) розчиняють у суміші розчинників і доводять об'єм розчину сумішшю розчинників до 20,0 мл. 1,0 мл одержаного розчину доводять сумішшю розчинників до об'єму 10,0 мл.

Розчин порівняння (б). 5,0 мл розчину порівняння (а) доводять сумішшю розчинників до об'єму 10,0 мл.

Розчин порівняння (с). Змішують 1 мл випробовуваного розчину та 1 мл розчину порівняння (а).

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю F_{254} Р ((2-10) мкм).

Рухомо фаза: аміаку розчин концентрований Р - етанол (96 %) Р - етилацетат Р - метилхлорид Р (1:20:30:50).

Об'єм проб: 10 мкл випробовуваного розчину та розчинів порівняння (б) і (с), смугами 6 мм.

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

Висушування при температурі 100 °С протягом 15 хв.

Виявлення: витримують у парі йоду, поки пластинка забарвиться у світло-коричневий колір, і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.

Коефіцієнти затримки: цитрату – близько 0; домішки Е – близько 0,25; силденафілу – близько 0,4.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (с):

– на хроматограмі виявляються дві чітко розділені плями.

Нормування:

– **домішка Е:** зона домішки Е не має бути інтенсивнішою ніж основна зона на хроматограмі розчину порівняння (б) (0,1 %).

Супровідні домішки. Рідинна хроматографія (2.2.29).

Випробовуваний розчин (а). 35,0 мг субстанції, якщо необхідно, за допомогою ультразвуку розчиняють

Додаток 3

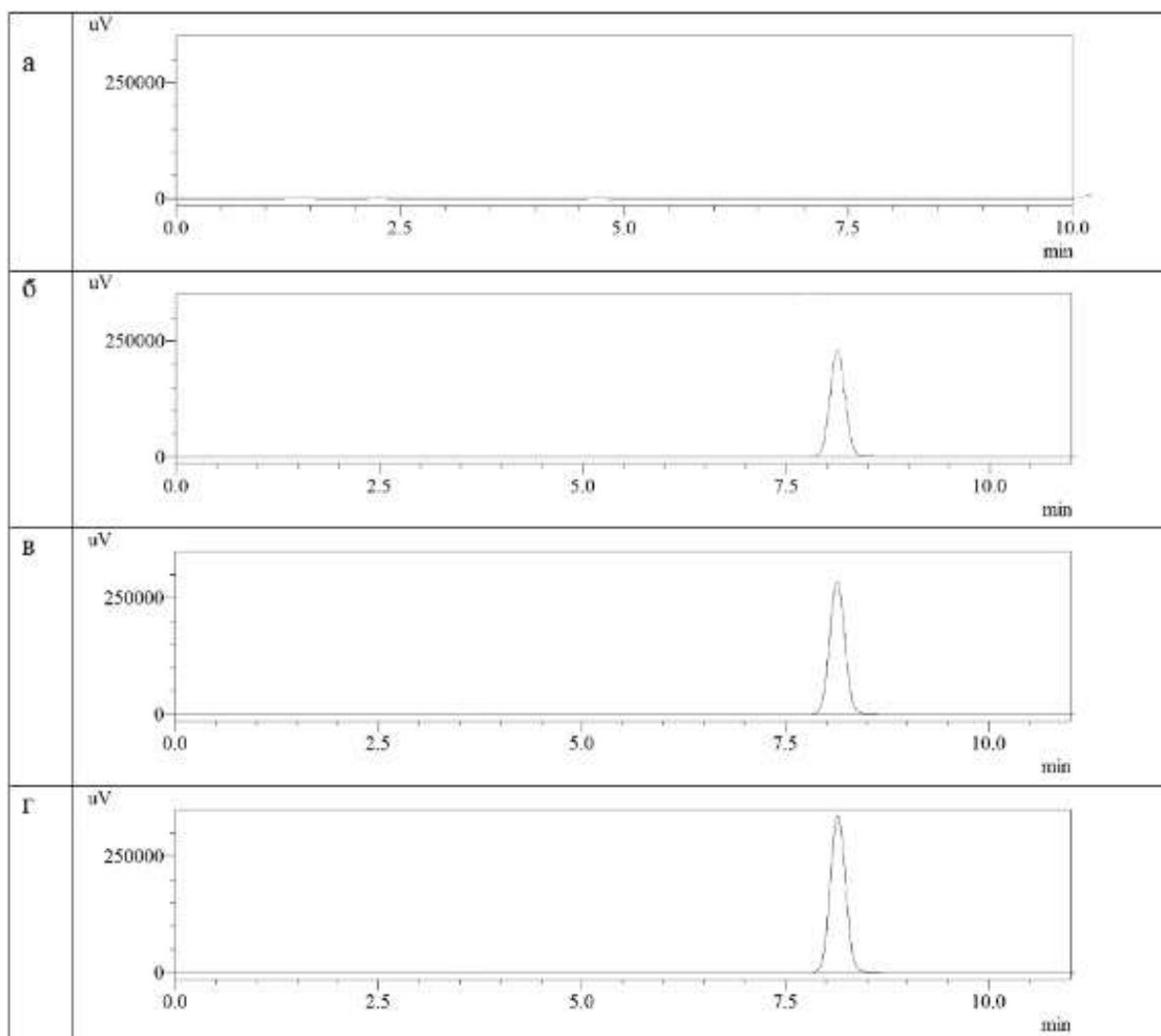
Хроматограф рідинний Shimadzu LC-10ADvp, зав. № С20964330924СS,
свідоцтво про калібрування № 3991 від
05.07.2019 ТОВ «МЕТРОЛОДЖІ СЕРВІС».



Додаток 4.

Хроматограми стандартних розчинів

- а) хроматограма ацетонітрилу для ВЕРХ;
- б) хроматограма градуювального розчину сечовини з концентрацією 80 мкг/мл;
- в) хроматограма градуювального розчину сечовини з концентрацією 100 мкг/мл;
- г) хроматограма градуювального розчину сечовини з концентрацією 120 мкг/мл.

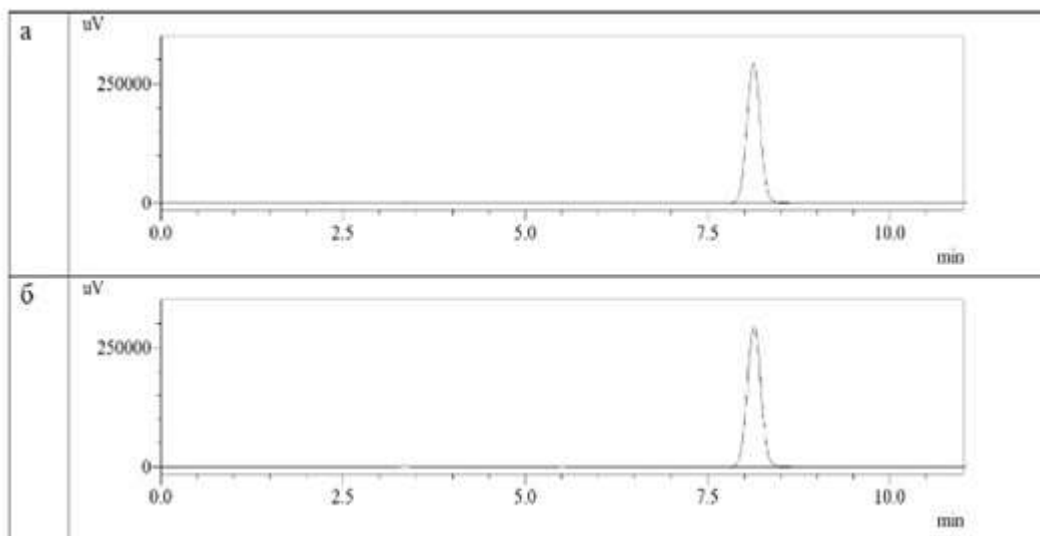


Додаток 5.

Хроматограми досліджуваних зразків.

а) Зразок 1.

б) Зразок 2



Анотація (Summary)

Urea is part of soft medicinal forms, widely used in pharmaceutical and medical practice in the treatment of psoriasis, seborrhea, and other dermatological diseases. Colorimetry does not belong to sensitive research methods and therefore is not a widespread method.

We were tasked with developing a new, alternative, highly sensitive method for the quantitative determination of urea in soft medicines.

We chose soft dosage forms (sample 1 and sample 2), which include urea, as the objects of the study. The content of urea in the samples, according to the instructions for medical use, is 10% and 12%, respectively.

To construct a calibration graph in the HPLC method.

Conditions of chromatographic determination. We chose acetonitrile-water mixture (70:30) as the mobile phase, the column temperature was 30 C, the volume of the injector loop was 20 μ l, and the wavelength at which spectrophotometric determination was performed was 260 nm.

As a result of our research, the indicators of the quantitative content of urea in the samples were obtained at the level of 9.89% and 10.07%, respectively.

Conclusions. A new alternative method for the quantitative determination of urea by HPLC in soft dosage forms is proposed. Of course, the HPLC method meets all international standards, but it is necessary to emphasize that the cost of the analysis, in our opinion, is significant.