

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

ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «**Кількісне визначення зопіклону у твердій лікарській формі**».

Виконала: здобувач вищої освіти 5-го курсу, групи 118В1А
фармацевтичного напрямку підготовки 226 Фармація,
промислова фармація

Трунова Наталія Миколаївна

Керівник:

Професорка кафедри аналітичної, фізичної та колоїдної хімії,
доктор педагогічних наук, кандидат хімічних наук,

Рева Тетяна Дмитрівна

Рецензент : доцентка кафедри хімії ліків та лікарської
токсикології, к.хім.н.,

доцентка Глушаченко Ольга Олександрівна

Київ – 2026

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів.	4
Вступ.	5
ОСНОВНА ЧАСТИНА. Розділ 1. Зопіклон, ідентифікація та методи кількісного визначення, фармакологічні та фармакокінетичні властивості.	9
1.1. Фізико-хімічні властивості зопіклону, ідентифікація та кількісне визначення.	9
1.2. Фармакологічні та фармакокінетичні властивості.	10
Розділ 2. Експериментальна частина.	13
2.1. Об'єкти дослідження та методи дослідження.	13
2.1.1. Об'єкти дослідження	13
2.1.2. Обладнання та реактиви.	14
2.1.3. Приготування розчинів та методики дослідження.	15
Розділ 3. Результати та їх обговорення.	18
3.1. Побудова градуовального графіка та вивчення лінійності методики спектрофотометричного кількісного визначення.	21
3.2. Кількісне спектрофотометричне визначення діючої	23

речовини зопіклон у Зразках 1 та 2.	
3.3 Часткова валідація методики спектрофотометричного визначення зопіклону у досліджуваних зразках.	25
3.3.1. Оцінка внутрішньолабораторної точності методики спектрофотометричного визначення.	25
3.3.2. Перевірка стабільності розчинів у часі.	26
3.4. Кількісне ацидиметричне визначення діючої речовини зопіклон у Зразках 1 та 2.	28
Висновки.	30
Список використаних джерел.	31
Додатки.	34
Анотація (Summary).	38

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

НМУ – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

ССЗ – снодійно-седативні засоби

ФСЗ – фармакопейний стандартний зразок

АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт

ЦНС – центральна нервова система

ШКТ – шлунково-кишковий тракт

БТС – сульфоталеїновий барвник бромтимоловий синій

ТШХ – тонкошарова хроматографія

РХ – рідинна хроматографія

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

УФ – ультрафіолетова спектрофотометрія

ІЧ – інфрачервона спектрофотометрія

ЛЗ – лікарський засіб

мг – міліграм

мл – мілілітр

нм – нанометр

д.р.- діюча речовина

Т. кип. – температура кипіння

Т. пл. – температура плавлення

С⁰ – градуси Цельсія

ВСТУП

Клінічними дослідженнями доведено, що при відсутності у людини регулярного сну на протязі 7 годин ризик виникнення розвитку важких захворювань збільшується у декілька разів оскільки сон є складовою частиною здорового способу життя. Недосип сприяє розвитку серцево-судинних захворювань, гіпертензивних станів, збільшується вага і, відповідно, з'являються ознаки ожиріння, порушується робота імунної системи та шлунково-кишкового тракту, виникає діабет та погіршується ментальне здоров'я людини[1-4], Рисунок 1:



Рисунок 1. Прояви безсоння. Фото сайту <https://pixabay.com>.

Класифікують порушення сну шістьма основними категоріями, а саме:

1. Різні форми безсоння (інсомнія);
2. Порушення дихання (апное);
3. Денна сонливість (гіперсомнія, нарколепсія);
4. Порушення циркадного ритму;

5. Переживання, які виникають при порушенні сну (парасомнія);
6. Синдром неспокійних ніг, бруксизм.

Снодійно-седативними засобами (ССЗ)[5] називають лікарські засоби, які мають властивість діяти на ЦНС людини і заспокоювати її. Седативні властивості можуть проявляти як природні речовини (валеріана, собача кропива тощо), так і синтетичні сполуки (барбітурати, транквілізатори тощо).

За здатністю впливати на організм ССЗ класифікують на три групи [5]:

1. Засоби, що посилюють гальмівні процеси та які опосередковані γ -аміномасляною кислотою (ГАМКергічні засоби).
2. Блокатори гістамінових H1- рецепторів.
3. Агоністи мелатонінових рецепторів.

Найпоширенішою групою ССЗ є ГАМКергічні засоби, за хімічною будовою ці сполуки діляться на похідні бензодіазепінового ряду (мідазолам, феназепам, діазепам, нітрозепам), небензодіазепінові препарати (Z – препарати: золпідем, зопіклон, залеплон) та барбітурати (фенобарбітал).

Z – препарати мають короткий час дії, тому вони є ефективними для швидкого засинання. Нажаль, прийом препарату може визивати звикання та прояви небажаних алергічних реакцій, сонливість, проблеми з ШКТ.

Але, аналізуючи дію ССЗ, неможливо не відмітити і певні позитивні аспекти оскільки при терапії снодійними препаратами знижується кількість нічних пробуджень, покращується якість сну. Нажаль, неконтрольований прийом ССЗ може викликати звикання та лікарську залежність (непереборне бажання людини постійно вживати певний лікарський засіб).

Актуальність теми: Враховуючи достатньо велику кількість препаратів з зопіклоном та наявні небажані побічні реакції, пошук нових експресних та недорогих методик кількісного визначення цієї діючої речовини у лікарських засобах є актуальним.

Метою роботи було розробка, апробація та часткова валідація методики кількісного спектрофотометричного визначення АФІ зопіклон у таблетках.

Завдання:

1. Проаналізувати застосування твердих лікарських форм, до складу яких входить зопіклон. Провести бібліосемантичний аналіз щодо фармакології зопіклону та фізико-хімічних властивостей сполуки зопіклон.
2. Провести моніторинг методик кількісного визначення АФІ зопіклон та його ідентифікації у субстанції та твердих лікарських формах.
3. Розробити та апробувати методику кількісного визначення зопіклону спектрофотометрією у видимій області, виконати її часткову валідацію.

Методи дослідження: бібліосемантичний, спектрофотометрія у видимій області, ацидиметрія з наступним визначенням точки еквівалентності потенціометрією.

Новизна та значення одержаних результатів:

Результатом роботи є розробка нової експресної та недорогої методики кількісного визначення зопіклону у твердій лікарській формі спектрофотометрією у видимій області.

Апробація результатів дослідження. Результати роботи були представлені на VI – тій Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Планта+. Наука, практика та освіта», Київ, Україна, 23 січня 2026 р.

Структура роботи. Робота представлена на 40 сторінках, додатків - 3 рисунків- 7, таблиць- 5.

ОСНОВНА ЧАСТИНА. Розділ 1. Зопіклон, ідентифікація та методи кількісного визначення, фармакологічні та фармакокінетичні властивості.

1.1 Фізико-хімічні властивості зопіклону, ідентифікація та кількісне визначення.

Зопіклон [6] є речовиною синтетичного походження, сполука вперше була синтезована у 1986 році у лабораторії фармацевтичної компанії Sanofi. За агрегатним станом зопіклон є білим або блідо-жовтим порошком з низькою розчинністю у воді та етанолі. Препарат добре розчиняється у мінеральних кислотах та хлорметані, плавиться при температурі 177⁰С, має здатність розкладатися під впливом світла. Зберігається у темному склі без доступу повітря та сонячних променів. Ідентифікують зопіклон фізико-хімічними методами (методом ТШХ у системі триетиламін-ацетон-етилацетат, співвідношення 2:50:50).

Зопіклон належить до похідних циклопірону та бензодіазепіну, молярна маса 388,08 г/ моль, міжнародна назва сполуки (RS)-6-(5-chloropyridin-2-yl)-7-охо-6,7-dihydro-5H-pyrrolo[3,4-*b*]pyrazin-5-yl 4-methylpiperazine-1-carboxylate. [6], брутоформула сполуки C₁₇H₁₇ClN₆O₃.

Фармакологічна група NO5CF01.

З точки зору хімічної будови, зопіклон є похідним циклопіролону та бензодіазепіну, тобто, прогнозовано, хімічні реакції можливі по семичленому гетероциклу (1,4-діазепін). Ідентифікацію похідних діазепіну проводять спираючись на процес гідролізу та наступної реакції діазотування, за продуктами реакції піролізу, позитивними реакціями з загальноалкогоїдними реактивами тощо. Кількісно зопіклон визначають об'ємним методом ацидиметричного титрування у неводному середовищі (Додаток 1) з наступним визначенням точки еквівалентності

потенціометрією за нижче наведеною методикою: 0,300 г наважки поступово розчиняють у 50 мл етанового ангідриду. Титрують приготований розчин перхлоратною кислотою, $c(\text{HClO}_4) = 0,1 \text{ M}$, 1 мл титранту відповідає 38,88 мг зопіклону (Рисунок 2):

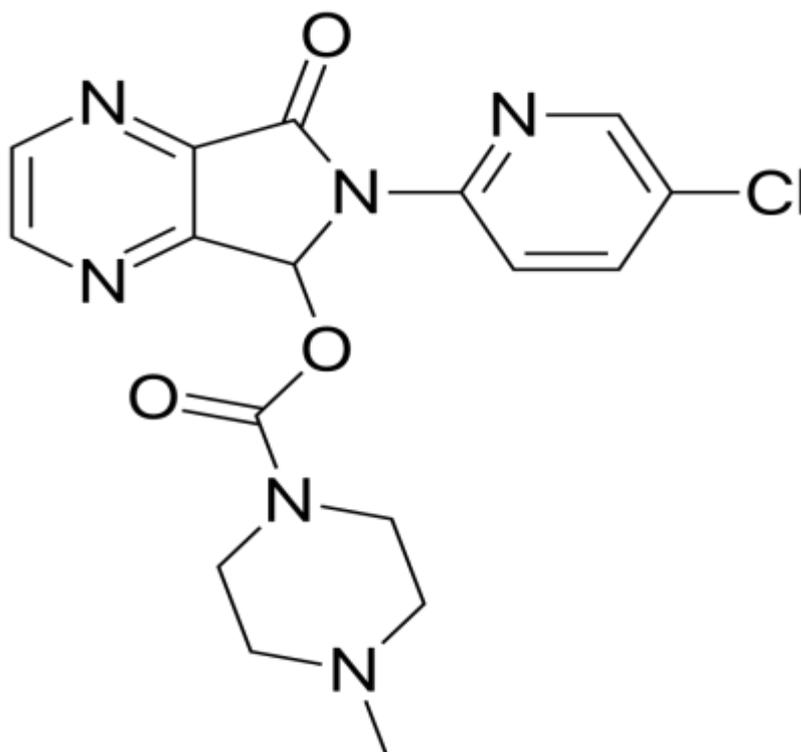


Рисунок 2. Зопіклон [6].

У ДФУ відсутня монографія на субстанцію зопіклон.

1.2. Фармакологічні та фармакокінетичні властивості.

Фармакологія [7-12] зопіклону обумовлена тим, що сполука діє як специфічний агоніст ГАМК-омега рецепторів ЦНС. Зопіклон зменшує тривалість I стадії сну і підтримує подовження II та III стадії, тобто впливає на покращення якості сну і гальмує частоту нічних і ранніх пробуджень. Біодоступність зопіклону є кількісною та досягає 80 %, швидкість абсорбції є високою і пікові значення концентрації у плазмі спостерігаються через дві години. Препарат швидко розподіляється із

судинного русла, не залежить від статі пацієнта та прийому їжі, період напіввиведення становить 5 годин, здатний перетинати гематоенцефалічний бар'єр, метаболізм відбувається у печінці з утворенням двох основних метаболітів у вигляді яких сполука виводиться з організму нирками (до 80%, має великий об'єм розподілу).

Зопіклон не бажано використовувати пацієнтам, які мають:

Підвищену чутливість до препарату;

Дихальну недостатність, у тому числі апное;

Хронічну печінкову недостатність;

Міастенію;

Парасомнію.

Взаємодія з іншими лікарськими засобами.

Зопіклон не бажано приймати з іншими седативними препаратами, або препаратами, що здатні зменшувати увагу та концентрування (похідні морфіну, опоїди, антидепресанти, седативні H1-антигістамінні препарати, антигіпертензивні препарати центральної дії).

Алкоголь посилює дію зопіклону, препарати з Натрієм (натрію оксибутират) при одночасному прийомі з зопіклоном посилює пригнічення функцій ЦНС.

При одночасному прийомі із:

Рифампіцином. Ефективність зопіклону знижується внаслідок посилення метаболізму останнього у печінці;

Барбітуратами. Пригнічується дихальна функція;

Наркотичними анальгетиками. Посилюється ейфорія і збільшується психічна залежність;

Бупренорфіном. Підвищується ризик пригнічення дихання;

Клозапіном. Розвивається колапс, що призводить до зупинки серцевої діяльності;

Антибіотики кларитроміцин, еритроміцин, телітроміцин здатні посилювати седативний ефект зопіклону;

Кетоконазол, ітраконазол, вориконазол здатні посилювати седативний ефект зопіклону.

Передозування при лікуванні зопіклоном.

Симптоми при передозуванні зопіклоном проявляються у пригніченні функції ЦНС (сонливість, млявість, сплутаність свідомості), атаксія, м'язова гіпотонія, артеріальна гіпотензія. Передозування проявляється такими побічними реакціями як порушення свідомості, блювання, прояви агресії, галюцинації, головний біль, когнітивні розлади, шкірні висипання, анафілактичні патології.

Зопіклон при неконтрольованому прийомі призводить до небажаного ефекту залежності від препарату. Не рекомендовано призначати препарат при лікуванні психозів [7-12].

Розділ 2. Експериментальна частина.

Випускна кваліфікаційна робота була виконана на кафедрі аналітичної, фізичної та колоїдної хімії НМУ імені О.О. Богомольця.

2.1. Об'єкти дослідження та методи дослідження.

Метою ВКР є розробка, апробація та часткова валідація методики спектрофотометричного кількісного визначення у видимій області АФІ зопіклон у таблетованих лікарських формах.

2.1.1. Об'єкти дослідження.

Об'єктами дослідження ми обрали таблетки вітчизняних виробників Лубни-фарм та ТОВ « Харківське фармацевтичне підприємство Здоров'я - народу»:

Зразок 1. До складу однієї таблетки входить діюча речовина зопіклон - 7,5 мг. Допоміжними речовинами є лактози моногідрат, целюлоза, крохмаль картопляний, повідон, кремнію діоксид колоїдний безводний, тальк, магній стеарат.

Зразок 2. До складу однієї таблетки входить діюча речовина зопіклон - 7,5 мг.

Допоміжними речовинами є лактози моногідрат, крохмаль кукурудзяний, кальцію гідрофосфат безводний, натрію крохмальгліколят, магній стеарат, гіпромелоза, титану діоксид, Рисунок 3:

Зразок 1



Зразок 2



Рисунок 3. Об'єкти дослідження, фото з сайту

<https://likiteka.info/instruction/Zopiklon-tabletki-po-7-5-mg-10/>.

2.1.2. Обладнання та реактиви.

1. Спектрофотометр Jenway 6305 (Велика Британія).
2. Хімічний посуд, точність А (Додаток 2).
3. Іонмір лабораторний «И-130» (Рисунок 4) та гальванічна пара (хлоридосрібний електрод та індикаторний платиновий електрод ЕПВ -1).
4. Магнітний змішувач.
5. Ваги лабораторні MettlerToledo XS204 (Додаток 3).
6. Фармакопейний стандартний зразок Zopiclone, реєстраційний номер Z0452, каталожний номер 43200-80-2.
7. Вода деіонізована.
8. Ацетон, х.ч.
9. Сульфопфталеїновий барвник БТС виробництва НВФ «Синбіас» приблизної концентрації 0,125%.
10. Кислота HClO_4 , концентрації 0,1М.

2.1.3. Приготування розчинів та методики дослідження.

Приготування розчину БТС приблизної концентрації 0,125%.

На лабораторних терезах MettlerToledo XS204 зважують 0,125 г барвника кристалічного бромтимолового синього, переносять у мірну колбу на 100 мл, розчиняють у ацетоні. Струшують.

Приготування розчину HClO_4 , концентрації 0,1М.

Розчин готують змішуванням інгредієнтів: 900 мл концентрованої етанової кислоти, 8,5 мл 70% -ої перхлоратної кислоти, струшують. Потім додають 30 мл етанатного ангідриду та доводять розчин до 1000 мл концентрованою етановою кислотою. Залишають у темному склі на 24 години. Стандартизацію проводять за калій гідроксофталатом.

Приготування розчину фармакопейного стандартного зразку ФСЗ зопіклону концентрації 10 мг/100 мл.

Готують розчин концентрації 0,388 г/л. На лабораторних терезах Mettler Toledo XS204 зважують 0,0388 г кристалічного ФСЗ та розчиняють у 100 мл ацетону. Струшують. Потім відбирають аліквоту 2,58 мл приготованого розчину, переносять у мірну колбу на 100 мл, додають ацетон до позначки, фільтрують крізь паперовий фільтр «синя стрічка».

Приготування стандартних розведених розчинів зопіклону для побудови градуовального графіка та вивчення лінійності методики.

З розчину, концентрація якого становить 10 мг/100 мл готували серію стандартних розчинів концентрації 1,0- 9,0 мг/100 мл. Для цього у мірні колби на 10 мл відбирали нижченаведений об'єм розчину концентрації 10 мг/100 мл, струшували:

№ розчину	Аліквота розчину концентрації 10 мг/100мл, мл	Концентрація приготованого розведеного розчину, мг/100 мл
1	1	1
2	2,5	2,5
3	4,5	4,5
4	6,0	6,0
5	7,0	7,0
6	7,5	7,5
7	9,5	9,5
8	10,0	зразок

Приготування розчинів досліджуваних зразків для спектрофотометричного визначення.

Одну таблетку (кожного зразка окремо) подрібнюють, переносять у мірну колбу на 100 мл, розчиняють у ацетоні. Струшують, за необхідністю фільтрують крізь паперовий фільтр «синя стрічка».

Приготування розчинів досліджуваних зразків для ацидиметричного титрування з наступним визначенням точки еквівалентності потенціометриєю.

П'ятдесят таблеток (кожного зразка окремо) подрібнюють, переносять у мірну колбу на 100 мл, розчиняють у ацетоні. Струшують, за необхідністю фільтрують крізь паперовий фільтр «синя стрічка».

Методика кількісного спектрофотометричного визначення зопіклону.

До 1 мл приготованого для аналізу розчину (стандартного або досліджуваного) додають 1 мл приготованого розчину БТС концентрації 0,125%, доводять ацетоном до 10 мл, струшують.

Вимірюють величину абсорбції (оптичну густину A) при довжині хвилі 400 нм (використовують кварцові кювети на 10 мм), концентрацію аналізованої речовини зопіклон визначають за градуювальним графіком. Прилад, на якому проводили визначення, представлено на Рисунку 4:



Рисунок 4. Спектрофотометр Jenway 6305 (Велика Британія).

Методика кількісного ацидиметричного визначення зопіклону.

10 мл приготованого розчину для об'ємного методу дослідження, постійно перемішуючи, титрують перхлоратною кислотою, $c(\text{HClO}_4) = 0,1\text{M}$. Точку еквівалентності визначають за стрибком на кривій титрування ($E = f(V)$), Рисунок 5:

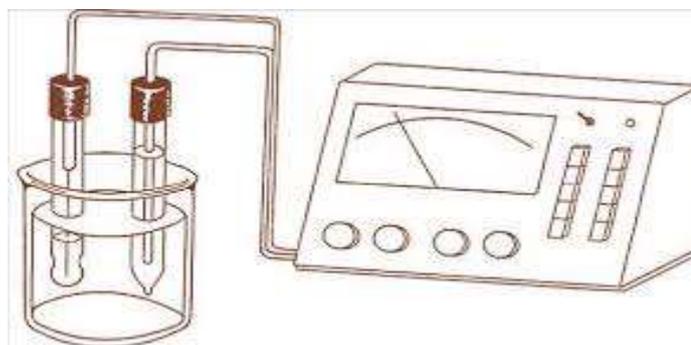


Рисунок 5. Принципова схема ацидиметричного потенціометричного титрування.

Розділ 3. Результати та їх обговорення.

У Державній Фармакопеї України відсутня монографія на субстанцію зопіклон, але, при проведенні бібліосемантичного аналізу, ми ознайомилися із монографією щодо ідентифікації зопіклону у таблетках (аналіз проводять інструментальним методом абсорбційної УФ-спектрофотометрії при довжині хвилі 305 нм та методом рідинної хроматографії РХ). Нижче наведено умови РХ [13]:

Нерухомою фазою обирають октадецильний силікагель з розміром часточок 5 мкм, розмір колонки 0,25 на 4,6 мм, визначення проводять при температурі 30⁰С, рухома фаза складається з ацетонітрилу, натрій додецилсульфату (5 г/л) та натрій дигідрофосфату (1 г/л), рН = 4,0. Об'єм інжекції 10 мкл, швидкість рухомої фази 1,5 мл/хв.

Інші фармакопеї Світу мають статті на АФІ зопіклон:

Країна	Ідентифікація	Кількісне визначення
Японія [14]	УФ-спектрофотометрія, довжина хвилі 214,218,302,306 нм.	Метод РХ, неводне ацидиметричне титрування з наступним визначенням точки еквівалентності потенціометрією.
Британія [15]	УФ-спектрофотометрія, довжина хвилі 340-380 нм, метод ТШХ	Метод ВЕРХ, ацидиметричне титрування з наступним визначенням точки еквівалентності

		потенціометрією.
Європейська фармакопея [16]	УФ -спектрофотометрія, довжина хвилі 340-380 нм, метод ТШХ	Метод ВЕРХ, ацидиметричне титрування з наступним визначенням точки еквівалентності потенціометрією.

При аналізі методик кількісного визначення АФІ зопіклон хотілося б відмітити здобутки українських вчених [17-20], а саме:

- кінетико-спектрофотометричний метод за реакцією окиснення з 3,3/5,5/-тетраметилбензидином [17];
- спектрофотометричне визначення зопіклону з барвником метиловим жовтогарячим [18];
- визначення методом обернено-фазової ВЕРХ [19];
- спектрофотометричне визначення зопіклону з бромтимоловим синім у ацетоні [20-21].

З нашої точки зору метод ВЕРХ є найбільш точним, але виконання аналітичних дій у цьому методі пов'язано із наявністю у лабораторії високовартісного обладнання. Спектрофотометрія (УФ -спектрофотометрія або визначення у видимій області), безумовно, є методом, який знаходиться у царині фізико-хімічних досліджень, тому, при розробці власної методики ми спиралися, переважно, на висновки та експериментальні дослідження запорізьких колег [20-21].

При проведенні кількісних спектрофотометричних досліджень, першим питанням при розробці методики є експериментальне визначення довжини

хвилі, при якій спостерігається максимальна абсорбція. Для того, щоб знайти відповідь на це питання, ми проаналізували спектр поглинання (залежність величини оптичної густини A від довжини хвилі λ), асоціату «зопіклон-БТС». Результати представляли таблично (Таблиця 1) та графічно (Рисунок б). Відповідно наведеним даним, можна стверджувати, що найоптимальнішою довжиною хвилі λ , при якій спостерігається максимальна абсорбція є 400 нм:

Таблиця 1. Залежність оптичної густини A стандартного розчину зопіклону (концентрація розчину 7,5 мг/100 мл) від довжини хвилі λ .

Довжина хвилі λ	350	360	365	370	375	380	400	405	410	420
A	0,009	0,012	0,083	0,092	0,214	0,345	0,789	0,610	0,105	0,022

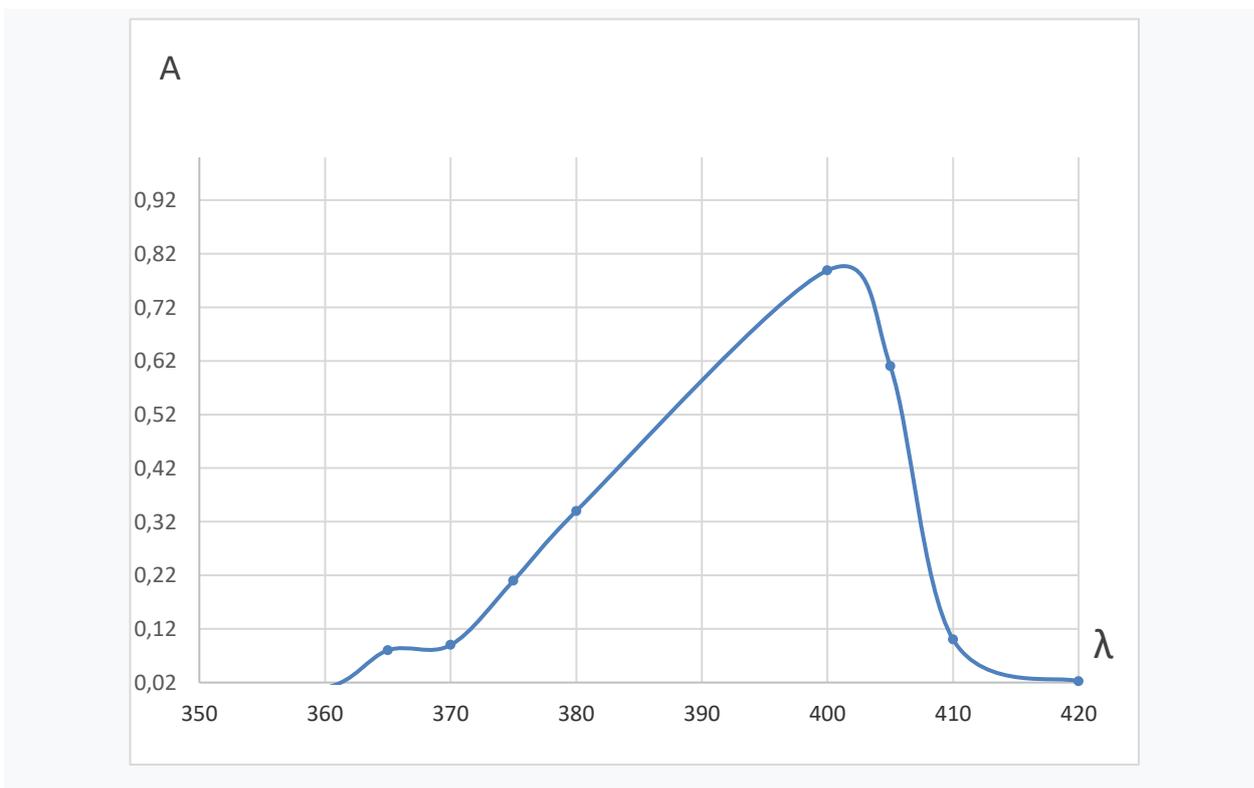


Рисунок б. Спектр поглинання асоціату «зопіклон-БТС».

3.1. Побудова градуовального графіка та вивчення лінійності методики спектрофотометричного кількісного визначення.

У методиках кількісного спектрофотометричного визначення концентрацію досліджуваної речовини допускається знаходити за градуовальним графіком. Для вирішення цієї задачі аналізується залежність між величиною абсорбції (оптичної густини A) та змінною концентрацією досліджуваної речовини. Для побудови цієї залежності ми визначали оптичну густину A асоціатів «зопіклон-БТС», концентрація зопіклону змінювалася у межах 1-10 мг/100мл. Графічну залежність будували у нормалізованій системі координат та перевіряли на лінійність, Рисунок 7:

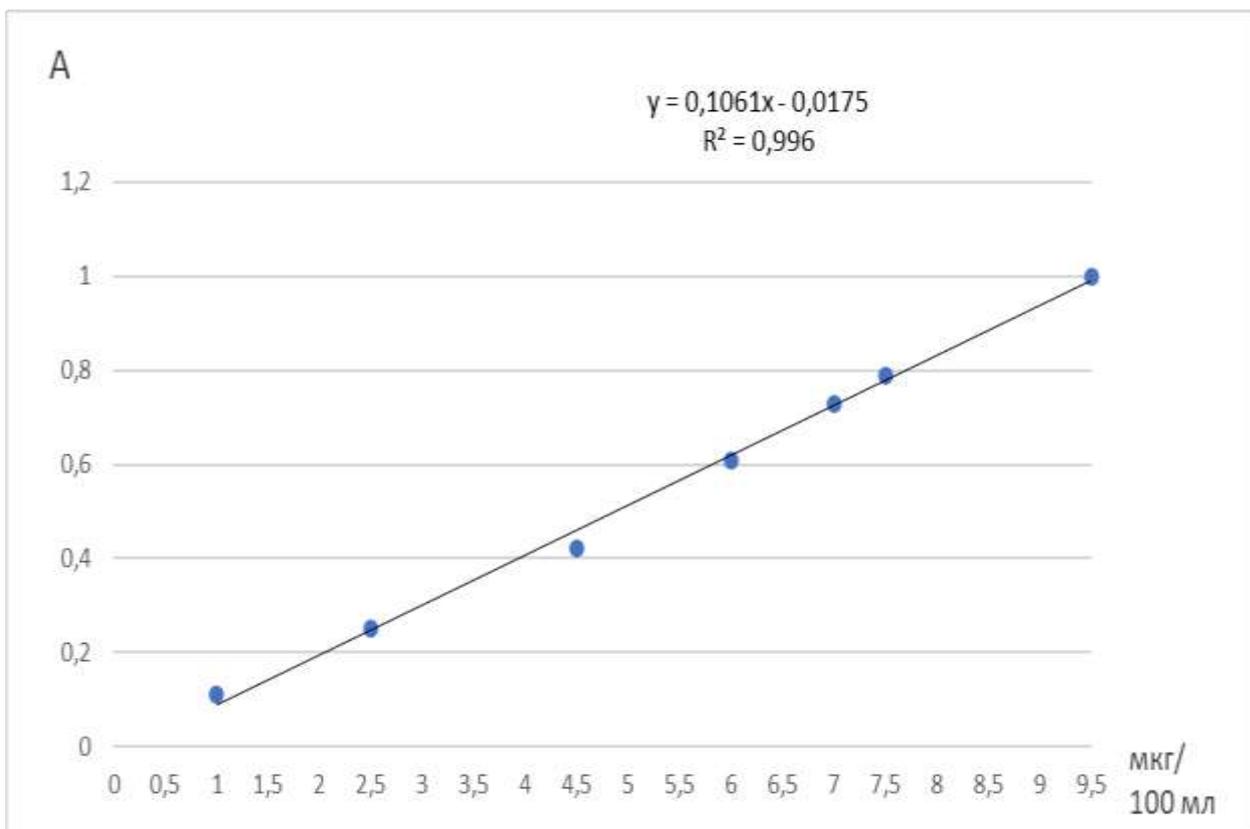


Рисунок 7. Графік лінійної залежності оптичної густини A від концентрації асоціату «зопіклон-БТС».

Статистична обробка результатів експериментальних досліджень[22-23]:

Функція лінійної регресії $y = 0,1061 \cdot x - 0,0175$ (коефіцієнт кореляції $R^2 = 0,996$).

Стандартні відхилення та довірчі інтервали розраховували за методом «найменших квадратів»:

У даному випадку приймаємо загальний вигляд функції лінійної регресії як $y = a \cdot x - b$.

$$s_0^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - Y_i)^2}{v} = 0,000479$$

$$s_b^2 = \frac{n \cdot s_0^2}{n \cdot \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2} = 9,08346 \cdot 10^{-6}$$

$$s_a^2 = \frac{s_b^2}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i^2 = 0,000336$$

$$s_b = \sqrt{s_b^2} = 0,003014$$

$$s_a = \sqrt{s_a^2} = 0,01833$$

Отже, стандартне відхилення для коефіцієнта a складає 0,01833, для коефіцієнта b – 0,003014.

Для розрахунку довірчого інтервалу виписуємо значення коефіцієнта Стьюдента при довірчій ймовірності $P = 0,95$ та ступенях свободи $v = 5 - t(0,95; 5) = 2,5706$.

Розраховуємо довірчий інтервал для коефіцієнта a :

$$a \pm s_a \cdot t(0,95; 5) = 0,1061 \pm 0,04713$$

Розраховуємо довірчий інтервал для коефіцієнта b :

$$b \pm s_b \cdot t(0,95; 5) = 0,0175 \pm 0,00775$$

Враховуючи вищенаведені розрахунки, можна зробити висновок, що методика є лінійною та відповідає вимогам ДФУ[22-23].

3.2. Кількісне спектрофотометричне визначення діючої речовини зопіклон у Зразках 1 та 2.

Після визначення оптимальної довжини хвилі, при якій спостерігається максимальна абсорбція асоціату «зопіклон-БТС» (400 нм) та побудови градуовального графіка ми визначали концентрацію АФІ зопіклон у досліджуваних Зразках (підготовка Зразків представлена у Розділі 2). Оптичну густину A вимірювали п'ять разів, за ГГ встановлювали концентрацію зопіклону, результати наведено у Таблиці 2. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали за загальновідомими співвідношеннями [22-23]:

Середнє значення \bar{x} , n – обсяг вибірки

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i,$$

Дисперсія та стандартне відхилення

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

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

$$v = n - 1.$$

Відносне стандартне відхилення

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\%.$$

Довірчий інтервал

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

де $t_{p,v}$ – коефіцієнт Стюдента або t -критерій; $t_{0,95;4} = 2,7764$

Відносна похибка середнього значення

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

Таблиця 2. Кількісне визначення АФІ зопіклон у Зразках 1 та 2 спектрофотометрією у видимій області.

	Кількісний вміст знайденої діючої речовини зопіклон, мг (враховуючи розведення)	
	Зразок 1	Зразок 2
	7,51	7,53
	7,48	7,51
	7,46	7,49
	7,50	7,47
	7,52	7,50
Середнє значення, \bar{x}	7,49	7,50
Стандартне відхилення, s	0,024	0,022
Дисперсія, s^2	0,00058	0,00048
Відносне стандартне відхилення, RSD %	0,32	0,30
Довірчий інтервал, $\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}}$	$7,49 \pm 0,030$	$7,50 \pm 0,028$
Відносна похибка середнього значення, $\bar{\epsilon}$, %	0,40	0,37

Аналізуючи наведені експериментальні та статистичні дані можна оцінювати методіку спектрофотометричного визначення зопіклону у Зразках як задовільну [22-23].

3.3. Часткова валідація методики спектрофотометричного визначення зопіклону у досліджуваних зразках.

3.3.1. Оцінка внутрішньолабораторної точності методики спектрофотометричного визначення.

Для оцінки ризику виникнення систематичної помилки, з'ясування «слабких місць» методики тощо ми виконали часткову валідацію (провели при незмінних лабораторних умовах спектрофотометричні визначення у різні календарні дні та вивчили стабільність розчинів у часі) [22-23].

Для перевірки внутрішньолабораторної точності ми провели експеримент (спектрофотометричні визначення діючої речовини зопіклон у Зразку 1) у різні календарні дні, результат кількісного визначення наведено у Таблиці 3:

Таблиця 3. Оцінка внутрішньолабораторної точності методики спектрофотометричного визначення.

	Кількісний вміст знайденої діючої речовини зопіклон, мг (враховуючи розведення) у Зразку 1.	
	День 1	День 2
	7,51	7,50
	7,48	7,52
	7,46	7,48
	7,50	7,51
	7,52	7,51
Середнє значення, \bar{x}	7,49	7,50

Аналізуючи дані Таблиці 3, можна зробити висновок, що результати відповідають вимогам ДФУ [22-23] оскільки знайдені концентрації зопіклону корелюють і відрізняються між собою не більше ніж на 1%.

3.3.2. Перевірка стабільності розчинів у часі.

Спираючись на наукові здобутки С. Завгороднього [20-21], ми провели вивчення стабільності асоціатів «зопіклон-БТС» протягом 60 хвилин. Для цього ми вимірювали значення величини абсорбції A для стандартного модельного розчину №6 у стадії спокою, результати наведено у Таблиці 4:

Аналізуючи значення оптичної густини A можна вважати, що асоціат «зопіклон-БТС» є стабільним у часі [22-23]:

Таблиця 4. Вивчення стабільності асоціату «зопіклон-БТС» у часі, концентрація АФІ 7,5 мг/100мл,

$\lambda = 400$ нм.

Величина абсорбції, t, хв.							Середнє	RSD, %	Довірчий інтервал	Відносна похибка середнього значення	Дисперсія
0	10	20	30	40	50	60					
0,791	0,792	0,792	0,793	0,793	0,793	0,793	0,792	0,099	$0,792 \pm 0,000728$	0,092	$6,19 \cdot 10^{-7}$

Отже, враховуючи вищезазначене, можна стверджувати, що методика спектрофотометричного кількісного визначення зопіклону є правильною оскільки часткова валідація (перевірка на лінійність, внутрішньолабораторну точність та стабільність розчинів) відповідає ДФУ [22-23], вплив допоміжних речовин на точність визначення не зафіксовано (методика є специфічною).

3.4. Кількісне ацидиметричне визначення діючої речовини зопіклон у Зразках 1 та 2.

У Європейській фармакопеї (Додаток 1) представлена методика кількісного визначення зопіклону у субстанції ацидиметричним методом з наступним визначенням точки еквівалентності потенціометрією. Ми підготували зразки та провели кількісне визначення зопіклону так, як описано у Розділі 1. Результати кількісного визначення зопіклону за методикою методу об'ємного аналізу представлено у Таблиці 5. Спираючись на експериментальні дані, можна зробити висновок, що відносна похибка середнього значення не перебільшує 2%, результати відповідають ДФУ [22-23], але, у порівнянні зі спектрофотометричним визначенням (0,4% для Зразка 1 та 0,37% для Зразка 2), точність об'ємного методу дослідження є дещо нижчою. Ми можемо пояснити це тим, що концентрацію діючої речовини ми визначали безпосередньо у ЛЗ, тому, найвірогідніше, присутня систематична помилка і методику необхідно доопрацювати:

Таблиця 5. Кількісне визначення зопіклону у Зразках 1 та 2 ацидиметрією з наступним визначенням точки еквівалентності потенціометричним методом.

	Кількісний вміст знайденої діючої речовини зопіклон, мг (враховуючи розведення)	
	Зразок 1	Зразок 2
	7,43	7,53
	7,45	7,66
	7,48	7,61
	7,72	7,69
	7,63	7,58
Середнє значення, \bar{x}	7,54	7,61
Стандартне відхилення, s	0,13	0,063
Дисперсія, s^2	0,017	0,0040
Відносне стандартне відхилення, RSD %	1,68	0,83
Довірчий інтервал, $\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}}$	$7,54 \pm 0,16$	$7,61 \pm 0,080$
Відносна похибка середнього значення, $\bar{\epsilon}$, %	2,00	1,04

ВИСНОВКИ

1. Проаналізовано застосування твердих лікарських форм, до складу яких входить зопіклон, фізико-хімічні властивості та фармакологія зопіклону.
2. Здійснено аналіз методик кількісного визначення зопіклону та ідентифікація у субстанції та твердих лікарських формах.
3. Розроблена та апробована методика кількісного визначення зопіклону спектрофотометрією у видимій області, виконана її часткова валідація.
4. Проведено кількісне визначення зопіклону у таблетках ацидиметрією з наступним потенціометричним визначенням точки еквівалентності.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Levenson, J.C., Kay, D.B., & Buysse, D.J. (2015). The pathophysiology of insomnia. *Chest*, 147(4), 1179-1192. DOI: <https://doi.org/10.1378/chest.14-1617>
2. Morin, C.M., Drake, C.L., Harvey, A.G., Krystal, A.D., Manber, R., Riemann, D., & Spiegelhalder, K. (2015). Insomnia disorder. *Nature reviews Disease primers*, 1(1), 1-18. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.26>
3. Winkelman, J. W. (2015). Insomnia disorder. *New England Journal of Medicine*, 373(15), 1437-1444.
DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMcп1412740>
4. Patel, D., Steinberg, J., & Patel, P. (2018). Insomnia in the elderly: a review. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, 14(6), 1017-1024.
DOI: <https://doi.org/10.5664/jcsm.7172>
5. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/571/snodijni>.
6. <https://uk.wikipedia.org/Зопіклон>.
7. Компендиум 2015 — лекарственные препараты / Под ред. В.Н. Коваленко. — К., 2015;
8. 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.
9. 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.

10. Побічна дія ліків: підручник для студентів вищих навчальних закладів медичної освіти/Беленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Бухтіярова Н.В., Самура Т.А., Бухтіярова Т.А., Нагорна О.О., Моргунцова С.А., Єгоров А.А., Риженко О.В., Тихоновський О.В. Запорізький державний медичний Університет. Вінниця: Нова книга, 2021. – 360 с.
11. Фармакологія. Підручник для медичних і стоматологічного факультетів Вищих медичних навчальних закладів освіти. І.С.Чекман, В.М.Бобирьов, В.В.Кресюн, В.В.Годован, Н.О.Горчакова, Л.І.Казак, Т.В.Кава, Г.Ю.Островська, Т.А.Петрова, Л.М.Рябушко. Вінниця: Нова книга, 2020. – 472 с.
12. Pharmacology / [M. A. Clark, R. Finkel, J. A. Rey et al.]. – [7th ed.]. – Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins, 2018. – 638 p.
13. State Pharmacopoeia of Ukraine (2016) State enterprise “Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for the Quality of Medicinal Products”. 2nd edition Supplement 1, 360 с
14. Japan Pharmacopoeia 18th Edition, (June 7, 2021).
URL: <https://www.pmda.go.jp/english/rs-sb-std/standards-development/jp/0029.html>.
15. British Pharmacopoeia (2021). URL: <https://www.pharmacopoeia.com>.
16. European Pharmacopoeia. 11 edn. (2022).
URL: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph.-eur.-11th-edition>.
17. Blazheyevskiy, M.Y., & Kryskiw, L.S. (2014). Development of the kinetic-spectrophotometric method for quantitative determination of zopiclone in tablets by the perhydrolysis reaction. Вісник фармації, (3), 38-41.
DOI: <https://doi.org/10.24959/nphj.14.1959>

18. Fotesko, K.A., Novitsky, A.I., Klimenko, L.Y., & Mykytenko, O.Y. (2015). Development and validation of tandem UV-spectrophotometric/extraction-photometric procedure of zopiclone quantitative determination.
19. Kozak, O.D., Sergeieva, M.S., Kostina, T.A., & Klimenko, L.Y. (2016). Development of tandem procedure for zopiclone determination in sewages of pharmaceutical plants.
20. Zagorodniy, S.L., Vasyuk, S O. (2014). Quantitative determination of zopiclone tablets “Sonovan” by spectrophotometry. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, (2), 23-26.
21. Zagorodniy, S.L., & Vasyuk, S.O. (2019). Validation methods quantifying zopiclone tablets by HPLC. *Farmatsevychnyi Zhurnal*, (2), 69-74.
22. Валідація аналітичних методик і випробувань. Державна Фармакопея України. Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е видання. Харків : РІПЕГ, 2001. С.58 – 67. Доповнення 1. 2004. С. 2 – 4.
23. Георгіянц В.А. Валідація аналітичних методик у фармації : теорія, нормативні аспекти, проблеми практики. В.А. Георгіянц. О.А. Євтіфєєва. *Фармацевтичний часопис*. 2007. №2. С.13 – 18.

ДОДАТКИ

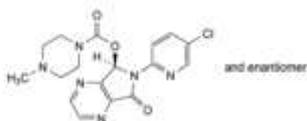
Додаток 1. Витяг з Європейської фармакопеї.

Zopiclone

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.0

ZOPICLONE

Zopiclonum



$C_{17}H_{17}ClN_5O_2$
[43200-80-2]

M_r 388.8

DEFINITION

(5*S*)-6-[5-(Chloropyridin-2-yl)-7-oxo-6,7-dihydro-5*H*-pyrrolo[3,4-*b*]pyrazin-5-yl]-4-methylpiperazine-1-carboxylate.
Content: 98.5 per cent to 100.5 per cent.

CHARACTERS

Appearance: white or slightly yellowish powder.

Solubility: practically insoluble in water, freely soluble in methylene chloride, sparingly soluble in acetone, practically insoluble in ethanol (96 per cent). It dissolves in dilute mineral acids.

mp: about 177 °C, with decomposition.

IDENTIFICATION

First identification: B.

Second identification: A, C.

A. Ultraviolet and visible absorption spectrophotometry (2.2.25).

Test solution. Dissolve 50.0 mg in a 3.5 g/L solution of hydrochloric acid R and dilute to 100.0 mL with the same solvent. Dilute 2.0 mL of this solution to 100.0 mL with a 3.5 g/L solution of hydrochloric acid R.

Spectral range: 220–350 nm.

Absorption maximum: at 303 nm.

Specific absorbance at the absorption maximum: 340 to 380.

B. Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

Preparation: discs.

Comparison: zopiclone CRS.

C. Thin-layer chromatography (2.2.27).

Test solution. Dissolve 10 mg of the substance to be examined in methylene chloride R and dilute to 10 mL with the same solvent.

Reference solution. Dissolve 10 mg of zopiclone CRS in methylene chloride R and dilute to 10 mL with the same solvent.

Plate: TLC silica gel GF₂₅₄ plate R.

Mobile phase: triethylamine R, acetone R, ethyl acetate R (2:50:50 V/V/V).

Application: 10 µL.

Development: over a path of 15 cm.

Drying: in air.

Detection: examine in ultraviolet light at 254 nm.

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 the reference solution.

TESTS

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

01/2008:1060 Appearance of solution. Solution S is not more opalescent than reference suspension II (2.2.1) and not more intensely coloured than intensity 5 of the range of reference solutions of the most appropriate colour (2.2.2, Method II).

Optical rotation (2.2.7): -0.05° to $+0.05^\circ$.

Dilute 10.0 mL of solution S to 50.0 mL with dimethylformamide R.

Related substances. Liquid chromatography (2.2.29). Prepare the solutions immediately before use.

Test solution. Dissolve 40.0 mg of the substance to be examined in the mobile phase and dilute to 10.0 mL with the mobile phase.

Reference solution (a). Dilute 3.0 mL of the test solution to 100.0 mL with the mobile phase. Dilute 1.0 mL of this solution to 10.0 mL with the mobile phase.

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

Reference solution (c). Dissolve 4.0 mg of zopiclone oxide CRS (impurity A) in the mobile phase and dilute to 10.0 mL with the mobile phase. To 10.0 mL of this solution, add 1.0 mL of the test solution and dilute to 100.0 mL with the mobile phase.

Column:

– size: $l = 0.25$ m, $\varnothing = 4.6$ mm;

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

– temperature: 30 °C.

Mobile phase: mix 38 volumes of acetonitrile R and 62 volumes of a solution containing 8.1 g/L of sodium laurylsulfate R and 1.6 g/L of sodium dihydrogen phosphate R adjusted to pH 3.5 with a 10 per cent V/V solution of phosphoric acid R.

Flow rate: 1.5 mL/min.

Detection: spectrophotometer at 303 nm.

Injection: 20 µL.

Run time: 1.5 times the retention time of zopiclone.

Retention time: zopiclone = 27 min to 31 min; if necessary, adjust the concentration of acetonitrile in the mobile phase (increasing the concentration decreases the retention times).

System suitability: reference solution (c):

– resolution: minimum 3.0 between the peaks due to impurity A and zopiclone; if necessary, adjust the mobile phase to pH 4.0 with a 10 per cent V/V solution of phosphoric acid R.

Limits:

– impurities A, B, C: for each impurity, not more than the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.3 per cent) and not more than 2 such peaks have an area greater than the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.1 per cent).

2-Propanol. Gas chromatography (2.2.28).

Internal standard solution. Dilute 5 mL of ethanol R1 to 100 mL with ethylene chloride R. Dilute 1 mL of this solution to 10 mL with ethylene chloride R.

Test solution. Dissolve 0.25 g of the substance to be examined in ethylene chloride R, add 0.5 mL of the internal standard solution and dilute to 5.0 mL with ethylene chloride R.

Reference solution. Dilute 4.5 mL of 2-propanol R to 100.0 mL with ethylene chloride R. To 1.0 mL of this solution, add 10.0 mL of the internal standard solution and dilute to 100.0 mL with ethylene chloride R.

Column:

– material: fused silica;

– size: $l = 10$ m, $\varnothing =$ about 0.53 mm;

– stationary phase: styrene-divinylbenzene copolymer R (film thickness 20 µm).

Carrier gas: helium for chromatography R.

Flow rate: 4 mL/min.

Temperature:

	Time (min)	Temperature (°C)
Column	0 - 5	50
	5 - 10	50 → 70
	10 - 14	70
	14 - 20.5	70 → 200
	20.5 - 27.5	200
Injection port		150
Detector		250

Detection: flame ionisation.

Injection: 1 µL.

Calculate the percentage content *m/m* of 2-propanol taking its density to be 0.785 g/mL at 20 °C.

Limit:

– 2-propanol: maximum 0.7 per cent *m/m*.

Heavy metals (2.4.8): maximum 20 ppm.

1.0 g complies with test C. Prepare the reference solution using 2 mL of lead standard solution (10 ppm Pb) R.

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

ASSAY

Dissolve 0.300 g in a mixture of 10 mL of anhydrous acetic acid R and 40 mL of acetic anhydride R. Titrate with 0.1 M perchloric acid, determining the end-point potentiometrically (2.2.20).

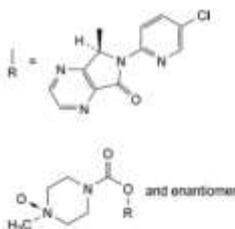
1 mL of 0.1 M perchloric acid is equivalent to 38.88 mg of C₁₇H₂₁ClN₂O₂.

STORAGE

Protected from light.

IMPURITIES

Specified impurities: A, B, C.



A. (5RS)-6-(5-chloropyridin-2-yl)-7-oxo-6,7-dihydro-5H-pyrrolo[3,4-b]pyrazin-5-yl 4-methylpiperazine-1-carboxylate 4-oxide (zopiclone oxide),

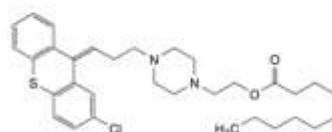
B. R-OH and enantiomer: (7RS)-6-(5-chloropyridin-2-yl)-7-hydroxy-6,7-dihydro-5H-pyrrolo[3,4-b]pyrazin-5-one,

C. R-H: 6-(5-chloropyridin-2-yl)-6,7-dihydro-5H-pyrrolo[3,4-b]pyrazin-5-one.

01/2008:1707

ZUCLOPENTHIXOL DECANOATE

Zuclopenthixoli decanoas



C₂₇H₄₁ClN₂O₂S
[64053-00-5]

M, 555.2

DEFINITION

2-[4-[3-[(9Z)-2-Chloro-9H-thioxanthen-9-ylidene]propyl]-piperazin-1-yl]ethyl decanoate.

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

CHARACTERS

Appearance: yellow, viscous, oily liquid.

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

IDENTIFICATION

Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

Comparison: Ph. Eur. reference spectrum of zuclopenthixol decanoate.

TESTS

Appearance of solution. The solution is clear (2.2.1).

Using an ultrasonic bath, dissolve 1.0 g in ethanol (96 per cent) R and dilute to 20.0 mL with the same solvent.

Related substances. Liquid chromatography (2.2.29). Carry out the test protected from light and prepare the solutions immediately before use.

Solution A. Dissolve 8.89 g of docusate sodium R in water R, stirring for about 6-8 h, and dilute to 1000 mL with the same solvent.

Test solution. Dissolve 25.0 mg of the substance to be examined in acetonitrile R and dilute to 100.0 mL with the same solvent.

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

Reference solution (b). Dissolve 5.0 mg of zuclopenthixol impurity B CRS in acetonitrile R and dilute to 100.0 mL with the same solvent. Dilute 5.0 mL of this solution to 100.0 mL with acetonitrile R.

Reference solution (c). Dissolve the contents of a vial of zuclopenthixol for system suitability CRS (zuclopenthixol decanoate containing impurities A, B and C) in 1 mL of methanol R.

Column:

– size: *l* = 0.25 m, Ø = 4.6 mm;

– stationary phase: spherical end-capped octadecylsilyl silica gel for chromatography R (5 µm);

– temperature: 40 °C.

Mobile phase: mix 25 volumes of solution A and 75 volumes of anhydrous ethanol R, then add 0.1 volumes of phosphoric acid R.

Flow rate: 1.0 mL/min.

Detection: spectrophotometer at 270 nm.

Injection: 20 µL.

Run time: twice the retention time of zuclopenthixol decanoate.

Додаток 2

Мірний посуд класу А.



Додаток 3

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



АНОТАЦІЯ (SUMMARY)

Introduction. Dosage forms containing zopiclone are used for sleep disorders, but uncontrolled use of this hypnotic-sedative can be addictive and accompanied by undesirable side effects.

Purpose of the study. Since the pharmaceutical market has a sufficient number of domestic and imported drugs with zopiclone, the search for new methods for the quantitative determination of this API is relevant.

The API zopiclone in medicinal products can be quantitatively determined by the LC method (Japan Pharmacopoeia 18th Edition, June 7, 2021), HPLC method (British Pharmacopoeia, 2021, European Pharmacopoeia. 11 edn. 2022), acidimetric non-aqueous titration followed by determination of the equivalence point by potentiometry. Ukrainian scientists propose to quantitatively determine the API zopiclone by the kinetic-spectrophotometric method (Blazheyevskiy, M.Y., & Kryskiw, L.S. (2014)), spectrophotometry using methyl orange as a color reagent (Fotesko, K.A., Novitsky, A.I., Klimenko, L.Y., & Mykytenko, O.Y. (2015)), and by the method of reversed-phase high-performance liquid chromatography (Kozak, O.D., Sergeieva, M.S., Kostina, T.A., & Klimenko, L.Y. (2016)). From our point of view, spectrophotometric determination of zopiclone with sulfophthalein dyes deserves special attention (Zagorodniy, S.L., Vasyuk, S O. (2014, 2019)). When developing a method for spectrophotometric determination of zopiclone in tablets, we relied precisely on the conclusions of Zaporizhzhia scientists Zagorodniy S. and Vasyuk S., the determination of the value of absorbed monochromatic light was carried out in the range of 350-420 nm, acetone was chosen as the solvent for the API. The concentration of the active substance zopiclone in solid dosage forms was determined by the calibration graph method, linearity was assessed by the least squares method. A preliminary photometric reaction was carried out with the dye bromothymol blue. The stability of

zopiclone-BTS associates was studied as a function of optical density versus time ($A = f(t)$) for 60 minutes, the relative error of the average value was less than 0.1%. Intra-laboratory precision was assessed by conducting the study the next day, the experimental conditions did not change.

Conclusions. So, from our point of view, the method of quantitative determination of the API zopiclone in the medicinal product is correct and specific, the excipients that are part of the medicinal product do not interfere with the spectrophotometric method, the results correlate with each other and with the concentration specified in the instructions for medical use.

