УДК 615.45:615.212].074:543.42.062

І.О. Юрченко, В.П. Буряк

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИЙ МЕТОД КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ НІМЕСУЛІДУ В СУБСТАНЦІЇ ТА ЛІКАРСЬКИХ ФОРМАХ

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: *німесулід, кількісне визначення, спектрофотометрія, лікарські форми.*

Ключевые слова: *нимесулид, количественное определение, спектрофотомерия, лекарственные формы.*

Key words: *nimesulide, quantitative determination, spectrophotometry, drug forms.*

Розроблено нову спектрофотометричну методику кількісного визначення німесуліду в субстанції, таблетках та 1% гелі (Ремісид ® ВАТ «Дарниця»). Проведено статистичну обробку результатів аналізу. Коефіцієнт достовірності (Cs,%) свідчить, що розкидання середніх не перевищує 3%, а методика характеризується високою точністю.

Разработана новая методика спектрофотометрического определения нимесулида в субстанции, таблетках и 1 % геле (Ремисид ® ОАО «Дарниця»). Проведена статистическая обработка результатов анализа. Коэффициент достоверности не превышает 3%, а методика анализа характеризуется высокой точностью.

A new spectrophotometric method of quantitative determination of nimesulide in substance, tablets and 1% gel (Remisid ® «Darnytsya») has been developed. The statistic analysis has been done. The authenticity coefficient (Cs,%) doesn't exceed 3% and the method is characterized by high accuracy.

Німесулід – N-(4-нітро-2-феноскифеніл) метансульфонамід – нестероїдний протизапальний засіб, що селективно інгібує циклооксигеназу-2 (ЦОГ-2) і незначною мірою ЦОГ-1 [2].

МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ – вивчити можливість спектрофотометричного визначення зазначеної речовини в субстанції та лікарських формах.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для кількісного визначення німесуліду в субстанції нормативно-аналітична документація в Україні передбачає кислотно-основне титрування в середовищі ацетону з фіксацією точки кінця титрування методом потенціометрії [10], в таблетках – спектрофотометричний метод після обробки порошку розтертих таблеток ультразвуком у середовищі метанолу та наступним визначенням абсорбції аналізованого розчину при 393 нм відповідно абсорбції стандартного розчину [10], або метод високоефективної рідинної хроматографії зі спектрофотометричним детектором (УФ- 230 нм) і подальшим розрахунком середнього вмісту німесуліду в таблетці. Кількісне визначення німесуліду в 1% гелі (Ремісид®) для зовнішнього застосування нормативно-аналітична документація [10] також рекомендує використання ВЕРХ з УФ-детектуванням (УФ-230 нм).

Європейська фармакопея 5-го видання також рекомендує вищезазначені методи, що застосовуються в Україні, для дослідження якості німесуліду в субстанції та лікарських формах [6].

Огляд наукової літератури

Mir Azam Khan та співавт. [7] розробили спектрофотометричну методику кількісного визначення німесуліду в субстанції та різних лікарських формах на підставі взаємодії продукту кислотного гідролізу з фенолом в присутності натрію нітриту [7]. Абсорбція аналізованих розчинів вимірювалась при 475 нм.

Швидкий, чутливий та простий у виконанні спектрофотометричній метод запропоновано P. Nagaraja та співавт. [8] для визначення німесуліду. Метод ґрунтується на реакції між відновленою формою досліджуваної речовини прометазином гідрохлоридом, який попередньо окислюється N-бромсукцинімідом. При цьому утворюється розчин зеленого кольору, абсорбція якого вимірюється при 610 нм.

Reddy M. Narayana та співавт. [9] рекомендують для визначення німесуліду спектрофотометричний метод по його реакції з реактивом Фоліна-Чокалтеу [3]. Абсорбцію, забарвленого в блакитний колір розчину, вимірюють при 600 нм.

За даними K.P.R. Chowdary та співавт. [5] німесулід можливо кількісно визначити спектрофотометрично у видимій ділянці електронного спектру двома варіантами. Перший варіант базується на реакції відновленої форми німесуліду з флороглюцином в присутності кислоти нітратної ($\lambda_{макс.}$ 415 нм), а другий – на реакції відновленої форми німесуліду з р-диметиламінобензальдегідом ($\lambda_{макс.}$ 415 нм).

Спектрофотометричний метод аналізу німесуліду у видимій ділянці спектру вбирання розроблено Andreia Claudia Perju та співавт. [4]. Попередньо нітрогрупу досліджуваної сполуки відновлюють цинком у присутності кислоти хлоридної з подальшим сполученням утвореної солі діазонію з тімолом.

Інтенсивність забарвлення розчину, що утворюється при цьому, вимірюється при 476 нм.

Вступ до експерименту

У зв'язку з тим, що німесулід характеризується середнім та високим значеннями молярного коефіцієнта вбирання (ε), вивчення його УФ-спектрів проводилося у розведених розчинах в концентрації 2 мг%.

Дослідження ультрафіолетових спектрів німесуліду проводилося за допомогою спектрофотометра CARY 50 у наступних розчинниках: вода; спирт етиловий 96%; 0,1М HCl; 1М HCl; 0,1М H_2SO_4; 1М H_2SO_4; 0,1М NaOH; 1М NaOH; н-гексан. Кваліфікація – хімічно чисті.

© І.О. Юрченко, В.П. Буряк, 2010

Експериментальна частина

Нами було вивчено умови спектрофотометричного визначення німесуліду та розроблено методики аналізу його в субстанції, таблетках та 1% гелі (Ремісид ®).

Експериментально встановлено, що в якості розчинника для кількісного визначення досліджуваного препарату може бути використаний етанол та 0,1 М розчин натрію гідроксиду.

Попередньо були визначені граничні концентрації, в межах яких світловбирання етанольних та лужних розчинів німесуліду підпорядковується загальному закону Бугера-Ламберта-Бера. З цією метою ми брали наважки від 10 до 50 мг, розчиняли в етанолі та 0,1 М розчині NaOH у мірних колбах ємкістю 100 мл і шляхом подальшого розведення одержували серію розчинів певної концентрації. З одержаних результатів вимірювань (не менше шести для однієї концентрації) ми розраховували середні значення показників вбирання ($A^{1\%}_{1см}$), які були використані з метою визначення оптимальної наважки для аналізу.

Встановлено, що УФ-спектр німесуліду в етанолі характеризується двома смугами вбирання. Перша – високоінтенсивна проявляє максимум при 203 нм ($\varepsilon_{макс}$ 26680) та 205 нм ($\varepsilon_{макс}$ 26870), друга смуга середньої інтенсивності з максимумом при 298 нм ($\varepsilon_{макс}$ 7820).

У лужному середовищі (0,1 М NaOH) спектр німесуліду також проявляє дві смуги вбирання. Перша має п'ять інтенсивних максимумів відповідно при 204 нм ($\varepsilon_{макс}$ 12250), 206 нм ($\varepsilon_{макс}$ 9020), 217 нм ($\varepsilon_{макс}$ 22540), 219 нм ($\varepsilon_{макс}$ 16450), 222 нм ($\varepsilon_{макс}$ 16450). Друга смуга має один високоінтенсивний максимум при 392 нм ($\varepsilon_{макс}$ 14510).

При розробці методики аналізу німесуліду в субстанції, таблетках і 1% гелі (Ремісид ®) в якості аналітичних були вибрані максимуми при 298 нм (етанол) та при 392 нм (0,1 М NaOH).

У цілях виключення помилки, пов'язаної з калібруванням спектрофотометра, температурним фактором тощо «Міжнародна фармакопея» [11] та Державна фармакопея України [1] вимагають проводити кількісний аналіз лікарських засобів з використанням стандартних зразків аналізованих речовин. Ми використовували в якості фармакопейного стандарту німесулід-стандарт виробництва ДП «Науково-експертний фармакопейний центр України». Вміст препарату при цьому визначали за формулою (1):

$$C_1 = \frac{A_1 \cdot C_0}{A_0} \quad (1),$$ де

C_1 – концентрація випробуваного розчину;

C_0 – концентрація розчину стандартного зразка;

A_1 – абсорбція випробуваного розчину;

A_0 – абсорбція розчину стандартного зразка.

Попередньо були розраховані питомі показники вбирання німесуліду в етанолі та 0,1 М NaOH і визначені граничні концентрації, в межах яких абсорбція підпорядковується закону світловбирання Бугера-Ламберта-Бера (*таблиця* 1).

Таблиця 1

Граничні концентрації розчинів німесуліду, в межах яких абсорбція підпорядковується закону Бугера-Ламберта-Бера

96% етанол, $\lambda_{макс.}$ 298 нм				0,1 М NaOH, $\lambda_{макс.}$ 392 нм			
Концентрація, мг%	Абсорбція розчину,А	Питомий показник вбирання, $A^{1\%}_{1см}$	Метрологічні характеристики	Концентрація, мг%	Абсорбція розчину, А	Питомий показник вбирання, $A^{1\%}_{1см}$	Метрологічні характеристики
0,4	0,198	248		0,2	0,092	460	
0,8	0,204	255		0,4	0,187	468	
1,2	0,308	257	$\bar{X}$ =253,67	0,6	0,285	475	
1,6	0,410	256	S=7,70	0,8	0,381	476	$\bar{X}$ =472,50
2,0	0,512	256	$S\bar{X}$ =0,80	1,0	0,477	477	S=23,55
2,4	0,610	254	$\Delta\bar{X}$ =1,44	1,2	0,569	474	$S\bar{X}$ =1,40
2,8	0,316	255	RSD=3,04%	1,4	0,664	474	$\Delta\bar{X}$ =2,52
3,2	0,816	255	ε=13,82	1,6	0,760	475	RSD=4,98%
3,6	0,910	252	$\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$ =253,67±1,44	1,8	0,857	476	ε=42,28
4,0	1,018	255		2,0	0,950	475	$\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$ =472,50±2,52
4,4	1,106	251		2,2	1,038	471	
4,8	1,200	250		2,4	1,126	469	

© І.О. Юрченко, В.П. Буряк, 2010

Таким чином, на підставі експерименту встановлено, що абсорбція етанольних розчинів німесуліду підпорядковується закону світловбирання Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій від 0,8 до 4,0 мг%, а статистична обробка чисельних значень питомого показника вбирання ($A^{1\%}_{1cm}$) показує, що середнє значення цієї величини ($\bar{x}$)дорівнює 255.

У розчині 0,1 М NaOH підпорядковування абсорбції німесуліду закону Бугера-Ламберта-Бера спостерігається в межах концентрацій від 0,6 до 2,0 мг%, а середнє значення питомого показника вбирання ($\bar{x}$) при цьому складає 475.

Кількісне визначення німесуліду в субстанції. Точну наважку німесуліду (біля 0,034 г для етанольного розчину або 0,020 г для 0,1 М розчину натрію гідроксиду) переносять до мірної колби місткістю 100 мл, додають 70 мл 96% етилового спирту або 0,1 М розчину натрію гідроксиду і перемішують до повного розчинення субстанції. Використаним розчинником доводять до мітки і знову ретельно перемішують (розчин А). 5 мл розчину А за допомогою піпетки переносять у мірну колбу місткістю 100 мл, 96% етанолом або 0,1 М розчином натрію гідроксиду, доводять до мітки і ретельно перемішують (розчин Б).

Абсорбцію одержаного розчину вимірюють за допомогою спектрофотометра при 298 нм (96% спирт етиловий) або при 392 нм (0,1 М NaOH) у кюветі з товщиною шару 1 см. Як розчин порівняння використовують 96% спирт етиловий або 0,1 М NaOH.

Паралельно за тих же довжинах хвиль вимірюють абсорбцію розчину стандартного зразка німесуліду в концентрації 0,0017 г в 100 мл (96% спирт етиловий) або в концентрації 0,0010 г в 100 мл (0,1 М NaOH).

Вміст німесуліду в субстанції розраховують за формулою:

$$C = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot 100}{A_0 \cdot m_1}, \quad \text{де} \quad (2)$$

A_1 – абсорбція випробуваного розчину відповідно при 298 нм (96% спирт етиловий) або при 392 нм (0,1 М NaOH);

A_0 – абсорбція розчину стандартного зразка німесуліду (0,0017 г в 100 мл для спирту етилового або 0,0010 г в 100 мл для 0,1 М NaOH);

m_1 – маса наважки випробуваного розчину (в г);

m_0 – маса наважки стандартного зразка німесуліду (в г).

Вміст німесуліду в субстанції в перерахунку на суху речовину повинен бути в межах від 98,5% до 101,5%.

Примітка. Виготовлення розчинів стандартного зразка німесуліду. Точну наважку стандартного зразка німесуліду ФС ЗДФУ (0,034 г для 96% спирту етилового або 0,0010 г для 0,1 М NaOH) вміщують у мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють при перемішуванні у 70 мл використаного розчинника, доводять об'єм розчину 95% спиртом етиловим або 0,1 М NaOH до мітки і перемішують.

5 мл отриманого розчину вміщують у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину використаним розчинником до мітки і перемішують. Концентрація розчину стандартного зразка німесуліду у 96% спирті етиловому дорівнює 1,7 мг%, а у 0,1 М NaOH – 1 мг%.

Розчини стандартних зразків німесуліду (ФСЗ ДФУ) при визначенні діючої речовини в таблетках та 1% гелі (Ремісид ®) готують аналогічно наведеній методиці, яка застосовується при кількісному визначенні німесуліду в субстанції. Результати кількісного визначення німесуліду в субстанції наведені в *таблиці 2.*

Кількісне визначення німесуліду в таблетках. Експеримен-

Таблиця 2

Результати кількісного визначення німесуліду в субстанції за стандартним зразком

Розчинник	Довжини хвиль, нм	Наважка німесуліду, мг%	Знайдено		Метрологічні характеристики
			мг%	у %	
95% етанол	298	1,68 1,82 1,76 1,75 1,69 1,74	1,71 1,82 1,77 1,73 1,68 1,73	101,81 100,00 100,60 98,86 99,50 99,52	$\bar{X}$ =100,05% S=1,08 $S\bar{X}$ =0,42 $\Delta\bar{X}$ =0,86 ε=2,18 RSD=1,08% $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$ =100,05%±0,86% δ=+0,05%
0,1 М NaOH	392	0,95 0,98 1,02 0,89 0,96 0,92	0,94 0,97 1,01 0,90 0,97 0,93	98,95 98,97 99,02 101,12 101,04 101,08	$\bar{X}$ =100,03% S=1,32 $S\bar{X}$ =0,47 $\Delta\bar{X}$ =0,95 ε=2,67 RSD=1,32% $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$ =100,03%±0,95% δ=+0,03%

© І.О. Юрченко, В.П. Буряк, 2010

тально встановлено, що допоміжні речовини, які входять до складу німесуліду в таблетках, не володіють вибірковим світловбиранням в межах від 200 до 400 нм і тому не заважають кількісному визначенню німесуліду в таблетках.

Для аналізу була виготовлена штучна суміш таблеток німесуліду. Середня маса таблетки складає 0,32 г, вміст діючої речовини в одній таблетці складає 0,10 г. У якості розчинників при розробці методики кількісного визначення німесуліду в таблетках рекомендується 96% спирт етиловий та 0,1 М розчин натрію гідроксиду.

Методика визначення. Точну наважку порошку розтертих таблеток (біля 0,11 г в 96% спирті етиловому або 0,064 г у 0,1 М NaOH) вміщують у мірну колбу місткістю 100 мл, додають 70 мл 96% спирту етилового або 0,1 М NaOH, енергійно збовтують протягом 20 хвилин, доводять об'єм розчину використаним розчинником до мітки, переміщують і фільтрують через паперовий фільтр «синя стрічка», 10 мл перших порцій фільтрату відкидають. 5 мл фільтрату переміщують у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину 96% спиртом етиловим або 0,1 М розчином натрію гідроксиду до мітки і перемішують.

Вимірюють абсорбцію випробуваного розчину та розчину стандартного зразка за допомогою спектрофотометра при 298 нм (96% спирт етиловий) або при 392 нм (0,1 М NaOH), використовуючи як компенсаційний розчин 96% спирт етиловий або 0,1 М розчин натрію гідроксиду.

Вміст німесуліду (C_1) в одній таблетці, в грамах, обчислюють за формулою (3):

$$C_1 = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 5 \cdot b \cdot P}{A_0 \cdot m_1 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 5 \cdot 100} = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot b \cdot P}{A_0 \cdot m_1 \cdot 100}$$, де

A_1 – абсорбція густини випробуваного розчину;
A_0 – абсорбція густини стандартного розчину;
m_1 – маса наважки препарату, в г;
m_0 – маса наважки стандартного зразка німесуліду, в г;
b – середня маса таблетки, в г;
P – вміст основної речовини в стандартному зразку німесуліду, %;

Вміст німесуліду в одній таблетці повинен бути від 0,0925 до 0,1075 г, з розрахунку на середню масу таблетки.

Результати кількісного визначення німесуліду в таблетках наведені в *таблиці 3*.

Кількісне визначення німесуліду в 1% гелі (Ремісид ®). Експериментально встановлено, що зазначені вище допоміжні речовини, які входять до складу гелю Ремісид ®, не проявляють вибіркове світловбирання в межах від 200 до 400 нм і тому, безумовно, не заважають кількісному визначенню німесуліду в складі 1% гелю Ремісид ®.

Для аналізу була виготовлена штучна суміш 1%

Таблиця 3

Результати кількісного визначення німесуліду в таблетках

Довжина хвиль,нм	Розчинники	Наважка таблеткової маси для аналізу, мг	Вміст препарату в наважці для аналізу, мг	Вміст препарату у випробовуваному розчині, мг/100 мл	Знайдено		Метрологічні характеристики
					мг/100 мл	у %	
298	96% спирт етиловий	110,8 120,0 116,2 114,5 118,6 122,4	34,63 37,5 36,30 35,78 37,06 38,25	1,73 1,88 1,82 1,80 1,85 1,91	1,72 1,85 1,83 1,82 1,88 1,88	99,42 98,40 100,55 100,95 101,62 98,44	$\bar{X}$ =99,90% S=1,82 S$\bar{X}$ =0,55 Δ$\bar{X}$ =1,11 RSD=1,82% ε = ±3,67% $\bar{X}$ ±Δ$\bar{X}$ =99,90%±1,11% δ= -0,1%
392	0,1 М розчин NaOH	51,2 50,4 52,0 52,6 49,8 51,6	16,0 15,8 16,3 16,4 15,6 16,2	0,80 0,79 0,81 0,82 0,78 0,81	0,81 0,80 0,82 0,81 0,77 0,80	101,00 101,27 101,23 98,78 98,72 98,77	$\bar{X}$ =99,96% S=1,75 S$\bar{X}$ =0,54 Δ$\bar{X}$ =1,09 RSD=1,75% ε=3,53 $\bar{X}$ ±Δ$\bar{X}$ =99,96%±1,09% δ= -0,04%

© І.О. Юрченко, В.П. Буряк, 2010

гелю німесуліду (Ремісид®). У якості розчинника при розробці методики кількісного визначення німесуліду в 1% гелі (Ремісид ®) рекомендується 0,1 М розчин натрію гідроксиду.

Методика визначення. Точну наважку (близько 1,4 г) 1% гелю німесуліду (Ремісид ®) тричі екстрагують 15 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду при постійному перемішуванні, одержані витяги фільтрують через паперовий фільтр «синя стрічка» в мірну колбу місткістю 100 мл, розчинником доводять до мітки і перемішують. 5 мл фільтрату піпеткою переносять до мірної колби місткістю 100 мл, доводять об'єм 0,1 М розчином натрію гідроксиду до мітки і перемішують. Абсорбцію випробуваного розчину та розчину стандартного зразка вимірюють за допомогою спектрофотометра при 392 нм, використовуючи як компенсаційний розчин 0,1 М NaOH.

Вміст німесуліду (C_1) в 1% гелі (Ремісид ®), у відсотках, обчислюють за формулою (4):

$$C_1 = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 5 \cdot b \cdot P}{A_0 \cdot m_1 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 5}$$, де

A_1 – абсорбція густини випробуваного розчину;

A_0 – абсорбція густини стандартного розчину;

m_1 – маса наважки препарату, в г;

m_0 – маса наважки стандартного зразка німесуліду, в г;

P – вміст основної речовини в стандартному зразку німесуліду, %.

Кожен грам гелю вміщує не менше ніж 99,0% і не більше 110,0% (від 9,0 до 11,0 мг) заявленої кількості німесуліду.

ЛІТЕРАТУРА

1. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний центр». – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.: Доповнення 1. – 2004. – 520 с.
2. *Машковский М.Д.* Лекарственные средства: Пособие для врачей / *М.Д.Машковский.* – 15-е изд. Перераб., испр. и доп. – М.: Новая волна, 2005. – 1200 с.
3. *Фланаган Р.Дж.* Основы аналитической токсикологии / *Р.Дж. Фланаган.* – Женева: Всемирная организация здравоохранения, 1997. – 364 с.
4. *Perju A.C.* Nimesulide spectrophotometric determination in visible / *A.C.Perju, M.Mândrescu, A.F.Spac V., Dorneanu* // Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi., 1999. – Vol.111. – N2. – P.535-539.
5. *Chowdary K.P.R.* New spectrophotometric methods for the determination of nimesulide / *K.P.R.Chowdary, K.G.Kumar, G.D.Rao* // IJPS, 1999. – 61(2). – P.86-89.
6. European Pharmacopea. – 5th ed. – Strasbourg: European department for the Quality of Medicines, 2005. – 2781 p.
7. *Mir A.K.* Spectrophotometric methods for the determination of nimesulide in bulk and various dosage forms / *Azam Khan Mir, Karim Mohhamad, Mahammad Wabaidur Saikh, Oh Jin Seung, Hak Lee Sang* // Applied Chemistry, 2007. – Vol. 11, №2. – P.453-456.
8. *Nagaraja P.* Spectrophotometric determination of nimesulide by oxidative coupling with N-bromosuccinimide and promethazine hydrochloride / *P. Nagaraja, H.R. Azun Kumar, R.A.Vasanta, H.S. Jathirajan* // Oxidation communicarions, 2003. – Vol. 26. – N1. – P.116-120.
9. Spectrophotometric determination of Nimesulide / [*R.M.Narayana, R.K.Sasira, S.D.Gowri et al.*]// Indian J. Pharm. Sci., 1998. – Vol. 60. – P.172-173.
10. Nimesulide 01/2005:1548 // Europ. Ph. 5th ed.: Supplement [Електронний ресурс] – 80 Min / 700 MB. – Strasbourg, 2005. – 1 електрон. опт. диск (CD-ROM); 12 см. – Систем. вимоги: Pentium ; 32 Mb RAM ; Windows 95, 98,2000, XP.
11. The International Pharmacopeia 5th ed. [Електронний ресурс] – 80 Min / 700 MB. – Genueva: WHO, 2008. – 1 електрон. опт. диск (CD-ROM); 12 см. – Систем. вимоги: Pentium; 32 Mb RAM; Windows 95, 98, 2000, XP.

Відомості про авторів:

Юрченко Іван Олексійович, аспірант кафедри токсикологічної та неорганічної хімії Запорізького державного медичного університету.

Буряк Валерій Прокопович, професор кафедри токсикологічної та неорганічної хімії Запорізького державного медичного університету, д.фарм.н., професор.

Адреса для листування: м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26, ЗДМУ.