

12. Гризодуб А.И. Стандартизованная процедура валидации количественных методик титрования лекарственных средств / [А.И. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, С.О. Чикалова и др.] // Фармаком. – 2007. – № 3. – С. 8-11.

13. Державна фармакопея України: Доп. 2 / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – Харків: PIPEG, 2008. – 608 с.

Резюме

Блажеєвський М.Є., Лабузова Ю.Ю. Валидація йодометричної методики кількісного визначення цефалексину в субстанції.

Проведено валидацію йодометричної методики кількісного визначення цефалексину у субстанції за допомогою калій гідрогенпероксомосульфату як аналітичного реагента. Валидацію проводили за схемою наведеною у ДФУ. Було вивчено такі параметри: діапазон застосування, межа виявлення, межа кількісного виявлення, правильність, збіжність і лінійність. Отримані показники метрологічних характеристик даної методики свідчать про можливість використання опрацьованої методики кількісного визначення цефалексину моногідрату у контрольно-аналітичних та заводських лабораторіях з контролю якості лікарських засобів.

Ключові слова: цефалексин, валидація, калій гідрогенпероксомосульфат.

Резюме

Блажеєвський Н.Е., Лабузова Ю.Ю. Валидація йодометрической методики количественного определения цефалексина в субстанции.

Проведена валидація йодометрической методики количественного определения цефалексина в субстанции с помощью калий гидрогенпероксомосульфата как аналитического реагента. Валидацию проводили по схеме приведенной в ГФУ. Были изучены такие параметры: диапазон применения, предел обнаружения, предел количественного обнаружения, правильность, сходимость и линейность. Полученные показатели метрологических характеристик данной методики свидетельствуют о возможности использования в контрольно-аналитических и заводских лабораториях по контролю качества лекарственных препаратов.

Ключевые слова: цефалексин, валидація, калій гідропероксомосульфат.

Summary

Blazheyevskiy M.Ye., Labuzova Yu.Yu. Validation of the iodometric method of the cefalexin pure substance assay.

Validation of the iodometric method of the cefalexin pure substance assay using potassium hydrogenperoxomonsulfate as analytical reagent was carried out under the scheme provided in the State Pharmacopoeia of Ukraine. Such parameters as revealing limit, quantitative revealing limit, range of application, linearity, repeatability and accuracy were studied. The obtained data allows to use the proposed method for cefalexin assay in control-analytical and pharmaceutical companies laboratories for quality control.

Key words: cefalexin, validation, potassium hydrogenperoxomonsulfate.

Рецензент: д.ф.н., проф. С.І. Мерзлікін

УДК 615.25:54.062

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ПІРОКАТЕХІНУ ТА ЕЛАГОВОЇ КИСЛОТИ ХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНТНИМ МЕТОДОМ

Н.Ю. Бондаренко

Національний фармацевтичний університет (Харків)

Вступ

Поліфенольні сполуки рослинного походження такі, як пірокатехін (**ПК**) та елагова кислота (**ЕК**), належать до дубильних речовин гідролізованої групи, виявляють різнобічну фармакологічну дію, а саме: антиоксидантну, протизапальну, антибактеріальну, кардіопротекторну, противіразкову та ін. [7]. Антиоксидантну дію **ПК** та **ЕК** зумовлює їх хімічна структура. Завдяки наявності в молекулі рухливих атомів водню, поліфенольні сполуки нейтралізують вільні радикали, утворюючи відносно стійкі семіхінони [5]. Зазначені фармакологічні властивості **ЕК** можна пояснити особливостями її хімічної структури – наявністю великої кількості ОН-груп, які здатні зв'язувати вільні радикали з утворенням семіхінонних комплексів, відновлювати вільні йони феруму і, таким чином, стабілізувати процес перекисного окиснення ліпідів [1].

На теперішній час у науковій літературі описані методики кількісного визначення **ПК** та **ЕК** за допомогою різних методів. В основному, кількісне визначення **ПК** та **ЕК** проводять за допомогою метода ВЕРХ [3, 8, 10], методом спектрофотометрії в УФ-ділянці спектра [9, 11, 13], а також іншими хімічними і фізико-хімічними методами кількісного аналізу [2, 4, 6, 12, 14, 15].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дослідження проведено у відповідності з планом науково-дослідницьких робіт Національного фармацевтичного університету «Хімічний синтез, виділення та аналіз нових фармакологічно-активних речовин, встановлення зв'язку «структура – дія», створення нових лікарських препаратів» (№ держреєстрації 198U007011).

Мета – порівняльне вивчення антиоксидантних властивостей **ПК** та **ЕК** за ефектом інгібування хемілюмінесценції (**ХЛ**) аналітичної системи $H_2L - H_2O_2 - Hb$.

Матеріали та методи дослідження

Для досліджень використовували субстанції пірокатехіну та кислоти елагової фармакопейної чистоти.

Вихідний 0,001 моль/л розчин люмінолу (H_2L) виготовляли з очищеного комерційного препарату кваліфікації ч.д.а. (НПФ «Синбіас», ТУ 6-09-08-973) перекристалізацією з льодової оцтової кислоти в присутності активованого вугілля, а відтак – з насиченого розчину луку за точною наважкою у 0,01 моль/л розчині натрій гідроксиду.

Для створення та підтримки необхідної кислотності середовища використовували 0,1 моль/л розчин натрій гідроксиду; значення величини рН розчинів контролювали за допомогою лабораторного потенціометра „Иономер И-130” зі скляним електродом ЭСЛ-43-07 в парі з аргентумхлоридним (ЭВЛ-1), заповненим насиченим розчином калій хлориду.

Розчин гідроген пероксиду (H_2O_2) 5% концентрації готували із 50% препарату о.с.ч. (Чехія) відповідним розбавленням двічі дистильованою водою з наступним контролем вмісту гідроген пероксиду перманганатометрично. Вихідний розчин гемоглобіну (Hb) з концентрацією 75 мкг/мл готували розчиненням 7,5 мг гемоглобіну виробництва фірми “Simko Ltd” (Україна) у 75 мл 0,7% розчину натрію дигідрогенфосфату при нагріванні до 313...323 К. Об'єм доводили до 100 мл двічі дистильованою водою при 293 К і перемішували. Робочий розчин гемоглобіну готували розбавленням вихідного двічі дистильованою водою точно в 100 разів. Розчин придатний до застосування протягом доби.

Виготовлення стандартного розчину ($PC3$) пірокатехіну (PK) $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Розчиняли 0,1100 г субстанції пірокатехіну (точна наважка) у мірній колбі на 100 мл у 75 мл двічі дистильованої води. Об'єм розчину доводили до позначки двічі дистильованою водою при 293 К. Розчин придатний до застосування протягом доби. Розчини з меншою концентрацією пірокатехіну готували з основного стандартного розчину відповідним розбавленням двічі дистильованою водою.

Виготовлення стандартного розчину елагової кислоти (EK) $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Розчиняли 0,0302 г субстанції елагової кислоти (точна наважка) у мірній колбі на 100 мл у 50 мл двічі дистильованої води з додаванням 10 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду. Розчин придатний до застосування протягом доби. Розчини з меншою концентрацією елагової кислоти готували з основного стандартного розчину відповідним розбавленням двічі дистильованою водою.

Інтенсивність хемілюмінесценції вимірювали в умовних одиницях (у.о.) на установці з фотоелектронним помножувачем ФЭУ-84-А, вимірювачем малих струмів ИМТ-0.5 і швидкодіючим (постійна часу 0.1с) потенціометром-самописцем. Реакцію, що супро-

воджується хемілюмінесценцією, проводили у кварцовій кюветі циліндричної форми діаметром 30 мм з робочим об'ємом 10 мл. При проведенні дослідів зберігали наступний порядок змішування реагентів: до суміші індикатора люмінолу в розчині луку та гідроген пероксиду в присутності або у відсутності PK або EK додавали за допомогою піпеткового дозувача П-1 0,50 мл розчину Hb і неперервно реєстрували кінетичну криву інтенсивності хемілюмінесценції ($I_{xл}$) - час ($x\theta$). Дозувач влаштований у зйомний тримач, який ізолює фотокатод фотоелектронного помножувача від стороннього світла, а відтак дозволяє працювати при звичайному освітленні. Усі досліди виконували при температурі 290...293 К.

Отримані результати та їх обговорення

У результаті проведених досліджень було встановлено, що оптимальним для інгібування $XЛ$ в системі $H_2L - H_2O_2 - Hb$ є порядок змішування, коли останнім додається розчин Hb . Оптимальними концентраціями реактивів для PK та EK є: $c(H_2L) = (1 - 2) \cdot 10^{-4}$ моль/л, $c(NaOH) = 0,05$ моль/л, $c(H_2O_2) = 0,0375$ моль/л, $C(Hb) = 3,75 \cdot 10^{-2}$ мкг/мл.

Методика кількісного визначення PK в модельних водних розчинах. У кварцову кювету послідовно приливали 2 мл $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л розчину H_2L , 5 мл 0,1 моль/л розчину натрію гідроксиду, 1,75 мл двічі дистильованої води, 0,25 мл 5%-вого розчину H_2O_2 та 0,5 мл 0,1 мг/мл розчину PK . Одержану суміш перемішували і встановлювали кювету у світлозахисну камеру фотометра. Відкривали шторку і вливали за допомогою піпеткового дозувача 0,5 мл розчину Hb . Аналогічного порядку додавання розчинів дотримувались при виконанні досліду з розчином $PC3$. У всіх випадках реєстрували максимальне значення інтенсивності світіння у порівнянні до його значення у холостому досліді, $\Delta I_{xл} = I_0 - I_{xл}$ (де ΔI_0 – максимальна інтенсивність хемілюмінесценції у холостому (контрольному) досліді, у.о.). Вміст PK у розчині знаходили методом порівняння $\Delta I_{xл}$ з розчином $PC3$.

Вміст PK розраховували за формулою:

$$X = \frac{C_{ст} \cdot \Delta I_{xл}}{\Delta I_{ст}}$$

де $C_{ст}$ – концентрація розчину порівняння $PC3$ PK , моль/л;
 $\Delta I_{ст}$ – зменшення максимальної інтенсивності $XЛ$ у досліді з розчином $PC3$ PK , у.о.;

$\Delta I_{xл}$ – зменшення максимальної інтенсивності $XЛ$ у досліді з розчином досліджуваного зразка PK , у.о.

На рис. 1 наведена залежність I_o/I_{xl} від концентрації **ПК**, а на рис. 2 - залежність I_o/I_{xl} від концентрації **ЕК** у системі $H_2L - H_2O_2 - Hb$ в логарифмічних координатах, де I_{xl} та I_o - максимальні інтенсивності хемілюмінесценції в присутності та за відсутності інгібітора відповідно. Як видно з наведених даних, кутовий коефіцієнт градувальної залежності для **ЕК** перевищує такий коефіцієнт градувальної залежності для **ПК** майже на порядок. Це свідчить про значно вищу чутливість методики хемілюмінесцентного визначення **ЕК** за опрацьованою методикою.

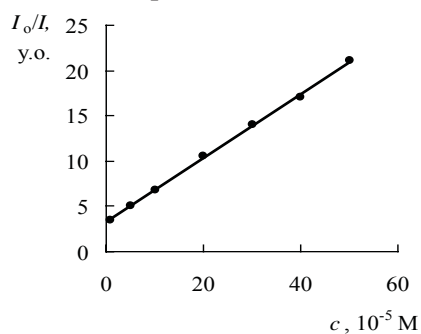


Рис. 1. Концентраційна залежність I_o/I_{xl} у системі $H_2L - H_2O_2 - PK - Hb$. $I_o/I_{xl} = 0,3536 \cdot 10^5 c + 3,245$.

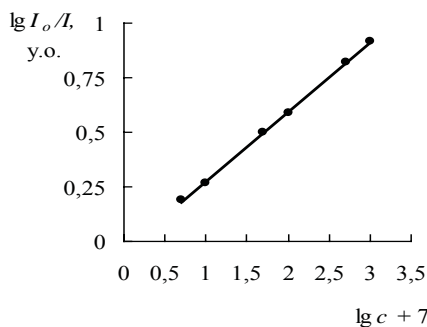


Рис. 2. Залежність $lg I_o/I_{xl}$ від концентрації **ЕК** в системі $H_2L - H_2O_2 - Hb$. $lg I_o/I_{xl} = 0,3183 (lg c + 7) - 0,0416$.

Методика кількісного визначення **ЕК** в модельних водних розчинах. У кварцову кювету послідовно приливали 1 мл $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л розчину H_2L , 5 мл 0,1 моль/л розчин натрію гідроксиду, 2,75 мл двічі дистильованої води, 0,25 мл 5%-вого розчину H_2O_2 та 0,5 мл розчину **ЕК**. Далі виконували аналіз, як при визначенні вмісту **ПК**. Вміст кислоти елагової розраховували за формулою:

$$X = \frac{C_{cm} \cdot \Delta I_{xl}}{\Delta I_{cm}}$$

де C_{cm} - концентрація розчину порівняння **РСЗ ЕК**, моль/л;
 ΔI_{cm} - зменшення максимальної інтенсивності **ХЛ** у досліді з розчином **РСЗ ЕК**, у.о.;

ΔI_{xl} - зменшення максимальної інтенсивності **ХЛ** у досліді з розчином досліджуваного зразка кислоти елагової, у.о.

Результати кількісного визначення **ПК** та **ЕК** в модельних розчинах субстанції наведені в табл.1.

Результати кількісного визначення пірокатехіну та кислоти елагової хемілюмінесцентним методом ($n = 5, P = 0,95$)

Уведено речовини, моль/л	Знайдено речовини, моль/л	Метрологічні характеристики
пірокатехіну $10,00 \cdot 10^{-4}$	$9,94 \cdot 10^{-4}$ $1,00 \cdot 10^{-3}$ $9,99 \cdot 10^{-4}$ $1,00 \cdot 10^{-3}$ $9,97 \cdot 10^{-4}$	$\bar{X} = 9,98 \cdot 10^{-4}$ $S = \pm 2,5 \cdot 10^{-6}$ $S_{\bar{X}} = \pm 1,1 \cdot 10^{-6}$ $\Delta \bar{X} = \pm 3,2 \cdot 10^{-6}$ $RSD = \pm 0,25 \%$ $\delta = -0,2 \%$
елагової кислоти $10,0 \cdot 10^{-5}$	$1,01 \cdot 10^{-4}$ $9,91 \cdot 10^{-5}$ $1,01 \cdot 10^{-4}$ $1,00 \cdot 10^{-4}$ $9,99 \cdot 10^{-5}$	$\bar{X} = 1,00 \cdot 10^{-4}$ $S = \pm 8,1 \cdot 10^{-7}$ $S_{\bar{X}} = \pm 3,6 \cdot 10^{-7}$ $\Delta \bar{X} = \pm 1,0 \cdot 10^{-6}$ $RSD = \pm 0,8 \%$ $\delta = 0 \%$

Отже, як результат дослідження, нами розроблені нові методики здійснення кількісного визначення **ПК** та **ЕК** в модельних розчинах субстанції методом хемілюмінесценції за ефектом інгібування люмінолової реакції. Відносне стандартне відхилення не перевищує $\pm 0,8 \%$ при правильності $\delta = -0,2 \dots 0 \%$. Нижня межа визначуваних концентрацій **ПК** та **ЕК**, c_n становить відповідно $1,2 \cdot 10^{-6}$ моль/л та $4 \cdot 10^{-8}$ моль/л.

Висновки

1. У порівняльному аспекті вивчений інгібіторний вплив **ПК** та **ЕК** на хемілюмінесцентну реакцію окиснення люмінолу гідроген пероксидом в присутності **Hb**: **ЕК** виявляє сильнішу інгібуючу активність.

2. Запропонована методика здійснення кількісного визначення вмісту **ПК** та **ЕК** в модельних розчинах субстанції кінетичним методом інгібування **ХЛ** системи $H_2L - H_2O_2 - Hb$. При визначенні **ПК** та **ЕК** у модельних розчинах субстанції $RSD = 0,8\%$ ($n = 5, P = 0,95$), нижня межа визначуваних концентрацій **ПК** та **ЕК**, c_n , становить $1,2 \cdot 10^{-6}$ та $4 \cdot 10^{-8}$ моль/л відповідно.

Література

1. Малиновська С.А. Порівняльне вивчення фізико-хімічних властивостей елагової кислоти та альтану / С.А. Малиновська, Є.В. Гладух, О.І. Зайцев // Фармац. журнал. - 2005. - № 2. - С. 80-82.

2. Пат. 2205398 Россия. Способ определения гидрохинона и пирокатехина в водных растворах; МПК $\text{G} 01 \text{ N} 30/02$ / Л. А. Харитоновна, Я. И. Коренман, О. Б. Рудаков. - № 20011356 96/28; Заявл. 24.12.2001; Оpubл. 27.05.2003.

3. Пеннер Н.А. Применение сверхчистого полистирола для определения пирокатехина, резорцина и гидрохинона методом ОФ ВЭЖХ с предварительным динамическим концентрированием на потоке / Н.А. Пеннер, П.Н. Нестеренко, М.А. Рыбалко // Журн. анал. химии. - 2001. - Т. 56, № 10. - С. 1067-1072.

4. Подолина Е.А. Электроаналитическое определение *p*-крезола и пирокатехина в водах / Е.А. Подолина, Л.А. Харитоновна, Я.И. Коренман // Вестн. Воронеж. гос. технол. акад. - 2000. - № 3. - С. 165-166.

5. Сербин А.Г. Альтан - новое отечественное эффективное средство ранозаживляющего, противовоспалительного, антимикробного действия / А.Г. Сербин, Л.В. Яковлева, О.П. Хворост // Провизор. - 1998. - № 18. - С. 40-41.

6. Харитоновна Л.А. Экстракционно-кондуктометрическое определение пирокатехина в сточных водах / Л.А. Харитоновна // Материалы 41 Отчетной научной конференции за 2002 г.: тез. доп. - Воронеж, 2002. - С. 183.

7. Яковлева Л.В. Защитное действие элаговой кислоты при экспериментальном миокардите / Л.В. Яковлева, А.К. Ивахненко, Н.Д. Бунытян // Эксперим. и клин. фармакология. - 1998. - Т. 61, № 3. - С. 32-34.

8. Hao Xue-Zhi. Определение содержания пирокатехина в соединениях, экстрагируемых из корней *red sage astragalus* методом ВЭЖХ / Hao Xue-Zhi, Liu Chen, Wang Xin-yan // Harbin Univ. Commer. Natur. Sci. Ed. - 2002. - Vol. 18, № 3. - P. 253-254.

9. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies / I. Bala, V. Bhardwaj, S. Hariharan [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. - 2006. - Vol. 40. - P. 206-210.

10. Li Zhong. Определение фенола и пирокатехина в табачных листьях твердофазной экстракцией и ВЭЖХ / Li Zhong, Wang Lan, Yang Guangyu // Anal. Chem. - 2001. - Vol. 29, № 12. - P. 1409-1411.

11. Liu Jianhua. Одновременное определение фенола, катехина и хинола в смесях методом спектрофотометрии с двойным фильтрованием посредством преобразования Фурье и использованием второй производной отношения спектров / Liu Jianhua, Lin Zhenyu // Spectrosc. and Spectral Anal. - 2000. - Vol. 20, № 4. - P. 480-483.

12. Sun Wei. Application of carbon ionic liquid electrode for the electrooxidative determination of catechol / Sun Wei, Li Yinzhao, Yang Maoxia [et al.] // Sens. and Actuators. B. - 2008. - Vol. 133, № 2. - P. 387-392.

13. Wilson C. Thomas. Quantitative determination of ellagic acid / Thomas C. Wilson, Ann E. Hagerman // J. Agric. Food Chem. - 1990. - Vol. 38. - P. 1678-1683.

14. Wang Liang. Covalent modification of glassy carbon electrode with aspartic acid for simultaneous determination of hydroquinone and catechol / Wang Liang, Huang Peng-fei, Wang Hong-jing [et al.] // Ann. chim. - 2007. - Vol. 97, № 5-6. - P. 295-404.

15. Yang Shaoming. Horseradish peroxidase biosensor based on layer technique for the determination of phenolic compounds / Yang Shaoming, Li Yangmei, Jiang Xiuming [et al.] // Sens. and Actuators. B. - 2006. - Vol. 114, № 2. - P. 774-780.

Резюме

Бондаренко Н.Ю. Кількісне визначення пірокатехіну та елагової кислоти хемілюмінесцентним методом.

Стаття присвячена порівняльному вивченню інгібіторного впливу пірокатехіну (ПК) та елагової кислоти (ЕК) на хемілюмінесцентну реакцію окиснення люмінолу гідроген пероксидом в присутності *Hb*. З'ясовано умови та розроблена методика кількісного визначення вмісту ПК та ЕК в модельних розчинах субстанції кінетичним методом інгібування хемілюмінесценції. При визначенні ПК та ЕК у модельних розчинах субстанції RSD = 0,8% ($n = 5$, $P = 0,95$), нижня межа визначуваності концентрацій ПК та ЕК становить $1,2 \cdot 10^{-6}$ моль/л та $4 \cdot 10^{-8}$ моль/л відповідно.

Ключові слова: люмінол, гемоглобін, пірокатехін, кислота елагова, хемілюмінесцентний метод.

Резюме

Бондаренко Н.Ю. Кількісне визначення пірокатехіну та елагової кислоти хемілюмінесцентним методом.

Стаття посвячена сравнительному изучению ингибиторного влияния пиракотехина и элаговой кислоты на хемилуминесцентную реакцию окисления люминола пероксидом водорода в присутствии *Hb*. Выяснены условия и разработана методика количественного определения содержания пиракотехина и элаговой кислоты в модельных растворах субстанции кинетическим методом ингибирования хемилуминесценции. При определении пиракотехина и элаговой кислоты в модельных растворах субстанции RSD = 0,8% ($n = 5$, $P = 0,95$), нижняя граница определяемых концентраций пиракотехина и элаговой кислоты, $c_{\text{н}}$, составляет $1,2 \cdot 10^{-6}$ моль/л та $4 \cdot 10^{-8}$ моль/л соответственно.

Ключові слова: люмінол, гемоглобін, пірокатехін, кислота елагова, хемілюмінесцентний метод.

Summary

Bondarenko N.Yu. Quantitative determination of pyrocatechol and ellagic acid by chemiluminescence method.

The article is devoted to the comparative study of inhibition influence of the pyrocatechol and ellagic acid on the chemiluminescent reaction of luminol oxidation by hydrogen peroxide in the presence of haemoglobin (Hb). Terms are found and methodology of quantitative determination of the pyrocatechol and ellagic acid content in model solutions of substance by the kinetic method of inhibition of chemiluminescence is developed. At determination of the pyrocatechol and ellagic acid in model solutions of substance of RSD = 0,8% ($n = 5$, $P = 0,95$), LOG of the pyrocatechol and ellagic acid is $1,2 \cdot 10^{-6}$ mol/l and $4 \cdot 10^{-8}$ mol/l accordingly.

Key words: luminol, haemoglobin, pyrocatechol, ellagic acid, chemiluminescence method.

Рецензент: д.ф.н., проф. С.І. Мерзлікін