

ЗАСТОСУВАННЯ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРІЇ ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЦЕЛЕКОКСИБУ В СУБСТАНЦІЇ ТА ЛІКАРСЬКИХ ФОРМАХ

Ключові слова: УФ-спектрофотометрія, субстанція, лікарська форма, цефекоксид

Згідно з міжнародною класифікаційною системою (АТС) нестероїдні протизапальні засоби (НПЗ) відносяться до лікарських препаратів, які впливають на опорно-руховий апарат людини [1–4].

Досліджуваний нами лікарський засіб – цефекоксид (4-[5-(4-метилфеніл)-3-трифторметил-1Н-піразол-1-іл]бензола сульфонамід) є 1,5-діарилзаміщений піразолу, застосовується в медичній практиці у вигляді капсул.

Метою дослідження було виявлення можливості кількісного визначення цефекоксиду в субстанції та лікарських формах методом УФ-спектрофотометрії.

Матеріали та методи дослідження

Всі використані нами розчинники та реактиви мали кваліфікацію «х.ч.». Стандартний зразок цефекоксиду був одержаний нами від ДП «Науково-експертний фармакопейний центр України».

Вступ до експерименту

Для вивчення УФ-спектрів цефекоксиду був використаний спектрофотометр SPECORD 200-222U214.

Вимірювання абсорбції досліджуваних розчинів цефекоксиду проводили у кварцевих кюветах з товщиною шару 10 мм. У зв'язку з тим, що аналізована речовина має в максимумі світлопоглинання високі значення молярного коефіцієнту екстинкції, вивчення її УФ-спектрів проводили у всіх випадках в концентрації 1 мг %. Вимірювання електронних спектрів проводили в межах від 200 до 400 нм, а графік спектрів будувався у координатах $A=f(\lambda)$.

У якості розчинників були використані: вода очищена, етанол (95 %), 0,1 М кислота хлористоводнева, 1 М кислота хлористоводнева, 0,1 М кислота сірчана, 1 М кислота сірчана, 0,1 М натрію гідроксид, 1 М натрію гідроксид, ацетонітрил, хлороформ, *n*-гексан. Вибір зазначених розчинників обумовлювався наступними факторами: а) частим використанням деяких розчинників (етанол, ацетонітрил, хлороформ, *n*-гексан) для виділення субстанції з лікарських форм та з біоматеріалу; б) необхідністю підбору розчинників, які утворюють розчини з найбільш високим значенням абсорбції з метою використання для кількісного визначення; в) можливістю встановлення утворення солей в розчинах хлористоводневої, сірчаної кислот та розчинах натрію гідроксиду, а також виявлення гідролітичних процесів у кислих та лужних середовищах.

Діючи в Україні методи контролю якості (МКЯ) щодо цефекоксиду рекомендують проводити ідентифікацію субстанції за спектром вбирання досліджуваної речовини, розчин якої в метанолі повинен характеризуватися максимумом при 254 ± 2 нм. Для кількісного визначення цефекоксиду за вимогами МКЯ використовують метод УФ-спектрофотометрії.

Ряд авторів для виявлення досліджуваної сполуки у крові людини пропонують метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) у різних її варіантах [5, 7, 11].

Для судово-хімічного аналізу целекоксибу автор Rose зі співавторами рекомендують нормально-фазову ВЕРХ з наступною детекцією речовини методом УФ-спектрофотометрії [6, 8–10].

Експериментальна частина

Вибір розчинника для розробки УФ-спектрофотометричного кількісного визначення целекоксибу в субстанції та лікарських формах (капсулах) був обумовлений ступенем його розчинності, можливістю використання розчинника для екстракції аналізованої сполуки з біоматеріалу при судово-хімічних дослідженнях.

Тому для розробки методики визначення целекоксибу нами були використані етанол (95 %), ацетонітрил та хлороформ.

Попередньо були визначені граничні концентрації, в межах яких світло-вбирання розчинів целекоксибу в етанолі, ацетонітрилі та хлороформі підпорядковується загальному закону Бугера-Ламберта-Бера. З цією метою ми брали наважки субстанції від 10 до 50 мг, розчиняли у обраних розчинниках у мірних колбах ємністю 100 мл і шляхом подальшого розведення одержували серію розчинів певної концентрації. З одержаних результатів вимірювань (не менш шести для однієї концентрації) ми розраховували середні значення показників вбирання ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$), які були використані з метою визначення оптимальної наважки для аналізу.

Встановлено, що УФ-спектр целекоксибу у зазначених розчинниках характеризується однією смугою вбирання з аналітичними максимумами при 254 нм (етанол, $\epsilon_{\text{макс}}$ 29400), 252 нм (ацетонітрил, $\epsilon_{\text{макс}}$ 23900), та 256 нм (хлороформ, $\epsilon_{\text{макс}}$ 23900).

З метою виключення помилки, що пов'язана з калібруванням спектрофотометра, температурним фактором тощо, фармакопейний аналіз вимагає проводити аналіз лікарських засобів з використанням стандартних зразків аналізованої речовини. Ми використовували у якості фармакопейного стандарту целекоксиб-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 целекоксибу в етанолі 95 % (773,80±0,03), ацетонітрилі (654,06±0,02) та хлороформі (632,32±0,02) та визначені граничні концентрації, в межах яких абсорбція підпорядковувалася закону світловбирання Бугера-Ламберта-Бера, відповідно 0,2–1,6 мг %, 0,2–1,8 мг % та 0,2–2,0 мг %.

Кількісне визначення целекоксибу в субстанції

Точну наважку целекоксибу (біля 0,011 г для розчину в етанолі (95 %), 0,014 для ацетонітрильного розчину та 0,020 г для хлороформного розчину) переносять до мірної колби місткістю 100 мл, додають 70 мл обраного розчинника та 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, етанолом (95 %) або ацетонітрилом, або хлороформом доводять до мітки і ретельно перемішують (розчин Б).

Абсорбцію одержаного розчину вимірюють за допомогою спектрофотометра при 254 нм (етанол 95 %), при 252 нм (ацетонітрил) або при 256 нм (хлороформ) у кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовують етанол (95 %) або ацетонітрил, або хлороформ.

Паралельно за тих же довжинах хвиль вимірюють абсорбцію розчину стандартного зразку целекоксибу в концентрації 0,0011 г в 100 мл (95% спирт етиловий), 0,0014 г в 100 мл (ацетонітрил), 0,0020 г (хлороформ).

Вміст целекоксибу розраховують за формулою (2):

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

де: A_1 – абсорбція випробуваного розчину відповідно при 254 нм (етанол 95 %), при 252 нм (ацетонітрил) або при 256 нм (хлороформ);

A_0 – абсорбція розчину стандартного зразку целекоксибу (0,0011 г в 100 мл при 254 нм в етанолі (95 %); 0,0014 г в 100 мл при 252 нм в ацетонітрилі; 0,0020 г в 100 мл при 256 нм в хлороформі);

m_1 – маса наважки субстанції в г;

m_0 – маса наважки стандартного зразку целекоксибу в г.

Вміст целекоксибу в субстанції в перерахуванні на суху речовину повинен бути в межах 98,5% до 101,5%.

Виготовлення розчинів стандартного зразка целекоксибу.

Точну наважку стандартного зразка целекоксибу ФСЗ ДФУ 0,011 г для 95% етанолу; 0,014 г для ацетонітрилу або 0,020 г для хлороформу вміщують у мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють при ретельному перемішуванні у 70 мл використаного розчинника, доводять об'єм розчину 95% етанолом або ацетонітрилом, або хлороформом до мітки і перемішують. 5 мл отриманого розчину вміщують у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину обраним розчинником до мітки і перемішують. Концентрація розчину стандартного зразку целекоксибу у етанолі (95 %) складає 1,1 мг%, в ацетонітрилі – 1,4 мг%, а в хлороформі 2 мг%.

Розчини стандартного зразка целекоксибу (ФСЗ ДФУ) при визначенні діючої речовини у капсулах готують аналогічно наведеній методиці, яка застосовується при кількісному визначенні целекоксибу у субстанції. Результати кількісного визначення целекоксибу в субстанції наведені в табл. 1.

Т а б л и ц я 1

Результати кількісного визначення целекоксибу в субстанції за стандартним зразком

Розчинник	Довжина хвилі, нм	Наважка целекоксибу, мг%	Знайдено		Метрологічні характеристики
			мг%	%	
Етанол (95 %)	254	1,12	1,14	101,78	$\bar{x}=100,03$ $S^2=1,81$ $S=1,35$ $\Delta x=0,03$ $\varepsilon=0,3$
		1,09	1,10	100,91	
		1,14	1,15	100,88	
		1,20	1,18	98,33	
		1,15	1,14	99,12	
		1,17	1,16	99,15	
Ацетонітрил	252	1,52	1,54	101,32	$\bar{x}=99,65$ $S^2=1,72$ $S=1,31$ $\Delta x=0,03$ $\varepsilon=0,03$
		1,48	1,46	98,65	
		1,47	1,46	99,32	
		1,49	1,47	98,65	
		1,50	1,48	98,67	
		1,54	1,56	101,30	
Хлороформ	256	1,98	1,99	100,50	$\bar{x}=99,87$ $S^2=1,39$ $S=1,18$ $\Delta x=0,03$ $\varepsilon=0,03$
		1,96	1,95	99,49	
		1,97	1,99	101,01	
		2,04	2,02	99,02	
		2,10	2,06	98,10	
		2,01	2,03	101,00	

Кількісне визначення целекоксибу у капсулах.

Згідно вимог аналітичної нормативної документації, в одній капсулі знаходиться 200 мг активної речовини (целекоксибу) та допоміжні речовини: лактоза – 78,5 мг; натрію кроскармелоза – 6,0 мг; магнію стеарат – 2,0 мг; тальк – 3,5 мг. Середня маса однієї капсули складає 290 мг.

Експериментально встановлено, що допоміжні речовини, які входять до складу капсул, не володіють вибіркоким світловбиранням в межах від 200 до 400 нм, і тому не заважають кількісному визначенню целекоксибу в капсулах.

Для аналізу була виготовлена штучна суміш целекоксибу у капсулах. У якості розчинників при розробці методики кількісного визначення целекоксибу в капсулах рекомендується етанол (95 %), ацетонітрил та хлороформ.

Методика визначення.

Точну наважку капсули (близько 32 мг в етанолі (95 %); 41 мг в ацетонітрилі, або 58 мг в хлороформі) вміщують у мірну колбу місткістю 100 мл, додають 70 мг одного з зазначених розчинників, енергійно збовтують протягом 20 хв, доводять об'єм розчину використаним розчинником до мітки, перемішують 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 етанолом (95 %) або ацетонітрилом, або хлороформом до мітки і перемішують.

Вимірюють абсорбцію випробуваного розчину та розчину стандартного зразка за допомогою спектрофотометра при 254 нм (95% спирт етиловий), при 252 нм (ацетонітрил), або при 256 нм (хлороформ).

Вміст целекоксибу (C_1) в одній капсулі в грамах, обчислюють за формулою (3):

$$C_1 = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 5 \cdot v \cdot P}{A_0 \cdot m_1 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 5 \cdot 100} = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot v \cdot P}{A_0 \cdot m_1 \cdot 100}, \quad (3),$$

де A_1 – абсорбція густини випробуваного розчину;

A_0 – абсорбція густини стандартного розчину;

m_1 – маса наважки субстанції;

m_0 – маса наважки стандартного зразку целекоксибу;

v – середня маса однієї капсули;

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

Вміст целекоксибу в одній капсулі повинен бути від 180 мг до 220 мг, в розрахунку на середню масу капсули. Результати кількісного визначення целекоксибу в капсулах наведені в табл. 2.

Таблиця 2

Результати кількісного визначення целекоксибу в капсулах

Довжина хвилі, нм	Розчинники	Наважка аналізованої маси капсули, мг	Вміст препарату в наважці для аналізу, мг	Вміст препарату у випробуваному розчині мг/100мл	Знайдено		Метрологічні характеристики
					мг/100мл	%	
254	етанол (95 %)	32,0	22,1	1,11	1,12	101,82	— $\bar{x} = 99,56$ $S^2 = 3,35$ $S = 1,83$ $\Delta x = 0,05$ $\epsilon = 0,05$
		32,6	22,5	1,12	1,14	101,79	
		33,8	23,3	1,17	1,16	99,15	
		32,8	22,6	1,13	1,11	98,09	
		34,6	23,9	1,19	1,16	97,48	
		33,2	22,9	1,14	1,13	99,40	

252	Ацетонітрил	39,8	27,5	1,37	1,34	98,03	—
		41,2	28,4	1,42	1,40	99,05	$\bar{x}=99,19$
		40,6	27,9	1,39	1,30	99,28	$S^2=1,83$
		41,9	28,9	1,45	1,41	97,24	$S=1,35$
		42,1	29,0	1,46	1,47	100,09	$\Delta x=0,04$
		41,1	28,3	1,41	1,43	101,42	$\varepsilon=0,04$
256	Хлороформ	57,6	39,7	1,99	1,97	98,81	—
		57,9	39,9	1,99	1,98	99,33	$\bar{x}=99,54$
		56,8	39,3	1,96	1,98	100,93	$S^2=1,83$
		58,1	40,1	2,01	1,96	97,51	$S=1,35$
		57,2	39,5	1,97	1,99	101,12	$\Delta x=0,04$
		57,5	39,6	1,98	1,97	99,54	$\varepsilon=0,04$

Кожна капсула з цецекоксибом повинна вміщувати не менше ніж 99,0 % і не більше 110,0 % (від 180 до 220 мг) заявленої кількості цецекоксибу.

В и с н о в к и

1. Вивчено УФ-спектри цецекоксибу у воді очищеній, етанолі (95 %), 0,1 М та 1 М розчинах хлористоводневої кислоти, 0,1 М та 1 М розчинах натрію гідроксиду, 0,1 М та 1 М розчинах кислоти сірчаної, ацетонітрилі та хлороформі.

2. Встановлено, що УФ-спектри цецекоксибу у зазначених розчинниках характеризуються максимумами вбирання в межах 238–256 нм.

3. Розроблено та запропоновано методики кількісного визначення цецекоксибу в субстанції та капсулах (етанол (95 %) $\lambda_{\text{макс}}$ 254 нм, ацетонітрил $\lambda_{\text{макс}}$ 252 нм, хлороформ $\lambda_{\text{макс}}$ 256 нм).

4. Похибка визначення цецекоксибу в субстанції не перевищує $\pm 0,03$, а в капсулах $\pm 0,05$.

1. Дроговоз С.М. Побочное действие лекарств: учебник-справочник / С.М.Дроговоз, А.П.Гудзенко, М.А.Будко, В.В.Дроговоз. – Х.: «СИМ», 2010. – 480 с.

2. Дроговоз С.М. Фармакологія на допомогу лікарю, провізору та студенту: підручник / С.М.Дроговоз, В.В.Дроговоз. – Х.: 2008. – 476 с.

3. Компендиум 2009 – лекарственные препараты / Под ред. В.Н.Коваленко, А.П.Викторова. – К.: МОРИОН, 2009. – 2224 с.

4. Машковский М.Д. Лекарственные средства [16-е изд.] / М.Д.Машковский. – М.: Новая волна, 2010. – 1216 с.

5. Abdel-Hamid M. Liquid chromatographic – mass spectrometric determination of celecoxib in plasma using single-ion monitoring and its use in clinical pharmacokinetics. / Abdel-Hamid M., Novotny L., Hamza H. – J. Chromatogr. B., 2001. – Vol. 753. – p. 401–408.

6. Determination of celecoxib in human plasma and breast milk by high – performance liquid chromatography assay / [Zhang M., moore J.A., Jardiner S.J., Begg E.J.]. – J. Chromatogr. B., 2006. – Vol. 830. p. 245–248.

7. Determination of celecoxib in human plasma and rat microdialysis samples by liquid chromatography tandem-mass spectrometry / [L. Brantigam, J. Vetter, J. Tegeder, J. Heinkele, J. Jeisslinger]. – J. Chromatogr. B., 2001. – № 761. – p. 203–212.

8. Determination of celecoxib in human plasma by high – performance liquid chromatography / [Jalalizaden H., Amini M., Ziaee V., Sata A., Shatiee F.H.]. – J. Pharm. Biomed. Anal., 2004. – Vol. 35. – p. 665–670.

9. Juermouche M.H. Simplified solid – phase extraction procedure and liquid chromatographic determination of celecoxib in rat serum / M.H.Juermouche, A.Charbi. – Chromatographia, 2004. – Vol. 60. – p. 341–345.

10. Rose M.J. Determination of celecoxib in human plasma by normal – phase high – performance liquid chromatography with column switching and ultraviolet absorbance detection / Rose M.J., Woolf E.J., Matuszewski B.K. – J. Chroma B., 2000. – Vol. 738. – p. 377 – 385

11. Simple and sensitive method for the determination of celecoxib in human serum by high – performance liquid chromatography with fluorescence detection / [F.Schonberger, J.Heinkele, T.E.Murdter, S.Brenner, U.Klotz, U.Hofmann]. – J. Chromatogr. B, 2009. – № 768. p. 255–260.

Надійшла до редакції 12.12.2011.

Е. А. Филатова, В. П. Буряк, И. А. Юрченко, С. В. Сур, И. М. Кейтлин

ПРИМЕНЕНИЕ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦЕЛЕКОКСИБА В СУБСТАНЦИИ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ

Ключевые слова: УФ-спектрофотометрия, субстанция, лекарственная форма, це-
лекоксиб

Изучены УФ-спектры целекоксиба в воде очищенной, этаноле (95 %), 0,1 М и 1 М растворах хлоридной кислоты, 0,1 М и 1 М растворах натрия гидроксида, 0,1 М и 1 М растворах сульфатной кислоты, ацетонитриле и хлороформе. Установлено, что УФ-спектры целекоксиба в указанных растворителях характеризуются максимумами поглощения в пределах 238–256 нм. Разработаны и предложены методики количественного определения целекоксиба в субстанции и капсулах.

Н. А. Filatova, V. P. Buryak, I. O. Iurchenko, S. V. Sur, I. M. Keytlin

USE OF UV-SPECTROPHOTOMETRY FOR CELECOXIB ASSAY IN SUBSTANCE AND DOSAGE FORMS

Key words: UV-spectrophotometry, substance, dosage form, celecoxib

The UV-specters of celecoxib in purified water, 95% ethyl alcohol, 0,1 M and 1 M chloride acid solutions, 0,1 M and 1 M sodium hydroxide solutions, 0,1 M and 1 M sulfuric acid solutions, acetonitrile and chloroform have been studied. It was defined that UV-specters of celecoxib are characterized by absorption peaks within 238-256 nm. The procedure of celecoxib assay in substance and capsules was carried out.