

**ВАЛІДАЦІЯ ЙОДОМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ
КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЦЕФАЛЕКСИНУ
У СУБСТАНЦІЇ****М.Є. Блажеєвський, Ю.Ю. Лабузова***Національний фармацевтичний університет (Харків)***Вступ**

Цефалексин (Cefalexin), моногідрат-7-(D- α -аміно- α -фенілацетил-аміно)-3-метил-3-цефем-4-карбонової кислоти, є похідним 7-амінодезацетоксицефалоспорової кислоти (7-АДЦК) і належить до напівсинтетичних цефалоспоринових β -лактамних антибіотиків I покоління. [1]. Порівняльні дослідження точності та чутливості відомих аналітичних методів визначення цефалексину в лікарських препаратах показали, що найкращі результати одержуються під час застосування методу прямої УФ-спектрофотометрії та високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Ненадійним та довготривалим визнаний класичний метод йодометричного титрування [2]. Для кількісного визначення цефалексину ДФУ та ЄФ рекомендує використовувати метод ВЕРХ [3,4]. Крім того, в науковій літературі описані методики кількісного визначення цефалексину в субстанції та лікарських препаратах методами колориметрії [5] і атомно-абсорбційної спектроскопії [6], спектрофотометрії [7], потенціометричного титрування [8], а також кінетичним методом [9].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження проведено у відповідності з планом науково-дослідницьких робіт Національного фармацевтичного університету і є складовою частиною держбюджетної теми "Хімічний синтез, виділення та аналіз нових фармакологічно-активних речовин, встановлення зв'язку "структура – дія", створення нових лікарських препаратів" (№ держреєстрації 198U007011).

Мета - валідація новоопрацьованої методики кількісного визначення цефалексину за реакцією S-окиснення калій гідрогенпероксомоносульфатом методом йодометричного титрування.

Матеріали та методи дослідження

Як окисник використовували калій гідрогенпероксомоносульфат у вигляді $2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$, Acros Organics (оксон). Вибір

реагента обумовлений його доступністю, задовільною розчинністю у воді, порівняно високою окисаційною здатністю ($E^0=1,82$ В) [10], а також достатньою стійкістю під час зберігання та застосування.

Виготовлення розчину калій гідрогенпероксомоносульфату, 0,02 моль/л. Наважку, близько 1,537 г, оксону розчиняли у 50 мл дистильованої води в мірній колбі на 100 мл. Об'єм розчину доводили водою до позначки при 20 °С. Вміст KHSO_5 у виготовленому розчині визначали методом йодометричного титрування.

Розчин натрій тіосульфату, 0,01 моль/л. Виготовляли розчин натрій тіосульфату 0,1 моль/л із фіксаналу стандарт-титру. За допомогою піпетки відбирали 10 мл одержаного розчину, переносили у мірну колбу на 100 мл та доводили об'єм розчину дистильованою водою до позначки при 20 °С.

Розчин калій йодиду, 5%. Наважку 5,0 г калій йодиду розчиняли у 50 мл дистильованої води в мірній колбі на 100 мл та доводили водою до позначки при температурі 20 °С.

Розчин сульфатної кислоти, 0,1 моль/л. Розчин сульфатної кислоти готували з фіксаналу стандарт-титру у мірній колбі на 500 мл.

Для дослідження використовували субстанцію цефалексину – Пурилекс, яка відповідала вимогам АНД (виробництва DMS Anti-infectives Chemferm S.A., Іспанія; сер. В425055; вміст основної речовини 100,9 % (ВPh); $W_{\text{H}_2\text{O}}=6,2$ %).

Методика кількісного визначення цефалексину моногідрату у субстанції. 10,0 мл досліджуваного розчину переносили в мірну колбу, додавали 10,0 мл 0,05 моль/л розчину калій гідрогенпероксомоносульфату, доводили об'єм дистильованою водою до 100,0 мл, ретельно перемішували і залишали на 1 хв. Потім відбирали 10,0 мл розчину, поміщали в конічну колбу для титрування, додавали 1 мл 0,1 моль/л розчину сульфатної кислоти і 1 мл 5 % розчину калій йодиду. Вивільнений йод одразу відтитровували 0,01 моль/л розчином натрій тіосульфату. Паралельно за аналогічних умов виконували контрольний дослід (за відсутності цефалексину моногідрату з тією ж кількістю 0,01 моль/л розчину калій гідрогенпероксомоносульфату).

1 мл стандартного 0,0100 моль/л розчину натрій тіосульфату відповідає 0,001827 г цефалексину моногідрату ($\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$), якого в субстанції повинно бути 95-101% в перерахунку на безводну речовину.

Хімізм реакцій, які покладено в основу опрацьованої методики, наведено на рис.1.

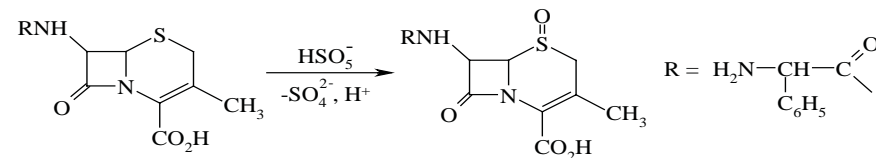
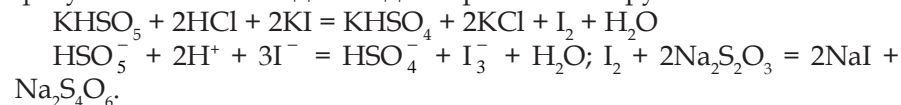


Рис. 1. Схема реакції S-оксидзації цефалексину калій гідрогенпероксомоносульфатом.

Надлишок непрореагованого калій гідрогенпероксомоносульфату визначали методом йодометричного титрування:



Вміст цефалексину моногідрату у субстанції, X, розраховували у %, враховуючи вміст вологи.

Приготування модельних робочих розчинів. Готували сім розчинів, виготовлених за точними наважками таких концентрацій: 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%. Точну наважку (відповідно 0,2388; 0,2538; 0,2687; 0,2836; 0,2985; 0,3284; 0,3582) субстанції препарату з відомим вмістом вологи розчиняли в 70 мл дистильованої води і доводили об'єм до 100,0 мл. Далі аналіз виконували, як в методиці кількісного визначення цефалексину моногідрату у субстанції. Кожний з модельних розчинів титрували тричі (три аліквоти). Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали відповідно до статті ДФУ «Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту» [11].

Отримані результати та їх обговорення

Діапазон застосування методики. При проведенні титриметричного кількісного визначення цефалексину моногідрату у субстанції було обрано діапазон застосування методики від 80% до 120% як рекомендовано у ДФУ [12].

Критерії невизначеності аналітичної методики. Максимально допустимої повної невизначеності - $\text{max}\Delta_{\text{As}} = 1,0\%$, максимальної систематичної похибки - $\text{max}\delta = 0,67\%$, критичне значення залишкового стандартного відхилення $\text{RSD}_0\% = \text{max}\Delta_{\text{As}}/t(0,95; n-2) = 0,48$, індексу кореляції $R_c = 0,99959$, критичного значення практичної невизначеності вільного члена лінійної залежності $a \leq 2,25$, $|b-1| \leq 0,146$ [13]. Результати наведені у табл. 1, 2.

Результати вивчення лінійності модельних розчинів

№ модельного розчину	Об'єм титранту (V_0), мл (контрольний дослід)	Об'єм титранту (V_1), мл (робочий дослід)	Знайдено y_i (%)	$Y_i = bx_i + a$
1	8,69	7,48	78,95	79,58
2	8,70	7,47	80,26	
3	8,69	7,47	79,61	
4	8,70	7,40	84,80	85,34
5	8,70	7,39	85,45	
6	8,71	7,40	85,45	
7	8,71	7,32	90,68	90,64
8	8,71	7,32	90,68	
9	8,70	7,32	90,03	
10	8,69	7,23	95,26	95,76
11	8,70	7,25	94,61	
12	8,70	7,24	95,26	
13	8,71	7,15	101,80	101,43
14	8,72	7,17	100,49	
15	8,71	7,16	100,49	
16	8,70	7,00	110,91	111,88
17	8,72	7,01	111,56	
18	8,70	7,00	110,91	
19	8,69	6,85	120,06	121,47
20	8,70	6,84	121,37	
21	8,70	6,86	120,06	

Одержані результати свідчать, що дані відповідають критеріям ДФУ.

Межа виявлення (МВ) та межа кількісного виявлення (МКВ) не перевищують 32%, тому не впливають на проведення кількісного визначення.

Правильність і збіжність. Визначення правильності та збіжності аналітичної методики проводили за результатами аналізу тих самих модельних розчинів. Дані обробляли статистично та порівнювали з критеріями за ДФУ. Отримані результати наведено у табл. 3.

Характеристики лінійної залежності $Y = a + b \cdot X$

Параметр	Значення	Стандартне відхилення (SD)	Критерій статистичної невизначеності ($\leq 1,21 \cdot SD$)	Критерій практичної прийнятності	Висновок
a	-2,0019	$S_a = 1,86$	$ a \leq 2,25$		відповідає
b	1,0248	$S_b = 0,12$	$ b-1 \leq 0,146$		відповідає
S_{rest}	0,418			$\leq 0,48$	відповідає
R	0,99965			$\geq 0,99959$	відповідає
r^2	0,9993			$\geq 0,99917$	задовільняє
МВ	5,99				
МКВ	18,15				

Лінійність. Визначення лінійності даної методики здійснювали за сімома модельними лікарськими формами, на всьому інтервалі застосування методики (80%; 85%; 90%; 95%; 100%; 110%; 120%) за методикою, яка наведена вище. Кожний розчин титрували тричі. Отримані результати обробляли методом найменших квадратів для прямої $Y = a + b \cdot X$. Результати обробки для прямої методом найменших квадратів наведені у таблиці 2. У нормалізованих координатах досліджувалась лінійна залежність (рис. 2).

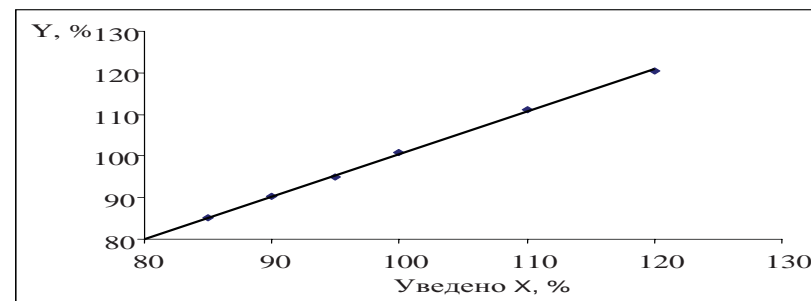


Рис. 2. Графік залежності об'єму титранта від концентрації цефалексину у нормалізованих координатах.

Як видно, графік зберігає лінійність на всьому інтервалі випробуваних концентрацій (80-120%).

Результати аналізу модельних розчинів та результати їх статистичної обробки

№ модельного розчину	Введено x_i , %	Об'єм титранту $(V_0 - V_1)$, мл	Знайдено y_i (%)	Знайдено в % до введеного $Z_i=100(Y_i/X_i)$
1	80,00	1,21	78,95	98,69
2		1,23	80,26	100,32
3		1,22	79,61	99,51
4	85,00	1,30	84,80	99,77
5		1,31	85,45	100,54
6		1,31	85,45	100,54
7	90,00	1,39	90,68	100,76
8		1,39	90,68	100,76
9		1,38	90,03	100,03
10	95,00	1,46	95,26	100,27
11		1,45	94,61	99,59
12		1,46	95,26	100,27
13	100,00	1,56	101,80	101,8
14		1,55	100,49	100,49
15		1,56	100,49	100,49
16	110,00	1,70	110,91	100,83
17		1,71	111,56	101,42
18		1,69	110,91	100,83
19	120,00	1,84	120,06	100,05
20		1,86	121,37	101,14
21		1,84	120,06	100,05
Середнє значення				100,39
Відносне стандартне відхилення				0,68
Відносний довірчий інтервал				1,46
Систематична похибка				+0,39
Статистична незначимість систематичної похибки $\delta \leq \Delta_R 0,39 \leq 0,47$				Виконується
Статистична незначимість систематичної похибки $\delta \leq \max \delta 0,39 \leq 0,67$				Виконується

Висновки

1. Здійснено валідацію новоопрацьованої аналітичної методики кількісного визначення цефалексину моногідрату у суб-

станції з використанням калій гідрогенпероксомосульфату як аналітичного реагента методом йодметрії за валідаційними характеристиками: межа виявлення, межа кількісного виявлення, правильність, збіжність і лінійність.

2. Отримані метрологічні характеристики методики не перевищують критерії прийнятності за ДФУ.

3. Отримані показники метрологічних характеристик свідчать про можливість використання опрацьованої методики кількісного визначення цефалексину моногідрату за допомогою калій гідрогенпероксомосульфату як аналітичного реагента у контрольно-аналітичних та заводських лабораторіях з контролю якості лікарських засобів.

Література

1. Компендиум 2008 – лекарственные препараты. В двух томах. Том 2 / [ред. В.Н. Коваленко, А.П. Викторова]. – К. : МОРИОН, 2008. – 2270 с.
2. Gallo M.L. Comparison of several methods used for the determination of cephalosporins. Analysis of cephalixin in pharmaceutical samples / M.L. Gallo, F.P. Campíns, C.A. Sevillano // J. Pharm. and Biomed. Anal. - 2002. - Vol. 29, № 3. - С. 405-423.
3. Державна Фармакопея України / Державне підприємство „Науково-експертний фармакопейний центр”. – [1-е вид.] – Харків: PIPEГ, 2001. – 477 с.
4. European Pharmacopoeia. - [4th ed.]. - Strasbourg: Council of Europe, 2003. - Suppl. 3. – P. 2975-2977.
5. Priyanka P. Development of colorimetric method for cephalixin in dosage form / P.Priyanka, P.Suresh // Asian J. Pharm. – 2008. – Vol. 2, № 2. – P. 120-122.
6. Salem H. Colourimetric and AAS determination of cephalosporins using Reineck's salt / H. Salem, H. Askal // J. Pharm. And Biomed. Anal. – 2002. – Vol. 29, № 1-2. – P. 347-354.
7. Зайцева К.В. Спектрофотометрическое определение ампициллина, амоксициллина и цефалексина в лекарственных формах / К.В.Зайцева, В.Г. Алексеев // Вестник ТвГУ. Сер. «Химия». - 2006. - Вып.3, № 8. - С. 112-115.
8. Алексеев В.Г. Определение пенициллинов методом потенциометрического титрования раствором нитрата ртути(II) / В.Г. Алексеев, И.А. Федорова-Левковская // Вестник ТвГУ. Сер. «Химия». - 2006. - Вып.3, № 8. - С. 108-111.
9. Omara M.A. Kinetic spectrofluorimetric determination of certain cephalosporins in human plasma / M.A. Omara, O.H. Abdelmageeda, T.Z. Attia // Talanta. – 2009. – Vol. 77, № 4. – P. 1394-1404.
10. Spiro M. The standard potential of the peroxosulphate/sulphate couple // M. Spiro // Electrochem. Acta. – 1979. – Vol. 24. – P. 313-314.
11. Державна Фармакопея України: Доп. 1 / Державне підприємство „Науково-експертний фармакопейний центр”. – Харків: PIPEГ, 2004. – 520 с.

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 гидропероксомосульфат.

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.