

М.Є. БЛАЖЕЄВСЬКИЙ, *канд. хім. наук, доцент*, Н.Ю. БОНДАРЕНКО,
асистент

Національний фармацевтичний університет

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВІКАСОЛУ В ЛІКАРСЬКИХ ФОРМАХ МЕТОДОМ ХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ

Вікасол (2,3-дигідро-2-метил-1,4-нафтохінон-2-сульфонат натрію) (**B**) належить до похідних метилнафтохінону та є водорозчинним синтетичним замінником вітамінів групи К або коагуляційним вітаміном. Його випускають у вигляді субстанції, а також лікарських форм: таблеток по 0,015 г та 1% розчину в ампулах. Крім фармакопейної методики [6], яка полягає у вилученні препарату з водного розчину хлороформом, а відтак відновленні його цинком з наступним церійметричним титруванням, кількісне визначення **B** можна здійснити методом спектрофотометрії [4, 7, 13], спектрофлуориметрії [5], флуориметрії [11], вольтамперометрії [9, 10], полярографії [14], потенціометрії [2] та амперометрії [3] тощо. У літературі також описані високочутливі хемілюмінесцентні методики визначення **B** за активуючою дією у реакції хемілюмінесцентного окиснення люмінолу гексаціанофератом (III) калію [8], а також за реакцією окиснення люмінолу гідроген пероксидом, утвореним у попередній реакції фотоокиснення вікасолу, в присутності гематину як каталізатора процесу [12]. Межа виявлення становить $3 \cdot 10^{-8} \text{M}$ та $2 \cdot 10^{-9} \text{M}$ відповідно.

Нами встановлено, що **B** чинить активуючий вплив на процес хемілюмінесцентного окиснення люмінолу гідроген пероксидом в сильнолужному середовищі. Таку поведінку **B** пояснено генеруванням, а відтак стабілізацією утворених у розчині активних форм кисню, які безпосередньо беруть участь в утворенні емітера хемілюмінесценції. Це явище покладено в

основу розроблення нової хемілюмінесцентної методики кількісного визначення ***B*** у його лікарських формах.

Експериментальна частина

Для досліджень використовували субстанцію вікасолу, що відповідає вимогам Європейської фармакопеї [6], та лікарські форми, які містять вікасол: таблетки „Вікасол” виробництва ЗАТ „Борщагівський ХФЗ”, Україна, 0,015 г діючої речовини, серія 100902 та розчин „Вікасол-Дарниця” 1% для ін’єкцій виробництва „Дарниця”, Україна, серія 30202.

Вихідний 0,001 М розчин люмінолу (H_2L) (фірма „Хемапол”, Чехія) готували з очищеного комерційного препарату перекристалізацією з льодової оцтової кислоти, а відтак – з насиченого розчину луку за точною наважкою у 0,01 М розчині натрію гідроксиду. В роботі використовували розчини луку без карбонатів.

Для створення та підтримки необхідної кислотності середовища використовували 0,1 М розчин натрію гідроксиду, рН розчинів контролювали за допомогою скляного індикаторного електрода ЭСЛ-43-07 та йономіра лабораторного И-130. Усі розчини готували на двічі дистильованій воді.

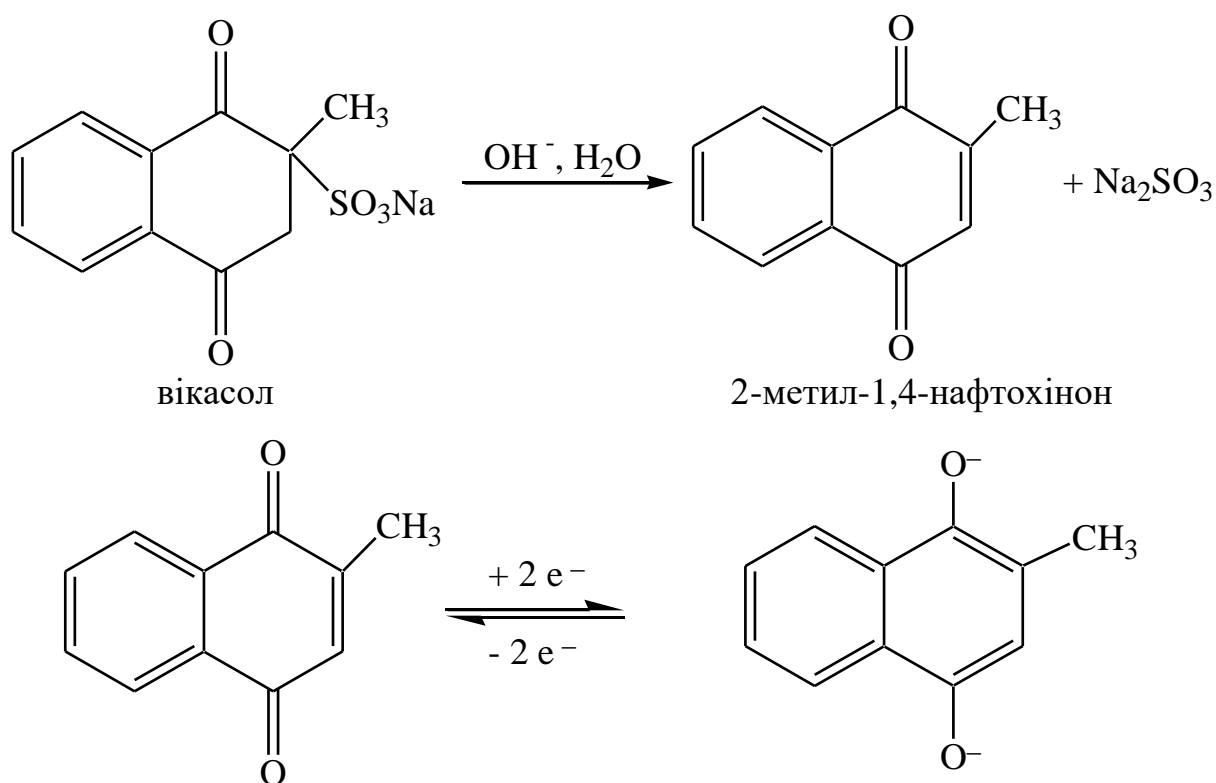
Розчин гідроген пероксиду масової концентрації 5% готували із 50% препарату о.с.ч. розбавленням його двічі дистильованою водою з наступним визначенням точної концентрації перманганатометрично.

Інтенсивність хемілюмінесценції вимірювали на установці з фотоелектронним помножувачем ФЭУ-84-А, вимірювачем малих струмів ИМТ-0.5 і швидкодіючим (постійна часу 0.1с) потенціометром-самописцем. Реакцію, що супроводжується 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 додавали за допомогою піпеткового дозувача П-1 0,50 мл розчину вікасолу і неперервно реєстрували кінетичну криву інтенсивність хемілюмінесценції ($I_{хл}$) - час ($xв$). Дозувач влаштований у зйомний тримач, який ізолює фотокатод

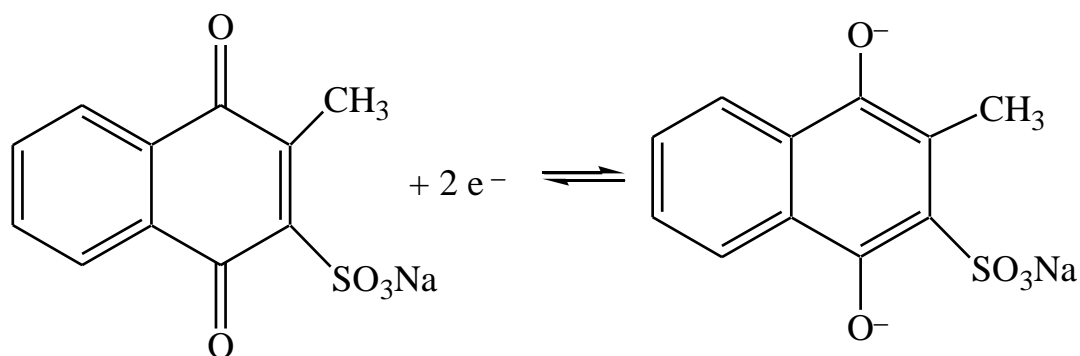
фотоелектронного помножувача від стороннього світла, а відтак дозволяє працювати при звичайному освітленні. Усі досліди виконували при температурі 290...293 °С.

Результати та їх обговорення

Ймовірно, що в умовах генерування хемілюмінесценції ($\text{pH} \approx 12$) відбувається елімінування сульфїтної групи з молекули вікасолу в результаті гідролізу і утворення молекули 2-метил-4-нафтохінону, який на відміну від вікасолу здатний до оборотних редокс-перетворень:



Не виключена можливість ізомеризації вікасолу з утворенням натрієвої солі 2-метил-1,4-нафтогідрохінон-3-сульфоїкислоти, яка також володіє здатністю до оборотних процесів окиснення-відновлення:



Такий механізм перетворень вікасолу підтверджується одержаними нами спектральними даними. На рис. 1 наведено диференційні електронні спектри сумішей натрію гідроксид – **B**, натрію гідроксид – цинковий пил – **B** та H_2L – натрію гідроксид – H_2O_2 – **B**. На спектрі продуктів взаємодії досліджуваної хемілюмінесцентної композиції з **B** знаходили смуги, ідентичні таким, що належать продукту відновлення **B** – відповідному гідрохінону.

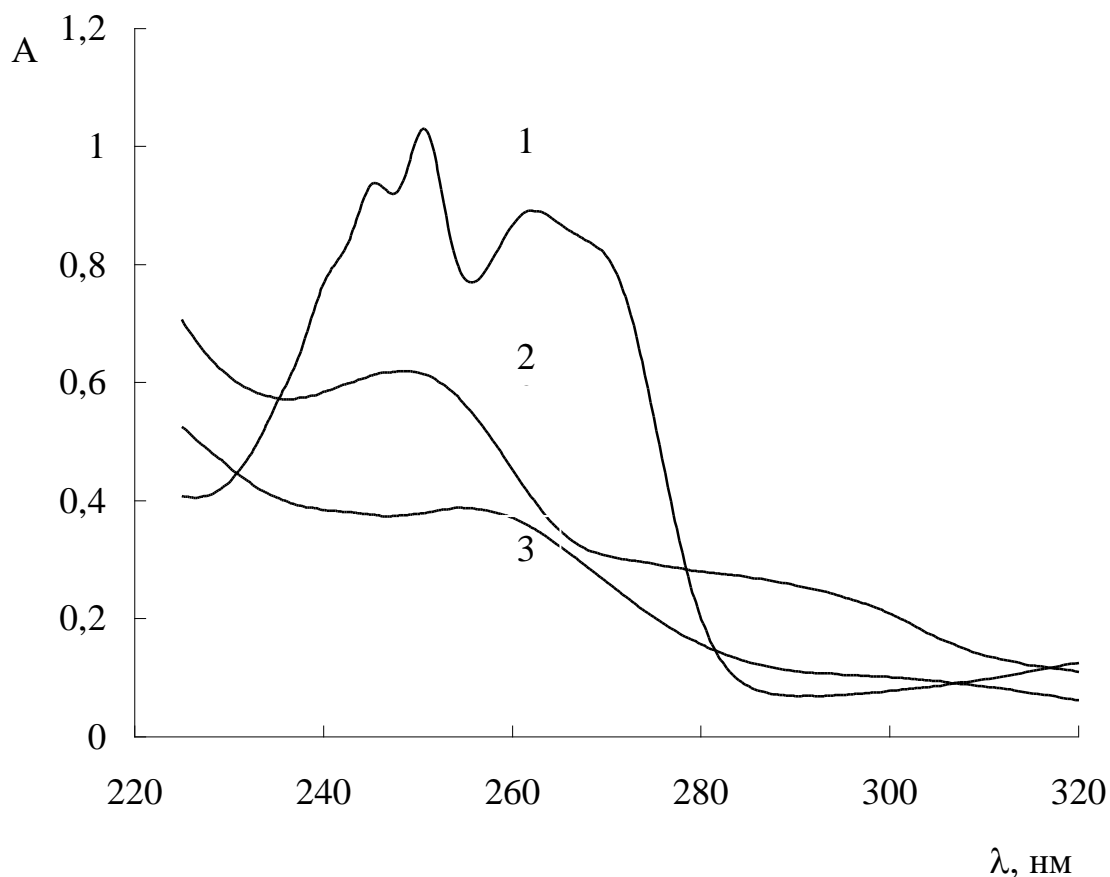
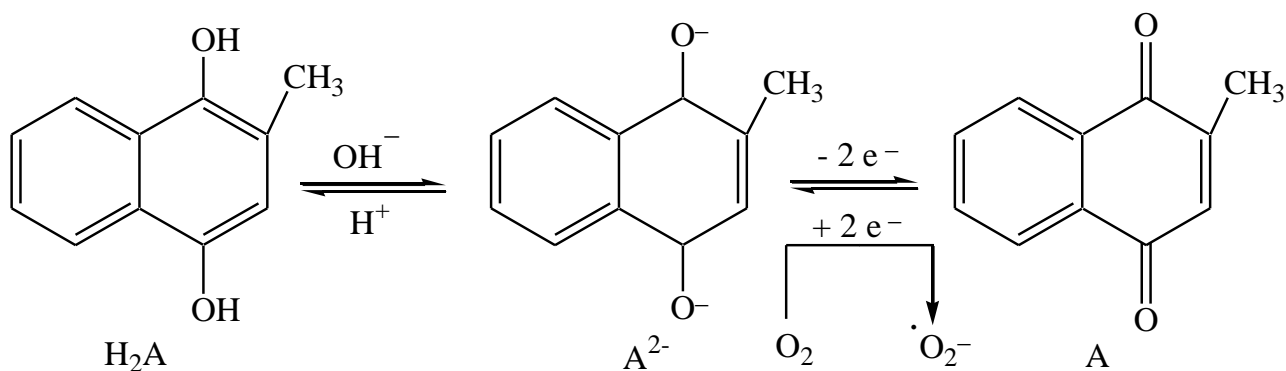


Рис. 1. Диференційний електронний спектр продукту реакції вікасолу з гідроген пероксидом в присутності люмінолу в лужному середовищі.

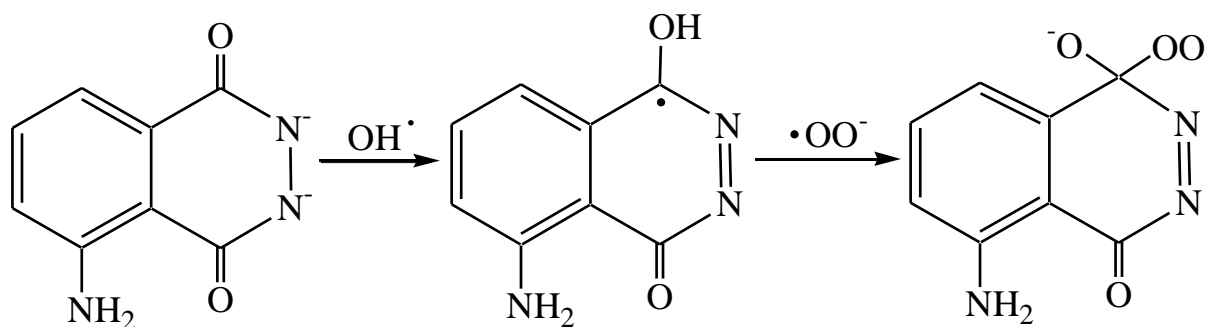
$c(H_2O_2) = 6 \cdot 10^{-4}$ М, $c(H_2L) = 4 \cdot 10^{-5}$ М, $c(B) = 4,54 \cdot 10^{-5}$ М, рН = 12,8. 1 – NaOH – **B**; 2 – NaOH – Zn – **B**; 3 – H_2L – NaOH – H_2O_2 – **B**

В реакційній суміші знаходили 2-метил-1,4-нафтогідрохінон з виходом більше 60%. Окиснення 2-метил-1,4-нафтогідрохінону (H_2A) у 2-метил-1,4-нафтохінон (**A**) у лужному середовищі практично повністю відбувається за механізмами, опосередкованими супероксидними аніонами $\cdot O-O^-$:

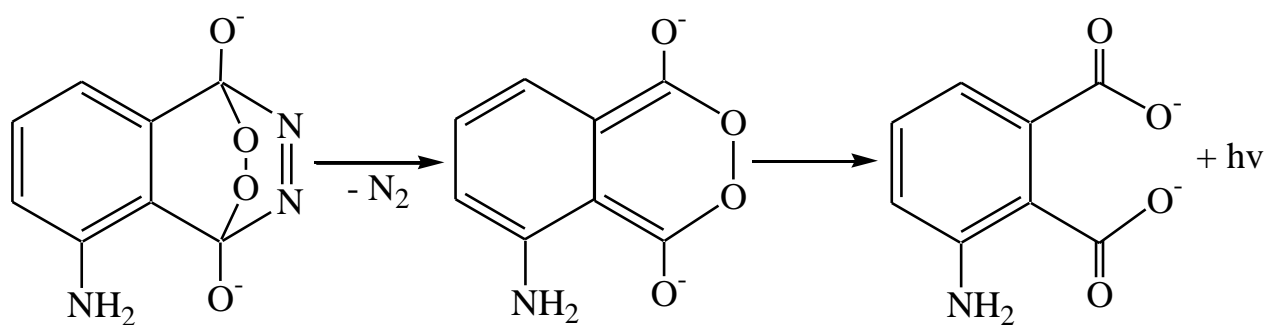


Хоча, в процесі відновлення як 2-метил-1,4-нафтохінон, так і 2-метил-1,4-нафтохінон-3-сульфоїкислота не утворюють помітних кількостей семіхінонової форми, кількість утвореного при відновленні $\cdot O-O^-$ (за умов наявності H_2O_2 в системі) виявляється достатньою для збудження хемілюмінесценції в системі $H_2L - H_2O_2 - B$ [1].

Процес виникнення хемілюмінесценції може бути представлений схемою:



Діаніон люмінолу (L^{2-})



трансанулярний
пероксид

3-амінофталат

Крім того, спостерігали кореляцію між швидкістю окиснення люмінолу та інтенсивністю хемілюмінесценції в досліджуваній системі (див. рис. 2).

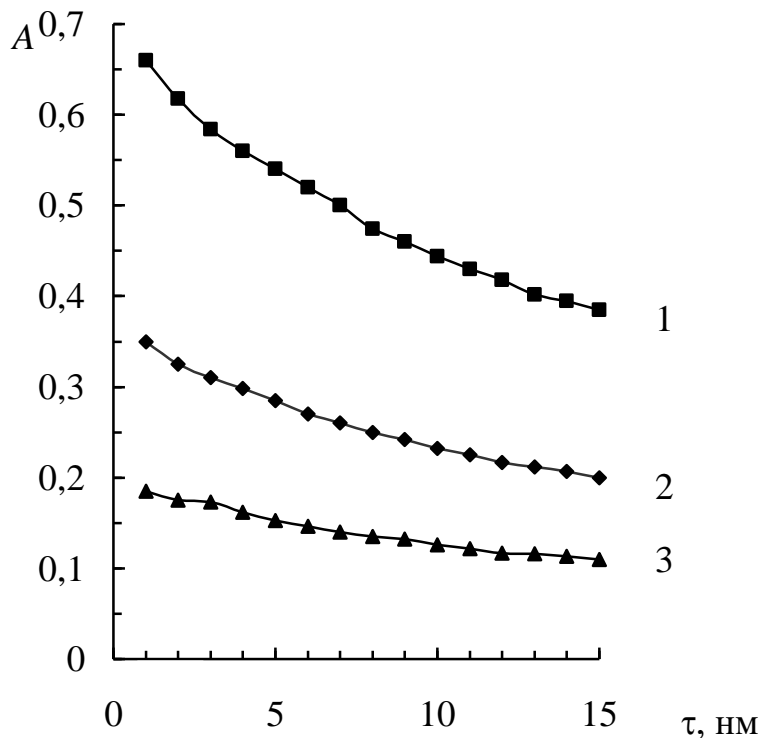


Рис. 2. Кінетичні криві окиснення люмінолу в системі $H_2L - H_2O_2 - B$. $c(B)$, М: 1 – $2,27 \cdot 10^{-5}$; 2 – $4,54 \cdot 10^{-5}$; 3 – $9,08 \cdot 10^{-5}$. $c(H_2O_2) = 0,075$ М, $c(H_2L) = 1 \cdot 10^{-4}$ М, рН = 12,8

На рис. 3 наведені типові кінетичні криві хемілюмінесценції в системі $H_2L - H_2O_2$ та $H_2L - H_2O_2 - B$. Як видно з рис. 3 при наявності B у системі $H_2L - H_2O_2$ спостерігається підвищення максимальної $I_{\text{хл}}$ – активування хемілюмінесцентної реакції. Цей ефект зростає при збільшенні концентрації активатора процесу.

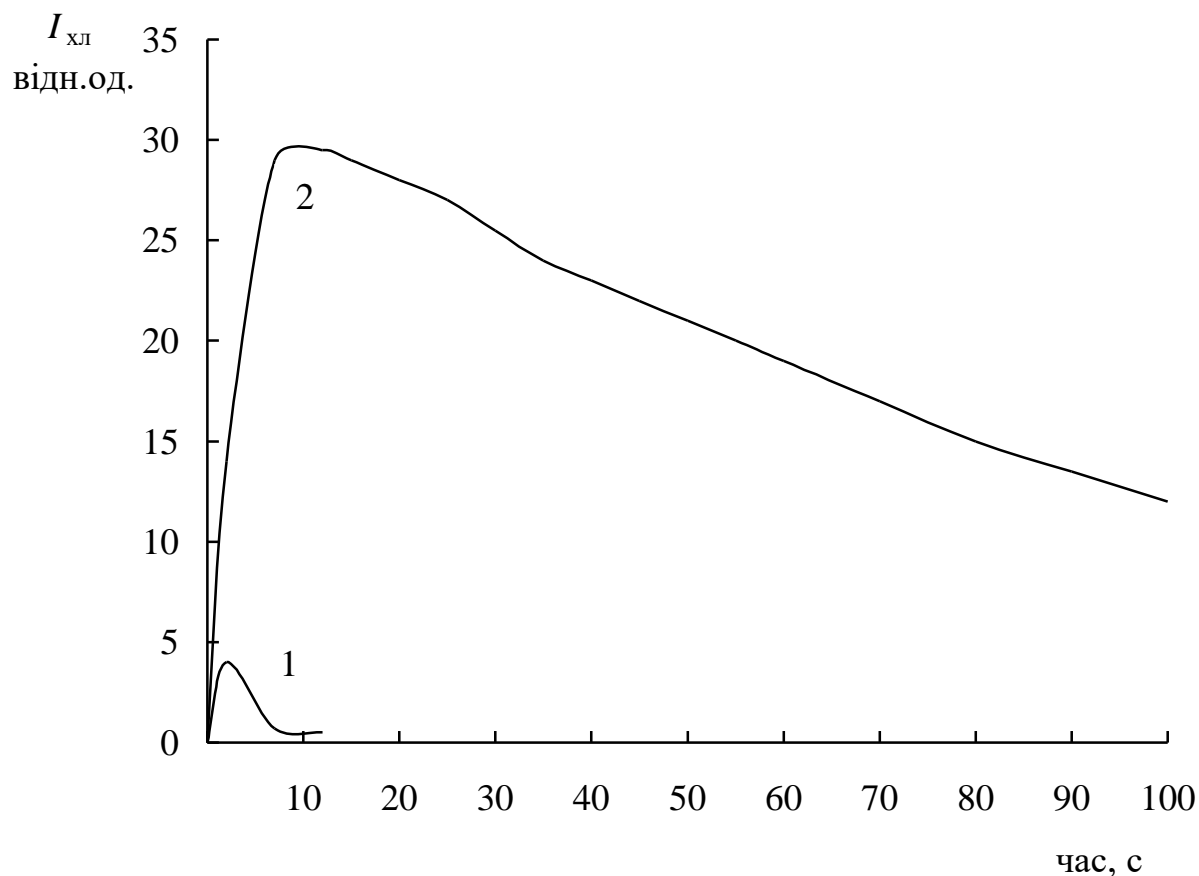


Рис. 3. Кінетичні криві хемілюмінесценції в системах: $H_2L - H_2O_2$ (1), $H_2L - H_2O_2 - B$ (2). $c(NaOH) = 0,07$ М, $c(H_2O_2) = 0,075$ М, $c(H_2L) = 1 \cdot 10^{-4}$ М, $c(B) = 4,5 \cdot 10^{-6}$ М

Нами був досліджений вплив порядку змішування розчинів H_2L , натрію гідроксиду, H_2O_2 і вікасолу та їх концентрацій на інтенсивність виникаючої хемілюмінесценції. В результаті проведених досліджень було встановлено, що оптимальним є порядок змішування, коли останнім додається розчин вікасолу. На рис. 4 наведена залежність $I_{xл}$ від концентрації вікасолу в системі $H_2L - H_2O_2 - B$.

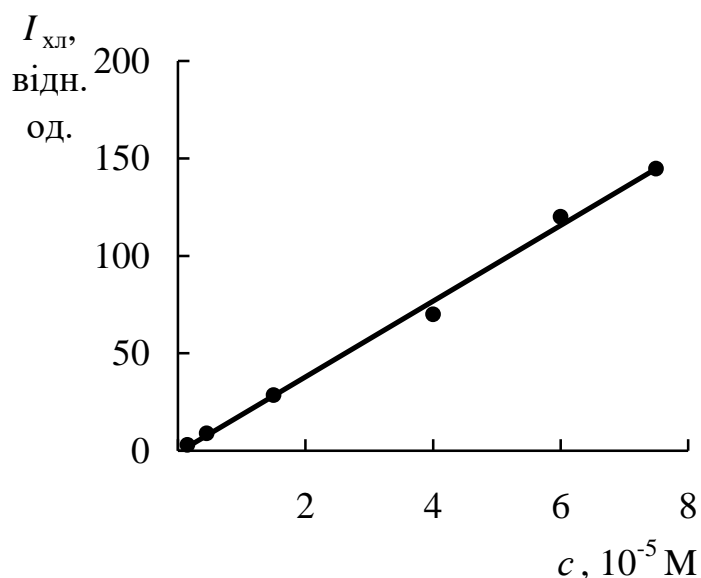


Рис. 4. Залежність інтенсивності хемілюмінесценції $I_{\text{хл}}$ в системі $H_2L - H_2O_2 - B$ від концентрації вікасолу. $c (NaOH) = 0,07 \text{ M}$, $c (H_2O_2) = 0,075 \text{ M}$, $c (H_2L) = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

У спеціально проведених дослідях встановлено, що інші компоненти лікарських форм – натрію бісульфіт та інші допоміжні речовини у регламентованих кількостях не впливали на ефект активуючої дії B у хемілюмінесцентній реакції окиснення люмінолу гідроген пероксидом. Достатня вибірковість хемілюмінесцентної реакції та прямо пропорційна залежність максимальної інтенсивності хемілюмінесценції від концентрації вікасолу (рис. 4) покладена нами в основу опрацювання нового методу кількісного визначення B у готових лікарських формах. Результати визначень наведено в таблиці 1.

Приготування розчину робочого стандартного зразка вікасолу 150 мкг/мл. Розчиняли 0,0150 г вікасолу в мірній колбі на 100 мл. Об'єм розчину доводили до позначки двічі дистильованою водою при 293 К. Розчин придатний до застосування протягом доби.

Методика кількісного визначення вікасолу в таблетках „Вікасол - Дарниця” по 0,015 г. Біля 100 мг розтертих таблеток (точна наважка) розчиняли в колбі на 100 мл у двічі дистильованій воді та доводили об'єм до позначки при 293 К. У кварцову кювету послідовно приливали 1 мл 10^{-3} M

розчину H_2L , 7 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду, 1 мл двічі дистильованої води та 0,5 мл 5%-вого розчину H_2O_2 . Одержану суміш перемішували і встановлювали кювету у світлозахисну камеру фотометра. Відкривали шторку і вливали за допомогою піпеткового дозувача 0,5 мл розчину **B** з концентрацією 0,15 мг/мл. Аналогічного порядку додавання розчинів дотримувались при виконанні досліду з розчином робочого стандартного зразка. В усіх випадках реєстрували максимальне значення інтенсивності світіння – I_{xl} . Вміст **B** в препараті знаходили методом порівняння I_{xl} з розчином робочого стандартного зразка.

Вміст вікасолу в г на таблетку (X) розраховували за формулою:

$$X = \frac{C_{cm} \cdot I_{xl} \cdot \bar{m} \cdot 100}{I_{cm} \cdot m_n},$$

де C_{cm} – концентрація розчину робочого стандартного зразка **B**, г/мл;

I_{cm} – максимальна інтенсивність XL в досліді з розчином робочого стандартного зразка **B**, відн. од.;

I_{xl} – максимальна інтенсивність XL в досліді з розчином досліджуваного зразка **B**, відн. од.;

\bar{m} – середня маса таблетки ($n = 20$), г;

m_n – маса наважки розтертих таблеток однієї серії, г;

Методика кількісного визначення вікасолу в розчині вікасолу 1% - 1 мл. 1 мл 1% розчину вікасолу вносили у мірну колбу на 100 мл і доводили об'єм до позначки двічі дистильованою водою при 293 К. Паралельно готували об'ємно-ваговим методом розчин робочого стандартного зразка вікасолу з концентрацією 0,1 мг/мл на двічі дистильованій воді. Далі виконували аналіз, як при визначенні вмісту вікасолу в таблетках по 0,015 г. Результати виражали кількістю грамів вікасолу в 1 мл препарата.

У таблиці 1 наведені результати аналізу лікарських форм вікасолу.

**Результати кількісного визначення вікасолу в лікарських формах
(n = 5, P = 0,95)**

Лікарська форма складу	Знайдено вікасолу, г	Метрологічні характеристики
Таблетки „Вікасол-Дарниця” по 0,015 г вікасолу 0,0151 г*	0,0149	$\bar{X} = 0,0155 (103,3\%)$
	0,0154	$S = \pm 4,7 \cdot 10^{-4}$
	0,0156	$S_{\bar{x}} = \pm 2,1 \cdot 10^{-4}$
	0,0154	$\Delta \bar{X} = \pm 5,8 \cdot 10^{-4}$
	0,0162	$S_r = \pm 3,0 \%$ $\delta = + 2,65 \%$
Розчин вікасолу 1% – 1 мл для ін’єкцій вікасолу 0,0098 г*	0,0105	$\bar{X} = 0,0099 (99,0\%)$
	0,0101	$S = \pm 4,1 \cdot 10^{-4}$
	0,0095	$S_{\bar{x}} = \pm 1,8 \cdot 10^{-4}$
	0,0096	$\Delta \bar{X} = \pm 5,05 \cdot 10^{-4}$
	0,0098	$S_r = \pm 4,1 \%$ $\delta = + 1,0 \%$

Примітка. * Вміст встановлено за методикою [6]

Отже, розроблено вибіркві методики кількісного визначення вікасолу в таблетках та розчинах для ін’єкцій методом хемілюмінесценції. Відносне стандартне відхилення не перевищує $\pm 4,1 \%$, $\delta = + 1,0 \dots + 2,65 \%$. Нижня межа визначуваних концентрацій $B C_n$ становить $3 \cdot 10^{-7} M$ ($C_{min.} = 1,5 \cdot 10^{-7} M$).

Висновки:

1. Вивчено активуючий вплив вікасолу на хемілюмінесценцію люмінолу в системі $H_2L - H_2O_2 - B$ та запропоновано схему виникнення хемілюмінесценції в системі $H_2L - H_2O_2 - B$. Встановлено кореляцію між швидкістю окиснення люмінолу та інтенсивністю виникаючої хемілюмінесценції.

2. Запропоновано умови та опрацьовано вибіркові методики кількісного визначення вікасолу в лікарських формах методом хемілюмінесценції за реакцією з люмінолом.

Література:

1. Ксенжек О.С., Петрова С.А. Электрохимические свойства обратимых биологических редокс-систем. – М.: Наука, 1986. – 152 с.
2. Одяков В.Ф., Жижина Е.Г., Матвеев К.И. // Хим.-фарм. журн. – 1996. – Т. 30, № 1. – С. 50 – 53.
3. Сахаров А.А., Зубкова Л.Н. // Хим.-фарм. журн. – 1985. – Т. 19, № 2. – С. 245 – 249.
4. Abdollani Hamid, Bagheri Leila // Anal. chim. acta. – 2004. – V. 514, № 2. – P. 211 – 218.
5. Berzas Nevado J.J., Murillo Pulgarin J.A., G3mez Laguna M.A. // Talanta. – 2000. – V. 53, № 5. – P. 951 – 959.
6. European Pharmacopoeia. – 4 th ed. – Strasbourg: Council of Europe, 2001. – 2416 p.
7. Hassan Saad S.M. // J.Assoc.Offic.Anal.Chem. – 1981. – V. 64, № 3. – P. 611 – 645.
8. Huang Yuming, Zhang Zhujun, Zhang Daojian // Anal. Lett. – 2000. – V. 33, № 13. – P. 2677 – 2688.
9. Jaiswal Priya V., Ijeri Vijaykumar S., Srivastava Ashwini K. // Bull. Chem. Soc. Jap. – 2001. – V. 74, № 11. – P. 2053 – 2057.
10. Liu Zhiming, Li Jie, You Tianyan, Yang Xiurong, Wang Erkang // Electroanalysis. – 1999. – V. 11, № 1. – P. 53 – 58.
11. Perez-Ruiz Tomas, Martinez-Lozano Carmen, Tomas Virginia, Martin Jesus // Anal. chim. acta. – 2004. – V. 514, № 2. – P. 259 – 264.
12. Peter-Ruiz Tomas, Martinez-Lozano Carmen, Tomas Virginia, Martin Jesus // Analyst. – 1999. – V. 124, № 2. – P. 197 – 201.
13. Saad A. Ismaiel, Dawoud A. Yassa // Pharmazie. – 1975 – V. 30, № 5. – P. 407 – 408.

14.Song Junfeng, He Ping, Guo Wei // Anal. Lett. – 2001. – V. 34, № 10. – P. 1677 – 1688.

УДК 615.453:542.943

Количественное определение викасола в лекарственных формах методом хемилюминесценции

Н.Е. Блажеевский, Н.Ю. Бондаренко

Разработаны методики хемилюминесцентного определения викасола в таблетках и инъекционных растворах, основанные на активировании реакции хемилюминесцентного окисления люминола пероксидом водорода. Относительное стандартное отклонение не превышает $\pm 2,65$ %. Нижняя граница определяемых концентраций составляет $3 \cdot 10^{-7}$ М. Натрия бисульфит и другие вспомогательные вещества в регламентированных количествах не влияли на эффект активирующего действия викасола в хемилюминесцентной реакции окисления люминола пероксидом водорода.

УДК 615.453:542.943

Кількісне визначення вікасолу в лікарських формах методом хемілюмінесценції

М.Є. Блажеєвський, Н.Ю. Бондаренко

Розроблені методики хемілюмінесцентного визначення вікасолу в таблетках та ін'єкційних розчинах, засновані на активуванні реакції хемілюмінесцентного окиснення люмінолу гідроген пероксидом. Відносне стандартне відхилення не перевищує $\pm 2,65$ %. Нижня межа визначуваних концентрацій складає $3 \cdot 10^{-7}$ М. Натрію бісульфіт та інші допоміжні речовини у регламентованих кількостях не впливали на ефект активуючої дії вікасолу у хемілюмінесцентній реакції окиснення люмінолу гідроген пероксидом.

UDC 615.453:542.943

Summary

Quantitative determination of vitamin K₃ in drugs by chemoluminescent method

M.Y. Blazheevskiy, N.U. Bondarenko

The method of vitamin K₃ chemiluminescent determination in different forms based on reaction of activation of chemiluminescent oxidation of luminol by hydrogen peroxide. The typical relative standard deviation is $\pm 2,65$ %. A lower limit of determining concentration is $3 \cdot 10^{-7}$ M. It was determined, that sodium bisulfate and other ingredients, included in composition of combined forms contained vitamin K₃ doesn't impede of its determination.