

КІНЕТИКО-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ СПАЗМОЛІТИНУ**Ключові слова:** спазмолітин, пергідроліз, спектрофотометрія, кількісне визначення

Спазмолітин (син. Adiphenine, Trasentin), 2-діетиламіноетилового естеру 1,1-дифенілацетатної кислоти гідрохлорид (СП) – синтетичний холінолітик із групи антихолінергетичних засобів. Він також виявляє місцеву анестезуючу та міотропну спазмолітичну дію [4]. Характерною особливістю його є здатність до гідролізу [6]. Для лікування дискінезії жовчовивідних шляхів рекомендована до вживання екстемпоральна форма: Rp: Spasmolytini 0.1, in pulv. D. t. D. N. 10. S. [7].

Стандартним методом кількісного визначення вмісту основної речовини у субстанції лікарської речовини «Спазмолітин» є аргентометрія за Фольгардом [6]. У науковій літературі описано методики кількісного визначення СП методом йонометрії [10] та іон-парної високоефективної рідинної хроматографії [11]. У сучасній практиці хіміко-токсикологічного аналізу рекомендовані до застосування тонкошарова, газова та обернено-фазова рідинна хроматографія [12].

Метою роботи є опрацювання нової методики кількісного визначення СП кінетико-спектрофотометричним методом за індикаторною реакцією окиснення 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ) гідроген пероксидом у слаболужному середовищі.

Матеріали та методи дослідження

Використовували реагенти кваліфікації ч.д.а., двічі очищену воду. ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидину дигідрохлориду гідрат) 97%, (ALDRICH, Німеччина), етанол 96% (Дубов'язівський спиртовий завод, Україна), 30% розчин гідроген пероксиду, виготовлений з «Перекису водню» 50%, медичний (ТОВ «Інтер-Синтез», Борислав, Україна). Для створення та підтримання необхідного рН використовували 0,2 М фосфатний буферний розчин з рН 8,5, виготовлений за Гріном [5].

Для досліджень використовували субстанцію СП фармакопейної чистоти, за даними методу аргентометрії вміст основної речовини $w=99,0\%$ ($W_{H_2O}=0,5\%$).

Приготування робочого розчину ТМБ молярної концентрації (с) $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Наважку 0,313 г ТМБ розчиняли у мірній колбі на 100 мл у 50 мл етанолу 96%, довели до позначки двічі очищеною водою при 20 °С та ретельно збовтували.

Приготування розчину робочого стандартного зразку (РСЗ) СП 0,7028 мг/мл (с= $2,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л). 0,3514 г СП розчиняли у 80 мл двічі очищеної води в мірній колбі на 100 мл, об'єм довели до позначки двічі очищеною водою при 20 °С та ретельно перемішували. За допомогою піпетки відбирали 20 мл одержаного розчину та переносили у мірну колбу на 100 мл, об'єм довели до позначки двічі очищеною водою при 20 °С та ретельно перемішували.

Електронний спектр світлопоглинання реєстрували у воді на модернізованому спектрофотометрі СФ-46 (ЛОМО, ССРСР) в автоматичному режимі з використанням програмного забезпечення «Спектр» (ВО «Техномир», Україна). Оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 у кюветі з збираючим шаром завтовшки $l=30$ мм. рН розчинів вимірювали за допомогою скляного електроду

типу ЭСЛ 43-07 (електрод порівняння – насичений калій хлоридом аргентумхлоридний електрод типу ЭВЛ-1М3.1) на лабораторному іонімірі И-130 (НПО „Аналитприбор”, Україна).

Отримані результати обробляли за рекомендаціями Міжнародного союзу теоретичної і прикладної хімії (ІЮПАК) [3] та ДФУ [2] з використанням методів математичної статистики пакету статистичних програм Microsoft Excel. Нижню межу визначуваної концентрації (c_n) розраховували, як рекомендовано у праці [9]. Перевірку правильності здійснювали за результатами аналізу модельних розчинів методом «уведено-знайдено». Вміст СП у модельних розчинах знаходили методом стандарту.

Результати дослідження та обговорення

В основу методики кінетичного визначення СП покладено систему двох спряжених реакцій: пергідролізу СП (реакція з надлишком H_2O_2 у слаболужному середовищі з утворенням дифенілнадацетатної кислоти (надалі надкарбонова кислота) та окиснення нею ТМБ до забарвленого продукту ($\lambda_{max} = 420$ нм), за зростанням світлопоглинання якого і здійснюють визначення СП.

На рис. 1 наведено характерний спектр поглинання продукту окиснення ТМБ утвореною надкарбоновою кислотою. Як видно, його максимальне поглинання спостерігається при $\lambda_{max} = 420$ нм і належить 3,3',5,5'-тетраметилдифенохінондіміну [1].

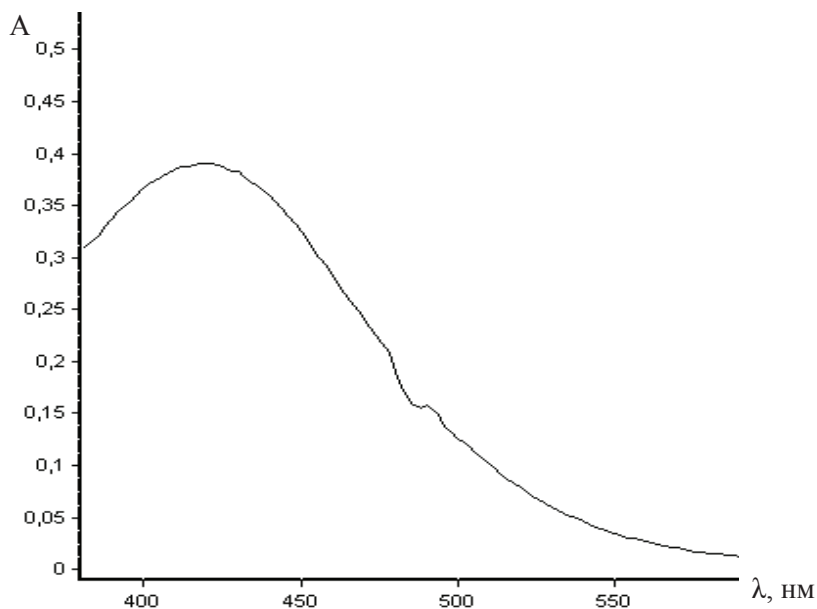


Рис. 1. Спектр поглинання 3,3',5,5'-тетраметилдифенохінондіміну, утвореного в реакції окиснення 3,3',5,5'-тетраметилбензидину надкарбоновою кислотою в системі ТМБ- H_2O_2 -СП.

c (ТМБ) = $8 \cdot 10^{-4}$ моль/л; c (H_2O_2) = 0,224 моль/л; c (СП) = $3,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л; 25,0% (об/об) метанолу; рН = 8,0

На рис. 2 зображено кінетичні криві нагромадження 3,3',5,5'-тетраметилдифенохінондіміну у системі ТМБ- H_2O_2 -СП при рН 8,5 за різних концентрацій СП. Їх початкові ділянки мають лінійний характер і характеризують початкову швидкість реакції (тангенс кута нахилу залежності А від τ).

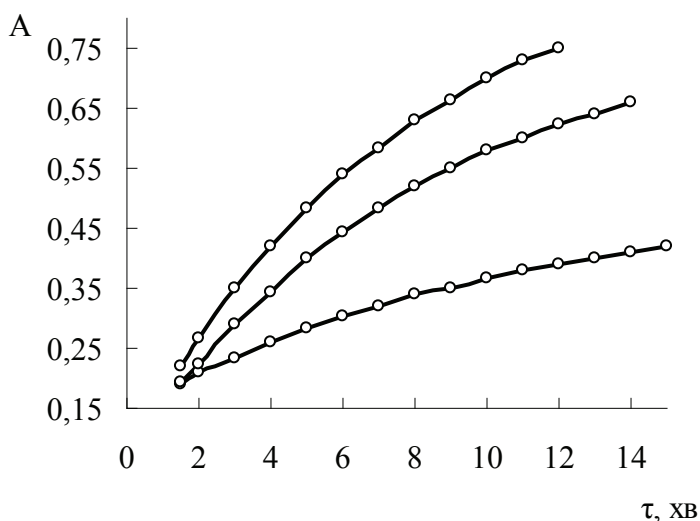


Рис. 2. Кінетичні криві нагромадження 3,3',5,5'-тетраметилдифенохінон-дііміну у системі ТМБ-Н₂О₂-СП.

c (ТМБ) = $8 \cdot 10^{-4}$ моль/л; c (Н₂О₂) = 0,224 моль/л; c (СП), моль/л: 1 – $0,73 \cdot 10^{-4}$; 2 – $2,92 \cdot 10^{-4}$; 3 – $3,64 \cdot 10^{-4}$; 25,0% (об/об) метанолу; рН = 8,5

Встановлено, що максимальна швидкість реакції досягається при рН 8,2–8,5 (рис. 3).

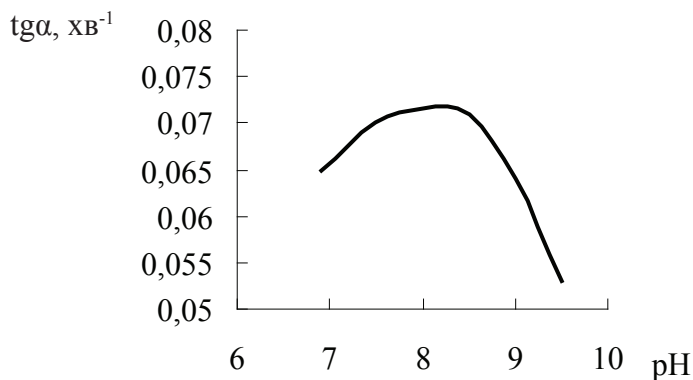
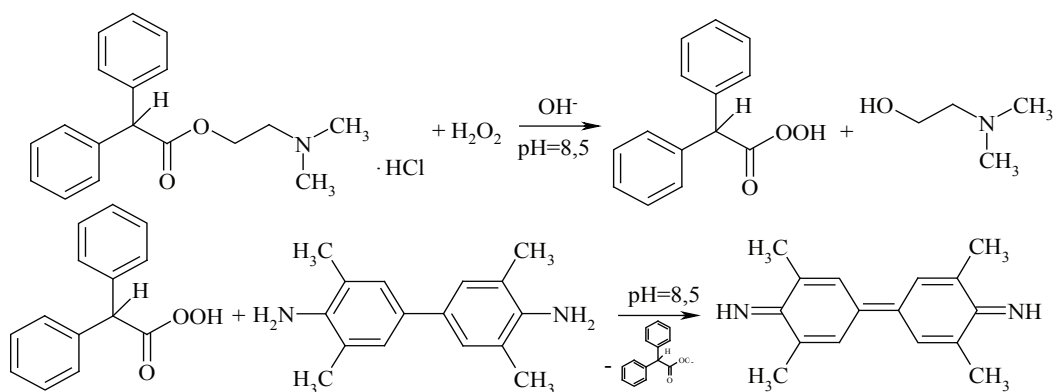


Рис. 3. Залежність швидкості утворення 3,3',5,5'-тетраметилдифенохінон-дііміну в системі ТМБ-Н₂О₂-СП від рН.

c (ТМБ) = $8 \cdot 10^{-4}$ моль/л; c (Н₂О₂) = 0,224 моль/л; c (СП) = $3,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л; 25,0% (об/об) метанолу

Хімізм спряжених реакцій пергідролізу СП та надкислотного окиснення ТМБ у системі ТМБ-Н₂О₂-СП наведено на рис. 4.



**Рис. 4. 3,3',5,5'-тетраметилдифенохінондімін ($\lambda_{\max}=420\text{nm}$)
Схема реакцій пергідролізу спазмолітину та надкислотного окиснення ТМБ**

Експериментально встановлено, що реакція пергідролізу є лімітуючою стадією окиснення 3,3',5,5'-тетраметилбензидину в системі ТМБ- H_2O_2 -СП. Вказані кінетичні особливості перебігу реакцій та достатньо висока селективність індикаторної реакції окиснення утвореною надкарбоною кислотою ТМБ за присутності відносно великого надлишку гідроген пероксиду покладено в основу розробленої нами нової методики кількісного визначення СП у субстанції кінетико-спектрофотометричним методом тангенсів.

Методика кількісного визначення вмісту основної речовини у субстанції СП. Близько 0,3 г (точна наважка) РСЗ субстанції СП розчиняють в мірній колбі на 100 мл, доводять до позначки двічі очищеною водою при 20 °С та ретельно перемішують. За допомогою піпетки відбирають 20 мл одержаного розчину та переносять у мірну колбу на 100 мл, об'єм доводять до позначки двічі очищеною водою при 20 °С та перемішують. У мірну колбу на 25 мл послідовно вносять розчини: 10,0 мл 0,2 моль/л фосфатного буферного розчину $\text{pH} = 8,5$, 5,0 мл метанолу, 2,0 мл досліджуваного розчину СП, 6,0 мл $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л розчину ТМБ, 0,5 мл 5,6 моль/л H_2O_2 , вмикають секундомір, доводять двічі очищеною водою до позначки, ретельно перемішують упродовж 30 с і переносять у кювету спектрофотометра. Починаючи з 2-ї хв, щохвилино вимірюють оптичну густину одержаної суміші впродовж 15 хв при 420 нм. Як компенсаційний використовують розчин сліпого досліджу (без СП) та кювету з вбираючим шаром завтовшки 30 мм.

Аналогічно виконують дослід з розчином РСЗ спазмолітину, починаючи зі слів: «У мірну колбу на 25 мл послідовно вносять...». Далі – аналогічно, як у разі побудови градууювального графіка.

Вміст основної речовини w (масова частка) у перерахунку на суху речовину $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{NO}_2 \cdot \text{HCl}$, у %, обчислюють за формулою:

$$w = \frac{C_{cm} \cdot \text{tg} \alpha \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100\%}{\text{tg} \alpha_{cm} \cdot 1000 \cdot 20 \cdot m_{\text{H}} \cdot (100 - w_{\text{H}_2\text{O}})},$$

де C_{cm} – концентрація СП у розчині РСЗ, у мг/мл;

$\text{tg} \alpha$ – тангенс кута нахилу у досліді з випробуванням розчином СП, хв^{-1} ;

$\text{tg} \alpha_{cm}$ – тангенс кута нахилу у досліді з розчином РСЗ, хв^{-1} ;

20 – об'єм розчину, взятий для аналізу, мл;

100 – об'єм мірної колби, мл;

m_{H} – маса наважки субстанції, г;

$W_{\text{H}_2\text{O}}$ – вміст води, встановлений експериментально за втратою вологи фармакопейним методом, %.

Результати аналізу СП у модельних розчинах та в субстанції наведено в табл. 1 та табл. 2 відповідно.

Т а б л и ц я 1

Метрологічні характеристики результатів кінетичного визначення спазмолітину у модельних розчинах ($n=5, P=0,95$)

Взято модельний розчин спазмолітину, моль/л	Знайдено концентрацію спазмолітину, моль/л	Метрологічні характеристики
$2,00 \cdot 10^{-4}$	$4,08 \cdot 10^{-4}$	$\bar{x} = 1,95 \cdot 10^{-4}$ $s = 6,92 \cdot 10^{-6}$ $s_{\bar{x}} = 3,10 \cdot 10^{-6}$ $\Delta \bar{x} = 8,61 \cdot 10^{-6}$ $RSD = 3,54\%$ $\varepsilon = 4,40\%$ $\delta = -1,11\%$
	$3,97 \cdot 10^{-4}$	
	$3,82 \cdot 10^{-4}$	
	$4,12 \cdot 10^{-4}$	
	$3,87 \cdot 10^{-4}$	
$4,00 \cdot 10^{-4}$	$4,08 \cdot 10^{-4}$	$\bar{x} = 3,97 \cdot 10^{-4}$ $s = 1,32 \cdot 10^{-5}$ $s_{\bar{x}} = 5,92 \cdot 10^{-6}$ $\Delta \bar{x} = 1,65 \cdot 10^{-5}$ $RSD = 3,33\%$ $\varepsilon = 4,14\%$ $\delta = -0,68\%$
	$3,97 \cdot 10^{-4}$	
	$3,82 \cdot 10^{-4}$	
	$4,12 \cdot 10^{-4}$	
	$3,87 \cdot 10^{-4}$	
$8,00 \cdot 10^{-4}$	$8,16 \cdot 10^{-4}$	$\bar{x} = 8,03 \cdot 10^{-4}$ $s = 1,69 \cdot 10^{-5}$ $s_{\bar{x}} = 7,55 \cdot 10^{-6}$ $\Delta \bar{x} = 2,10 \cdot 10^{-5}$ $RSD = 2,39\%$ $\varepsilon = 2,61\%$ $\delta = 0,43\%$
	$7,94 \cdot 10^{-4}$	
	$7,83 \cdot 10^{-4}$	
	$8,24 \cdot 10^{-4}$	
	$7,98 \cdot 10^{-4}$	

Т а б л и ц я 2

Метрологічні характеристики результатів кінетичного визначення спазмолітину у субстанції ($n=5, P=0,95$)

Взято препарату, г	Знайдено спазмолітину		Метрологічні характеристики
	г	%	
0,35140 (99,0%)*	0,3584	101,99	$\bar{x} = 0,3489$ (99,30%) $s = 0,0113$ $s_{\bar{x}} = 0,0051$ $\Delta \bar{x} = 0,0141$ $RSD = 3,26\%$ $\varepsilon = 4,05\%$ $\delta = -0,25\%$
	0,3488	99,26	
	0,3356	95,50	
	0,3619	102,99	
	0,3400	96,76	

П р и м і т к а.* – Встановлено за даними аргентометрії [6].

Як видно з одержаних результатів аналізу, опрацьовану методику відрізняє можливість здійснення визначення значно менших кількостей СП, ніж методом аргентометрії [6], простота у виконанні та експресність. Вона не вимагає використання токсичних розчинників та складного апаратурного оснащення. При визначенні $4,00 \cdot 10^{-4}$ моль/л (0,14 мг/мл) СП $RSD \leq 3,33\%$ ($\delta = -0,68\%$). Нижня межа визначуваних концентрацій $c_n = 3,9 \cdot 10^{-5}$ моль/л (13 мкг/мл).

В и с н о в о к

Опрацьовано нову кінетико-спектрофотометричну методику та показано можливість здійснення кількісного визначення вмісту основної речовини у субстанції спазмолітину за допомогою індикаторної реакції окиснення ТМБ гідроген пероксидом у водно-спиртових розчинах. Методика характеризується задовільною відтворюваністю та правильністю ($RSD \leq 3,33\%$, $\delta \leq -0,68\%$). Нижня межа визначуваних концентрацій $c_n = 3,9 \cdot 10^{-5}$ моль/л (13 мкг/мл). Вміст основної речовини у випробуваній субстанції спазмолітину $99,30 \pm 4,05\%$. Розроблена методика може бути використана для здійснення аналізу екстемпоральних лікарських форм спазмолітину.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Беклемишев М. К.* Новые индикаторные системы в кинетических методах анализа. Сорбционно-кинетический метод. Автореф. дисс. ... докт. хим. наук: спец. 02.00.02 «Аналитическая химия». – М., 2011. – 43 с.
2. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-ше вид. – Харків: РІПЕГ, 2001. – 556 с.
3. *Дёрффель К.* Статистика в аналитической химии. – М.: Мир, 1994. – 267 с.
4. *Крыжановский С. А., Вититнова М. Б.* Полный современный справочник лекарственных препаратов. Практическое руководство: 2-е изд., перераб. и доп. – М.: РИПОЛ КЛАССИК, 2002. – 1216 с.
5. *Лазарев А. И., Харламов И. П., Яковлев П. Я. и др.* Справочник химика-аналитика. – М.: Металлургия, 1976. – 184 с.
6. *Машковский М. Д.* Лекарственные средства: В 2 т. Т. 1. – 14-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: Новая Волна, 2002. – 540 с.
7. *Тихонова О. І., Ярних Т. Г., Гриценко С. В. та ін.* Тверді лікарські форми: Екстемпоральна рецептура: Методичні рекомендації. – Хаоків: Вид-во НФаУ, Золоті сторінки, 2003. – 176 с.
8. *Туркевич М. М.* Фармацевтична хімія. – К.: Вища школа, 1973. – 494 с.
9. *Експериандова Л. П., Беликов К. Н., Химченко С. В та ін.* // ЖАХ. – 2010. – Т. 65, № 3. – С. 229–234.
10. *Cserháti T., Forgács E.* // J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. – 1998. – V. 717, № 1–2. – P. 157–178.
11. *Issa Y. M., Ibrahim Hosny, Shoukry A. F. et al.* // Microchemical J. – 1990. – V. 42, N 3. – P. 267–273.
12. *Laurent Y. Galichet.* Clark's analysis of Drugs and Poisons: Third edition [Електронний ресурс]. – 80 Min / 700 MB. – Pharmaceutical Press, 2005. – 1 електрон. опт. диск (CD-ROM); 12 см. – Систем. вимоги: Pentium; 128 Mb RAM; CD-ROM; Windows XP/Vista. – Назва з титул. екрану.

Надійшла до редакції 22. 05. 2012.

КИНЕТИКО-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПАЗМОЛИТИНА

Ключевые слова: спазмолитин, пергидролиз, спектрофотометрия, количественное определение

Р Е З Ю М Е

Разработана методика и показана возможность количественного определения спазмолитина в субстанции кинетико-спектрофотометрическим методом по индикаторной реакции окисления 3,3',5,5'-тетрамethylбензидина перекисью водорода при pH 8,5. Градуировочный график линейный в пределах от 0,01–0,14 мг/мл, $c_n = 3,9 \cdot 10^{-5}$ моль/л (13 мкг/мл) спазмолитина. При определении $4 \cdot 10^{-4}$ моль·л⁻¹ СП RSD ≤ 3,33% ($\delta = -0,68\%$). Содержание основного вещества в исследуемой субстанции спазмолитина $99,30 \pm 4,05\%$. Преимуществами разработанной методики, которые выгодно отличают ее от известных, являются более высокая чувствительность, простота выполнения и экспрессность.

M. Ye. Blazheyevskiy, L. S. Kryskiy

SPASMOLITINE KINETIC SPECTROPHOTOMETRIC ASSAY

Key words: spasmolitrine, perhydrolysis, spectrophotometric method, quantitative assay

SUMMURY

A kinetic spectrophotometric method has been developed for the determination of Spasmolitrine using the indicator reaction of catalytic 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine oxidation by hydrogen peroxide at pH 8,5 in pure substance. Calibration graph for Sp has linear dependence in the range 0,01 – 0,15 mg/ml, a limit of quantitation (LOQ) is $3,9 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³ Spasmolitrine. At Spasmolitrine concentration 0,40 mmol·l⁻¹ determinations the reproducibility has a relative S. D. ≤ 3,33% ($\delta = -0,68\%$). The proposed method is more sensitive, simple and expresses in comparance with the well-known one. Sp substance contains $99,30 \pm 4,05\%$ of C₂₀H₂₅NO₂·HCl.