

# ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

А.С. Федерякина, Р.А. Родионова

## ПРИМЕНЕНИЕ ПРОИЗВОДНОЙ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА «ПАРАСКОФЕН»

Витебский государственный  
медицинский университет

*Определены параметры количественного определения действующих веществ лекарственного средства «Параскофен» методом производной спектрофотометрии. Исследованы производные спектры первого порядка с использованием графического метода. Для построения градуировочных графиков использовали разведения определяемого компонента при постоянном минимальном содержании двух оставшихся веществ (эти вещества использовали в качестве «разделителей»). Проведено сравнение методики с применением производной спектрофотометрии с фармакопейной (дифференциальная спектрофотометрия). Проведена статистическая обработка полученных данных.*

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для контроля качества ряда лекарственных средств широко используются физико-химические методы. Перспективным является метод производной спектрофотометрии, отличающийся доступностью, простотой методики анализа, экспрессностью, высокой чувствительностью, достаточной воспроизводимостью, нетоксичностью. В случае применения производной спектрофотометрии повышается объективность анализа лекарственных веществ в многокомпонентных лекарственных средствах [1]. Ме-

тодики количественного определения по производным УФ-спектров с расчетом комбинированных полиномов позволяют исключить операции по выделению компонентов из смесей и определять в них миллиграммовые дозы лекарственных веществ [2].

На сегодняшний день в отечественной литературе недостаточно информации относительно применения производной спектрофотометрии как метода анализа, характеристики способов дифференцирования спектров. Поэтому представляется необходимым подробное рассмотрение сущности производной спектрофотометрии, а также практическое изучение производных спектров различных порядков.

Метод производной спектрофотометрии незаменим при одновременном анализе нескольких лекарственных веществ. В подавляющем большинстве случаев спектры поглощения смесей веществ состоят из ряда перекрывающихся полос. Установление характеристик этих полос и их числа представляет собой трудную задачу. При исследовании спектров поглощения смесей лишь в редких случаях могут быть выделены участки спектра, поглощение света в которых обусловлено лишь одним из компонентов. В основе производной спектрофотометрии лежит изменение формы спектральной кривой при её дифференцировании по длине волны [3, 4].

Экстремумы первой производной соответствуют точкам перегиба исходной полосы поглощения, а нулевая точка - её максимуму.

Центральный пик второй производной подобен контуру исходной полосы, но значительно сужен. В нечетных производных  $\lambda_{\max}$  исходного спектра проходит через ноль, а сами производные содержат два пика, соответствующих точкам перегиба.

С ростом порядка уменьшается ширина основного экстремума прогрессивно. Одновременно уменьшается и отношение интенсивностей пика и сателлитов. Тем не

менее, благодаря совпадению положений пиков четные производные сохраняют определенное сходство со спектром [5].

Производные спектры дают значительное усиление отдельных полос и повышение селективности спектрофотометрического анализа. При этом лекарственные вещества в смеси можно определять без предварительного разделения, а в некоторых случаях этот метод способствует снижению предела обнаружения. Следовательно, избирательность анализа становится намного выше.

Благодаря методу производной спектрофотометрии можно разрешать полосы поглощения, отвечающие смеси веществ, на полосы поглощения отдельных компонентов, исследовать их тонкую структуру, таким образом обеспечивается правильность и воспроизводимость анализа [2].

Примером многокомпонентного лекарственного средства является лекарственное средство «Параскофен» состава:

- Парацетамол – 200 мг
- Ацетилсалициловая кислота – 200 мг
- Кофеин – 40 мг
- Вспомогательные вещества-до получения таблетки массой 500 мг

На современном этапе количественный анализ данной лекарственной формы, согласно действующей нормативной документации, проводят методом дифференциальной спектрофотометрии. В нашей работе [6] была описана методика идентификации действующих веществ лекарственного средства «Параскофен». Целесообразным является разработка методики количественного анализа единым с идентификацией методом.

Основной целью данной работы является исследование производной спектрофотометрии как перспективного метода контроля качества лекарственных средств, в частности, для количественного определения действующих веществ лекарственного средства «Параскофен».

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования данной работы являются основные аспекты диффе-

ренцирования спектров с применением в качественном и количественном анализе.

Количественное определение проводили графическим методом с построением градуировочных графиков для каждого компонента. Поскольку лекарственное средство состоит из трёх веществ, то для построения градуировочных графиков использовали разведения определяемого компонента при постоянном минимальном содержании двух оставшихся веществ (т.е. эти вещества использовали в качестве «разделителей»). Параллельно сравнивали этот метод с фармакопейным (дифференциальная спектрофотометрия) [7].

Для построения градуировочных графиков изначально приготовили растворы субстанций парацетамола, ацетилсалициловой кислоты и кофеина.

Точные навески (0,250 г) ацетилсалициловой кислоты, парацетамола и кофеина (раздельно) помещали в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 40 мл 96% спирта, встряхивали в течение 15 минут, затем добавляли 100 мл 0,01 М раствора кислоты хлористоводородной, встряхивали до полного растворения, доводили объём раствора в колбе до метки 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной и перемешивали (исходный раствор).

Градуировочные графики строили по четырём точкам, проводя по три параллельных измерения первой производной.

Расчёт и статистическую оценку параметров линейной зависимости проводили согласно Государственной Фармакопеи Республики Беларусь.

Расчёт остаточной дисперсии  $s_0^2$  проводили по формуле (1):

$$s_0^2 = \frac{\sum_{i=1}^m (y_i - Y_i)^2}{v} = \frac{\sum_{i=1}^m y_i^2 - a \sum_{i=1}^m y_i - b \sum_{i=1}^m x_i y_i}{v} \quad (1),$$

где  $y_i$ -экспериментальные значения  
 $Y_i$ -вычисленные значения  $y$ .

Дисперсии констант а и b находили по формулам (2, 3):

$$s_b^2 = \frac{ms_0^2}{m \sum_1^m x_i^2 - (\sum_1^m x_i)^2} \quad (2)$$

$$s_a^2 = \frac{s_b^2}{m} \sum_1^m x_i^2 \quad (3)$$

Величины, необходимые для оценки доверительного интервала констант а и b, рассчитывали по уравнениям (4, 5):

$$\Delta_b = t(P_2, \nu) \times \sqrt{s_b^2} \quad (4)$$

$$\Delta_a = t(P_2, \nu) \times \sqrt{s_a^2} \quad (5)$$

Проверку правильности методики проводили по критерию Стьюдента t (6):

$$t = \frac{|\mu - \bar{x}| \times \sqrt{m}}{s} \quad (6)$$

Для сравнения воспроизводимости разработанной методики и фармакопейной использовали критерий Фишера.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью оценить влияние компонентов смеси на спектры индивидуальных веществ провели сравнение спектров изолированных веществ и их производных в четырёх разведениях (0,2; 0,5; 1; 1,5 мл исходного раствора на 100 мл) со спектрами этих веществ в присутствии «разделителей» (рис. 1 - 6).

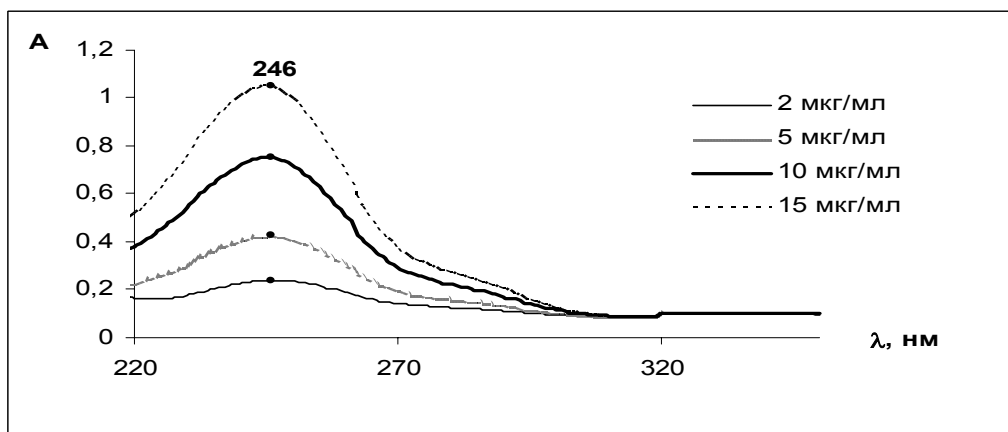


Рис. 1. Спектры поглощения растворов парацетамола в четырёх разведениях

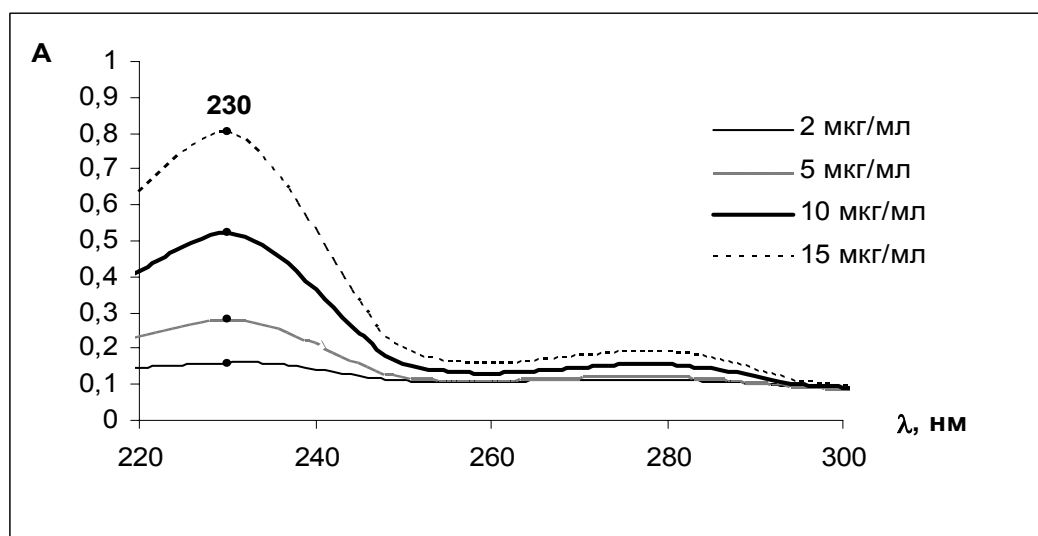


Рис. 2. Спектры поглощения растворов ацетилсалициловой кислоты в четырёх разведениях

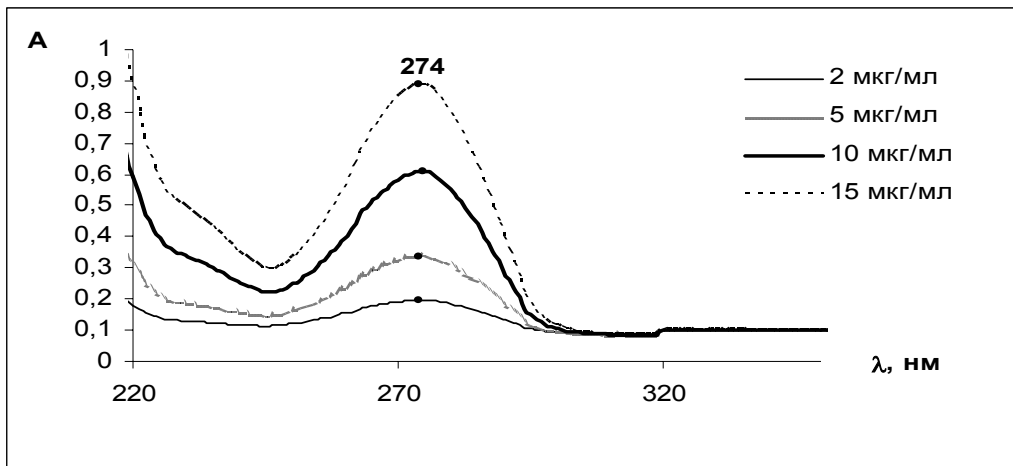


Рис. 3. Спектры поглощения растворов кофеина в четырёх разведениях

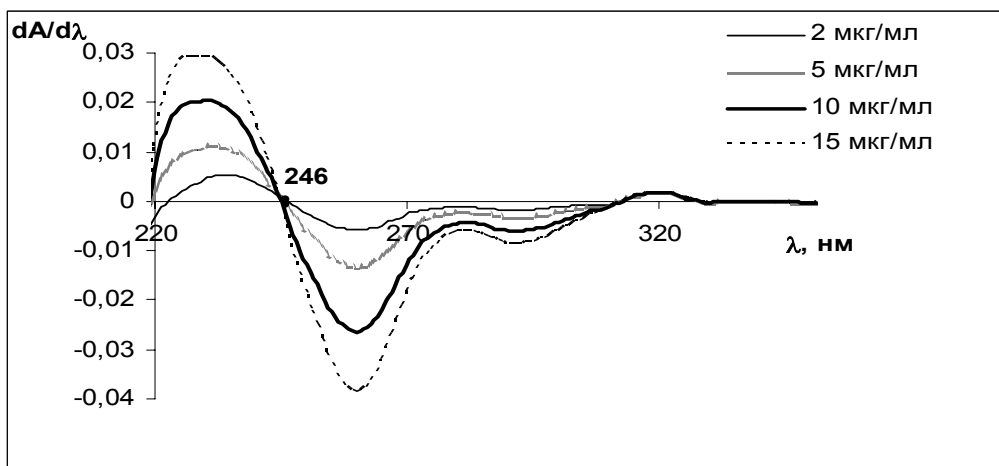


Рис. 4. Первые производные спектров поглощения растворов парацетамола в четырёх разведениях

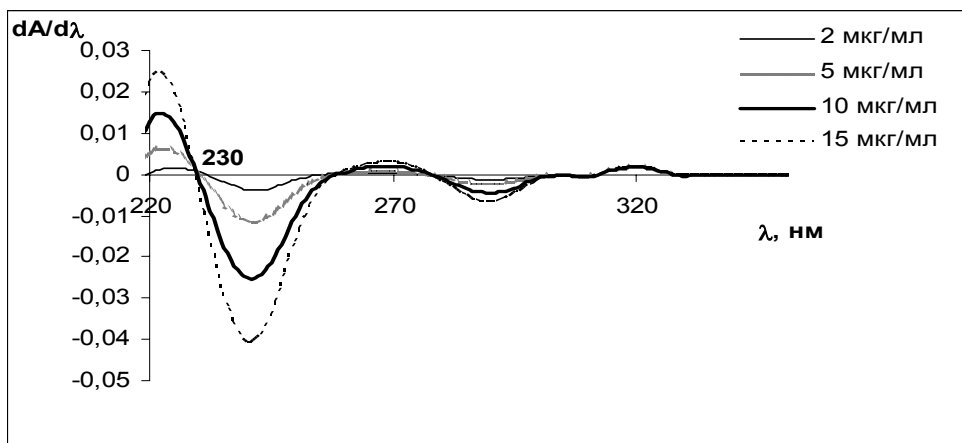


Рис. 5. Первые производные спектров поглощения растворов ацетилсалициловой кислоты в четырёх разведениях

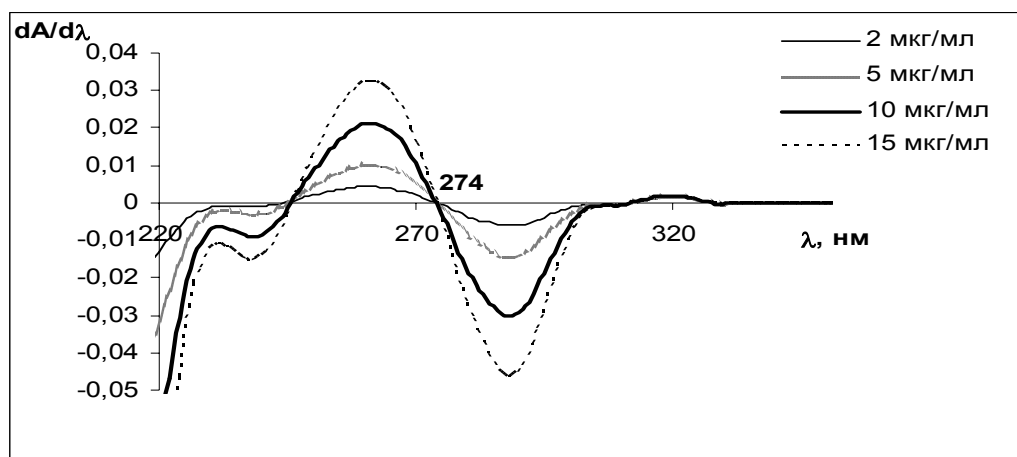


Рис. 6. Первые производные спектров поглощения растворов кофеина в четырёх разведениях

Затем для разных растворов прибавляли различное количество исходного раствора в колбу на 100 мл и довели до метки 0,01 М HCl, чтобы адсорбции опре-

деляемых веществ были в пределах 0,2 - 0,8 (в этом диапазоне оптических плотностей относительная ошибка минимальна) (таблица 1).

Таблица 1 – Количество добавляемого исходного раствора в мл

Определяемый компонент	Парацетамол	Ацетилсалициловая кислота	Кофеин
Парацетамол	0,2	0,2	0,2
	0,5	0,2	0,2
	1	0,2	0,2
	1,5	0,2	0,2
Ацетилсалициловая кислота	0,2	0,2	0,2
	0,2	0,5	0,2
	0,2	1	0,2
	0,2	1,5	0,2
Кофеин	0,2	0,2	0,2
	0,2	0,2	0,5
	0,2	0,2	1
	0,2	0,2	1,5

Спектры поглощения определяемых веществ при этом имели следующий вид (рисунки 7 – 9).

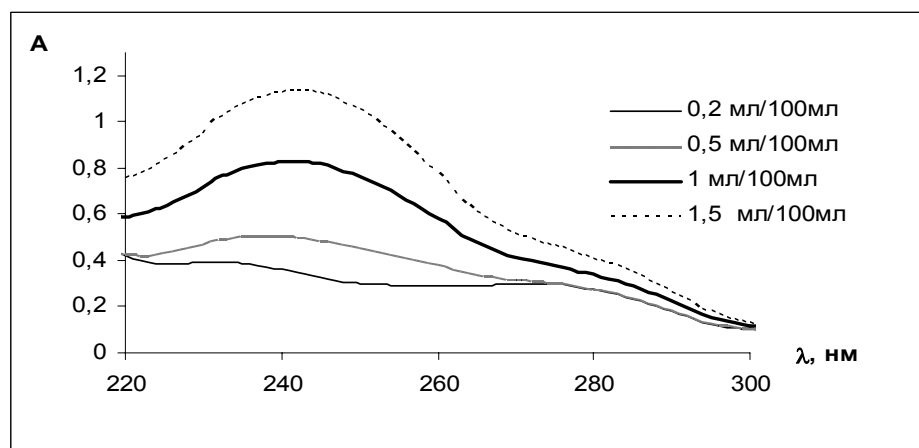


Рис. 7. Спектры поглощения растворов парацетамола в присутствии «разделителей»

Как видно, чёткого максимума на исходном спектре у парацетамола в при-

сутствии других компонентов смеси не обнаруживается (рис.7).

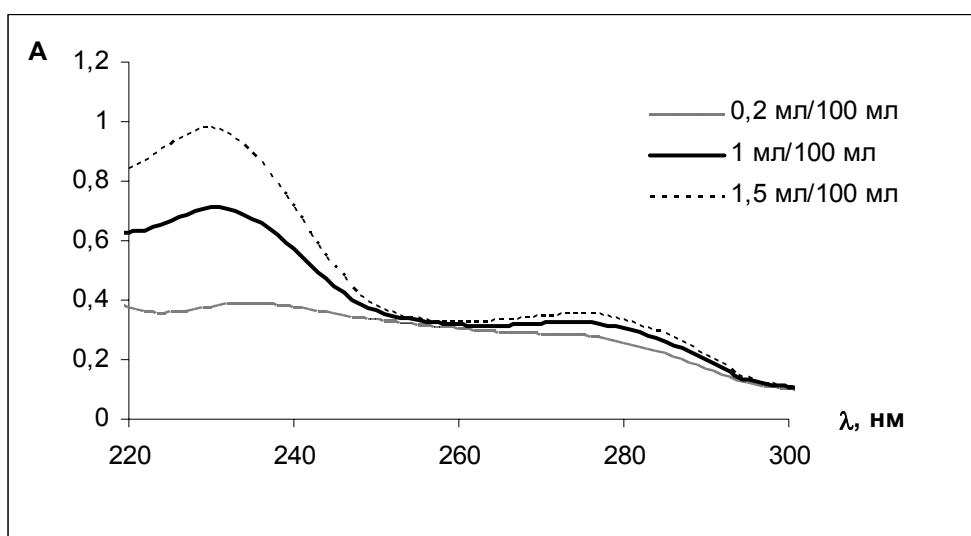


Рис. 8. Спектры поглощения растворов ацетилсалициловой кислоты в присутствии «разделителей»

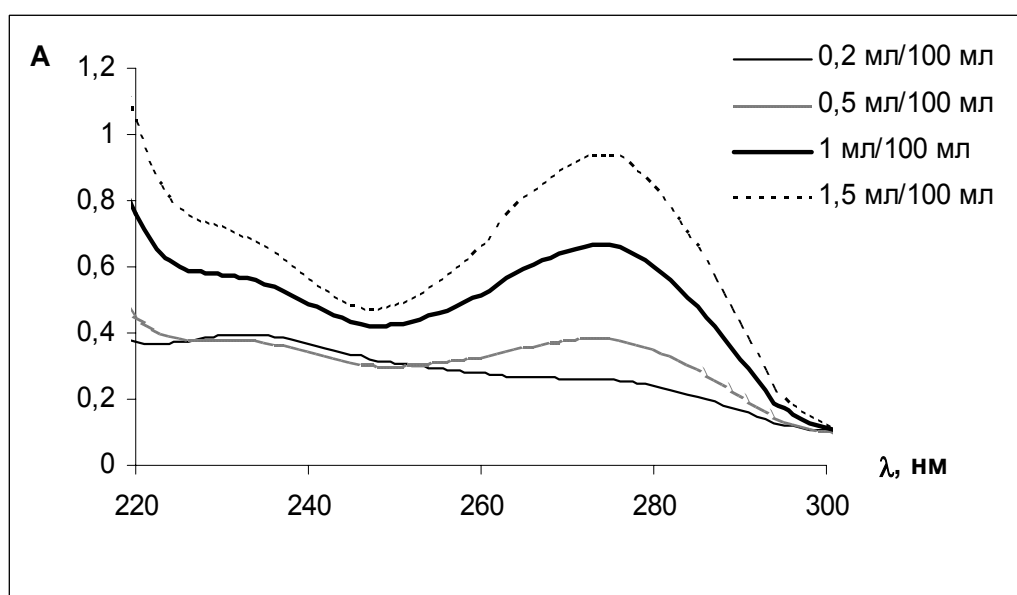


Рис. 9. Спектры поглощения растворов кофеина в присутствии «разделителей»

На спектре поглощения ацетилсалициловой кислоты и кофеина в присутствии «разделителей» чёткие пики также не обнаруживаются, т.е., сопутствующие компоненты способствуют некоторой «размытости» исходного спектра, что затрудняет количественное определение отдельных веществ в смеси.

Этой проблемы можно избежать при использовании первых производных

спектров смесей этого состава (рис.10 – 12). При этом фиксировалось значение максимума или минимума на графике самой производной, что в присутствии «разделителей» позволяло построить градуировочные графики (рис.13 – 15) с большим коэффициентом  $b$  (что в свою очередь повышало чувствительность такого метода определения).

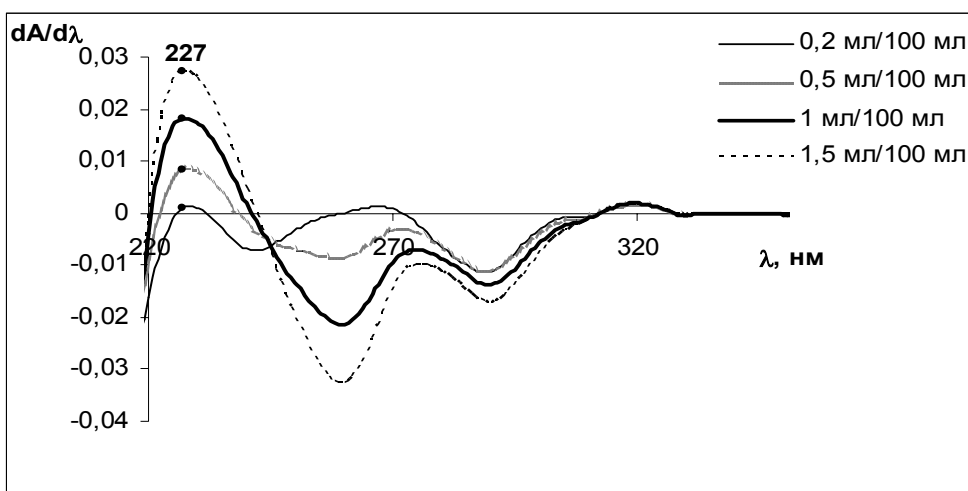


Рис. 10. Первые производные спектров поглощения растворов парацетамола в присутствии «разделителей» (максимум при 227 нм)

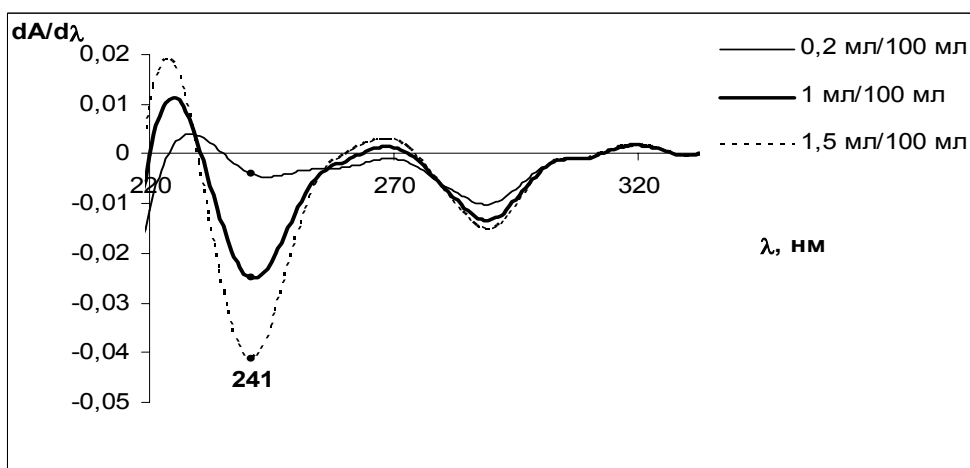


Рис. 11. Первые производные спектров поглощения растворов ацетилсалициловой кислоты в присутствии «разделителей» (максимум при 241 нм)

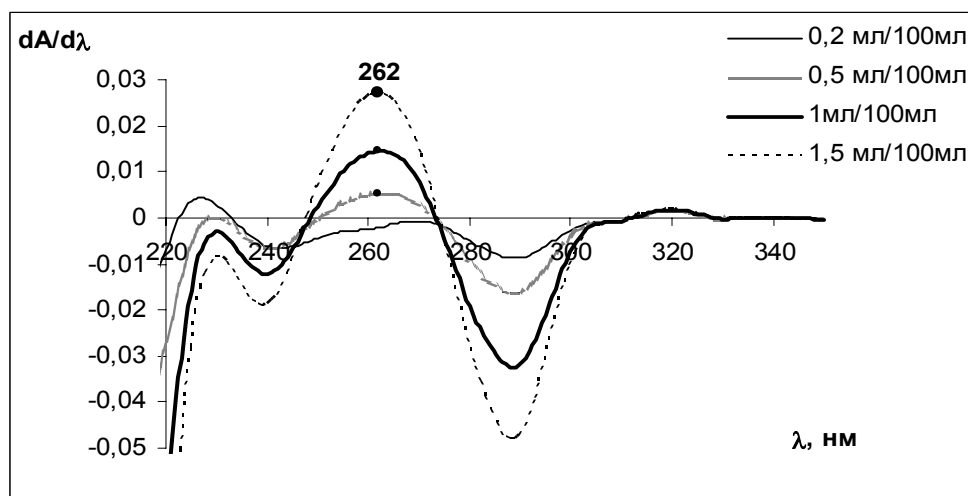


Рис. 12. Первые производные спектров поглощения растворов кофеина в присутствии «разделителей» (максимум при 262 нм)

На основании изложенных данных строили градуировочные графики (рисунки 13 – 15) для определения каждого компонента, добавляя компоненты лекарственного средства в следующих соотношениях (таблица 2).

При этом для кофеина разбавление даёт значение абсорбции (A), меньше диапазона 0,2-0,8, т.к. необходимо учитывать его соотношение с остальными компонентами лекарственного средства в лекарственной форме.

Таблица 2 – Количество добавляемого исходного раствора (см. выше) в мл для построения градуировочного графика определяемого вещества

Определяемый компонент	Парацетамол	Ацетилсалициловая кислота	Кофеин
Парацетамол	0,2	0,2	0,2
	0,5	0,2	0,2
	1	0,2	0,2
	1,5	0,2	0,2
Ацетилсалициловая кислота	0,2	0,2	0,2
	0,2	0,5	0,2
	0,2	1	0,2
	0,2	1,5	0,2
Кофеин	0,05	0,05	0,05
	0,05	0,05	0,1
	0,05	0,05	0,15
	0,05	0,05	0,2
	0,05	0,05	0,5
	0,05	0,05	1
	0,05	0,05	1,5

Установлено, что наименьшие отклонения экспериментальных значений  $y_i$  от вычисленных  $Y_i$  наблюдаются в окрестностях центра графика, т.е. точки с координатами  $\langle x \rangle$  и  $\langle y \rangle$ , поэтому разведения исходных растворов подбирались таким

образом, чтобы центр графика находился в окрестностях значения  $C$  для соответствующего разведения таблеток (4 мкг/мл для парацетамола и ацетилсалициловой кислоты, 0,8 мкг/мл для кофеина (таблицы 3 – 5).

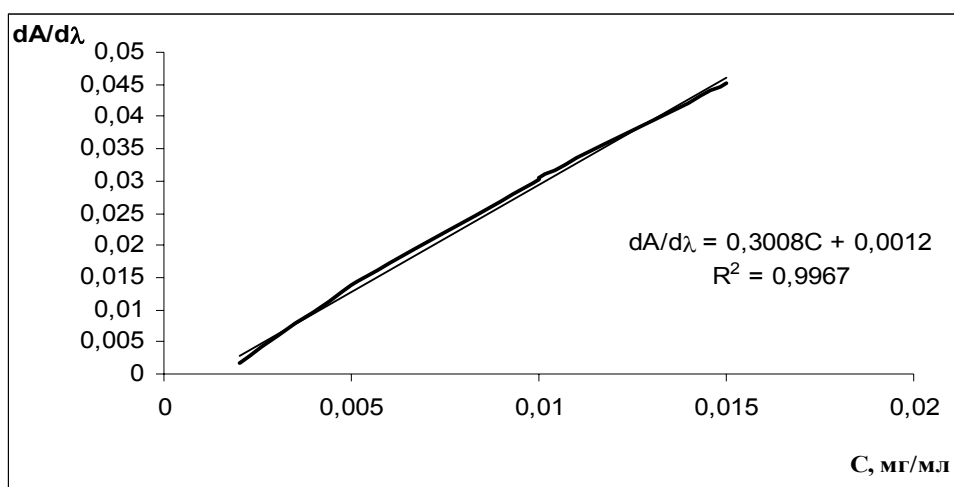


Рис. 13. Градуировочный график для количественного определения парацетамола по графику первой производной при 227 нм



Таблица 3 – Результаты статистической обработки экспериментальных данных линейной зависимости для парацетамола

v	<x>	<y>	b	a	t(P2;v)	Δb	Δa	s0 <sup>2</sup>	r
10	0,008	0,0227	0,3008	0,0012	2,2281	0,01487	0,00106	0,007059	0,9984

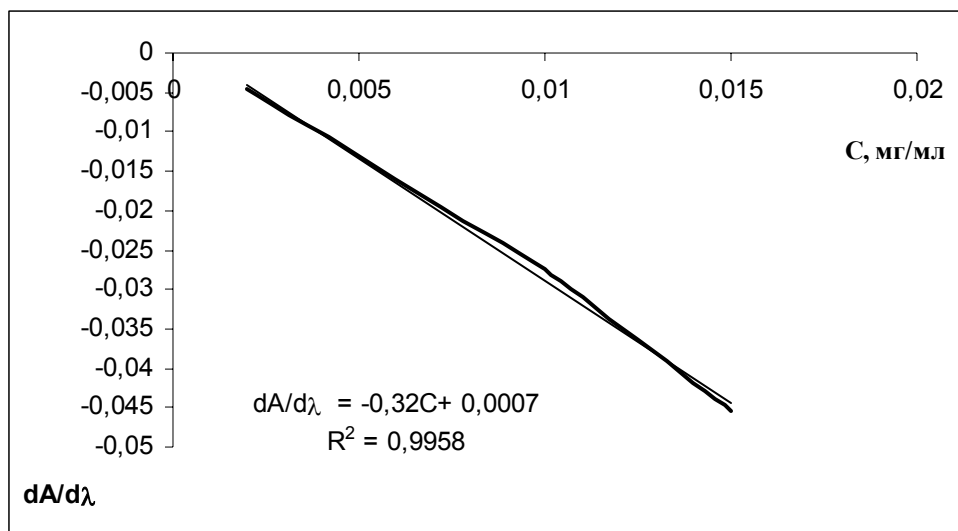


Рис. 14. Градуировочный график для количественного определения ацетилсалициловой кислоты по графику первой производной при 241 нм

Таблица 4 – Результаты статистической обработки экспериментальных данных линейной зависимости для ацетилсалициловой кислоты

v	<x>	<y>	b	a	t(P2;v)	Δb	Δa	s0 <sup>2</sup>	r
10	0,008	-0,0258	-0,32	0,0007	2,2281	0,01583	0,000297	0,00587	0,9979

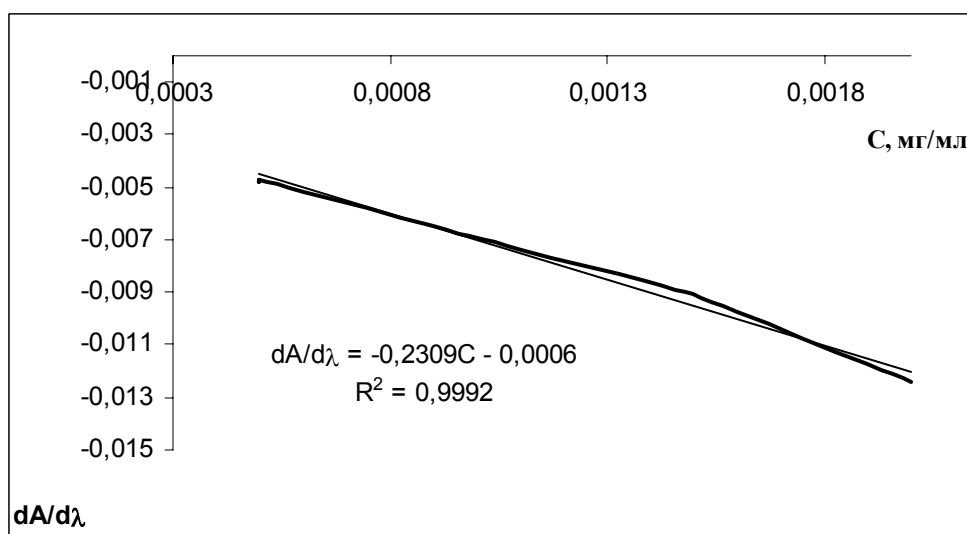


Рис. 15. Градуировочный график для количественного определения кофеина по графику первой производной при 289 нм

Таблица 5 – Результаты статистической обработки экспериментальных данных линейной зависимости для кофеина

v	<x>	<y>	b	a	t(P2;v)	Δb	Δa	s <sub>0</sub> <sup>2</sup>	r
10	0,00125	-0,0083	-0,2309	-0,0006	2,2281	0,1473	0,000476	0,00934	0,9996

Для того, чтобы уравнения градуировочных графиков адекватно описывали экспериментальные данные, необходимо, чтобы остаточная дисперсия  $s_0^2$  не отличалась значимо по критерию Фишера от дисперсии величин  $y_i$ .

Высокие значения коэффициентов корреляции и близость коэффициента а к нулю обуславливают пригодность этих графиков для количественного определения.

**Статистическая обработка результатов количественного определения (таблица 6).** Для статистической обработки результатов пятикратно определяли значения концентраций контрольной пробы, максимально приближенной по составу к раствору, полученному из таблеток для количественного определения по фармакопейной методике.

Таблица 6 – Метрологические характеристики методики анализа

Определяемое вещество	μ (концентрация пробы, мкг/мл)	v=n-1	<x>	<x>/μ	s	sr=s/<x>	P	t (P,v)	t	Δx= s×t (P,v)	Δx,r=Δ x/<x>	ε %
Парацетамол	4,00	4	4,01	1,0025	0,012247	0,003054	0,95	2,7764	1,82 574	0,034	0,008479	0,84 8
Ацетилсалициловая кислота	4,00	4	3,982	0,9955	0,008367	0,002101	0,95	2,7764	2,31 070 2	0,0232 29	0,005834	0,58 43
Кофеин	1,00	4	1,006	1,006	0,005477	0,005445	0,95	2,7764	2,44 949	0,0152 07	0,015116	1,51 16

Поскольку  $t < t(P,v)$ , можно сделать вывод об отсутствии систематической погрешности данной методики количественного определения.

Кроме того, провели сравнение данной методики с фармакопейной по воспроизводимости (таблицы 7 - 8).

Таблица 7 – Метрологические характеристики метода производной спектрофотометрии

Определяемое вещество	v=n-1	<x>, мг	s	s <sup>2</sup>
Парацетамол	4	201,71	0,012245	0,00014994
Ацетилсалициловая кислота	4	201,17	0,008126	6,60319E-05
Кофеин	4	40,604	0,005263	2,76992E-05

Таблица 8 – Метрологические характеристики фармакопейного метода

Определяемое вещество	v=n-1	<x>	s	s <sup>2</sup>
Парацетамол	4	201,14	0,002983	8,89829E-06
Ацетилсалициловая кислота	4	201,11	0,00198	3,91921E-06
Кофеин	4	40,445	0,001282	1,64352E-06

Сравнение проводили по значениям дисперсий для парацетамола. При этом F (P=99%, v<sub>1</sub>=4, v<sub>2</sub>=4)=16,69.

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{0,00014994}{0,0000088} = 17,034 > F_{\text{крит.}} \quad (7)$$

По результатам эксперимента установлено, что воспроизводимость фармакопейной методики лучше. Это утверждает целесообразность использования метода производной спектрофотометрии больше для качественного анализа.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В результате исследования выявлено, что дифференцирование спектра позволяет:

- добиться значительного усиления контрастности дифференцированных кривых по сравнению с обычными даже при небольших изменениях монотонности спектра, увеличить чувствительность определения для слабых, замаскированных полос поглощения в результате чего облегчается анализ;

- повысить контрастность максимумов поглощения, что особенно важно при анализе многокомпонентных систем;

- значительно повысить селективность определения веществ в смесях сложного состава;

- уменьшить поглощение фона и тем самым исключить систематические погрешности, обусловленные неучтённым фоном;

- снизить абсорбцию, вызванную рассеянием света.

2. Установлены параметры количественного определения действующих веществ, проведена их статистическая обработка и сравнение с фармакопейной методикой. При этом худшая воспроизводимость предложенной методики не исключает возможность её использования для контроля качества иных многокомпонентных лекарственных средств.

3. Разработанная методика позволяет одним и тем же методом установить подлинность и количественное содержание действующих веществ лекарственного средства «Параскофен». Методика отличается простотой, экспрессностью, меньшим расходом реактивов, что соответствует требованиям к оптимальным методам контроля качества лекарственных средств в современной фармацевтической науке.

## SUMMARY

A.S. Federyakina, R.A. Rodionova  
THE USING OF DERIVATIVE SPECTROPHOTOMETRY FOR QUANTITATIVE DEFINITION OF ACTIVE SUBSTANCES OF DRUG "PARASCOFEN"

The parameters of quantitative definition of active substances of drug "Parascofen" by derivative spectrophotometry have been defined. The 3-rd order derivative spectrums have been investigated by the using of graphic method. The dilutions of defined component by the constant contents of both other components (these substances have been used as "divisors") have been used for building of graduated spectrums. The comparison of the derivative spectrophotometry method with the pharmacopoeial method (differential spectrophotometry) has been carried out. The statistical treatment of received data has been carried out.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Идентификация препаратов в лекарственных формах методом производной спектрофотометрии / В.Г. Беликов [и др.] // Фармация. – 2000. – Т. 49, №1. – С. 23-25.
2. Дубровкин, И.М. Спектрометрия по методу регистрации производных / И.М. Дубровкин // Журнал прикладной спектроскопии. – Т. 34, №6. – 1983. – С. 885-899.
3. Кварацхели, Ю.К. О целесообразности выбора производных оптической плотности n-го порядка в спектрофотометрии / Ю.К. Кварацхели, Ю.В. Демин // Журнал аналитической химии. – Т. 38, №8. – 1983. – С. 1427-1433.
4. Об одном варианте метода первой производной в спектрофотометрии / Ю.К. Кварацхели [и др.] // Журнал аналитической химии. – 1981. – Т. 36, №10. – С. 2054-2058.
5. Спектроскопические методы в физиологии и биохимии. Способы дифференцирования спектральных кривых при реализации метода производной спектрофотометрии / В.С. Сааков [и др.]; – Ленинград: Наука, 1987. – 234 с.
6. Федерякина, А.С. Разработка методики идентификации и количественного определения лекарственного средства «Параскофен» методом производной спектрофотометрии / А.С. Федерякина, Р.А. Родионова // Вестник фармации – Т. 41, №3. – 2008. – С. 82-89.
7. Вергейчик, Е.Н. Определение фетанола в таблетках методом ортогональных функций / Е.Н. Вергейчик, В.В. Кочанов // Фармация. – Т. 32, №2. – 1983 – С. 60-61.

8. ФС РБ № 0348-07.
9. Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т. 1. Общие методы контроля качества лекарственных средств / Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении; под общ. ред. Г.В. Годовальникова. – Минск: Минский государственный ПТК полиграфии, 2006. – 656 с.
10. Использование производной спектрофотометрии для избирательного определения никеля, кобальта, меди и железа (III) 4-(2-пиридилазо) резорцином в бинарных смесях / Л.Л. Коломиец [и др.] // Журнал аналитической химии. – 1999. – Т. 54, №1. – С. 34-36.
11. Перфильев, В.А. Определение урана (IV) производной спектрофотометрией его комплексов с оксиэтилендифосфоновой кислотой / В.А. Перфильев, В.Т. Мищенко, Н.С. Полуэктов // Журнал аналитической химии. – Т. 39, №12. – 1984. – С. 2132-2133.
12. Dave, H.N. Simultaneous determination of salbutamol sulphate, bromhexine hydrochloride and etofylline in pharmaceutical formulations with the use of four rapid derivative spectrophotometric methods / H.N. Dave, R.C. Mashru, A.R. Thakkar // Analytica Chimica Acta. – V.597. – 2007. – P. 113–120
13. Dinc, E. Comparative study of the continuous wavelet transform, derivative and partial least squares method applied to the overlapping spectra for the simultaneous quantitative resolution of ascorbic acid and acetisalicylic acid in effervescent tablets / E.Dinc, A.Ozdemir, D.Baleanu // Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis – V.37. – 2005. – P. 569-575
14. Fawzi, A. Derivative-ratio spectrophotometric method for the determination of ternary mixture of aspirin, paracetamol and salicylic acid / A.Fawzi, El-Yazbi, H. Hassan Hammud // Spectrochimica Acta P. A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – V. 68, I. 2. – 2007. – P. 275-278.
15. Simultaneous determination of loratadine and pseudoephedrine sulfate in pharmaceutical formulation by RPLC and derivative spectrophotometry / M.M. Mabrouk // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2003. – V.33. – P. 597-604
16. Talsky G. Derivative Spectrophotometry. Low and higher order / G.Talsky. – VCH, 1991. – 238 p.

*Поступила 14.05.2009 г*

\*\*\*\*\*