



Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*

ANALIZA IN NADZOR ZDRAVIL

UČNO GRADIVO ZA VAJE

Stane Pajk, Martina Hrast Rambaher, Damijan Knez in Janez Ilaš

Ljubljana, 2023

ANALIZA IN NADZOR ZDRAVIL

Učno gradivo za vaje

Avtorji: Stane Pajk, Martina Hrast Rambaher, Damijan Knez, Janez Ilaš

Recenzenti – študentje:

Metka Kocjančič

Nastja Pavlišič

Zala Pestotnik

Anja Tršek

Ana Rahne

Recenzenti:

izr. prof. dr. Janez Mravljak, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

doc. dr. Rok Frlan, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

dr. Ema Valentina Brovč, Novartis d. o. o.

dr. Žiga Hodnik, Krka d. d.

Lektoriranje: Helena Kavaš

Grafično oblikovanje in prelom: Omisli.si, d. o. o.

Založnik: Založba Univerze v Ljubljani (University of Ljubljana Press)

Za založnika: prof. dr. Gregor Majdič, rektor

Izdajatelj: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Za izdajatelja: prof. dr. Rok Dreu, dekan

Ljubljana, 2023

Prva e-izdaja.

Publikacija je brezplačna.

Publikacija je v digitalni obliki prosto dostopna na: <https://ebooks.uni-lj.si/ZalozbaUL>

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v
Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

COBISS.SI-ID **178209539**

ISBN 978-961-297-232-5 (PDF)

Predgovor

V hitro napredujočem svetu farmacevtske znanosti se izpostavlja področje, ki leži v osrčju zagotavljanja varnih, učinkovitih in kakovostnih zdravil – farmacevtska analiza in nadzor zdravil.

Pri vajah iz Analize in nadzora zdravil se ne ukvarjamo le z enačbami in laboratorijskimi napravami; gre tudi za razvoj zavesti o natančnosti, odgovornosti in etičnem ravnanju. Gre za ključ k razumevanju farmacevtske analize zdravil, kjer sta skrbno opazovanje in natančno delo ključnega pomena. Kot študenti ne oblikujete le svoje nadaljnje kariere, temveč s svojim delom potencialno vplivate na zdravje in dobro počutje številnih uporabnikov farmacevtskih izdelkov, kar vam kot bodočim farmacevtom nalaga veliko odgovornost. Analiza in nadzor zdravil ni le še en predmet; gre za pomembno orodje pri zagotavljanju varnosti in kakovosti zdravil, ki spreminjajo življenja milijonov. To je znanost, ki pomaga preveriti kakovost in čistoto zdravil, razumeti, kako le-ta delujejo, in prepoznati morebitna tveganja (povezana z njihovo uporabo). Te vaje vas bodo seznanile z osnovami analitskih pristopov, ki so temelj pri razvoju, proizvodnji ter nadzoru kakovosti farmacevtskih izdelkov.

Laboratorijske vaje ponujajo študentom praktične izkušnje, ki so bistvene za njihovo nadaljnjo kariero, asistenti pa postanemo most med akademsko teorijo in uporabo v resničnem svetu.

S tem učbenikom želimo avtorji s študentom prijaznim, multimedijskim pristopom prispevati k zgoraj opisanim ciljem.

Avtorji

Kazalo

1. Osnovna pravila za delo v analiznem laboratoriju.....	2
1.1. Laboratorijski red in varnost pri delu	2
1.2. Pravilno tehtanje in odmerjanje volumnov ter prava uporaba količin	4
1.3. Določanje vsebnosti.....	7
1.4. Splošna navodila za izvedbo vaj.....	8
2. Prvi sklop krožnih vaj	10
2.1. Acidoalkalimetrija: Vsebnost acetilsalicilne kisline	10
2.2. Oksidoreduktometrija: Vsebnost askorbinske kisline v tabletah.....	14
2.3. Argentometrija: Določanje vsebnosti kloridnih ionov v Ringerjevi infuzijski raztopini 20	
3. Drugi sklop krožnih vaj	24
3.1. UV-Vis In IR spektroskopija: Identifikacija in vsebnost paracetamola v tabletah ter kvalifikacija UV-Vis spektrofotometra	24
3.2. Fluorimetrija: Preskus prisotnosti aluminija v natrijevem kloridu.....	30
3.3. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti: Vsebnost amoksicilina in klavulanske kisline v tabletah.....	34
4. Tretji sklop krožnih vaj	38
4.1. UV-Vis spektroskopija: Določanje vsebnosti železa(III) v sirupu.....	38
4.2. Titracije v brezvodnem mediju: Vsebnost lidokainjevega klorida v raztopini za injiciranje.....	42
4.3. Plinska kromatografija: Določanje vsebnosti D- α -tokoferola v mehkih želatinastih kapsulah.....	46
4.4. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti: Določitev vsebnosti izoniazida in nečistot v učinkovini.....	50
4.5. Kompleksometrija: Priprava in standardizacija 0,05 M dinatrijevega edetata, priprava in standardizacija 0,05 M cinkovega sulfata ter vsebnost aluminijevega hidroksida in magnezijevega hidroksida v tabletah.....	55
4.6. UV-Vis spektroskopija: Identifikacija furosemida v tabletah in določanje enakomernosti vsebnosti furosemida v tabletah.....	62
4.7. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti: Določitev vsebnosti sulfametoksazola in nečistot v učinkovini.....	68
4.8. Teoretična vaja: Določitev vsebnosti učinkovine v snovi za farmacevtsko uporabo... 72	

1. Osnovna pravila za delo v analiznem laboratoriju

1.1. Laboratorijski red in varnost pri delu

Čisto in urejeno delovno okolje je v analiznem laboratoriju izjemno pomembno tako za zagotavljanje osebne varnosti in varnosti drugih kot tudi za kakovost izvedenih analiz.

Osebna varovalna oprema

- Delovna obleka (hlače in laboratorijska halja ali delovna obleka z dolgimi rokavi): ves čas v laboratoriju nosite zapeto laboratorijsko haljo, da zaščitite svoja oblačila in kožo pred morebitnimi razlitji kemikalij in kontaminacijo. Vstopanje v prostore laboratorija ni dovoljeno v kratkih hlačah, majicah in s spredaj odprto obutvijo.
- Sredstva za zaščito oči in obraza: nosite zaščitna očala ali ščitnik za obraz, da zaščitite oči pred brizgi kemikalij ali letečimi drobci.
- Rokavice: pri ravnanju z nevarnimi kemikalijami in steklovino uporabljajte ustrezne zaščitne rokavice. Prepričajte se, da so odporne proti kemikalijam, da so ustrezne velikosti in da so pravilno nameščene (segajo čez rokav halje).

Osebna higiena

- Umivanje rok: pred delom v laboratoriju in po njem si temeljito umijte roke, zlasti preden jeste, pijete ali se dotikate obraza.
- Hrana in pijača: v laboratoriju ne uživajte hrane ali pijače.

Ravnanje s kemikalijami

- Kemikalij nikoli ne preizkušajte organoleptično (ugotavljanje vonja in okusa), razen če je to izrecno zahtevano v specifikaciji (npr. arome).
- V digestoriju izvajajte aktivnosti s kemikalijami, kot so prelivanje, mešanje, segrevanje in podobno.
- Označevanje: pred uporabo vedno preverite kemijske oznake glede vsebine, nevarnosti in datumov poteka uporabnosti. Nikoli ne uporabljajte kemikalij, ki so neustrezno označene.
- Skladiščenje kemikalij: kemikalije hranite na za to določenih območjih ob upoštevanju pravil toksičnosti, vnetljivosti, jedkosti, oksidativnosti, eksplozivnosti in združljivosti. Ločeno hranite nezdružljive snovi.
- Z vnetljivimi kemikalijami napolnite največ do 95 % prostornine zbirnega vsebnika.
- Kislin in baz ne shranjujte skupaj na isti polici zaradi nevarnosti ekostemnega učinka.
- Večjih steklenic nikoli ne prenašajte samo s prijemom za vrat, ampak jim vedno podpirajte tudi dno (možnost globokih ureznin).

Razlitje kemikalij in nujni primeri

- Razlitje: razlitje kemikalij takoj prijavite asistentu na vajah. Po asistentovih navodilih uporabite ustrezen postopek čiščenja.

- Požarna varnost: seznanite se z lokacijo in pravilno uporabo peska za gašenje ter gasilnih aparatov in zasilnih izhodov. V primeru požarnega alarma evakuirajte laboratorij.
- Za nujne primere se seznanite z lokacijo tušev (pri vratih), postaj za izpiranje oči (poleg umivalnika) in kompletov prve pomoči (v označeni stenski omari).
- V primeru politja kože s kemikalijo prizadeto mesto takoj izpirajte s tekočo vodo najmanj 15 minut. Po brizgu kemikalije v oči prizadeto oko takoj sperite s tekočo vodo ali fiziološko raztopino in nadaljujte z nevtralizacijskim sredstvom.

Odstranjevanje odpadkov

- Po končani uporabi vzorce, ostanke analiz, kemikalije in delovne pripomočke odstranite z delovne površine, jih pospravite na ustrezna mesta za shranjevanje le-teh, odpadke ustrezno ločite in jih oddajte na definirano zbirno mesto.
- Ločevanje: pravilno ločujte in označite nevarne in nenevarne odpadke. Pri odstranjevanju odpadkov upoštevajte navodila. Organska topila odstranjujte v plastične 10-litrne vsebnike, trdne odpadke v plastične 1-litrne vsebnike.
- Ostri predmeti: ostre predmete (igle) zavrzite v za to namenjene in označene vsebnike za igle (rumene škatle z rdečim pokrovom).

Nadzor kontaminacije

- Navzkrižna kontaminacija: bodite previdni, da preprečite navzkrižno kontaminacijo med vzorci, standardi in reagenti. Med uporabo očistite opremo in površine.
- Umazano steklovino dobro sperite.

Uporaba analiznih instrumentov

- Pred uporabo opreme preberite dana navodila in se posvetujete z asistentom.
- Vzdrževanje opreme: nemudoma prijavite vsako okvarjeno opremo. Ne poskušajte popravljati opreme brez ustreznega dovoljenja.

Poročanje

- Nesreče in incidenti: o vseh nesrečah, incidentih ali nevarnih razmerah na vajah nemudoma obvestite asistenta.
- Zdravstvene težave: obvestite svojega asistenta, če imate kakršne koli zdravstvene težave, ki so povezane z izpostavljenostjo kemikalijam oz. nezdržljive z delom v laboratoriju (nosečnost).

Usposabljanje in znanje

- V analizni laboratorij vstopajte le ustrezno pripravljene. Če za izvedbo vaje niste ustrezno pripravljene, ima asistent zaradi vaše varnosti pravico, da vam prepreči opravljanje vaje.

1.2. Pravilno tehtanje in odmerjanje volumnov ter prava uporaba količin

Količina, navedena v predpisu (natehta ali odmerjen volumen vzorca), ustreza količini, ki je bila uporabljena med razvojem analitskega postopka. Dejansko uporabljena količina sme odstopati od navedene količine za največ 10 odstotkov. Uporabljena količina vzorca se v vseh primerih natančno izmeri, rezultat analize pa se izračuna glede na odmerjeno količino.

Tudi reagente uporabljamo v predpisanih količinah in v odstopanju za največ deset odstotkov.

Število signifikantnih mest v farmakopeji navedenih številčnih vrednosti količin definirajo zahteve za navedene količine (masa ali prostornina), ki jih je treba izmeriti na ustrezen način.

Tehtanje

Tehtanje je pogosta operacija v analitskih postopkih in tehtnica je bistven del laboratorijske opreme. Tehtanje je lahko vir napak, ki jih je težko zaznati v končnem analitskem rezultatu, zato je natančno tehtanje izredno pomembno.

Pred izvedbo tehtanja izberemo primerno posodo glede na količino in vrsto tehtalnega materiala (tekočine, trdne snovi, praški).

Zahteve glede mase pri tehtnicah za analitske namene so navedene v splošnem poglavju Evropske farmakopeje 2.1.7 *Tehtnice za analitski namen* in veljajo za vsa besedila. Vrednost prikaza tehtnice se mora med tehtanjem ujemati z vrednostjo ciljne mase, ki je navedena v besedilu, ko je matematično zaokrožena na enako število signifikantnih mest.

Na primer, če je ciljna masna vrednost, navedena v besedilu, 50,0 mg, mora minimalna natehta tehtnice (m_{\min}) uporabljene tehtnice manjša od naše mase. Dejansko natehtana količina snovi lahko odstopa od predpisane za $\pm 10\%$. Tehtanje izvedemo znotraj ± 5 podenot glede na zadnjo številko navedene masne vrednosti. Torej, 50,0 mg je treba razlagati kot 49,95 mg do 50,04 mg ali 49,950 mg do 50,049 mg, odvisno od občutljivosti tehtnice.

Praktičen primer

Glede na vse navedeno (dovoljeno odstopanje ter natančnost tehtanja), bo v primeru, ko je farmakopejski predpis za tehtanje 50,0 mg:

- katerakoli natehta na tehtnici z odčitki na 0,01 mg v območju 44,95 mg do 55,04 mg ustreza,
- katerakoli natehta na tehtnici z odčitki na 0,001 mg v območju od 44,950 mg do 55,049 mg ustreza.

Za izračun rezultata analize moramo upoštevati dejansko natehto. Pri testih vsebnosti je pomembno, da za standard in vzorec uporabimo enako vrsto tehtnice.

Poznamo več vrst tehtnic

- Precizne tehtnice: najmanjši odčitek 1 mg (uporabno za tehtanje reagentov).
- Analitske tehtnice: najmanjši odčitek 0,1 mg (uporabno za tehtanje vzorcev ali standardov).
- Semi-mikro analitske tehtnice: najmanjši odčitek 0,01 mg.
- Mikro analitske tehtnice: najmanjši odčitek 0,001 mg (1 µg).
- Ultra-mikro analitske tehtnice: najmanjši odčitek 0,0001 mg (0,1 µg).

Najbolj pomemben podatek, ki v praksi določa, ali je neka tehtnica primerna za tehtanje določenih količin, je podatek o minimalni natehti.

Če ste v dilemi, ali tehtnica pravilno deluje, to lahko preverite z zunanjo utežjo, ki zagotavlja, da tehtnica deluje znotraj predpisanih meja. Pogostost preverjanja tehtnic določimo glede na podlago kritičnosti procesa.

Če imamo zahtevo po točnem tehtanju, moramo tehtanje izvesti na tehtnici, ki je kalibrirana v celotnem merilnem območju in mora ustrezati kriterijem za ponovljivost in točnost.

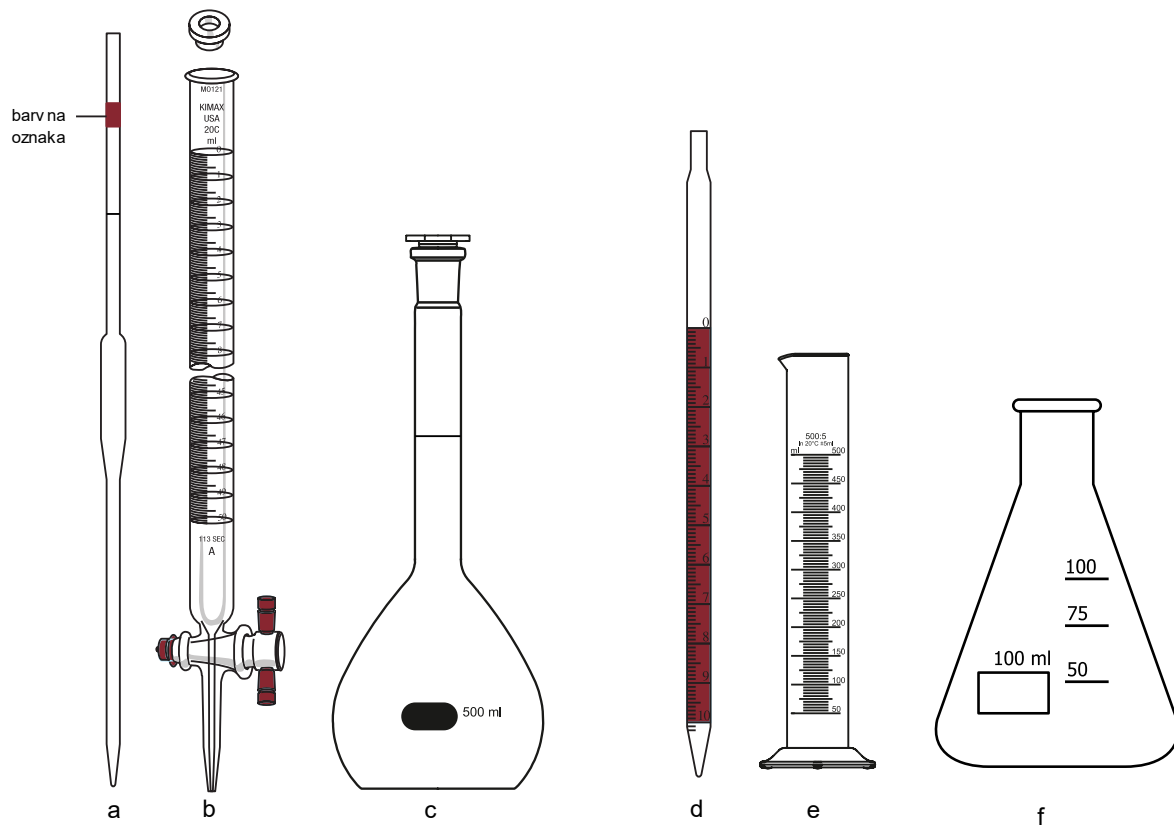
Odmerjanje volumnov

Če je v farmakopeji za določeno prostornino številka za decimalno vejico nič ali se konča z ničlo (na primer 10,0 mL ali 0,50 mL), navedeno prostornino izmerimo s polnilno pipeto, volumetrično bučko ali bireto, kot je primerno. V nasprotnem primeru lahko uporabimo merilni valj ali merilno pipeto (na primer za 10 mL). Prostornine, navedene v mikrolitrih, merimo z mikropipeto ali mikrobrizgo.

Steklovina

Volumetrična steklovina je ustrezna, če je v skladu z zahtevami razreda A ustreznega mednarodnega standarda, ki ga je izdala Mednarodna organizacija za standardizacijo (ISO).

Tipična steklovina, ki jo uporabljamo na vajah, je prikazana na Sliki 1.



Slika 1: Steklovina, ki jo uporabljamo v analitskem laboratoriju: a) polnilna pipeta, b) bireta, c) volumetrična bučka, d) merilna pipeta, e) merilni valj, f) erlenmajerica.

Prvi trije kosi steklovine (a, b, c) omogočajo točno odmerjanje volumnov, drugi trije kosi (d, e, f) ne omogočajo točnega odmerjanja volumnov.

1.3. Določanje vsebnosti

Pri določanju vsebnosti se »odstotek« uporablja v dveh kontekstih glede na okoliščine:

- »odstotek m/m« (odstotek, masa v masi oz. masno-masni odstotek) predstavlja število gramov snovi v 100 g končnega izdelka;
- »odstotek v/v« (odstotek, prostornina v prostornini oz. volumsko-volumski odstotek) predstavlja število mililitrov snovi v 100 mL končnega izdelka.

Izraza »ppm« (deli v milijonu delov) in »ppb« (deli v milijardi delov) se nanašata na maso v masi, razen če je navedeno drugače.

Koncentracijo volumetričnih raztopin (npr. standardne raztopine pri titrimetrični analizi) navajamo z nominalno koncentracijo (npr. 1 M) in korekcijskim faktorjem (npr. $f = 0,912$). Slednjega izračunamo tako, da delimo dejansko koncentracijo (c_d) z nominalno (c_n).

$$f = \frac{c_{dejanska}}{c_{nominalna}}$$

Meje in pravila signifikantnih mest

Signifikantna mesta se uporabljajo za približno oceno natančnosti ali negotovosti številčnega rezultata.

Pri preverjanju skladnosti z numerično omejitvijo rezultate izračunajo na navedeno število signifikantnih mest, razen če ni predpisano drugače. Meje, ne glede na to, ali so vrednosti izražene v odstotkih ali kot absolutne vrednosti, veljajo za pomembne do zadnje prikazane številke (na primer, 0,15 označuje 2 signifikantni mesti, 140 označuje 3 signifikantna mesta). Pri zaokroževanju je treba upoštevati samo številko neposredno desno od zadnjega mesta v omejitvi. Če je ta številka manjša od 5, se izloči in predhodna številka ostane nespremenjena. Če je ta številka enaka ali večja od 5, se izloči in predhodna številka pa se poveča za 1.

Če je pri izračunu vsebnosti navedena meja 98,0–102,0 %, se rezultat poda (zaokroži) na enak način (preglednica 1).

Pri izračunih, kot so seštevanje, odštevanje, deljenje, množenje, vedno najprej izvedemo izračun in šele nato zaokrožimo rezultat (rezultat zaokrožimo le enkrat, pri končnem podajanju rezultata). Rezultat naj nikoli ne vsebuje več signifikantnih mest, kot jih vsebuje najmanj natančen podatek, ki je bil uporabljen v izračunu.

Preglednica 1: Primeri za zaokroževanje in ugotavljanje ustreznosti

izračunan rezultat	zaokrožen rezultat	ustreznost
97,96 %	98,0 %	DA
97,94 %	97,9 %	NE
97,95 %	98,0 %	DA
102,05 %	102,1 %	NE
101,96 %	102,0 %	DA
101,95 %	102,0 %	DA

Preglednica 2: Pravila za določitev števila signifikantnih mest

pravilo	primer	št. signifikantnih mest
Signifikantna mesta so vse 0 in števke za in pred decimalno vejico.	10,10 110 110,0	4 3 4
Neničelne števke: vsa neničelna števila v številu so signifikantna.	1,2345	5
Ujete ničle: Ujete ničle med števki se štejejo za signifikantna mesta.	100,01	5
Vodilne ničle: Vodilne ničle, ki se pojavljajo pred prvo neničelno števko, niso signifikantne.	0,011	2

Enak pristop uporabljamo tudi pri drugih numeričnih mejah, rezultat se poda (zaokroži) na enak način (Preglednica 3).

Preglednica 3: Primeri zaokroževanja in ugotavljanja ustreznosti za preskus z mejo 5 ppm

izračunan rezultat	zaokrožen rezultat	ustreznost
5,5 ppm	6 ppm	NE
5,4 ppm	5 ppm	DA
4,5 ppm	5 ppm	DA

Če uporaba referenčnega standarda za določeno nečistoto ni predpisana, se lahko vsebnost nečistote izrazi kot delež nazivne koncentracije snovi, ki se uporablja za pripravo referenčne (standardne) raztopine, razen če je navedeno drugače.

1.4. Splošna navodila za izvedbo vaj

Vsa steklovina, ki jo potrebujemo za izvedbo vaje, je pripravljena na pladnjih oziroma ob analiznih instrumentih, kjer izvajamo analizo. Vse pripravljene raztopine in reagente moramo ustrezno označiti. Po končanih vajah naj bo steklovina čista (brez ostankov reagentov in oznak) in pospravljena nazaj na pladnje. Med pranjem steklovine obvezno uporabljamo rokavice. Vse birete po končani analizi speremo z vodo in 96 % etanolom. Če pri analizi uporabimo organska topila oziroma druge nevarne kemikalije, jih po izvedeni analizi prenesemo v označene vsebnike za odpadna organska topila oz. vsebnike za odpadne reagente.

Vaje vedno izvajamo v treh ponovitvah (triplikatih), razen če so navodila za posamezno vajo drugačna. Pri ponovitvah analize uporabljamo bodisi alikvote ali paralelke vzorca. Alikvot predstavlja reprezentativni del laboratorijskega vzorca, ki ga potrebujemo za izvedbo ene analize, pri čemer je v vsakem alikvotu količina analita identična. Navadno uporabimo alikvote pri raztopinah vzorcev ali standardov, ker lahko z ustreznimi pipetami večkrat odmerimo enak volumen, ki vsebuje enako količino analita (primer: od osnovne raztopine vzamemo del, ki ga uporabimo za eno analizo). V primeru trdnih vzorcev ali standardov, ki jih tehtamo, uporabimo paralelke. Pri slednjih vzorec ali standard natehtamo večkrat, pri čemer se mase posameznih nateht (paralelk) med seboj razlikujejo. V primeru paralelk tako vzamemo določeno količino vzorca (točno natehto) in jo uporabimo za izvedbo ene analize. Ker so točne natehte vzorca pri

paralelkah različne, je posledično različna tudi količina analita, zato moramo pri izračunu uporabiti posamezne točne natehte. V teoriji bi lahko tudi pri trdnih vzorcih vsakič natehtali enako maso, vendar je to zelo zamudno in nepraktično.

Slepa raztopina je vedno pripravljena po enakem postopku kot vzorec, le da v njej analit ni prisoten.

Razredčene raztopine kislin vedno pripravljamo tako, da v volumetrično bučko ustrezne velikosti najprej nalijemo *vodo R* do polovice volumna bučke in nato dodamo ustrezen volumen koncentrirane kisline ter dopolnimo z *vodo R* do oznake in premešamo. Če se raztopina močno segreva, jo hladimo na ledeni kopeli.

Pri vajah kot osnovno literaturo uporabljamo Evropsko, Ameriško in Britansko farmakopejo. Vse farmakopeje so dostopne v fizični obliki v laboratoriju za Analizo in nadzor zdravil.

Reagenti, ki jih uporabljamo pod oznako:

- *Alkohol R*: 96 % etanol.
- *Voda R*: prečiščena voda.
- *Voda brez ogljikovega dioksida R*: pri določenih analizah moramo uporabiti vodo brez CO₂, v tem primeru uporabimo prečiščeno vodo.

2. Prvi sklop krožnih vaj

2.1. ACIDOALKALIMETRIJA: Vsebnost acetilsalicilne kisline

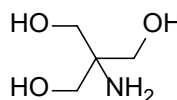
a) Opis vaje

Pripravimo raztopino 0,5 M klorovodikove kisline (HCl) in jo standardiziramo s primarnim standardom tris(hidroksimetil)aminometanom (trometamolom). Za določanje vsebnosti acetilsalicilne kisline pripravimo tudi raztopino 0,5 M natrijevega hidroksida (NaOH), ki pa je ne standardiziramo. Vsebnost acetilsalicilne kisline določimo tako, da znani masi acetilsalicilne kisline dodamo presežno količino raztopine 0,5 M natrijevega hidroksida.

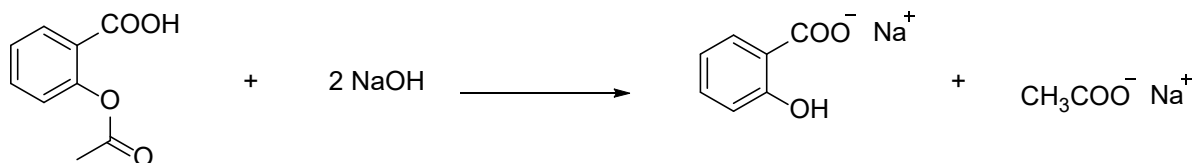
Nasvet:

Najprej pripravimo raztopino 0,5 M natrijevega hidroksida in jo dodamo k acetilsalicilni kislini. Reakcija poteka eno uro. Nato pripravimo in standardiziramo raztopino 0,5 M klorovodikove kisline, s katero nato titriramo presežni 0,5 M natrijev hidroksid, ki smo ga dodali acetilsalicilni kislini.

Struktura tris(hidroksimetil)aminometana (trometamol):



Hidroliza acetilsalicilne kisline poteka po dodatku 0,5 M natrijevega hidroksida. V tej reakciji se ester acetilsalicilne kisline hidrolizira, pri čemer se za vsak ekvivalent acetilsalicilne kisline porabita dva ekvivalenta natrijevega hidroksida.



b) Priprava 0,5 M natrijevega hidroksida

Pripravimo 250 mL 0,5 M natrijevega hidroksida po prilagojenem predpisu iz Ph. Eur. 11.2 (v okvirčku). Upoštevajte, da je navedeni predpis za 1 L 1 M raztopine NaOH.

1 M natrijev hidroksid (1 M Sodium hydroxide)

Priprava: 42 g natrijevega hidroksida R raztopimo v vodi R in z istim topilom razredčimo na 1000,0 mL ter premešamo.

c) Priprava in standardizacija 0,5 M klorovodikove kisline

Pripravimo 250 mL 0,5 M klorovodikove kisline in jo standardiziramo po prilagojenem predpisu iz Ph. Eur. 11.2 (naveden v okvirčku). Predpis opisuje pripravo 1 M raztopine, zato je treba preračunati ustrezne količine za pripravo 0,5 M raztopine. Titriramo 1 × slepo raztopino in 3 × raztopine trometamola (3 paralelke).

1 M klorovodikova kislina (1 M Hydrochloric acid)

Priprava: 103,0 g klorovodikove kisline R razredčimo z vodo R na 1000,0 mL.

Standardizacija. 0,950 g trometamola RV raztopimo v 50 mL vode R. Titrimo z raztopino klorovodikove kisline, končno točko določimo potenciometrično ali z uporabo 0,1 mL raztopine metilno oranžnega R kot indikatorja, dokler ne dobimo rumenkasto rdeče barve.

1 mL 1 M klorovodikove kisline ustreza 121,1 mg $C_4H_{11}NO_3$.

d) Določanje vsebnosti acetilsalicilne kisline v učinkovini

Vsebnost acetilsalicilne kisline v učinkovini določamo po prilagojenem predpisu iz Ph. Eur. 11.2 (v okvirčku). Titrimo 1 × slepo raztopino in 3 × raztopine vzorcev (3 paralelke).

Acetilsalicilna kislina (Acetylsalicylic acid)

Zahtevana vsebnost: 99,5–101,0 % (računano na suho snov)

V erlenmajerici z obrusom raztopimo 1,000 g acetilsalicilne kisline v 10 mL etanola R (96 % v/v). Dodamo 50,0 mL 0,5 M natrijevega hidroksida, erlenmajerico zapremo in pustimo stati 1 uro. Dodamo 0,2 mL raztopine indikatorja fenolftaleina R, premešamo in titrimo z 0,5 M klorovodikovo kislino. Izvedemo slepo titracijo.

1 mL 0,5 M natrijevega hidroksida ustreza 45,04 mg $C_9H_8O_4$.

Vprašanje

Zakaj ni treba standardizirati 0,5 M natrijevega hidroksida?

Literatura

- Evropska farmakopeja 11.2, poglavje 4.2.2. volumetrične raztopine.
- Evropska farmakopeja 11.2, poglavje 14, monografija acetilsalicilna kislina.

POROČILO

1. vaja: Vsebnost *acetilsalicilne kisline*

Priprava in standardizacija *0,5 M klorovodikove kisline*

Standard: -----

Serijska: -----

Datum proizvodnje: -----

Proizvajalec: -----

Rezultati analize:

	natehta <i>trometamola</i> [mg]	poraba raztopine HCl [mL]:	koncentracija raztopine HCl [M]	faktor (f) <i>0,5 M HCl</i>
1				
2				
3				

Slepa [mL]:

$$\bar{f} = \boxed{}$$

Izračun:

$$\text{RSD [\%]} =$$

Komentar:

Vsebnost acetilsalicilne kisline

Vzorec: -----

Serijska: -----

Datum proizvodnje: -----

Proizvajalec: -----

Rezultati analize:

	natehta vzorca [mg]	poraba 0,5 M HCl [mL]	vsebnost [mg]	vsebnost glede na navedeno vsebnost v učinkovini [%]
1				
2				
3				

Slepa (mL):

$$\overline{vsebnost} = \boxed{}$$

Izračun:

$$RSD [\%] =$$

Zahteva:

Vzorec: ustreza ne ustreza

Komentar:

Analizo opravil:

Pregledal:

Datum:

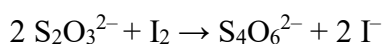
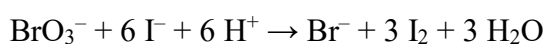
2.2. OKSIDOREDUKTOMETRIJA: Vsebnost askorbinske kisline v tabletah

a) Opis vaje

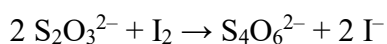
Pripravimo 0,033 M kalijev bromat ($KBrO_3$, primarni standard), 0,05 M jod in 0,1 M natrijev tiosulfat ($Na_2S_2O_3$). 0,1 M natrijev tiosulfat standardiziramo tako, da 0,033 M kalijevemu bromatu (koncentracijo slednjega poznamo) dodamo presežno količino kalijevega jodida, pri čemer nastane jod, ki ga titriramo z 0,1 M natrijevim tiosulfatom. S standardizirano raztopino $Na_2S_2O_3$ nato standardiziramo 0,05 M jod.

Za določitev vsebnosti askorbinske kisline v tabletah najprej stehamo in zdrobimo 3 tablete, nato preračunamo, koliko tabletnega prahu potrebujemo za analizo in preračunano količino natehemo. Vsebnost askorbinske kisline v tabletnem prahu določimo s titracijo z raztopino 0,05 M joda.

Princip standardizacije 0,1 M natrijevega tiosulfata:

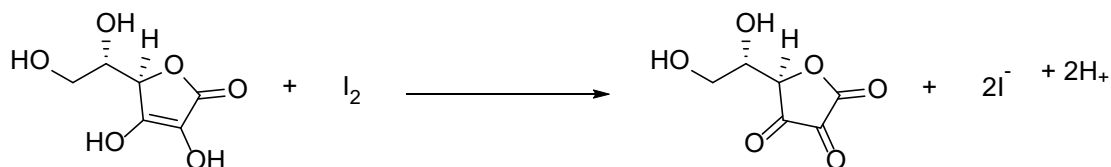


Princip standardizacije 0,05 M joda:



Princip določanja vsebnosti askorbinske kisline:

Reakcija:



b) Priprava 0,033 M kalijevega bromata

Pripravimo 50,0 mL 0,033 M kalijevega bromata (primarni standard) po prilagojenem predpisu iz Ph. Eur. 11.2. Predpis je za 1 L raztopine, zato je treba preračunati ustrezne količine za pripravo 50 mL raztopine.

0,033 M kalijev bromat (0.033 M Potassium bromate)

Priprava: 5,5670 g kalijevega bromata RV raztopimo v vodi R in z istim topilom razredčimo na 1000,0 mL ter premešamo.

c) Priprava in standardizacija 0,1 M natrijevega tiosulfata

Pripravimo 500 mL 0,1 M natrijevega tiosulfata in ga standardiziramo po prilagojenem predpisu iz Ph. Eur. 11.2. Predpis (spodaj v okvirčku) je za 1 L raztopine, zato preračunamo

ustrezne količine za pripravo 500 mL raztopine. *0,1 M natrijev tiosulfat* standardiziramo s tremi alikvoti *0,033 M kalijevega bromata*.

0,1 M natrijev tiosulfat (0.1 M Sodium thiosulfate)

Priprava: 25 g *natrijevega tiosulfata R* in 0,2 g *natrijevega karbonata R* raztopimo v vodi *R* in z istim topilom razredčimo na 1000,0 mL.

Standardizacija: 10,0 mL *0,033 M kalijevega bromata* dodamo 40 mL vode *R*, 10 mL raztopine *kalijevega jodida R* in 5 mL *klorovodikove kisline R1*. Titriramo z raztopino *natrijevega tiosulfata*, pri čemer kot indikator uporabimo 1 mL raztopine *škroba R*, dodane proti koncu titracije.

1 mL *0,1 M natrijevega tiosulfata* ustreza 2,783 mg KBrO_3 ali 0,5 mL *0,033 M kalijevega bromata*.

d) Standardizacija 0,05 M joda

Pripravimo 250 mL *0,05 M joda* po prilagojenem predpisu iz Ph. Eur. 11.2. Standardizacijo izvedemo s tremi alikvoti *0,05 M joda*. Predpis (v okvirčku) je za 1 L raztopine, zato preračunamo ustrezne količine za pripravo 250 mL raztopine.

0,05 M jod (0.05 M Iodine)

Priprava: 12,7 g *joda R* in 20 g *kalijevega jodida R* raztopimo v vodi *R* in z istim topilom razredčimo na 1000,0 mL in premešamo.

Standardizacija: K 20,0 mL raztopine *joda* dodamo 1 mL *razredčene očetne kisline R* in 30 mL vode *R*. Titriramo z *0,1 M natrijevim tiosulfatom*, za indikator uporabimo *raztopino škroba R*.

Vsebnik z *jodovico* mora biti zaščiten pred svetlobo.

e) Določanje vsebnosti askorbinske kisline v tabletah oziroma kapsulah

Vsebnost *askorbinske kisline* v tabletah ali kapsulah določamo po prilagojenem predpisu iz Ph. Eur. 11.2. Titracijo izvedemo v 3 paralelkah, slepe titracije ne izvajamo.

Postopek: Stehramo in zdrobimo 3 tablete. V primeru kapsul najprej stehramo 3 polne kapsule, nato odstranimo vsebino in stehramo prazne kapsule. Natehramo količino prahu, ki ustreza približno 150 mg *askorbinske kisline*, in jo raztopimo v 10 mL *razredčene žveplove kisline R* ter 80 mL vode *R*. Dodamo 1 mL raztopine *škroba R* in titriramo z *0,05 M jodom*, dokler ne dobimo obstojne vijolično modre barve.

1 mL *0,05 M joda* ustreza 8,81 mg $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$.

Zahtevana vsebnost: 95,0–105,0 % navedene vsebnosti.

Za izvedbo vaje potrebujemo še spodnje raztopine:

Raztopina kalijevega jodida (Potassium iodide solution) – za standardizacijo tiosulfata.
Vsebuje 166 g/L kalijevega jodida.

Ocetna kislina, razredčena (Acetic acid, dilute) – za standardizacijo joda.
Vsebuje med 115 g/L in 125 g/L očetne kisline.
12 g *ledoceta R* razredčimo z *vodo R* na 100 mL.

Klorovodikova kislina R1 (Hydrochloric acid R1) – za standardizacijo tiosulfata.
Vsebuje 250 g/L klorovodikove kisline.
70 g *klorovodikove kisline R* razredčimo z *vodo R* na 100 mL.

Žveplova(VI) kislina, razredčena (Sulfuric acid, dilute R) – za določanje askorbinske kisline.
Vsebuje 98 g/L žveplove(VI) kisline.
V 60 mL *vode R* dodamo 5,5 mL *žveplove(VI) kisline R*, pustimo, da se ohladi in z istim topilom razredčimo na 100 mL.

Vprašnji

Zakaj pri pripravi raztopine joda dodamo k raztopini kalijev jodid?

Kaj je lahko vzrok za večjo vsebnost askorbinske kisline, kot je navedeno, v tabletah ali v kapsulah?

Literatura

- Evropska farmakopeja 11.2, poglavje 4.2.2. volumetrične raztopine.
- Evropska farmakopeja 11.2, poglavje 4.1.1. reagenti.
- Evropska farmakopeja 11.2, poglavje 14, monografija askorbinska kislina.

POROČILO

2. vaja: Vsebnost askorbinske kisline

Priprava in standardizacija 0,1 M natrijevega tiosulfata

Standard: -----

m (KBrO₃) = -----

$f(0,033 \text{ M KBrO}_3) =$ -----

Rezultati analize:

	V 0,033 M KBrO ₃ [mL]	poraba 0,1 M Na ₂ S ₂ O ₃ [mL]	koncentracija Na ₂ S ₂ O ₃ [M]	faktor (f) 0,1 M Na ₂ S ₂ O ₃
1				
2				
3				

Izračun:

$$\bar{f} = \boxed{}$$

RSD [%] =

Komentar:

Priprava in standardizacija 0,05 M joda

Standard: -----

$c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) =$ -----

$f(0,1 \text{ M Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) =$ -----

Rezultati analize:

	V 0,05 M I ₂ [mL]	poraba 0,1 M Na ₂ S ₂ O ₃ [mL]	koncentracija I ₂ [M]	faktor (f) 0,05 M I ₂
1				
2				
3				

Izračun:

$$\bar{f} = \boxed{}$$

$$\text{RSD} [\%] =$$

Komentar:

Vsebnost askorbinske kisline

Vzorec: -----

Serijska: -----

Datum proizvodnje: -----

Proizvajalec: -----

Rezultati analize:

	natehta vzorca [mg]	poraba 0,05 M I ₂ [mL]	vsebnost na tableto [mg]	vsebnost glede na navedeno vsebnost [%]
1				
2				
3				

Izračun:

$$\overline{vsebnost} = \boxed{}$$

$$RSD [\%] =$$

Zahteva:

Vzorec: ustreza ne ustreza

Komentar:

Analizo opravil:

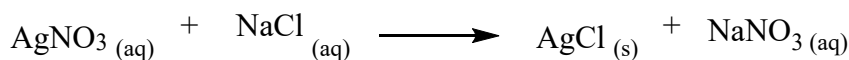
Pregledal:

Datum:

2.3. ARGENTOMETRIJA: Določanje vsebnosti kloridnih ionov v Ringerjevi infuzijski raztopini

a) Opis vaje

Pripravimo raztopino $0,1\text{ M}$ srebrovega nitrata (AgNO_3), ki jo nato standardiziramo z natrijevim kloridom (NaCl , primarni standard). S standardiziranim $0,1\text{ M}$ srebrom nitratom nato določimo vsebnost kloridnih ionov v Ringerjevi raztopini.



Opozorila: Ob stiku s kožo srebrov nitrat pusti siv ali črn madež, zato med vajo vseskozi nosite rokavice. Količina pripravljenega $0,1\text{ M}$ srebrovega nitrata zadošča za izvedbo vseh titracij, če ni nepotrebnih izgub (npr. pri prelivanju raztopin, pretitraciji itd). Po končanem delu oborine, ki vsebujejo Ag^+ ione, odfiltriramo in shranimo v temu namenjene vsebnike. Matičnice (vodne raztopine) lahko zlijemo v odtok.

b) Priprava in standardizacija $0,1\text{ M}$ srebrovega nitrata

Pripravimo 100,0 mL $0,1\text{ M}$ srebrovega nitrata in standardiziramo po prilagojenem predpisu iz Ph. Eur. 11.2 (predpis v okvirčku). Analizo izvedemo v treh paralelkah, slepe titracije ne izvajamo.

0,1 M srebrov nitrat (0.1 M Silver nitrate)

Priprava: 17,0 g srebrovega nitrata *R* raztopimo v vodi *R* in z istim topilom razredčimo na 1000,0 mL in premešamo.

Standardizacija: 0,100 g natrijevega klorida *RV* raztopimo v 30 mL vode *R*. Titriramo z raztopino srebrovega nitrata. Kot indikator uporabimo 0,25 mL raztopine kalijevega kromata, ki v končni točki titracije tvori rjavo oborino.

1 mL $0,1\text{ M}$ srebrovega nitrata ustreza 5,844 mg NaCl.

Shranjevanje: zaščititi pred svetlobo.

Kalijev kromat(VI), raztopina (Potassium chromate solution)

Raztopina 50 g/L kalijevega(VI) kromata.

c) Določanje vsebnosti kloridnih ionov v Ringerjevi infuzijski raztopini

S pomočjo brizge in injekcijske igle v suho erlenmajerico prenesemo približno 40 mL infuzijske raztopine. Nato vsebnost kloridnih ionov v Ringerjevi infuzijski raztopini določamo po prilagojenem predpisu iz USP 43. Titracijo izvedemo v treh alikvotih, slepe titracije ne izvajamo. Rezultat podamo kot vsebnost kloridnih ionov (mmol/L).

10,0 mL Ringerjeve infuzijske raztopine prenesemo v erlenmajerico in dodamo 10 mL ledoceta R in 25 mL metanola R. Titriramo z 0,1 M srebrovim nitratom do končne točke, kot indikator uporabimo 0,25 mL raztopine eozina Y, ki v končni točki titracije tvori roza obarvano oborino. 100 mL Ringerjeve raztopine vsebuje med 523,0 in 580,0 kloridnih ionov (Cl, kot NaCl, KCl in CaCl₂).

1 mL 0,1 M srebrovega nitrata ustreza 3,545 mg Cl.

Eozin Y (Eosin Y TS)

Raztopina 1 g eozina Y R v 2 mL vode R in 50 mL alkohola R.

Vprašanje

Razložite princip delovanja indikatorja eozina Y.

Literatura

- Evropska farmakopeja 11.2, poglavje 4.2.2. volumetrične raztopine.
- Evropska farmakopeja 11.2, poglavje 4.1.1. reagenti.
- Ameriška farmakopeja (USP 43), monografija Ringerjeva injekcijska raztopina.

POROČILO

3. vaja: Določanje vsebnosti kloridnih ionov v Ringerjevi infuzijski raztopini po USP 43

Priprava in standardizacija 0,1 M srebrovega nitrata

Standard: -----

Rezultati analize:

	m NaCl [mg]	poraba 0,1 M AgNO ₃ [mL]	koncentracija AgNO ₃ [M]	faktor (<i>f</i>) 0,1 M AgNO ₃
1				
2				
3				

$$\bar{f} = \boxed{}$$

$$\text{RSD [\%]} =$$

Izračun:

Komentar:

Vsebnost kloridnih ionov v Ringerjevi infuzijski raztopini

Vzorec: -----

Serijska: -----

Datum proizvodnje: -----

Proizvajalec: -----

Rezultati analize:

	V vzorca [mL]	poraba 0,1 M AgNO ₃ [mL]	vsebnost Cl ⁻ [mg/100 mL]	vsebnost Cl ⁻ [mmol/L]
1				
2				
3				

$\overline{vsebnost} =$

RSD [%] =

Zahteva

Vzorec: ustreza ne ustreza

Izračun:

Komentar:

Analizo opravil:

Pregledal:

Datum:

3. Drugi sklop krožnih vaj

3.1. UV-VIS IN IR SPEKTROSKOPIJA: Identifikacija in vsebnost paracetamola v tabletah ter kvalifikacija UV-Vis spektrofotometra

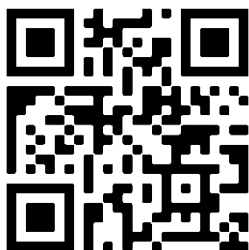
a) Opis vaje

Najprej izvedemo izbrane preskuse kvalifikacije UV-Vis spektrofotometra (prilagojene po navodilih iz Ph. Eur. 11.2): preverjanje točnosti absorbance, preverjanje točnosti valovnih dolžin in meja razpršene svetlobe. Nato določimo vsebnost paracetamola v tabletah z UV-Vis spektrofotometrom in potrdimo istovetnost z IR spektrofotometrom. Postopek za določitev vsebnosti je prilagojen po monografiji iz Britanske farmakopeje.

b) Kvalifikacija UV-Vis spektrofotometra

Za snemanje absorpcijskih spektrov in merjenje absorbance si oglejte posnetek na povezavi ali uporabite QR kodo.

- <https://video.arnes.si/watch/2jir2473jkld>



– Preverjanje točnosti absorbance (*Control of absorbance accuracy*)

Priprava raztopine nikotinske kisline:

57,0–63,0 mg *nikotinske kisline* za kvalifikacijo opreme CRS prenesemo v 200,0 mL bučko, raztopimo v 0,1 M klorovodikovi kislini R, dopolnimo do oznake in premešamo. 2,0 mL pripravljene raztopine prenesemo v 50,0 mL bučko in dopolnimo do oznake (končna koncentracija nikotinske kisline je približno 12 mg/L). Raztopini pomerimo absorbanci pri 213 nm in 261 nm.

Merila sprejemljivosti:

Razlika med izmerjeno in izračunano absorbanco certificiranega materiala za vsako kombinacijo valovnih dolžin ne sme presegati $\pm 0,010$ ali ± 1 odstotka, pri čemer se upošteva večjo od obeh vrednosti.

Podatki specifične absorbance za *nikotinsko kislino* CRS:

$$A_{1\text{ cm}}^{1\%} = 430,7 \text{ (pri 213 nm)}$$

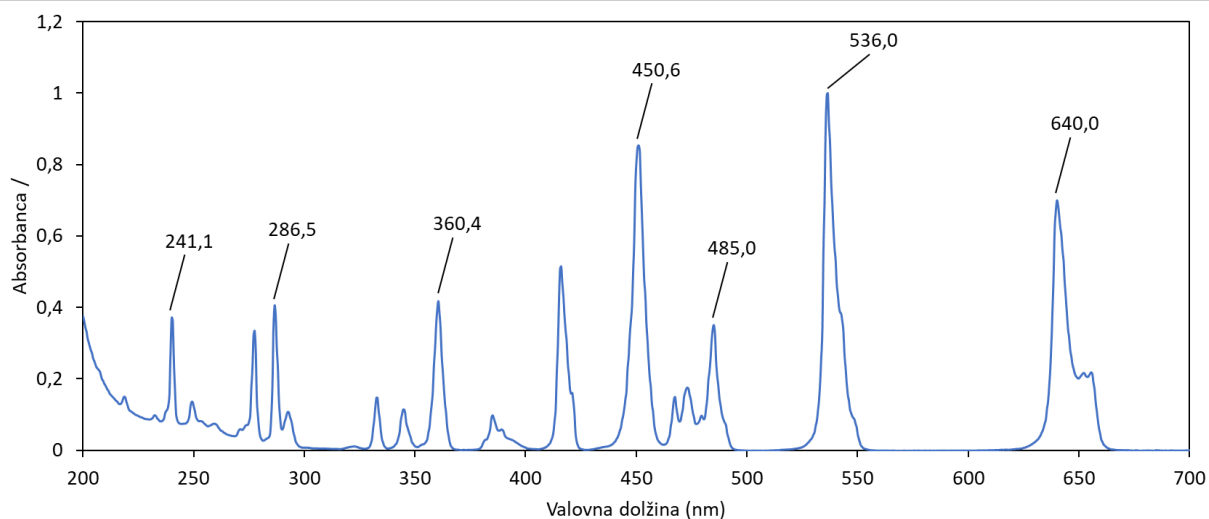
$$A_{1\text{ cm}}^{1\%} = 422,5 \text{ (pri 261 nm)}$$

– Preverjanje točnosti valovnih dolžin (*Control of wavelength accuracy*)

Posnamemo spekter raztopine holmijevega(III) perklorata med 200 nm in 700 nm in preverimo ustreznost valovnih dolžin spektrofotometra. Raztopine holmijevega(III) perklorata ne zavržemo.

Pričakovani absorpcijski vrhovi za *raztopino holmijevega(III) perklorata R* so naslednji:

241,1; 287,2; 361,3; 451,4; 485,2; 536,6; 640,5 (Slika 2)



Slika 2: Primer absorpcijskega spektra *raztopine holmijevega(III) perklorata R*

Merila sprejemljivosti:

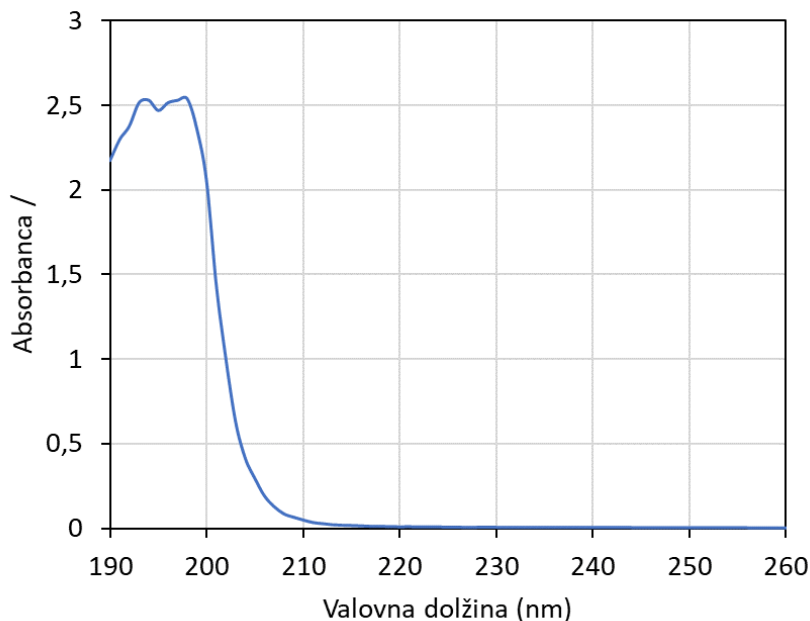
Za namizne instrumente je dovoljeno odstopanje valovne dolžine posameznega absorpcijskega vrha ± 1 nm pri valovnih dolžinah pod 400 nm in ± 3 nm pri valovnih dolžinah 400 nm in več.

– Meja razpršene svetlobe (*Limit of stray light*)

Pripravimo 25 mL ustrezne raztopine *kalijevega klorida* s koncentracijo 12 g/L, posnamemo spekter med 190 nm in 260 nm ter odčitamo absorbanco pri 198 nm.

Merila sprejemljivosti:

Absorbanca pri 198 nm ne sme biti manjša kot 2 (Slika 3).



Slika 3: Primer absorpcijskega spektra raztopine kalijevega klorida (12 g/L)

c) Vsebnost paracetamola

Pred pripravo vzorcev pripravimo 1 L 0,1 M natrijevega hidroksida. Iz povprečne mase tablet preračunamo količino prahu, ki vsebuje ustrezno količino paracetamola za izvedbo analize. Vsebnost določamo v 2 paralelkah (+ slepi vzorec). Po koncu vaje preostanek tabletne mase prenesemo v vsebnik za trdne odpadke.

Tablete s paracetamolom

Zahtevana vsebnost: 95,0–105,0 % navedene vsebnosti

Stehtamo in zdrobimo 5 tablet. V 200,0 mL bučko natehtamo količino praška, ki vsebuje 0,15 g paracetamola in dodamo 50 mL 0,1 M natrijevega hidroksida ter 100 mL vode R. Suspenzijo stresamo 15 minut in z vodo dopolnimo do oznake. Nastalo suspenzijo premešamo in filtriramo, pri čemer prvih 10 mL filtrata zavržemo. 10,0 mL filtrata prenesemo v 100,0 mL bučko in dopolnimo do oznake z vodo. 10,0 mL dobljene raztopine prenesemo v 100,0 mL bučko, dodamo 10 mL 0,1 M natrijevega hidroksida in dopolnimo z vodo do oznake. Tako pripravljeni raztopini pomerimo absorbanco pri 257 nm.

Za izračun vsebnosti paracetamola ($C_8H_9NO_2$) vzamemo $A(1\%, 1\text{ cm})$, ki pri 257 nm znaša 715.

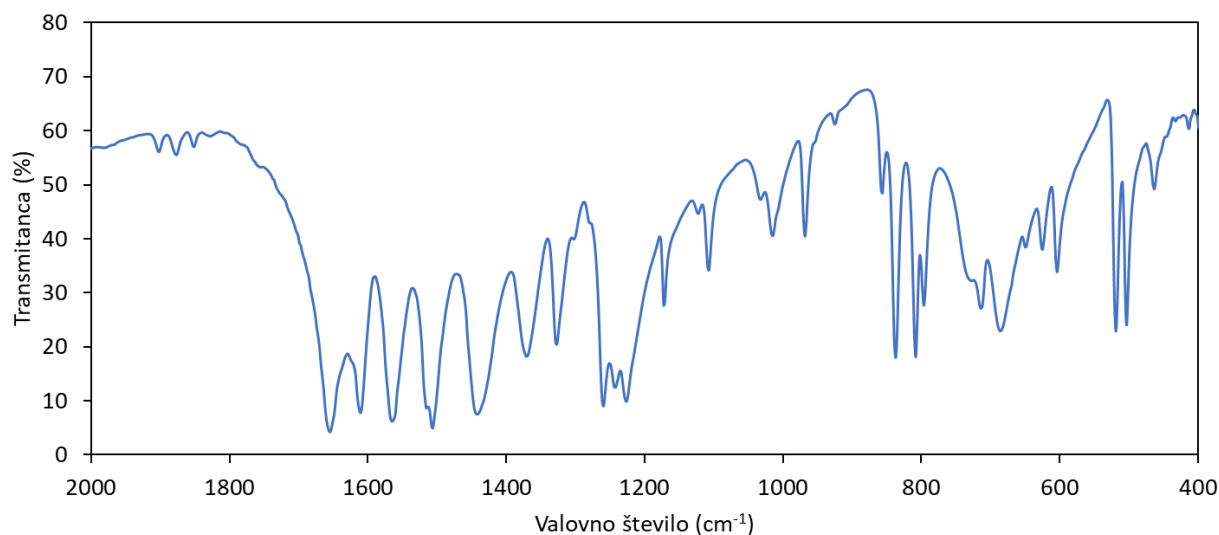
d) Identifikacija paracetamola

K masi tabletnega prahu, ki vsebuje približno 250 mg paracetamola, dodamo 10 mL acetona. Steklovina mora biti suha! Pokrijemo s folijo in mešamo 10 minut. Nato prefiltriramo v suho čašo in pustimo, da aceton izpari. To izvajamo v digestoriju, vmes lahko previdno segrejemo. Suh zaostanek dodatno posušimo v sušilniku, približno 10 minut pri 105 °C. Ustrezno

pripravimo vzorec (tableta s KBr), posnamemo spekter med 2000 cm^{-1} in 400 cm^{-1} ter primerjamo z referenčnim spektrom paracetamola (Slika 4).

Za pripravo vzorca za IR in snemanje IR spektra si oglejte posnetka na spodnjih povezavah ali uporabite QR kodo za dostop.

- <https://video.arnes.si/watch/zdvt9dqr5frt>
- <https://video.arnes.si/watch/v2z9mrr8kt0c>



Slika 4: Referenčni IR spekter paracetamola

Vprašanja

Zakaj pri določanju vsebnosti paracetamola kot topilo uporabljamo 0,1 M natrijev hidroksid in ne vode?

Ali bi lahko za identifikacijo paracetamola z IR spektroskopijo uporabili kar tabletni prah?

Literatura

- Britanska farmakopeja 2009, monografija za tablete s paracetamolom.
- Evropska farmakopeja 11.2, poglavje 2.2.25 – absorpcijska spektrometrija, UV in Vis.

POROČILO
UV-Vis in IR spektroskopija

Vsebnost paracetamola v tabletah

Vzorec: -----

Serijska: -----

Datum proizvodnje: -----

Proizvajalec: -----

Rezultati analize:

	natehta vzorca [mg]	absorbanca	vsebnost [mg/tableto]	vsebnost glede na navedeno vsebnost [%]
1				
2				

Izračun:

$$\overline{vsebnost} = \boxed{}$$

RSD [%] =

Zahteva:

Vzorec: ustreza ne ustreza

Komentar:

Analizo opravil:

Pregledal:

Datum:

Kvalifikacija UV-Vis spektrofotometra po Ph. Eur. 11.2 (2.2.25)

Preverjanje točnosti absorbance UV-Vis spektrofotometra

Rezultati in komentar:

val. dolžina [nm]	$A_{\text{izmerjena}}$	$A_{\text{referenčna}}$	zahteve	ustreznost

Preverjanje točnosti valovnih dolžin UV-Vis spektrofotometra

Rezultati in komentar:

$\lambda_{\text{izmerjena}}$	$\lambda_{\text{referenčna}}$	zahteve	ustreznost

Meja razpršene svetlobe

Rezultati in komentar:

Analizo opravil:

Pregledal:

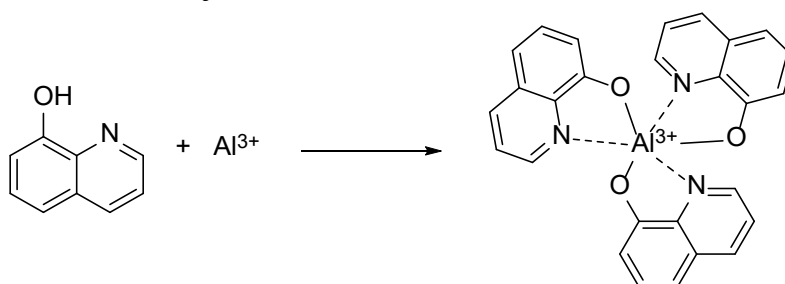
Datum:

3.2. FLUORIMETRIJA: Preskus prisotnosti aluminija v natrijevem kloridu

a) Opis vaje

Navodila za preskus prisotnosti aluminija so prilagojena po monografijah iz Ph. Eur. 11.2. Po navodilih najprej pripravimo ustrezne količine *acetatne pufrske raztopine pH 6,0*, *razredčeno žveplovo(VI) kislino*, *raztopino 8-hidroksikinolina v diklorometanu* in *standardno raztopino aluminija (2 ppm Al)*. Nato pripravimo raztopine vzorca, slepe in referenčno raztopino. Posamezno raztopino nato ekstrahiramo z *raztopino 8-hidroksikinolina v diklorometanu* (diklorometan ima večjo gostoto kot voda). Pri tem se tvori kompleks med 8-hidroksikinolinom in aluminijem, ki fluorescira, in je dobro topen v diklorometanu. Po ekstrakciji združimo posamezne organske faze in pomerimo emisijski spekter.

Tvorba kompleksa med aluminijem in 8-hidroksikinolinom:



b) Priprava raztopin, ki jih potrebujemo za izvedbo preskusa

Pripravimo 50 mL *acetatne pufrske raztopine pH 6,0* po spodnjem predpisu. pH vrednosti ne preverjamo.

Acetatna pufrska raztopina pH 6,0 (Acetate buffer solution pH 6.0)

100 g *amonijevega acetata R* raztopimo v 300 mL *vode R*, dodamo 4,1 mL *koncentrirane očetne kisline R*. z *vodo R* dopolnimo do 500.0 mL in premešamo.

Pripravimo 100 mL *razredčene žveplove(VI) kisline* po spodnjem predpisu.

Razredčena žveplova(VI) kislina (Sulfuric acid, dilute)

5,5 mL *žveplove(VI) kisline R* dodamo k 60 mL *vode R*, pustimo, da se ohladi in z *vodo R* razredčimo na 100 mL ter premešamo.

Pripravimo 150 mL *raztopine 8-hidroksikinolina v diklorometanu* s koncentracijo 5 g/L.

Raztopina 8-hidroksikinolina v diklorometanu

V 250 mL erlenmajerico z obrusom natehtamo preračunano količino *8-hidroksikinolina R* in ga raztopimo v 150 mL *diklorometana R*, ki ga odmerimo z merilnim valjem.

Pripravimo 100,0 mL standardne raztopine aluminija (2,0 ppm)

Standardna raztopina aluminija (2 ppm Al) (Aluminium standard solution (2 ppm Al))

Raztopino pripravimo tik pred uporabo. Točno in natančno natehtamo 352 mg $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$ v 100,0 mL bučko, dodamo 10 mL *razredčene žveplove(VI) kisline*, pomešamo, da se sol raztopi, in dopolnimo do oznake z *vodo R*. 1,0 mL tako pripravljene raztopine nato prenesemo v 100,0 mL bučko in dopolnimo do oznake z *vodo R* ter premešamo.

c) Priprava raztopin vzorca, slepe in referenčne raztopine aluminija

Referenčna raztopina (Reference solution)

2 mL *standardne raztopine aluminija (2 ppm Al) R* prenesemo v erlenmajerico, dodamo 10 mL *acetatne pufrske raztopine pH 6,0 R* in 100 mL *vode R* ter premešamo.

Raztopina vzorca (Prescribed solution)

20 g *natrijevega klorida* prenesemo v erlenmajerico, dodamo 100 mL *vode R* in 10 mL *raztopine acetatne pufrske raztopine pH 6,0 R* ter dobro premešamo.

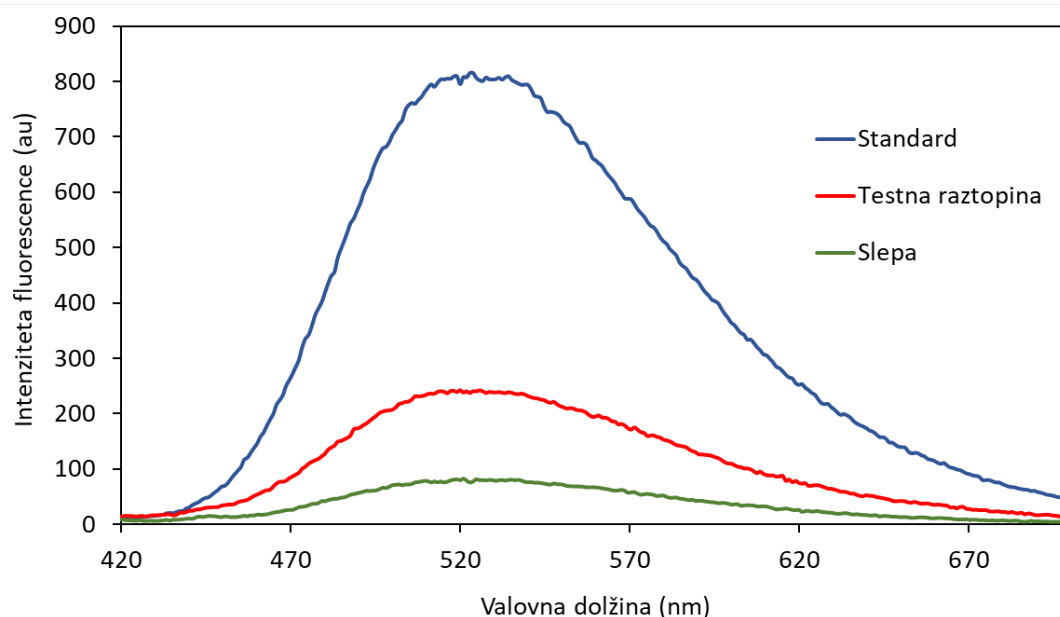
Slepa raztopina (Blank solution)

10 mL *acetatne pufrske raztopine pH 6,0 R* prenesemo v erlenmajerico in dodamo in 100 mL *vode R* ter premešamo.

d) Ekstrakcija vodnih raztopin in meritve fluorescence

Vsako raztopino posebej prenesemo v lij ločnik in ekstrahiramo z 2×20 mL in 1×10 mL *raztopine 8-hidroksikinolina v diklorometanu*. Diklorometan je težji od vode! Organsko fazo združujemo v 50,0 mL bučko, ki jo po ekstrakciji dopolnimo do oznake z diklorometanom. Pri tem za vsako raztopino uporabite ločen lij ločnik, da zmanjšamo možnost kontaminacije.

Tako dobimo tri ekstrakte: testno raztopino (*Test solution*) – ekstrakt raztopine vzorca, standard (*Standard*) – ekstrakt referenčne raztopine in slepo (*Blank*) – ekstrakt slepe raztopine. Tem raztopinam nato na spektrofluorometru izmerimo emisijski spekter (Slika 5) in odčitamo intenziteto fluorescence pri 520 nm za vsako raztopino: I_1 (intenziteta za testno raztopino), I_2 (intenziteta za standard) in I_3 (intenziteta za slepo). Natrijev klorid prestane preskus prisotnosti aluminija, če vrednost emisije fluorescence za testno raztopino ($I_1 - I_3$) ni večja od intenzitete emisije fluorescence za standard ($I_2 - I_3$).



Slika 5: Primeri spektrov, ki so bili izmerjeni pri preskusu za aluminij.

Za pripravo vzorca za fluorimetrijo, snemanje spektra in interpretacijo spektra si oglejte posnetke na spodnjih povezavah oziroma uporabite QR kode.

- <https://video.arnes.si/watch/4nkhdg357qkx>
- <https://video.arnes.si/watch/sqtlfwvyb3yd>
- <https://video.arnes.si/watch/rxf8xbb4rqv5>



Vprašanja

Kakšna je prednost fluorimetrije v primerjavi z UV-Vis spektroskopijo v primeru limitnih preskusov?

Katero enoto pri intenziteti fluorescence predstavlja oznaka "au"?

Literatura

- Evropska farmakopeja 11.2, poglavje 4.1.1. reagenti.
- Evropska farmakopeja 11.2, poglavje 2.4.17. limitni testi.
- Evropska farmakopeja 11.2, poglavje 17, monografija za natrijev klorid.

FLUORIMETRIJA: Preskus na prisotnost aluminija v natrijevem kloridu

Vzorec: -----

Serijska: -----

Datum proizvodnje: -----

Proizvajalec: -----

Rezultati analize:

	raztopina	izmerjena fluorescenca
1		
2		
3		

Zahteva:

Vzorec: ustreza ne ustreza

Komentar:

Analizo opravil:

Pregledal:

Datum:

3.3. TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI: Vsebnost amoksicilina in klavulanske kisline v tabletah

a) Opis vaje

S tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) analiziramo vsebnost amoksicilina in klavulanske kisline v različnih farmacevtskih oblikah (tablete, peroralna suspenzija). Najprej pripravimo primerno mobilno fazo, nato standarde in vzorce ter izvedemo analizo po prilagojenem postopku iz USP 43.

b) Priprava mobilne faze, standardov in vzorca

- Mobilna faza: metanol in *puffer* v razmerju 1:19 (v/v).

Puffer: 7,8 g natrijev dihidrogenfosfat v 1000 mL vode, pH $4,4 \pm 0,1$.

Za umerjanje elektrode pH metra in postopek priprave pufra si oglejte posnetka na spodnjih povezavah ali uporabite QR kodi.

- <https://video.arnes.si/en/watch/vpkyyyc7f75y>
- <https://video.arnes.si/en/watch/zdvt9dqr5ftr>



- Priprava standarda:

Natehtamo 20,0 mg standarda *kalijevega klavulanata RS* in 50,0 mg standarda *amoksicilina trihidrata RS*, ju kvantitativno prenesemo v isto 100,0 mL bučko, raztopimo v *vodi R* ter dopolnimo z *vodo R* do oznake ter premešamo (označimo kot **ST**).

- Priprava vzorca:

2 tableti (oziroma ustrezno količino suspenzije, ki ustreza 1000 mg amoksicilina) prenesemo v 500,0 mL bučko, dopolnimo z *vodo R* do oznake in šele nato dodamo magnet. Mešamo vsaj 60 minut z magnetnim mešalom, da tablete popolnoma razpadejo in da se učinkovina raztopi. Del raztopine filtriramo skozi filter papir, prvih nekaj mL filtrata zavržemo, nato razredčimo z *vodo R*, da dobimo končno koncentracijo amoksicilina 0,5 mg/mL (označimo kot **VZ**).

– Priprava slepe raztopine:

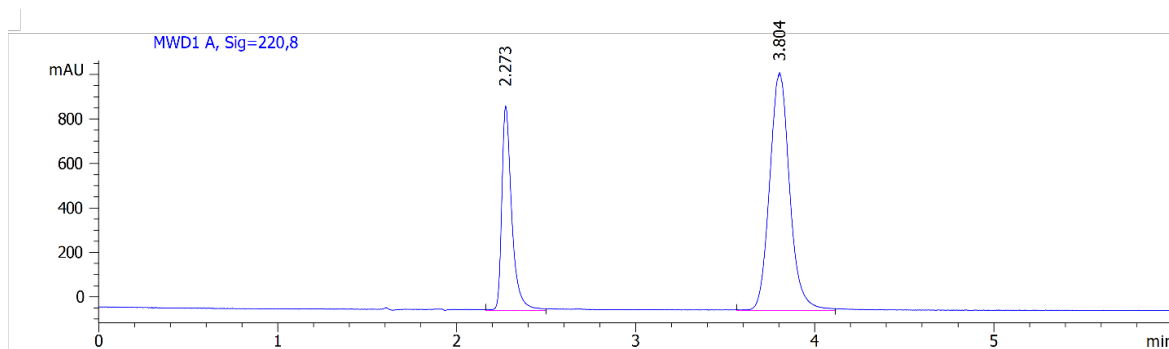
Mobilno fazo filtriramo skozi filter z velikostjo por 0,45 µm v HPLC vialo (označimo kot SL).

c) Analiza vzorca

Pred injiciranjem standard in vzorec filtriramo skozi 0,45 µm filter direktno v HPLC vialo.

Relativni retencijski faktor za klavulansko kislino znaša 0,5 in za amoksicilin 1,0 (Slika 5).

- Ločevanje: v uravnotežen kromatografski sistem injiciramo 1 × SL, 3 × ST (iz iste vialo), 1 × VZ in 1 × SL.
- Zahteve za vsebnost: Vsebnost amoksicilina: 90,0–120,0 %, vsebnost klavulanske kisline: 90,0–120,0 %. Pri izračunu upoštevamo jakost oziroma čistot standardov.



Slika 6: Kromatogram amoksicilina in klavulanske kisline

Kromatografski pogoji

Mobilna faza	50 mM NaH ₂ PO ₄ , MeOH (95:5 v/v) (uporabimo enokanalni način)
Pretok	1,5 mL/min
Kolona	dimenzije: 4,6 × 250 mm, stacionarna faza: oktadecilsilil silika gel (C18) za kromatografijo 3,5 µm, temperatura kolone: 20–30 °C
Detekcija	spektrofotometrična pri 220 nm.
Volumen injiciranja	20 µL
Čas analize	8 min

– Ustreznost kromatografskega sistema:

- Relativna standardna deviacija (RSD) površine kromatografskega vrhov treh zaporednih injiciranj raztopine standarda je manjši od 2,0 %.
- Resolucija (R) med amoksicilinom in klavulansko kislino v raztopini standarda je vsaj 3,5.
- Faktor simetrije (T) vsakega signala ni večji od 1,5.

Literatura

- Evropska farmakopeja 11.2, poglavje 2.2.29 tekočinska kromatografija.
- Evropska farmakopeja 11.2, poglavje 2.2.46 kromatografske separacijske tehnike.
- Ameriška farmakopeja (USP 43), monografija za tablete z amoksicilinom in kalijevim klavulanatom.

POROČILO

HPLC: Vsebnost amoksicilina in klavulanske kisline po USP 43

Vzorec: -----

Serijska: -----

Datum proizvodnje: -----

Proizvajalec: -----

Ustreznost kromatografskega sistema:

parameter	zahteva	rezultat
R		
T		
RSD		

Rezultati analize vsebnosti:

Izračun:

Zahteva:

Vzorec: ustreza ne ustreza

Komentar:

Analizo opravil:

Pregledal:

Datum:

4. Tretji sklop krožnih vaj

4.1. UV-VIS SPEKTROSKOPIJA: Določanje vsebnosti železa(III) v sirupu

a) Opis vaje

Najprej pripravimo 0,1 % raztopino fenantrolina, 10 % raztopino hidroksilamonijevega klorida in pufrsko raztopino natrijevega acetata pH 4,8, nato pripravimo standardne raztopine železovega(III) klorida heksahidrata ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) in raztopine vzorcev. Vsebnost železa v vzorcu določimo tako, da vzorcu dodamo raztopino fenantrolina in izmerimo absorbanco nastalega kompleksa pri absorpcijskem maksimumu.

Nasvet:

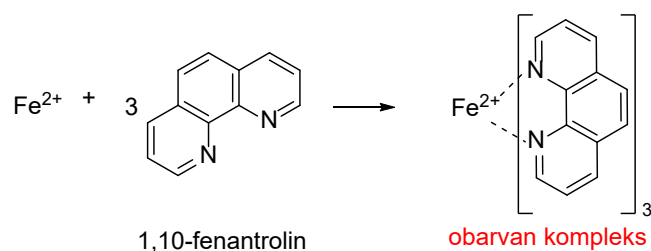
Pred vajo si oglejte posnetek o pravilnem pipetiranju s polavtomatsko pipeto.

- <https://www.youtube.com/watch?v=QGx490kuKjg>



Princip določanja vsebnosti železa:

Železo(III) v prisotnosti hidroksilamonijevega klorida reduciramo v železo(II), ki s fenantrolinom tvori stabilen obarvan kompleks z absorpcijskim maksimumom pri $\lambda = 510 \text{ nm}$.



b) Priprava osnovnih raztopin

0,1 % Raztopina fenantrolina: Natehtamo 250,0 mg fenantrolinijevega monohidrata, ga prenesemo v 250,0 mL bučko, dodamo 200 mL vode R in soniciramo v ultrazvočni kadički, dokler se ves fenantrolin ne raztopi (približno 10 minut). Nato dodamo vodo R do oznake ter dobro premešamo.

10 % raztopina hidrosilamonijevega klorida: V 50,0 mL bučko natehtamo 5,0 g hidrosilamonijevega klorida ($\text{NH}_2\text{OH} \times \text{HCl}$), dopolnimo z vodo R do oznake in dobro premešamo, da dobimo bistro raztopino.

Pufrska raztopina natrijevega acetata pH 4,8: V 250,0 mL bučko natehtamo 25,0 g natrijevega acetata, bučko dopolnimo z vodo R do oznake in dobro premešamo, da dobimo bistro raztopino.

c) Priprava standardnih raztopin železovega(III) klorida heksahidrata ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$)

Standard: železov(III) klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$).

1. V 100,0 mL bučko natehtamo količino standarda, ki ustreza 100 mg železa, nato dodamo 10 mL vode R in 10 mL konc. HCl (37 %). Premešamo in soniciramo 10 minut v ultrazvočni kadički, ohladimo, dopolnimo z vodo R do oznake in dobro premešamo (**raztopina standarda 1**, $c = 1 \text{ mg/mL}$).
2. 5,0 mL pripravljene raztopine standarda 1 odpipetiramo v 50,0 mL bučko, dopolnimo z vodo R do oznake in dobro premešamo (**raztopina standarda 2**, $c = 0,1 \text{ mg/mL}$).
3. V 20,0 mL bučko natočimo približno 10 mL vode R ter pripravljene raztopine v naslednjem zaporedju: X μL raztopine standarda 2; 200,0 μL 10 % raztopine hidrosilamonijevega klorida; 2,0 mL 0,1 % raztopine fenantrolina in 1,6 mL pufrske raztopine natrijevega acetata ter dopolnimo z vodo R do oznake in dobro premešamo.
 $X = 0,0 \mu\text{L}$ (slepa); 200,0 μL ; 400,0 μL ; 600,0 μL ; 800,0 μL ; 1000,0 μL
4. Počakamo 10 minut, nato pripravljenim raztopinam izmerimo absorbanco pri absorpcijskem maksimumu kompleksa ($\lambda = 510 \text{ nm}$).

d) Priprava raztopin vzorcev

1. V 100,0 mL bučko odmerimo volumen vzorca (sirupa), ki ustreza 100 mg železa(III), dodamo 10 mL vode R in 10 mL koncentrirane klorovodikove kisline (37 %), premešamo ter soniciramo 10 minut v ultrazvočni kadički z vodo, segreto na 90 °C. Raztopino nato ohladimo na sobno temperaturo, dopolnimo z vodo R do oznake in dobro premešamo (**raztopina vzorca 1**). Vsebnost izvajamo v treh paralelkah (pripravimo tri raztopine vzorca 1) ter ustrezen vzorec brez sirupa (slepi vzorec).
2. Pripravljeno raztopino vzorca 1 po potrebi filtriramo (če je v raztopini prisotna oborina, prvih nekaj mL filtrata zavržemo), nato v 50,0 mL bučko odpipetiramo 5,0 mL filtrata, dopolnimo z vodo R do oznake in dobro premešamo (**raztopina vzorca 2**).
3. V 20,0 mL bučko nalijemo 10 mL vode R ter dodamo pripravljene raztopine v naslednjem zaporedju: 800,0 μL raztopine vzorca 2; 200,0 μL 10 % raztopine hidrosilamonijevega klorida; 2,0 mL 0,1 % raztopine fenantrolina in 1,6 mL pufrske raztopine natrijevega acetata ter dopolnimo z vodo R do oznake in dobro premešamo.
4. Počakamo 10 minut, nato pripravljeni raztopini izmerimo absorbanco pri absorpcijskem maksimumu kompleksa ($\lambda = 510 \text{ nm}$).

e) Izračun

Iz izračunanih koncentracij in izmerjenih absorbanc standardnih raztopin narišemo umeritveno krivuljo ter določimo enačbo umeritvene premice. Enačbo umeritvene premice nato uporabimo za izračun vsebnosti železa(III) v sirupu.

Vsebnost železa(III) v sirupu izračunamo še s pomočjo molarne absorpcijskega koeficienta za kompleks železa(II) s fenantrolinom ($\epsilon = 11000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in primerjamo oba rezultata.

Zahteva za vsebnost železa(III) v sirupu: 95–105 % navedene vsebnosti.

Literatura

- D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, and S. R. Crouch, Analytical Chemistry: An Introduction, 7th ed., Chapters 21 and 22, pp. 547–592.

POROČILO

Določanje vsebnosti železa(III) v sirupu

Vzorec: -----

Serijska: -----

Datum proizvodnje: -----

Proizvajalec: -----

Rezultati analize in izračun:

Natehta $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ [mg]:

Meritve:

koncentracija Fe(III) [mg/mL]	$A_{\text{izmerjena}}$

Enačba umeritvene premice:

Izračun:

$\overline{\text{vsebnost}} =$

RSD [%] =

Zahteva:

Vzorec: ustreza ne ustreza

Komentar:

Analizo opravil:

Datum:

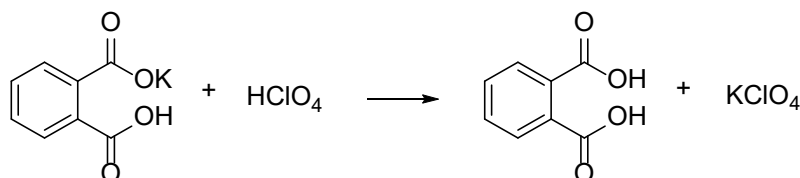
Pregledal:

4.2. TITRACIJE V BREZVODNEM MEDIJU: Vsebnost lidokainijevega klorida v raztopini za injiciranje

a) Opis vaje

Pripravimo 0,02 M perklorovo kislino in jo standardiziramo s primarnim standardom kalijevim hidrogen ftalatom RV po predpisu iz Ph. Eur. 11.2, nato pa določimo vsebnost lidokainijevega klorida v raztopini za injiciranje po prilagojenem postopku iz BP 2011.

Princip standardizacije perklorove kisline:



Nasvet:

Uporabljamo zgolj suho steklovino. Z diklorometanom delamo v digestoriju, steklovina naj bo pokrita s folijo. Odpadne raztopine, ki vsebujejo diklorometan oziroma ocatno kislino, zbiramo v ločeni posodi za odpadna topila.

b) Priprava in standardizacija 0,02 M perklorove kisline

0,1 M perklorova kislina (0.1 M Perchloric acid)

V merilno bučko, ki vsebuje približno 900 mL ledoceta R, damo 8,5 mL perklorove kisline R in premešamo. Dodamo 30 mL acetanhidrida R, razredčimo do 1000,0 mL ledocetom R, premešamo in pustimo stati 24 h.

Standardizacija: 0,350 g kalijevega hidrogenftalata RV raztopimo v 50 mL brezvodne ocatne kisline R in po potrebi rahlo segrejemo. Zaščiteno pred zrakom pustimo, da se ohladi in titriramo z 0,1 M perklorovo kislino, pri čemer kot indikator uporabimo 0,05 mL raztopine kristalno vijoličnega R. Upoštevamo temperaturo 0,1 M perklorove kisline v času titracije. Če se temperatura med analizo razlikuje od tiste, pri kateri je bila standardizirana 0,1 M perklorova kislina, upoštevamo naslednji korekcijski faktor za volumen, uporabljen v analizi:

$$V_c = V [1 + (T_1 - T_2) 0,0011]$$

T_1 = temperatura med standardizacijo

T_2 = temperatura med preskusom

V_c = popravljen volumen

V = določen volumen

1 mL 0,1 M perklorove kisline ustreza 20,42 mg $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$.

Opomba: 0,02 M perklorova kislina je že pripravljena.

Standardizacijo 0,02 M perklorove kisline izvedemo v 3 paralelkah, izvedemo tudi slepo titracijo.

Natehnamo 100,0 mg kalijevega hidrogenftalata (predhodno sušen pri 120 °C), ga raztopimo v 20 mL ledoceta (po potrebi rahlo segrejemo, da se kristali kalijevega hidrogenftalata *RV* raztopijo) in titriramo ob prisotnosti 0,05 mL (1 kapljica) raztopine indikatorja kristalno vijoličnega do modrozelenene barve.

c) Določanje vsebnosti lidokainijevega klorida v raztopini za injiciranje po prilagojenem postopku iz BP 2011

Injekcije z lidokainom

Zahtevana vsebnost: 95,0–105,0 % (računano na $C_{14}H_{22}N_2O \times HCl \times H_2O$)

Odpipetiramo 5,0 mL raztopine za injiciranje, dodamo 1 mL 2 M natrijevega hidroksida (pH preverimo s pH lističi) in ekstrahiramo s 3×20 mL diklorometana *R* (manj toksičen od kloroforma). Združene organske faze prenesemo v lij ločnik in ekstrahiramo z 10 mL vode *R*. Organsko fazo nato filtriramo skozi *Whatman PSI* filter (teflonski filter za fazno separacijo, ki ni prepusten za vodo), filter na koncu speremo z 10 mL diklorometana *R*.

Slepi vzorec: 60 mL diklorometana *R* ekstrahiramo z 10 mL vode *R*, filtriramo skozi *Whatman PSI* filter in speremo z 10 mL diklorometana *R*.

Organsko fazo titriramo z 0,02 M perklorovo kislino ob prisotnosti indikatorja raztopine kristalno vijoličnega *R* (1 kapljica).

1 mL 0,02 M perklorove kisline ustreza 5,776 mg $C_{14}H_{22}N_2O \times HCl \times H_2O$.

Določitev vsebnosti lidokainijevega klorida izvedemo v 3 paralelkah, izvedemo tudi slepo titracijo (1 ×).

Opomba: Pri izračunu vsebnosti lidokainijevega klorida bodite pozorni, saj je izračun vsebnosti po farmakopeji podan za lidokainijev klorid monohidrat.

Vprašanje

Zakaj raztopino za injiciranje z lidokainijevim kloridom najprej naalkalimo z 2 M natrijevim hidroksidom?

Literatura

- Evropska farmakopeja 11.2, poglavje 4.2.2. volumetrične raztopine
- Britanska farmakopeja 2009, monografija za injekcije z lidokainom

POROČILO

Titracije v brezvodnem mediju

Priprava in standardizacija 0,02 M perklorove kisline

Standard: -----

Serijska: -----

Datum proizvodnje: -----

Proizvajalec: -----

Rezultati analize:

	natehta $C_8H_5KO_4$ [mg]	poraba raztopine $HClO_4$ [mL]:	faktor (f) 0,02 M $HClO_4$
1			
2			
3			

Slepa (mL):

$$\bar{f} = \boxed{}$$

Izračun:

$$RSD [\%] =$$

Komentar:

Vsebnost lidokainijevega klorida

Vzorec: -----

Serijska: -----

Datum proizvodnje: -----

Proizvajalec: -----

Rezultati analize:

	volumen vzorca [mL]	poraba 0,02 M HClO ₄ [mL]	vsebnost [mg/mL]	vsebnost glede na navedeno vsebnost [%]
1				
2				
3				

Slepa (mL):

$$\overline{vsebnost} = \boxed{}$$

Izračun:

$$RSD [\%] =$$

Zahteva:

Vzorec: ustreza ne ustreza

Komentar:

Analizo opravil:

Pregledal:

Datum:

4.3. PLINSKA KROMATOGRAFIJA: Določanje vsebnosti D- α -tokoferola v mehkih želatinastih kapsulah

a) Opis vaje

S plinsko kromatografijo (GC) analiziramo vsebnost D- α -tokoferola v mehkih želatinastih kapsulah. Najprej natehtamo standarde in pripravimo ustrezne raztopine. Nato pripravimo vzorec in mu dodamo interni standard ter izvedemo analizo vsebnosti po prilagojenem postopku iz Ph. Eur. 11.2.

Opomba: Pri vaji mora biti vsa steklovina suha, po koncu vaje pa steklovine ne spiramo z vodo, ampak z acetonom.

b) Priprava raztopin standardov

– Raztopina internega standarda (IS)

V 50,0 mL bučko natehtamo 250 mg *skvalena R*, ga raztopimo v približno 35 mL *cikloheksana R*, dopolnimo s topilom do oznake in dobro premešamo.

($c_{\text{skv}} \sim 5 \text{ mg/mL}$)

– Raztopina D- α -tokoferola (α -Toc-OH)

V 20,0 mL bučko približno natančno natehtamo 100,0 mg standarda *D- α -tokoferola R*, ga raztopimo v približno 15 mL *cikloheksana R*, dopolnimo s topilom do oznake in dobro premešamo.

Standard *D- α -tokoferola* tehtamo tako, da najprej stariramo 20,0 mL bučko in nato čisto stekleno palčko ali spatulo pomočimo v standard. Viskozno tekočino, ki se oprime palčke ali spatule, prenesemo direktno v bučko in zapišemo maso. Natehtan standard nato s stene bučke speremo s *cikloheksanom R* iz puhalke in z istim topilom dopolnimo do oznake.

($c_{\alpha\text{-Toc-OH}} \sim 5 \text{ mg/mL}$)

– Raztopina α -tokoferilacetata (α -Toc-Ac)

V 20,0 mL bučko natehtamo približno 100 mg standarda *α -tokoferilacetata R*, ga raztopimo v približno 15 mL *cikloheksana R*, dopolnimo do oznake s *cikloheksanom R* in dobro premešamo.

($c_{\alpha\text{-Toc-Ac}} \sim 5 \text{ mg/mL}$)

– Raztopina standarda a (RSa)

V 25,0 mL bučko odmerimo 5,0 mL raztopine *D- α -tokoferola R* (α -Toc-OH) in 5,0 mL raztopine internega standarda (IS), dopolnimo do oznake s *cikloheksanom R* in dobro premešamo.

($c_{\alpha\text{-Toc-OH}} \sim 1 \text{ mg/mL}$, $c_{\text{skv}} \sim 1 \text{ mg/mL}$)

– Raztopina standarda b (RSb)

V 25,0 mL bučko odmerimo 5,0 mL raztopine *D- α -tokoferola R* (α -Toc-OH) in 5,0 mL raztopine *α -tokoferilacetata R* (α -Toc-Ac), dopolnimo do oznake s *cikloheksanom R* in dobro premešamo.

($c_{\alpha\text{-Toc-OH}} \sim 1 \text{ mg/mL}$, $c_{\alpha\text{-Toc-Ac}} \sim 1 \text{ mg/mL}$)

– Slepa: cikloheksan – (SL).

c) Priprava raztopine vzorca (RV)

Stehtamo 5 mehkih želatinskih kapsul. Kapsule nato previdno prebodemo z injekcijsko iglo. Iglo izvlečemo ter jih ponovno previdno prebodemo na drugi strani ter vsebino vseh petih kapsul s pomočjo injekcijske igle in brizge prenesemo v suho vialo.

Prazne kapsule damo v manjšo (50 ali 100 mL) čašo in vse skupaj postavimo v sušilnik pri 65 °C za 5 minut, da se kapsule nekoliko zmečajo. Kapsule nato previdno (držimo jih s pinceto!) prerežemo na dva dela, ki ju nad večjo čašo speremo s heksanom (vsebino čaše po spiranju zavržemo v odpadna topila). Čiste kapsule damo v manjšo suho čašo in jih ponovno postavimo za 5 minut v sušilnik (65 °C), da se posušijo. Nato jih ohladimo na sobno temperaturo ter stehtamo. Maso suhih kapsul odštejemo od začetne mase kapsul ter tako določimo maso vsebine kapsul.

V 25,0 mL bučko točno natehtamo vsebino kapsul, ki vsebuje približno 28,0 mg *D- α -tokoferola*, dodamo 10 mL *cikloheksana R* in 5,0 mL raztopine internega standarda (IS), premešamo, dopolnimo do oznake s *cikloheksanom R* in dobro premešamo. Tako pripravljeno raztopino filtriramo skozi 0,45 μm filter v 1,5 mL vialo za injiciranje.

($c_{\alpha\text{-Toc-OH}} \sim 1,1 \text{ mg/mL}$, $c_{\text{skv}} \sim 1 \text{ mg/mL}$)

Za pripravo vzorca za GC si oglejte posnetek na spodnji povezavi ali uporabite QR kodo za dostop.

- <https://video.arnes.si/watch/mjrjz30nf9n5>



d) Analiza vzorca

V kromatografski sistem zaporedoma injiciramo *slepo (SL)*, *raztopino standarda a (RSa)*, *raztopino standarda b (RSb)* in *raztopino vzorca (RV)*.

- Ustreznost kromatografskega sistema:

Ločljivost med vrhovoma D- α -tokoferola in α -tokoferilacetata v *raztopini standarda b* ne sme biti manjša od 3,5.

Kromatografski pogoji

Nosilni plin	helij, 3 mL/min
Kolona Zebron ZB-5MSi	dimenzije: 0,25 mm \times 30 m, stacionarna faza: silika gel 5 % fenil 95 % metil; 0,25 μ temperatura kolone: 290 °C
Detekcija	detektor s plamensko ionizacijo (<i>flame ionisation detector, FID</i>)
Volumen injiciranja	1 μ L
Način injiciranja	»split« (1:100)
Temperatura injektorja	320 °C
Čas analize	10 min

- Zahteva: vsebnost D- α -tokoferola 95,0–105,0 %.

Literatura

- Evropska farmakopeja 11.2, poglavje 2.2.28 plinska kromatografija.
- Evropska farmakopeja 11.2, poglavje 2.2.46 kromatografske separacijske tehnike.
- Evropska farmakopeja 11.2, poglavje 17, monografija za RRR- α -tokoferol.

POROČILO
Plinska kromatografija

Določanje vsebnosti D- α -tokoferola v mehkih želatinastih kapsulah

Vzorec: -----

Serijska: -----

Datum proizvodnje: -----

Proizvajalec: -----

Ustreznost kromatografskega sistema:

parameter	zahteva	rezultat
R		

Rezultati analize vsebnosti:

Izračun:

Zahteva:

Vzorec: ustreza ne ustreza

Komentar:

Analizo opravil:

Pregledal:

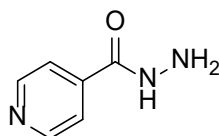
Datum:

4.4. TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI: Določitev vsebnosti izoniazida in nečistot v učinkovini

a) Opis vaje

S tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) določamo vsebnost izoniazida v učinkovini, ki so jo pripravili študentje na vajah iz Farmacevtske kemije 3 v prejšnjih študijskih letih. Pufer pripravimo po spodaj opisanem postopku, pripravimo tudi raztopino standarda, raztopino za preverjaje ustreznosti kromatografskega sistema in raztopino vzorca ter jih injiciramo v uravnotežen kromatografski sistem. Sledi analiza rezultatov in izračun vsebnosti.

Struktura izoniazida ($M_r = 137,14$):



b) Priprava pufrske raztopine in mobilne faze: 50 mM fosfatna pufrska raztopina pH 6,9

Za pripravo 500 mL pufru natehtamo 2,16 g dikalijevega hidrogenfosfata (K_2HPO_4) in 1,71 g kalijevega dihidrogenfosfata (KH_2PO_4), ju prenesemo v 500 mL erlenmajerico in raztopimo v približno 450 mL bidestilirane (MilliQ) vode.

pH preverimo s predhodno umerjenim pH metrom in po potrebi uravnamo pH pufru z dodatkom 5 % raztopine kalijevega hidroksida (KOH) oziroma 10 % raztopine fosforjeve(V) kisline (H_3PO_4). Po uravnavi pH ($pH = 6,85-6,94$) prenesemo pufer v 500 mL bučko in dopolnimo z bidestilirano (MilliQ) vodo do oznake. Za pripravo mobilne faze (50 mM fosfatna pufrska raztopina pH 6,9, metanol [95:5 V/V]) z merilnim valjem odmerimo ustrezno količino pufru in metanola (HPLC čistost) ter ju prenesemo v čisto 500 mL erlenmajerico, premešamo ter filtriramo skozi 0,45 μm filter v steklenico za HPLC topila. Približno 250 mL mobilne faze odlijemo v čisto erlenmajerico (potrebujemo za pripravo vzorcev in standardov), preostanek pa uporabimo kot mobilno fazo.

Za umerjanje elektrode pH metra in postopek priprave pufru si oglejte posnetka na spodnjih povezavah ali uporabite QR kodi.

- <https://video.arnes.si/en/watch/vpkyyyc7f75y>
- <https://video.arnes.si/en/watch/zdvt9dqr5ftr>



c) Priprava raztopin z izoniazidom in nečistot

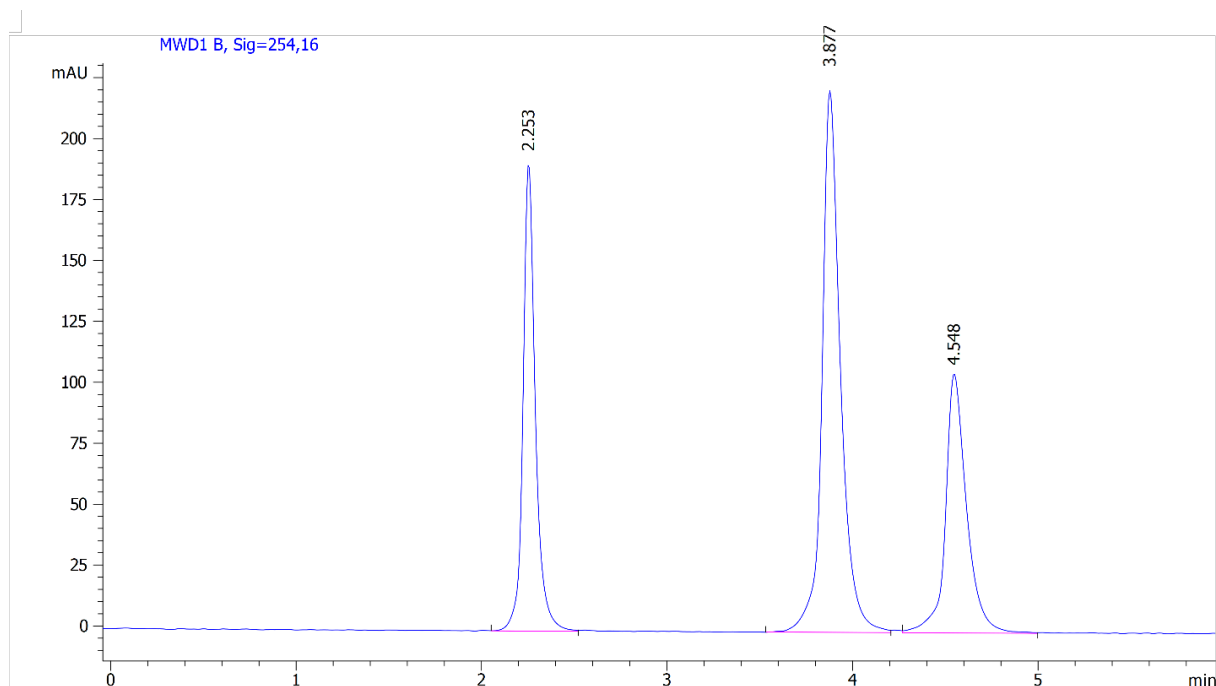
- Raztopina standarda: V 25,0 mL bučko približno natančno natehtamo 25,0 mg standarda *izoniazida* in dopolnimo do oznake z mobilno fazo (standard stock – **ST-stock**, $c_{ST-stock} \sim 1$ mg/mL). 5,0 mL tako pripravljene raztopine prenesemo v 50,0 mL bučko in dopolnimo do oznake z mobilno fazo. Raztopino filtriramo skozi 0,45 μ m filter v HPLC vialo – **ST**. ($c_{ST} \sim 0,1$ mg/mL)
- Raztopina vzorca: V 25,0 mL bučko približno natančno natehtamo 25,0 mg vzorca *izoniazida* in dopolnimo do oznake z mobilno fazo. 5,0 mL tako pripravljene raztopine prenesemo v 50,0 mL bučko in dopolnimo do oznake z mobilno fazo. Raztopino filtriramo skozi 0,45 μ m filter v vialo – **VZ**. ($c_{VZ} \sim 0,1$ mg/mL).
- Referenčna raztopina a: V 100,0 mL bučko dodamo 1,0 mL raztopine vzorca (**VZ**) ter dopolnimo z mobilno fazo do oznake – **RSa**. Raztopina za preverjanje kromatografskega sistema (SST): Natehtamo 5 mg *izonikotinske kisline* in 5 mg *izonikotinamida*, prenesemo v 50,0 mL bučko, dodamo 5,0 mL raztopine **ST-stock** (prva alineja) in dopolnimo do oznake z mobilno fazo – **SST**. ($c_{SST} \sim 0,1$ mg/mL).
- Slepa: mobilna faza – **SL**.

d) Analiza vzorca

- Ločevanje: v uravnotežen kromatografski sistem injiciramo 1 \times SL, 3 \times ST (iz iste vialo), 1 \times SST, 1 \times RSa in 1 \times VZ.
- Zahteva za vsebnost izoniazida: 95,0–105,0 %.
- Relativna retencija za izonikotinsko kislino znaša 0,61, za izoniazid 1,0 in za izonikotinamid 1,15 (Slika 7).

Kromatografski pogoji

Mobilna faza	50 mM KH ₂ PO ₄ , MeOH (95:5 v/v) (uporabimo enokanalni način)
Pretok	1 mL/min
Kolona	dimenzije: 4,6 \times 150 mm, stacionarna faza: <i>silika gel z vezanimi fenilnimi skupinami (Phenyl) za kromatografijo 3,5 μm</i> , temperatura kolone: 20–30 °C
Detekcija	spektrofotometrično pri 254 nm.
Volumen injiciranja	10 μ L
Čas analize	6 min



Slika 7: Kromatogram izoniazida in sorodnih substanc

– Ustreznost kromatografskega sistema:

- RSD površine kromatografskega vrha za izoniazid treh zaporednih injiciranj raztopine ST je manjši od 2,0 %.
- Resolucija med izoniazidom in izonikotinsko kislino je vsaj 3,0 in resolucija med izoniazidom in izonikotinamidom je vsaj 2,0 na kromatogramu, posnetem s SST.

– Sorodne substance:

Izračun vsebnosti nečistot:

- korekcijski faktorji: pomnožite površine vrhov naslednjih nečistot z ustreznim korekcijskim faktorjem: nečistota A = 1,4; nečistota B = 1,5;
- za vsako nečistoto uporabite **odziv** izoniazida v referenčni raztopini a:

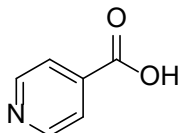
Nečistoti A in B v vzorcu (VZ) sta največ 0,15 %.

Vsaka druga nečistota v vzorcu (VZ) je največ 0,10 %.

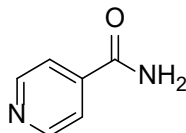
Seštevek vseh nečistot v vzorcu (VZ) ni več kot 0,5 %.

Nečistote:

Izonikotinska kislina:
(nečistota A)



Izonikotinamid:
(nečistota B)



Vprašanja

Kaj je izvor izonikotinske kisline in izonikotinamida?

Za kakšne spojine je primerna stacionarna faza s fenilnimi skupinami?

Na podlagi katerih interakcij poteka separacija?

Literatura

- Evropska farmakopeja 11.2, poglavje 4.1.3 pufrske raztopine.
- Evropska farmakopeja 11.2, poglavje 15, monografija za izoniazid.
- Evropska farmakopeja 11.2, poglavje 2.2.26 tekočinska kromatografija.
- Evropska farmakopeja 11.2, poglavje 2.2.46 kromatografske separacijske tehnike.

POROČILO

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti: Vsebnost izoniazida in nečistot v učinkovini

Vzorec: -----
Serijska: -----
Datum proizvodnje: -----
Proizvajalec: -----

Ustreznost kromatografskega sistema:

parameter	zahteva	rezultat
R		
T		
RSD		

Rezultati analize vsebnosti:

Izračun:

Zahteva:

Vzorec: ustreza ne ustreza

Komentar:

Analizo opravil:

Pregledal:

Datum:

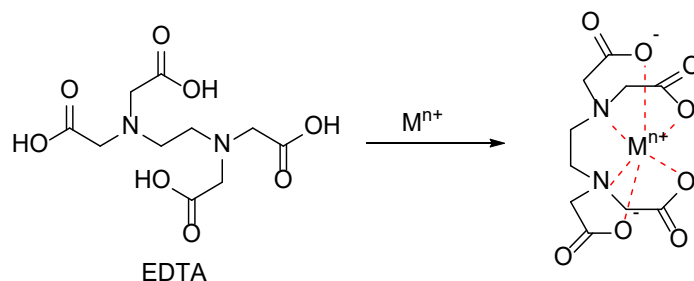
4.5. KOMPLEKSOMETRIJA: Priprava in standardizacija 0,05 M dinatrijevega edetata, priprava in standardizacija 0,05 M cinkovega sulfata ter vsebnost aluminijevega hidroksida in magnezijevega hidroksida v tabletah

a) Opis vaje

Pripravimo 0,05 M dinatrijev edetat (Na_2EDTA) in ga standardiziramo s primarnim standardom kalcijevim karbonatom RV. Pripravimo tudi 0,05 M cinkov sulfat, ki ga standardiziramo z 0,05 M raztopino Na_2EDTA . Vsebnost magnezijevega hidroksida in aluminijevega hidroksida v tabletah določimo po prilagojenem predpisu iz USP 43.

Princip kompleksometrije:

Pri kompleksometriji uporabljamo etilendiamintetraocetno kislino (EDTA), ki z dvo- ali trovalentnimi kationi tvori stabilne komplekse v stehiometričnem razmerju 1 : 1.



b) Priprava 0,05 M dinatrijevega edetata in 0,05 M cinkovega sulfata

500,0 mL 0,05 M dinatrijevega edetata in 250,0 mL 0,05 M cinkovega sulfata pripravimo po prilagojenem predpisu (spodaj) iz USP 43. Raztopini etilendiamintetraocetne kisline in cinkovega sulfata standardiziramo v 3 paralelkah, slepe titracije ne izvajamo.

0,05 M dinatrijev edetat (Edetate disodium, Twentieth-Molar (0.05 M))

$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 372,24

18,6 g Na_2EDTA R raztopimo v vodi R, da dobimo 1000 mL, in standardiziramo po sledečem postopku.

Približno natančno natehtamo 200 mg kelometričnega standarda – kalcijev karbonat, ki smo ga predhodno sušili pri 110 °C 2 uri in ohladili v eksikatorju, prenesemo ga v 400 mL čašo, dodamo 10 mL vode in zavrtimo, da nastane gosta suspenzija. S pipeto dodamo 2 mL razredčene klorovodikove kisline. Vsebino čaše zavrtimo, da se kalcijev karbonat raztopi. Z vodo speremo stene čaše ter zunanjo površino pipete in razredčimo z vodo na približno 100 mL. Med mešanjem raztopine, po možnosti z magnetnim mešalom, dodamo približno 30 mL 0,05 M dinatrijevega edetata iz 50 mL birete, nato dodamo 15 mL natrijevega hidroksida TS in 300 mg hidroksinaftolno modrega ter nadaljujemo s titracijo z 0,05 M dinatrijevim edetatom do modre končne točke.

$$M = \frac{(g \text{ CaCO}_3) \times (1000)}{100,09 \times \text{mL EDTA}}$$

0,05 M cinkov sulfat (Zinc Sulfate, Twentieth-Molar (0.05 M))

$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 287,56

14,4 g cinkovega sulfata R raztopimo v vodi R in premešamo, da dobimo 1 L. Raztopino standardiziramo po sledečem postopku.

Natančno odmerimo 10 mL 0,05 M dinatrijev edetat VS v 250 mL erlenmajerico in dodamo v navedenem vrstnem redu 10 mL pufrske raztopine očetna kislina-amonijev acetat TS, 50 mL alkohola in 2 mL ditizona TS. Titriramo z raztopino cinkovega sulfata do bistro rožnate barve.

$$M = \frac{\text{mL dinatrijev edetat} \times M \text{ dinatrijev edetat}}{\text{mL ZnSO}_4}$$

Za izvedbo vaje potrebujete še spodnje raztopine oziroma reagente:

Razredčena klorovodikova kislina (10 %) – Pripravimo jo z mešanjem 226 mL 37 % klorovodikove kisline z vodo do volumna 1000 mL.

Hidroksinaftolno modro – 100 mg hidroksinaftolno modrega R zmešamo z 10 g natrijevega klorida R in v terilnici homogeniziramo, da dobimo približno 1 % (m/m) zmes.

Natrijev hidroksid TS – 4,0 g natrijevega hidroksida raztopimo v vodi, da dobimo 100 mL in premešamo.

Pufrska raztopina očetna kislina-amonijev acetat TS – 77,1 g amonijevega acetata raztopimo v 500 mL vode R, dodamo 57 mL koncentrirane očetne kisline in razredčimo z vodo R do 1000 mL in premešamo.

Ditizon TS – 25,6 mg ditizona R raztopimo v 100 mL etanola R (96 % v/v) in premešamo. Hranimo na hladnem in porabimo v 2 mesecih.

Pufrska raztopina amonijak-amonijev klorid TS – 67,5 g amonijevega klorida raztopimo v vodi, dodamo 570 mL amonijevega hidroksida in dopolnimo do 1000 mL z vodo ter premešamo.

Eriokrom črno T – 200 mg eriokrom črno T raztopimo v mešanici 15 mL trietanolamina in 5 mL dehidriranega alkohola in premešamo.

c) Priprava vzorca

Vzorec: Gastal[®] 450 mg/300 mg tablete: 1 tableta vsebuje 95,26 mg Al^{3+} in 141,11 mg Mg^{2+} , kar ustreza 275 mg suhega $\text{Al}(\text{OH})_3$ in 340 mg $\text{Mg}(\text{OH})_2$

Zahtevana vsebnost: 90,0–110,0 % aluminijevega hidroksida in magnezijevega hidroksida

Na začetku stehamo in zdrobimo 5 tablet. Za pripravo osnovne raztopine natehemo v 250 mL bučko za reakcije maso tabletnega prahu, ki vsebuje približno 1200 mg aluminijevega hidroksida, dodamo 30 mL vode R in 30 mL koncentrirane klorovodikove kisline ter vrele kamenčke in segrevamo pri pogojih refluxa na grelni kaloti okoli 10 minut (v digestoriju).

Raztopino ohladimo in kvantitativno prenesemo v 200,0 mL bučko in dopolnimo z vodo do oznake (raztopina vzorca).

d) Določanje vsebnosti aluminijeva hidroksida

Vsebnost aluminijevega hidroksida izvajamo v 2 paralelkah (odpipetiramo 2 alikvota) in izvedemo slepo meritev. V 250 mL čašo odpipetiramo 10,0 mL raztopine vzorca, dodamo 20 mL vode *R* in med mešanjem dodamo 25,0 mL 0,05 M dinatrijevega edetata, 20 mL pufrske raztopine očetna kislina-amonijev acetat *TS* in segrevamo malo pod temperaturo vrenja 5 min. Ohladimo, dodamo 50 mL etanola (96 %) in 2 mL ditizona *TS* ter premešamo. Titriramo z 0,05 M cinkovim sulfatom, dokler se barva ne spremeni iz zeleno vijolične v rožnato. Slepo meritev izvedemo tako, da 10,0 mL raztopine vzorca zamenjamo za vodo *R*.

1 mL 0,05 M dinatrijevega edetata ustreza 3,900 mg Al(OH)₃.

e) Določanje vsebnosti magnezijevega hidroksida

Vsebnost magnezijevega hidroksida izvajamo v 2 paralelkah (odpipetiramo 2 alikvota) in izvedemo slepo meritev. Odpipetiramo 5,0 mL raztopine vzorca v 400 mL čašo, dodamo 200 mL vode *R* in 20 mL trietanolamina in premešamo. Dodamo 10 mL pufrske raztopine amonijak-amonijev klorid *TS* in 3 kapljice raztopine indikatorja eriokrom črno *T*. Raztopino ohladimo na 3–4 °C tako, da čašo potopimo v ledeno kopel, odstranimo z ledu ter titriramo z 0,05 M dinatrijevim edetatom do modre končne točke. Slepo meritev izvedemo tako, da 5,0 mL vzorca zamenjamo za vodo *R*.

1 mL 0,05 M dinatrijevega edetata ustreza 2,916 mg Mg(OH)₂.

Literatura

- Ameriška farmakopeja USP 43, monografija za tablete z aluminijem in magnezijem.
- Ameriška farmakopeja USP 43, Volume 4, poglavje volumetrične raztopine.

POROČILO

Kompleksometrija

Priprava in standardizacija 0,05 M dinatrijevega edetata

Standard: -----

Serijska: -----

Datum proizvodnje: -----

Proizvajalec: -----

Rezultati analize:

	natehta CaCO ₃ [mg]	poraba Na ₂ EDTA raztopine [mL]	koncentracija Na ₂ EDTA [M]	faktor (f) 0,05 M Na ₂ EDTA
1				
2				
3				

$$\bar{f} = \boxed{}$$

Izračun:

$$\text{RSD [\%]} =$$

Komentar:

Priprava in standardizacija 0,05 M cinkovega sulfata

Standard: -----

Serijska: -----

Datum proizvodnje: -----

Proizvajalec: -----

Rezultati analize:

	volumen 0,05 M Na ₂ EDTA [mL]	poraba ZnSO ₄ raztopine [mL]	koncentracija ZnSO ₄ [M]	faktor (f) 0,05 M ZnSO ₄
1				
2				
3				

$$\bar{f} = \boxed{}$$

Izračun:

$$\text{RSD [\%]} =$$

Komentar:

Vsebnost aluminijevega hidroksida

Vzorec: -----

Serijska: -----

Datum proizvodnje: -----

Proizvajalec: -----

Rezultati analize:

	natehta vzorca [mg]	poraba 0,05 M ZnSO ₄ [mL]	vsebnost [mg]	vsebnost glede na navedeno vsebnost [%]
1				
2				

Slepa [mL]:

$\overline{vsebnost} =$

Izračun:

RSD [%] =

Zahteva:

Vzorec: ustreza ne ustreza

Komentar:

Analizo opravil:

Pregledal:

Datum:

Vsebnost magnezijevega hidroksida

Vzorec: -----

Serijska: -----

Datum proizvodnje: -----

Proizvajalec: -----

Rezultati analize:

	natehta vzorca [mg]	poraba 0,05 M Na ₂ EDTA [mL]	vsebnost [mg]	vsebnost glede na navedeno vsebnost [%]
1				
2				

Slepa [mL]:

$$\overline{vsebnost} = \boxed{}$$

Izračun:

$$RSD [\%] =$$

Zahteva:

Vzorec: ustreza ne ustreza

Komentar:

Analizo opravil:

Pregledal:

Datum:

4.6. UV-VIS SPEKTROSKOPIJA: Identifikacija furosemida v tabletah in določanje enakomernosti vsebnosti furosemida v tabletah

a) Opis vaje

Enakomernost vsebnosti furosemida v odmernih enotah – tabletah določamo po prilagojenem postopku iz Eur. Ph. 11.2. Pripravimo raztopine desetih tablet, ki jim določimo vsebnost s pomočjo UV-Vis spektroskopije. Nato posnamemo UV spekter enega vzorca in izvedemo identifikacijo furosemida v tabletah po Britanski farmakopeji.

Preskus enakomernosti vsebnosti:

Preskus enakomernosti odmernih enot temelji na določanju vsebnosti učinkovine v posamezni odmerni enoti na vnaprej predpisanem številu odmernih enot. Z njim ugotovimo, če je vsebnost zdravilne učinkovine v posamezni odmerni enoti (tableti, kapsuli itd.) znotraj postavljenih meja.

Nasvet:

Za pravilno uporabo UV-Vis spektrometra si oglejte posnetek z navodili o uporabi ali uporabite QR kodo.

- <https://video.arnes.si/watch/2jyr2473jkld>

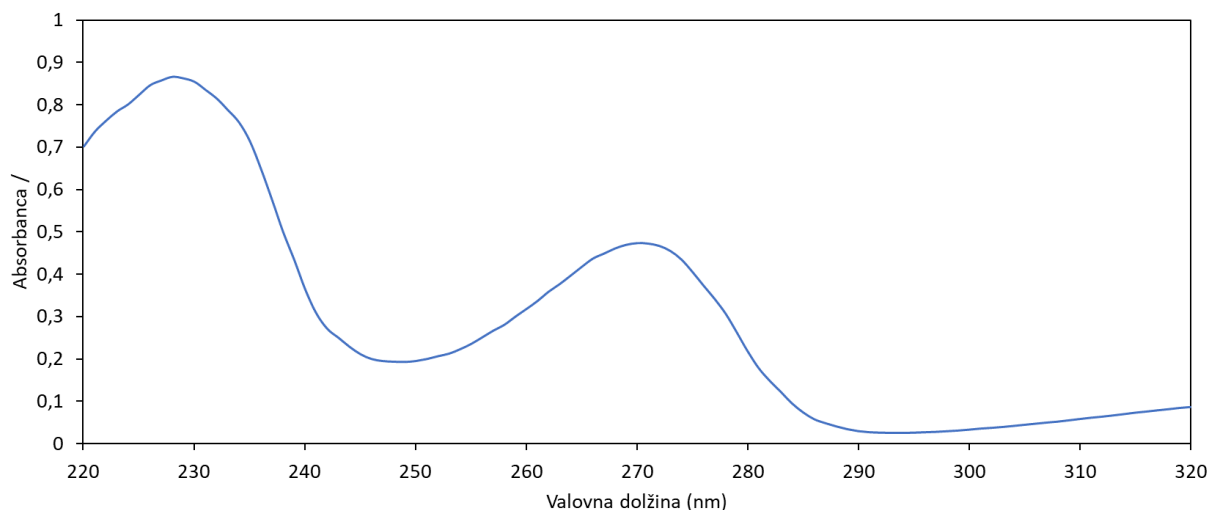


b) Identifikacija furosemida v tabletah

Furosemid tablete

IDENTIFIKACIJA

A. Absorpcija svetlobe, Dodatek II B, v območju med 220 in 320 nm ima končna raztopina, pripravljena pri preskusu vsebnosti, dva maksimuma pri 228 nm in 271 nm (Slika 8).



Slika 8: Spektar furosemida

b) Določanje enakomernosti vsebnosti furosemida

Najprej pripravimo 2 L *0,1 M natrijevega hidroksida*. Iz pretisnega omota vzamemo 10 tablet, jih vse skupaj stehamo in izračunamo povprečno maso tablete. Nato vsako posamezno tableto prenesemo v svojo 100,0 mL bučko, dodamo približno 40 mL *0,1 M natrijevega hidroksida*, stresamo, da tableta razpade, dopolnimo do oznake z *0,1 M natrijevim hidroksidom* in dobro premešamo. Počakamo 10 min, da se delci suspenzije posedejo, nato iz zgornjega bistrega dela raztopine s pipeto prenesemo 1,0 mL raztopine v 50,0 mL bučko in dopolnimo do oznake z *0,1 M natrijevim hidroksidom*. Tako pripravljene raztopine pomerimo absorbance pri 271 nm. Vsebnost za vsako izmed desetih tablet izračunamo s pomočjo specifične absorbance, ki pri 271 nm znaša 580.

Iz rezultatov posameznih vsebnosti izračunamo povprečno vsebnost (v odstotkih glede na navedeno vsebnost) ter ustreznost tablet glede na preskus enakomernosti vsebnosti.

Izračunamo sprejemljivo vrednost («Acceptance Value» [AV]) z uporabo spodnje enačbe in preglednice 4: $AV = |M - \bar{x}| + ks$.

Zahteve za enakomernost vsebnosti so izpolnjene, če je sprejemljiva vrednost (AV) za prvih 10 odmernih enot (tablet) manjša ali enaka *L1*. Če je sprejemljiva vrednost večja od *L1*, moramo preskus enakomernosti vsebnosti ponoviti še z 20 odmernimi enotami in ponovno izračunati sprejemljivo vrednost. Zahteve so izpolnjene, če je končna sprejemljiva vrednost vseh 30 odmernih enot manjša ali enaka *L1* in nobena posamezna vsebnost učinkovine ni manjša kot $(1 - L2 \times 0,01)M$ ali večja kot $(1 + L2 \times 0,01)M$. Če ni drugače določeno, je $L1 = 15$ in $L2 = 25$.

Preglednica 4: Izračun sprejemljive vrednosti (AV), povzeto po Eur. Ph. 11.2, poglavje 2.9.40. Enakomernost odmernih enot.

Spremenljivka	Definicija	Pogoj	Vrednost
\bar{X}	Povprečje posameznih vsebnosti (x_1, x_2, \dots, x_n), izraženo kot % glede na navedeno vrednost.		
x_1, x_2, \dots, x_n	Posamezne vsebnosti testiranih odmernih enot, izražene kot % glede na navedeno vsebnost.		
n	Velikost vzorca (število odmernih enot v vzorcu).		
k	Konstanta sprejemljivosti.	Če je število vzorcev 10.	2,4
		Če je število vzorcev 30.	2,0
s	Standardna deviacija vzorca.		$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$
M (primer 1) Ko je $T \leq 101,5$	Referenčna vrednost.	$98,5 \% \leq \bar{X} \leq 101,5 \%$	$M = \bar{X}$ ($AV = ks$)
		$\bar{X} < 98,5 \%$	$M = 98,5 \%$ ($AV = 98,5 - \bar{X} + ks$)
		$\bar{X} > 101,5 \%$	$M = 101,5 \%$ ($AV = \bar{X} - 101,5 + ks$)
M (primer 2) Ko je $T > 101,5$	Referenčna vrednost.	$98,5 \% \leq \bar{X} \leq T$	$M = X$ ($AV = ks$)
		$\bar{X} < 98,5 \%$	$M = 98,5 \%$ ($AV = 98,5 - \bar{X} + ks$)
		$\bar{X} > T$	$M = T \%$ ($AV = \bar{X} - T + ks$)
T	Ciljna vsebnost na odmerno enoto v času izdelave, izražena kot odstotek navedene vsebnosti. Če ni navedeno drugače, je T enak 100 % oziroma T definira proizvajalec kot ciljno vsebnost na odmerno enoto.		
$L1$	Maksimalna dovoljena AV.		$L1 = 15,0$ (če ni definirano drugače).
$L2$	Maksimalno dovoljeno območje raztrosa posamezne odmerne enote na osnovi izračunane vrednosti M .	Na spodnji strani vsebnosti ne sme biti nobena izmed odmernih enot manjša od 0,75 M , na zgornji strani pa ne sme biti nobena izmed odmernih enot večja od 1,25 M .	$L2 = 25,0$ (če ni definirano drugače).

Vprašanja

Zakaj smemo tehtati tablete na precizni tehtnici, glede na to, da gre za vzorec?

Ali je potrebno glede na zahteve Evropske farmakopeje opraviti preskus na enakomernost vsebnosti (*Content uniformity*) za tablete s furosemidom, ki ste jih analizirali pri vajah?

Ali je glede na monografijo Enakomernost odmernih enot »2.9.40 *Uniformity of dosage forms*« možen oziroma dovoljen kakšen drug preskus?

Literatura

- Evropska farmakopeja 11.2, poglavje 2.9.40. enakomernost odmernih enot.
- Britanska farmakopeja 2009, volumen 3, monografija za tablete s furosemidom.

POROČILO
UV-Vis spektroskopija

Preskus enakomernosti vsebnosti furosemida v tabletah

Standard: -----

Serijska: -----

Datum proizvodnje: -----

Proizvajalec: -----

Rezultati preskusa enakomernosti odmernih enot:

Tableta:	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	x_7	x_8	x_9	x_{10}
Vsebnost (%)										
\bar{X} (%)										
s										
$M (T = 100)$										
AV										
LI										

Izračun za 1 vzorec:

Zahteva:

Vzorec: ustreza ne ustreza

Komentar:

Identifikacija furosemida v tabletah

Standard: -----

Serijska: -----

Datum proizvodnje: -----

Proizvajalec: -----

Rezultat analize:

Zahteva:

Vzorec: ustreza ne ustreza

Komentar:

Analizo opravil:

Pregledal:

Datum:

4.7. TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI: Določitev vsebnosti sulfametoksazola in nečistot v učinkovini

a) Opis vaje

Vsebnost sulfametoksazola v učinkovini, ki so jo sintetizirali študentje na vajah iz Farmacevske kemije 3, določamo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Najprej pripravimo pufer in mobilno fazo ter začnemo uravnateževati HPLC sistem, nato po opisanem postopku pripravimo raztopine standarda in vzorca ter jih injiciramo v uravnotežen sistem. Sledi analiza rezultatov in izračun vsebnosti.

Struktura sulfametoksazola ($M_r = 253,28$): Nečistota A:



Za umerjanje elektrode pH metra in pripravo pufru za mobilno fazo si oglejte videa s praktičnim prikazom na spodnjih povezavah ali uporabite QR kodi.

- <https://video.arnes.si/watch/vpkyyyc7f75y>
- <https://video.arnes.si/watch/zdvt9dqr5firt>



b) Priprava pufrske raztopine amonijevega acetata pH 6,9 za mobilno fazo (20 mM NH₄AcO, pH 6,9, 500 mL)

Za pripravo pufru najprej izračunamo zahtevano maso amonijevega acetata (NH₄AcO), asistent preveri pravilnost izračuna, nato NH₄AcO prenesemo v 500 mL erlenmajerico in raztopimo v približno 450 mL *bidestilirane (MilliQ) vode*. pH preverimo z umerjenim pH metrom in po potrebi uravnamo pH pufru z dodatkom 5 % raztopine amonijaka oz. 5 % raztopine očetne kisline (pH 6,85–6,94). Pufer prenesemo v 500 mL bučko, dopolnimo do oznake z *bidestilirano (MilliQ) vodo*, dobro premešamo, filtriramo skozi 0,45 μm filter. Približno 150 mL pufru odlijemo v čisto 250 mL erlenmajerico, ker ga potrebujemo za pripravo vzorcev, preostanek prelijemo v steklenico za HPLC in nastavimo ustrezen kanal.

c) Priprava raztopin s sulfametoksazolom in nečistotami

- Raztopina standarda: V 25,0 mL bučko natehtamo 25,0 mg standarda *sulfametoksazola* in dopolnimo do oznake z *metanolom R*. 5,0 mL tako pripravljene raztopine prenesemo v 50,0 mL merilno bučko in dopolnimo do oznake s *pufirsko raztopino amonijevega acetata pH 6,9*. Raztopino filtriramo skozi 0,45 µm filter v HPLC vialo. Raztopino označimo z oznako **ST**.
- Raztopina vzorca: V 25,0 mL merilno bučko natehtamo 25,0 mg vzorca *sulfametoksazola* in dopolnimo do oznake z *metanolom R*. 5,0 mL tako pripravljene raztopine prenesemo v 50,0 mL merilno bučko in dopolnimo do oznake s *pufirsko raztopino amonijevega acetata pH 6,9*. Raztopino filtriramo skozi 0,45 µm filter v HPLC vialo in jo označimo z oznako **VZ**.
- Raztopina za preskus ustreznosti kromatografskega sistema: raztopina nečistote A in *sulfametoksazola* s koncentracijo 0,1 mg/mL je že pripravljena. Označimo jo z oznako **SST**.
- Slepa: v 10,0 mL bučko odmerimo 1,0 mL *metanola* in dopolnimo do oznake s *pufirsko raztopino amonijevega acetata pH 6,9*. Raztopino filtriramo skozi 0,45 µm filter v HPLC vialo in jo označimo z oznako **SL**.

d) Izvedba analize

- Ločevanje: V uravnotežen kromatografski sistem injiciramo 3 × ST (iz iste vialo), 1 × SST, 1 × SL in 1 × VZ.
- Zahteva: vsebnost sulfametoksazola: 95,0–105,0 %
- Zahteve za vsebnost nečistot:
 - Nečistota A v vzorcu (VZ) največ 0,1 % površine kromatografskega vrha (*area under curve*) signala za sulfametoksazol v vzorcu (VZ).
 - Vsaka druga nečistota v vzorcu (VZ) največ 0,1 % površine kromatografskega vrha signala za sulfametoksazol v vzorcu (VZ).
 - Seštevek vseh nečistot v vzorcu (VZ) ne več kot 0,3 % površine kromatografskega vrha signala za sulfametoksazol v vzorcu (VZ).

Kromatografski pogoji

Mobilna faza	20 mM NH ₄ AcO, MeOH (90:10 V/V) (uporabimo dvokanalni način)
Pretok	1 mL/min
Kolona	dimenzije: 4,6 × 150 mm, stacionarna faza: <i>oktadecilsilil silika gel (C18)</i> za kromatografijo 3,5 µm, temperatura kolone: 40 °C
Detekcija	spektrofotometrično pri 254 nm za vsebnost in ustreznost kromatografskega sistema ter 210 nm za vsebnost nečistot.
Volumen injiciranja	10 µL
Čas analize	9 min

- Zahteve za ustreznost kromatografskega sistema:
 - RSD površine kromatografskega vrha za sulfametoksazol treh zaporednih injiciranj raztopine ST je največ 2 %.
 - Resolucija med nečistoto A in sulfametoksazolom na kromatogramu posnetem s SST je več kot 3,5.

Vprašnji

Kaj je izvor nečistote A?

Zakaj imamo različni valovni dolžini za določanje vsebnosti in nečistot?

Literatura

- Evropska farmakopeja 11.2, poglavje 2.2.26 tekočinska kromatografija.
- Evropska farmakopeja 11.2, poglavje 2.2.46 kromatografske separacijske tehnike.

Vsebnost sulfametoksazola in nečistot v učinkovini

Vzorec: -----

Serijska: -----

Datum proizvodnje: -----

Proizvajalec: -----

Ustreznost kromatografskega sistema:

parameter	zahteva	rezultat
R		
T		
RSD		

Rezultati analize vsebnosti:

Izračun:

Zahteva:

Vzorec: ustreza ne ustreza

Komentar:

Analizo opravil:

Pregledal:

Datum:

4.8. TEORETIČNA VAJA: Določitev vsebnosti učinkovine v snovi za farmacevtsko uporabo

a) Opis vaje

Ta vaja je namenjena preverjanju razumevanja postopkov, opisanih v Evropski, Ameriški oziroma Britanski farmakopeji za analizo vsebnosti učinkovine v različnih snoveh za farmacevtsko uporabo. Tako kot v industriji bomo pripravili standardni postopek analize (SOP), ki mora biti razumljiv in natančen, da ga lahko v laboratoriju izvede tudi manj izkušen tehnik.

Nasvet:

Postopek lahko napišete na podoben način, kot so podana navodila za posamezno vajo.

b) Navodila za izdelavo teoretične vaje

Vsaki skupini na vajah bo asistent dodelil posamezno učinkovino, ki jo bo treba analizirati po postopku, opisanem v izbrani farmakopeji.

Najprej dobro preberite navodila za analizo učinkovine v farmakopeji. Navodila prevedite v jasno slovenščino in po korakih opišite postopek analize vsebnosti vzorca. Če je treba za analizo učinkovine pripraviti volumetrične raztopine, opišite postopek priprave teh raztopin in postopek standardizacije, prav tako poiščite in opišite postopek priprave različnih reagentov, ki jih potrebujete za analizo učinkovine. V postopku jasno definirajte, katero laboratorijsko opremo boste potrebovali. Natančno opišite, na kateri tehtnici boste tehtali vzorce (analitska ali precizna ter zakaj), standarde oziroma reagente in katero steklovino boste potrebovali za pripravo posameznih raztopin (erlenmajerica, merilna bučka, merilni valj, pipeta – merilna ali polnilna).