Региональная конференция по научно-техническому творчеству школьников

«Лабиринты науки»

Секция ХИМИЯ

Исследовательская работа

«ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА НА ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МЕТИЛОВОГО ЭФИРА САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ В МЯГКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ»

Работу выполнил –
ученик 11 «Ф» класса лицея № 86 г. Ярославля
Репкин Петр Иванович

Руководитель –
Специалист дирекции по биотехнологическим проектам АО ГК «Р-ФАРМ»
Камнева Анастасия Анатольевна

Ярославль 2023

Содержание

1. Введение: *3*

2. Основная часть *4*

2.1. Литературный обзор **4**

2.2. Практическая часть **5**

2.2.1. Подготовка к проведению определений **5**

2.2.2. Определение аналитической области методики и линейности. **6**

2.2.3. Оценка специфичности методики **7**

2.2.4. Оценка прецизионности и правильности метода **7**

2.2.5. Проведение анализа препаратов при выбранных условиях **9**

2.2.6. Оценка вариативности условий анализа **10**

3. Заключение *10*

Список использованных источников *11*

Приложение 1. ..... *12*

Приложение 2. ..... *13*

Приложение 3. ..... *14*

Приложение 4. ..... *15*

Приложение 5. ..... *16*

Приложение 6. ..... *17*

Приложение 7. ..... *18*

Приложение 8. ..... *19*

Приложение 9. ..... *20*

Приложение 10. ..... *Ошибка! Закладка не определена.*

1. **Введение:**

В данной работе рассмотрен процесс валидации, предложенной ранее (в исследовательской работе за 2022 год), методики количественного анализа на содержание метилового эфира салициловой кислоты (метилсалицилата, МС) в мягкой лекарственной форме.

Актуальность выбранной темы заключается в необходимости доказать соответствие разработанной методики требованиям системы менеджмента качества на производстве.

Наша исследовательская работа решает **проблему** обеспечения аналитических лабораторий, контролирующих качество производимых продуктов, более точными, быстрыми, современными методами анализа, которые могут быть частично автоматизированы.

Практическая значимость работы заключается в возможности предложить производству новый, точный и высокотехнологичный метод, обладающий рядом преимуществ, по сравнению с предложенным в фармакопее РФ анализом.

Целью работы является осуществление процесса валидации методики количественного анализа метилового эфира салициловой кислоты по основным критериям, приведенным в регламентирующих нормативных документах.

Для достижения цели работы были поставлены следующие **задачи**:

1. Продумать и поставить эксперименты, доказывающие селективность, специфичность, правильность и устойчивость методики.
2. Провести необходимое количество экспериментов и математические расчеты для установления прецизионных параметров методики и границ аналитической области методики.
3. Систематизировать и проанализировать полученные результаты; сделать выводы о каждом аспекте валидационного процесса.

4. Разработать проект методики для проведения количественного анализа на содержание метилового эфира салициловой кислоты в мягких лекарственных формах.

В процессе выполнения цели и задач использовались следующие **методы исследования**: эксперимент, наблюдение, сравнение, измерение и абстрагирование.

2. Основная часть

2.1. Литературный обзор

Валидация - сложный и кропотливый процесс, который показывает практическую применимость методики и целесообразность ее использования. Проведение процесса валидации позволяет установить такие параметры, как специфичность, предел обнаружения, предел количественного определения, аналитическая область методики, линейность, правильность, прецизионность и устойчивость. Критерии, по которым оцениваются методики в процессе валидация зависят от целей их использования и характера определяемых веществ [1].

Все виды анализа можно разделить на две большие группы: количественное определение и проверка подлинности (качественное определение). Методики для количественного определения в свою очередь подразделяются на определение содержания примесей и собственно количественное определение основного вещества (или компонентов) [2].

Процесс валидации регламентируется документом ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [4].

Параметры, которые оценивались нами при стандартизации методики и объяснение их значения приведены далее:

1. *Специфичность* должна быть подтверждена с целью доказательства отсутствия влияния на результаты определения некоторых количеств сопутствующих компонентов, содержащихся в анализируемом объекте.

2. *Аналитическая область методики* – это диапазон определяемых величин (массовая или молярная концентрации, процентное содержание, масса и тд), при которых наблюдается хорошая повторяемость экспериментальных данных.
3. *Линейность* – это линейная зависимость содержания определяемого компонента от аналитического сигнала, характер которого зависит от метода анализа (оптическая плотность, показатель преломления, электропроводность и тд) [3].
4. *Правильность* методики подтверждается путем сравнения усредненного значения, полученного из множества экспериментальных данных с истинным значением. Методика признается правильной, если истинные значения лежат в доверительном интервале полученных экспериментально соответствующих средних результатов.
5. *Прецизионность* характеризует степень разброса результатов каждого отдельного определения относительно среднего результата, полученного из большого числа экспериментов.
6. *Устойчивость* – способность сохранения определенных экспериментально характеристик при небольших отклонениях во внешних условиях (температура, влажность, давление, работа дистиллятора).

Перечень параметров был выбран в соответствии с регламентирующим документом (ОФС.1.1.0012.15) для методик количественного определения основного действующего вещества, нормируемых компонентов [4].

2.2. Практическая часть

2.2.1. Подготовка к проведению определений

Определение проводилось спектрофотометрическим методом, в основе которого лежит качественная реакция фенольной функциональной группы с ионами трехвалентного железа [3]. Для проведения анализа были приготовлены следующие растворы (приложение 1, таблица 1):

1. Стандартный раствор салициловой кислоты 3 мг/см^3 (в воде)
2. Стандартный раствор метилового эфира салициловой кислоты 3 мг/см^3 (в изопропиловом спирте)
3. Раствор хлорида железа (III) 6-водн. 2% (в воде)
4. Стандартный раствор метола 2 мг/см^3 (в изопропиловом спирте).

Также была осуществлена эквивалентная пробоподготовка каждого образца мягкой лекарственной формы: рассчитанная навеска лекарственного препарата была растворена, количественно перенесена в мерную колбу и отфильтрована через мембранные фильтры 0.22 μm (приложение 2, рисунок 1).

2.2.2. Определение аналитической области методики и линейности.

Для определения аналитической области методики был приготовлен ряд стандартных растворов в мерных колбах на 50,00 см^3, имеющий широкий разброс концентраций МС в трех повторностях. Каждый раствор был измерен на спектрофотометре после добавления 2,00 см^3 раствора хлорида железа (III) и выдержки 10 мин при выбранных условиях: кювета 10 мм, длина волны 530 нм (по данным работы 2022 года). По полученных данным (приложение 3, таблица 2) были построены графики зависимости оптической плотности (А) от концентрации МС на всей области концентраций и, отдельно в области низких, средних и высоких концентраций (приложение 4-5, рис. 2-5).

Из графиков видно, что в областях низких и высоких концентраций коэффициенты корреляции значительно ниже и не удовлетворяет требованиям, регламентирующим приемлемость градуировочной характеристики. Это связано с низкими и высокими значениями оптических плотностей, выходящих из рекомендуемого диапазона. Также, в области высоких концентраций наблюдается рост межмолекулярных взаимодействий, которое приводит к отсутствию линейной зависимости оптической плотности от концентрации, что хорошо прослеживается в тренде на занижение значений оптической плотности последних концентрированных растворов.

Вывод. За рабочий диапазон концентраций МС следует принять интервал (0,06-0,90) мг/см^3 (см. рис 5, приложение 5), на котором линейность зависимости подтверждается значением коэффициента корреляции, равным 0,9984.

2.2.3. Оценка специфичности методики

В преобладающем количестве мазей на основе МС (механизм местного действия) присутствует метол, который оказывает успокаивающее и охлаждающее действие на кожу. Массовое содержание метола по отношению к содержанию МС варьируется в подобранных препаратах от 1:1,50 (Бом-Бенге) до 1:5,2 (Бенгей), соответственно (приложение 2). В фармакопейной статье приведена методика совместного определения метола и МС.

Для того, чтобы подтвердить селективность методики фотометрического определения МС, мы приготовили стандартный раствор метола, в концентрации в 1,5 раза меньшей, чем концентрация МС. Разбавили раствор до концентрации 1 мг/см^3 в мерной колбе на 50,00 см^3, добавили 2,00 см^3 раствор железа 2% и измерили значение оптической плотности после выдержки в 10 минут по отношению к раствору сравнения (раствор, который содержит только дистиллированную воду и хлорид железа) при выбранных условиях: кювета 10 мм, длина волны 530 нм. Визуально появление окраски не наблюдалось, что подтвердилось нулевым значением оптической плотности на приборе.

Вывод. Доказана избирательность методики по отношению к определяемому компоненту в мягкой лекарственной форме.

2.2.4. Оценка прецизионности и правильности метода

Определив диапазон рабочих концентраций и подтвердив отсутствие мешающего влияния основных компонентов лекарственной формы, мы провели 10 одинаковых экспериментов в одной лаборатории, одним оператором, с использованием одного и того же аналитического инструмента и исходных стандартных растворов. Градуировка состояла из 6 растворов с концентрациями МС 0,06; 0,12; 0,18; 0,24; 0,30 и 0,36 мг/см^3, которые

находятся в отобранной аналитической области (приложение 6, таблица 3). В качестве контрольного образца был выбран раствор МС, разбавленный до концентрации 0,25 мг/см^3 в мерных колбах вместимостью 50,00 см^3 и окрашенный при взаимодействии с раствором хлорида железа (III). Причем, к половине растворов было добавлено одинаковое количество метола, концентрация которого составила 0,15 мг/см^3 в каждой из колб.

Для каждой серии был построен график (приложение 6, рисунок 7), определено уравнение зависимости и коэффициент корреляции, по уравнению линии тренда рассчитаны значения концентрации МС в каждом образце. Полученные результаты расположили в ряд по возрастанию найденных концентраций (таблица 3).

Таблица 3. Значения концентраций контрольного образца, определенные экспериментально.

N	Без добавления метола					С добавлением метола				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Конц МС, мг/см^3	0,233	0,235	0,248	0,250	0,255	0,231	0,237	0,251	0,256	0,260
	Общий ряд возрастающих значений									
	0,231	0,233	0,235	0,237	0,248	0,250	0,251	0,255	0,256	0,260

Выполнили обработку полученного массива данных и определили метрологические характеристики методики (таблица 4). Расчетные формулы приведены в приложении 7 на рисунке 7 [5].

Таблица 4. Метрологические характеристики методики.

n	f	$\bar{x}$, мг/см^3	s^2	s, мг/см^3	Δx, мг/см^3	P, %	t(P,t)	ε, %	r, %
10	9	0,2459	0,00016	0,013	0,028	95,0	2,23	11,51	3,52

Где, n – число определений;

f – число степеней свободы (n-1);

$\bar{x}$ – среднее значение концентрации МС, мг/см^3;

s^2 – дисперсия (воспроизводимость методики);

s – стандартное отклонение от среднего результата;

Δx – полуширина доверительного интервала;

P – доверительная вероятность;

t – критерий Стьюдента;

ε – относительная ошибка среднего результата отдельного определения, полученного в двух повторениях;

r – предел относительной сходимости результатов двух параллельных определений, полученных в условиях повторяемости.

Вывод. Исходя из полученных данных о среднем значении и доверительном интервале, можно сделать вывод о правильности методики: истинное значение концентрации (0,25 мг/см^3) должно находиться в интервале ($\bar{x} \pm \Delta x$).

$0{,}25 \in (0{,}2179 - 0{,}2739)$, следовательно, правильность методики подтверждена.

Аналогичные опыты и вычисления были проведены для концентраций контрольных образцов 0,10 и 0,18 мг/см^3. Результаты представлены в приложении 7.

2.2.5. Проведение анализа препаратов при выбранных условиях

Две порции по 10,00 см^3 каждого из приготовленных растворов препаратов (смотри пункт 2.2.1) поместили в восемь мерных колб вместимостью 50,00 см^3. Добавили 2,00 см^3 раствора хлорида железа (III) и измерили при выбранных условиях после выдержки 10 минут. По полученным значениям оптических плотностей определили концентрацию МС в лекарственной форме. Все экспериментальные и расчётные данные представлены в таблице 5.

Таблица 5. Результаты определения концентрации МС в мягкой лекарственной форме.

Препарат	Средняя оптическая плотность	Конц-я разбавленная, мг/сд^3	Конц-я исходная, мг/см^3	Конц-я расчетная, мг	Δ, %
Бом-Бенге	0,729	0,1931	0,9655		3,45%

Бенгей	0,741	0,1966	0,9830	1,0000 мг/см^3	1,70%
Диклоран	0,754	0,2005	1,0025		0,25%
Апизартрон	0,696	0,1833	0,9165		2,35%

2.2.6. Оценка вариативности условий анализа

При выборе оптимальных условий анализа было обнаружено, что замена растворителя с воды на изопропиловый спирт влечет за собой изменение окраски определяемого соединения. Комплекс, имевший в водной среде фиолетовое окрашивание, при растворении в спирте становился грязно желтого цвета. Однако, интенсивность окраски монотонно возрастала при увеличении концентрации определяемого вещества в растворах. Следовательно, можно предполагать возможность проведения анализа в данных условиях. Но, детальное изучение этого процесса пока не проводилась.

В предыдущей работе мы декларировали о том, что теория допускает использование салициловой кислоты в качестве стандартных растворов, с последующим пересчетом концентрации по разнице молекулярных масс. По экспериментальным данным и полученным концентрациям МС в анализируемых препаратах, представленных в приложениях 8-9, можно сделать вывод, что это возможно. Но, объективно, ошибка эксперимента получается больше, чем в случае построения градуировочной зависимости по растворам МС.

3. Заключение

В процессе работы были продуманы и поставлены эксперименты, доказывающие селективность, специфичность и правильность методики; проведены математические расчеты по результатам многочисленных экспериментов для установления прецизионных параметров методики и границ аналитической области определения.

Все полученные данные систематизировали в таблицах и проанализировали; сделали выводы о каждом аспекте валидационного процесса.

Разработали проект методики для проведения количественного анализа на содержание метилового эфира салициловой кислоты в мягких лекарственных формах, который можно найти в приложении 10.

В продолжение работы предстоит выяснить, возможно ли проводить анализ в неводной среде (с образованием соединения желтого цвета), а также провести валидацию методики со стандартом в виде салициловой кислоты.

Список использованных источников

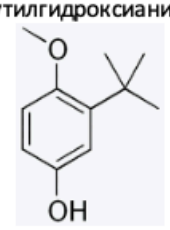
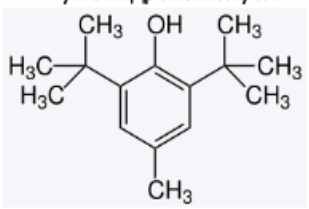
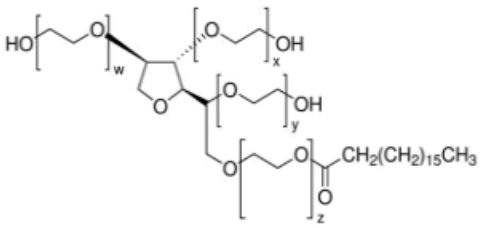
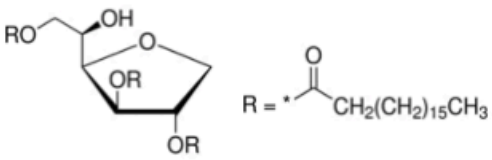
1. Валидация аналитических методик: пер. с англ. Яз. 2-го изд. Под ред. Г.Р. Нежиховского. Количественное описание неопределенности в аналитических измерений: пер. с англ. Яз. 3-го изд. Под. ред. Р.Л. Кадиса. Руководства для лабораторий. – СПб.: ЦОП «Профессия», 2016. – 312 с.
2. Основы аналитической химии. В 2 т. Т. 1: учеб. для студ. учреждений высш. проф. Образования / [Т.А. Большова и др.] ; под ред. Ю.А. Золотова. – 5-е изд., стер. – М. : Издательский центр «Академия», 2012. – 384 с.
3. Основы аналитической химии. В 2 т. Т. 2 : учеб. для студ. учреждений О-753 высш. проф. Образования/ [Н.В. Алов и др.] под ред. Ю.А.Золотова. — 5-е изд., стер. — М. : Издательский центр «Академия», 2012. — 416 с.
4. ОФС.1.1.0012.15 ГФ XIII "Валидация аналитических методик"
5. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств (методические рекомендации), Москва, 2007 (согласовано Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития Министерства здравоохранения и социального развития РФ, утверждено и введено в действие решением общего собрания членов Ассоциации Российских фармацевтических производителей от « 10 » августа 2007 г., протокол № 55) ISBN 5904723059, 9785904723057.

Приложение 1.
Таблица 1. Данные по приготовлению растворов.

<table>
<tr><th>Наименование</th><th>Объем, см^3</th><th colspan="2">Концентрация</th><th>Масса навески, г</th></tr>
<tr><td>Стандартный раствор салициловой кислоты</td><td>1000</td><td colspan="2" rowspan="2">3 мг/см^3</td><td>3,0000</td></tr>
<tr><td>Стандартный раствор метил-салицилата</td><td>1000</td><td>3,0000</td></tr>
<tr><td>Стандартный раствор метола</td><td>100</td><td colspan="2">2 мг/см^3</td><td>0,2000</td></tr>
<tr><td>Раствор хлорида железа 6-водн.</td><td>250</td><td colspan="2">2%</td><td>5,00</td></tr>
<tr><td rowspan="2"></td><td rowspan="2"></td><td>Исходная</td><td>Требуемая</td><td rowspan="2"></td></tr>
<tr><td>Бом-Бенге</td><td>50</td><td>20%</td><td rowspan="3">1 мг/см^3</td><td>0,2500</td></tr>
<tr><td>Бенгей</td><td>50</td><td>15%</td><td>0,3750</td></tr>
<tr><td>Диклоран</td><td>50</td><td>10%</td><td>0,5000</td></tr>
<tr><td>Апизартрон</td><td>50</td><td>10%</td><td>0,5000</td></tr>
</table>

Приложение 2.

Рисунок 1. Состав анализируемых препаратов

Наименование ЛС	Компоненты	Количество
Бом-венге (Тульская фармацевтическая фабрика)	Метилсалицилат	20,20%
	Ментол	3,90%
	Вазелин медицинский	68,90%
	Парафины нефтяные	7,00%
Диклоран + гель (Индия, Юник Фармасьютикал Лабораториз)	Диклофенак диэтиламина	1,16%
	Метилсалицилат	10,00%
	Ментол	5,00%
	Льняное масло	3,00%
	Карбомер	1,00%
	Пропиленгликоль	10,00%
	Вода	до 70%
	Бутилгидроксианизол 	0,02%
	Бутилгидрокситолуол 	0,20%
Бенгей крем (Франция, Янссен-Силаг)	Метилсалицилат	15,00%
	Ментол	10,00%
	Стеариновая кислота	13,00%
	Глицерил моностеарат	8,00%
	Ланолин безводный	2,00%
	Полисорбат 85 	2,00%
	Спан 65 	1,00%
	Триэтаноламин	1,00%
	Вода	48,00%
Апизортрон	Метилсалицилат	10%
	Аллилизотиоционат	1%
	яд пчелиный	0,00%
	Вазелин	6%
	Вода	до 70%

Приложение 3.

Таблица 2. Результаты измерения растворов для выбора аналитической области методики.

N	Конц МС, мг/см^3	Объем ст.р-ра МС, см^3	Серия 1		Серия 2		Серия 3		A ср
			A1	A2	A1	A2	A1	A2	
1	0,01	0,15	0,026	0,026	0,018	0,018	0,020	0,021	0,021
2	0,02	0,30	0,054	0,055	0,061	0,064	0,049	0,050	0,056
3	0,03	0,50	0,138	0,138	0,144	0,145	0,158	0,158	0,147
4	0,06	1,00	0,216	0,215	0,237	0,237	0,252	0,253	0,235
5	0,09	1,50	0,283	0,284	0,301	0,301	0,359	0,360	0,314
6	0,15	2,50	0,420	0,420	0,392	0,390	0,407	0,408	0,407
7	0,30	5,00	0,698	0,700	0,712	0,712	0,738	0,738	0,716
8	0,50	8,00	0,962	0,961	1,118	1,120	1,034	1,034	1,038
9	0,70	12,00	1,411	1,411	1,358	1,358	1,406	1,407	1,392
10	0,9	15,00	1,725	1,724	1,662	1,662	1,704	1,704	1,697
11	1,20	20,00	1,948	1,950	1,813	1,813	1,976	1,978	1,903
12	1,50	25,00	2,087	2,088	2,135	2,134	2,017	2,018	2,080

Приложение 4.

Рисунок 2. Зависимость оптической плотности от концентрации градуировочных растворов на всей области концентраций.

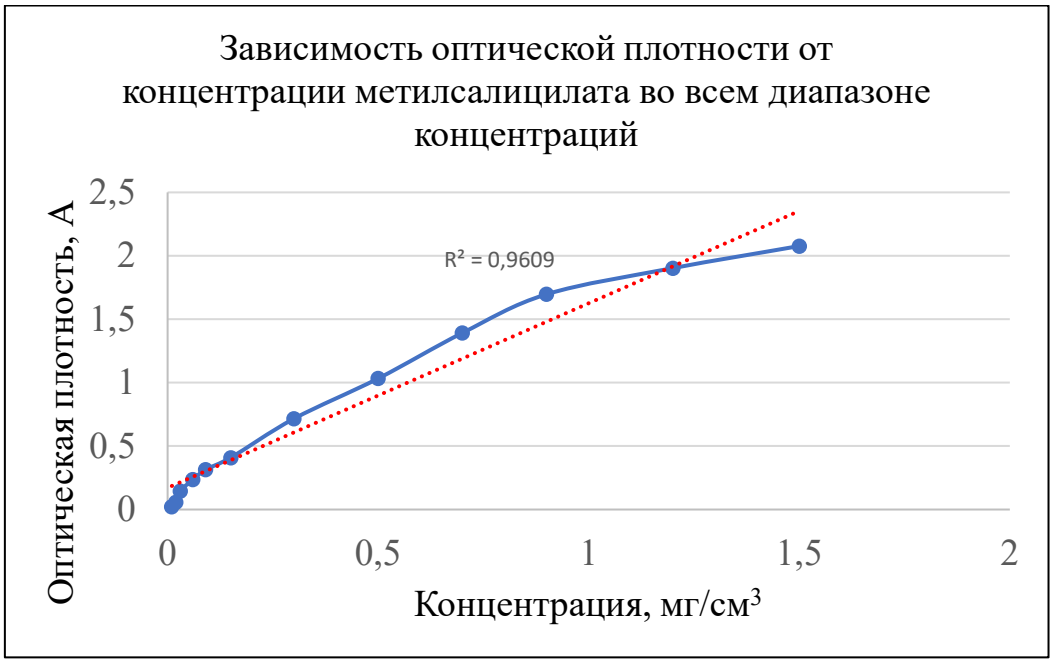
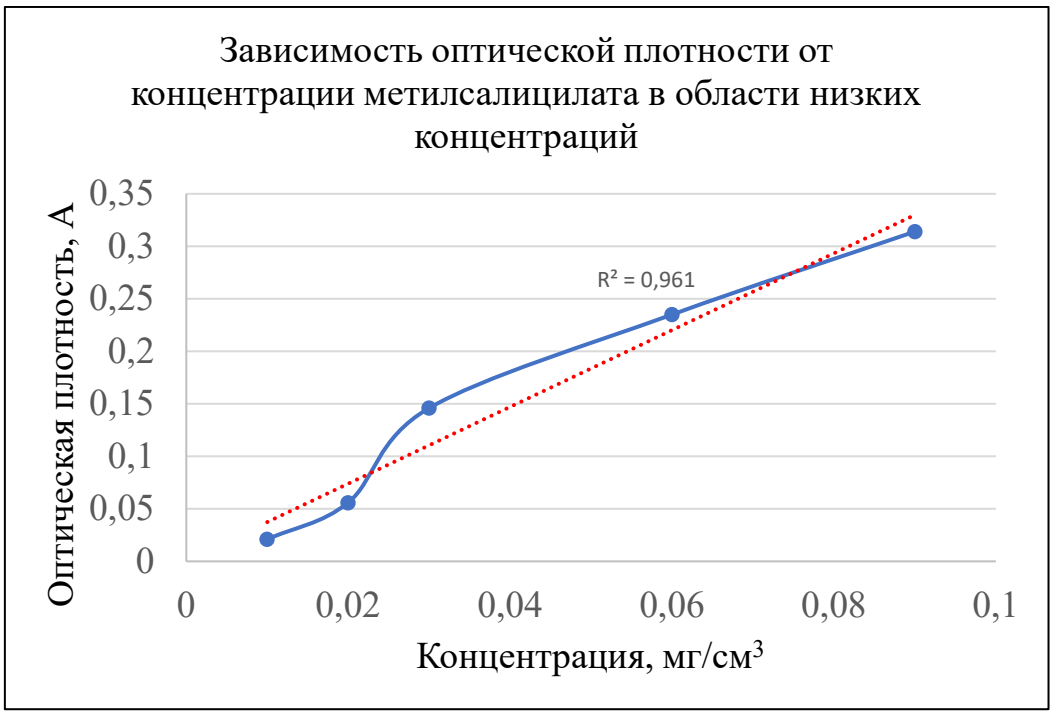


Рисунок 3. Зависимость оптической плотности от концентрации градуировочных растворов в области низких концентраций.



Приложение 5.

Рисунок 4. Зависимость оптической плотности от концентрации градуировочных растворов в области высоких концентраций.

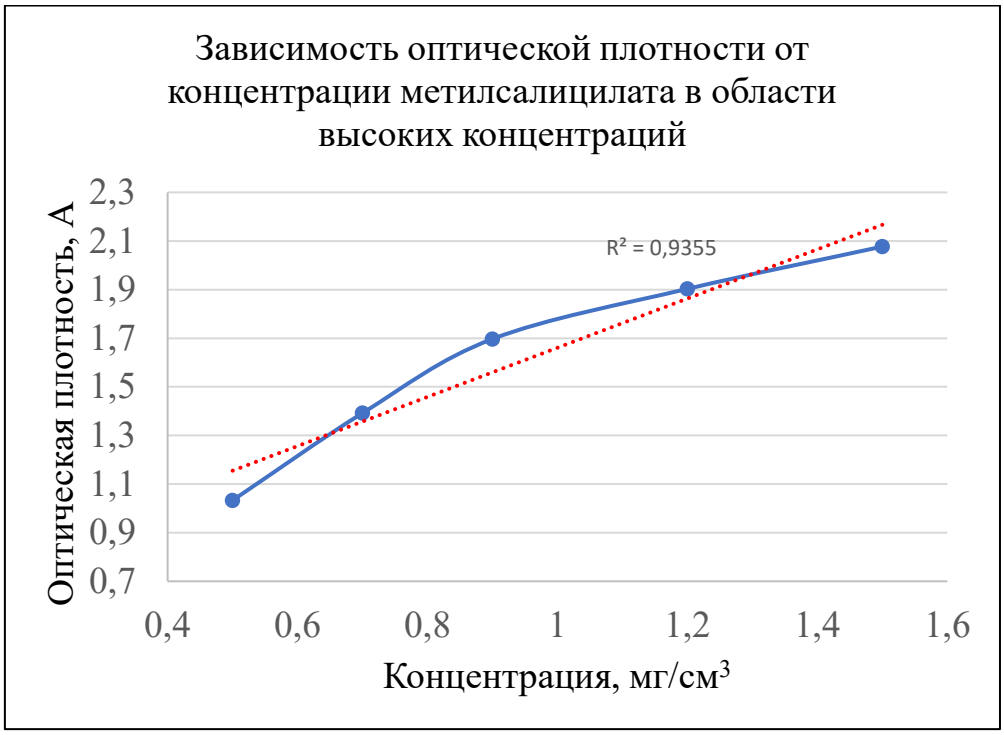
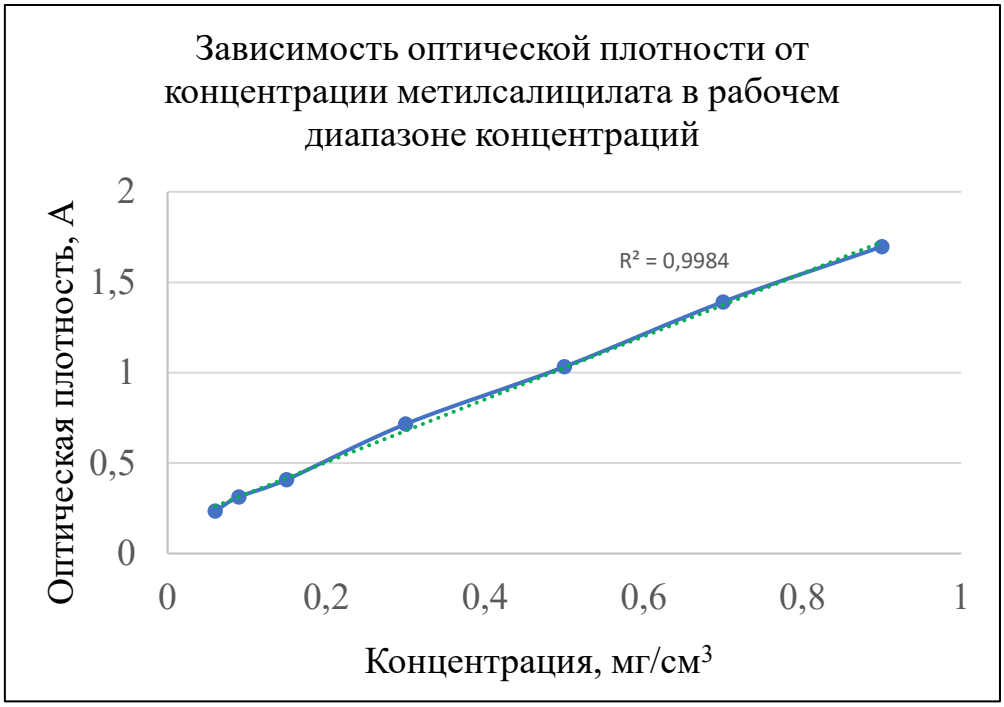


Рисунок 5. Зависимость оптической плотности от концентрации градуировочных растворов в области выбранных концентраций.

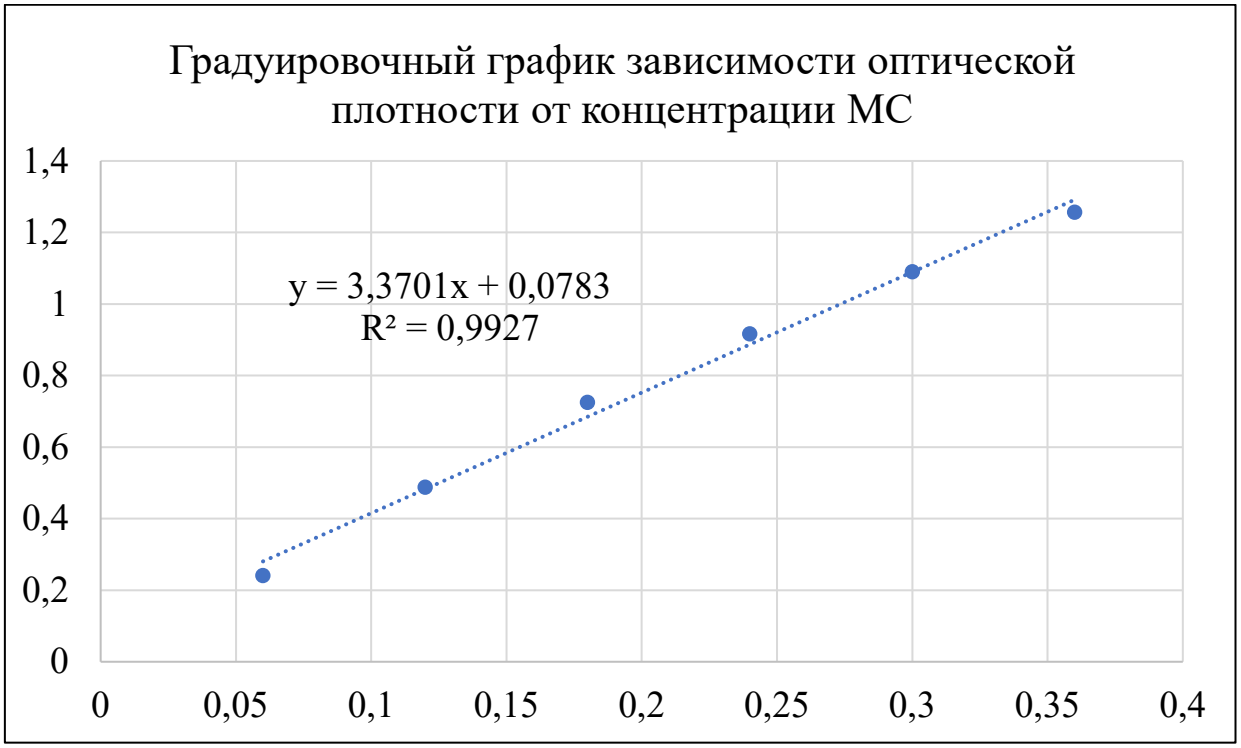


Приложение 6.

Таблица 3. Экспериментальные данные для построения градуировочного графика.

Номер раствора	Конц-я МС исх, мг/мл3	Объем аликвоты, см3	Конц-я град р-ра, мг/мл3	Средняя оптическая плотность
1	3,00	1,00	0,06	0,24075
2		2,00	0,12	0,48775
3		3,00	0,18	0,72475
4		4,00	0,24	0,91625
5		5,00	0,30	1,0905
6		6,00	0,36	1,25625

Рисунок 6. Градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации МС



Приложение 7.

Таблица 4. Значения концентраций контрольного образца, определенные экспериментально.

N	Для концентрации 0,10 мг/см^3					Для концентрации 0,18 мг/см^3				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Конц МС, мг/см^3	0,097	0,098	0,101	0,101	0,103	0,171	0,177	0,178	0,178	0,182

Таблица 5. Метрологические характеристики методики.

n	f	$\bar{x}$, мг/см^3	s^2	s, мг/см^3	Δx, мг/см^3	P, %	t(P,t)	ε, %	r, %
5	4	0,1000	0,000006	0,0024	0,005	95,0	2,57	6,30	0,68
5	4	0,1782	0,000015	0,0040	0,010			5,75	1,10

Рисунок 7. Формулы, для расчета метрологических характеристик

$$f = n - 1$$

$$s^2 = \frac{\sum_1^n d_i^2}{f} = \frac{\sum_1^n x_i^2 - n \cdot \bar{x}^2}{f}$$

$$s = \sqrt{s^2}$$

$$x_i \pm \Delta x = x_i \pm t(P, f) \cdot s$$

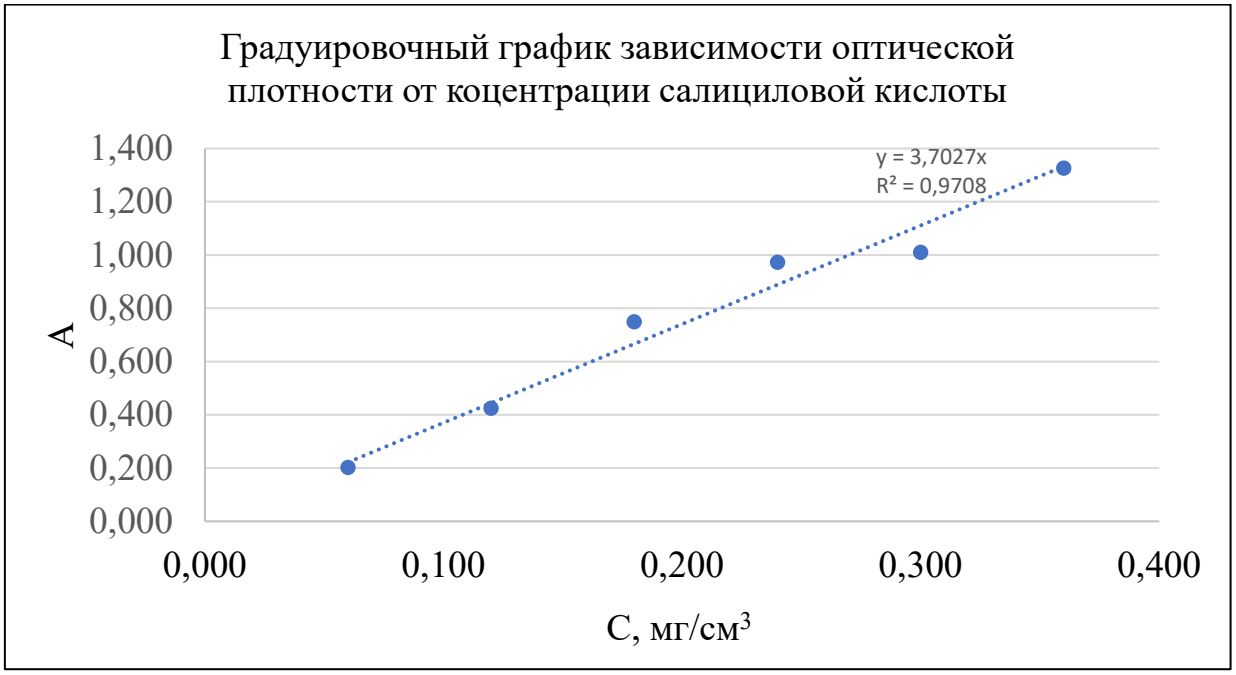
$$\varepsilon = \frac{\Delta x}{x} \cdot 100\%$$

Приложение 8.

Таблица 6. Экспериментальные данные для построения градуировочного графика.

Градуировочная серия								
№	Конц-я исх, мг/см3	Объем ал-ты, мл	Конц-я, мг/см3	Серия 1		Серия 2		Аср
				А1	А2	А1	А2	
1	3,00	1,00	0,060	0,194	0,193	0,212	0,214	0,203
2		2,00	0,120	0,419	0,420	0,430	0,431	0,425
3		3,00	0,180	0,743	0,744	0,757	0,756	0,750
4		4,00	0,240	0,974	0,972	0,974	0,974	0,974
5		5,00	0,300	0,997	0,997	1,025	1,026	1,011
6		6,00	0,360	1,306	1,301	1,351	1,351	1,327

Рисунок 8. Градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации салициловой кислоты.



Приложение 9.

Таблица 7. Экспериментальные и расчётные данные для анализируемых препаратов.

Наименование препарата	Оптическая плотность			Конц-я разб, мг/см3	Конц-я исх, мг/см3	Конц-я теор, мг/см3	Δ, %
	A1	A2	Aср				
Бом-Венге (Самара)	0,438	0,438	0,438	0,1297	1,038	1,000	3,758
	0,431	0,437	0,434				
Апизартрон	0,454	0,445	0,450	0,1331	1,065		6,495
	0,446	0,396	0,4455				
Диклоран + (Индия)	0,466	0,466	0,466	0,1322	1,058		5,781
	0,423	0,423	0,423				
Бенгей (Франция)	0,389	0,388	0,3885	0,1162	0,930		7,010
	0,393	0,393	0,393				

Приложение 10.

Методика определения массового содержания метилового эфира салициловой кислоты в мягкой лекарственной форме спектрофотометрически

Область применения

Методика распространяется на определение метилового эфира салициловой кислоты в мягких лекарственных формах. В основе метода лежит образование окрашенного соединения определяемой субстанции с ионами железа (III) в водной среде. Определению могут мешать растворимые в воде и спирте соединения с фенольной функциональной группой в составе лекарственной формы.

Приборы и реактивы

- Спектрофотометр или фотоэлектроколориметр.
- Кюветы с длиной поглощающего слоя 10 мм
- Весы лабораторные общего назначения 2 класса точности.
- Весы лабораторные с максимальной нагрузкой 210 г.
- Колбы мерные, наливные 2-50-2, 2-100-2, 2-500-2, 2-1000-2.
- Пипетки 4(5)-2-1, 4(5)-2-2, 6(7)-2-5, 6(7)-2-10, 3-2-1, 3-2-5, 3-2-10.
- Колбы КН-2-100-18 ТХС.
- Вода дистиллированная.
- Изопропиловый спирт 97%.
- Фильтры мембранные 0.22 μм.
- Метиловый эфир салициловой кислоты.
- Салициловая кислота (техн).
- Железо (III) хлористое 6-водн.
- Анализируемые образцы лекарственных препаратов.

Подготовка к проведению определений.

1. **Приготовление стандартного раствора метилового эфира салициловой кислоты с концентрацией 3 мг/см^3**

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 количественное переносят точную навеску метилового эфира салициловой кислоты (1,0000±0,0002) г, растворяют в изопропиловом спирте и доводят до метки также спиртом.

2. **Приготовление стандартного раствора салициловой кислоты с концентрацией 3 мг/см^3**

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 количественное переносят точную навеску салициловой кислоты (1,0000±0,0002) г, растворяют в дистиллированной воде и доводят до метки водой.

3. **Приготовление стандартного раствора метола с концентрацией 2 мг/см^3**

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 количественное переносят точную навеску метола (0,2000±0,0002) г, растворяют в изопропиловом спирте и доводят до метки также спиртом.

4. **Приготовление рабочего раствора хлорида железа с концентрацией 2%**

В мерную колбу вместимостью 250 см^3 количественное переносят точную навеску салициловой кислоты (5,0000±0,0002) г, растворяют в дистиллированной воде и доводят до метки водой.

5. **Построение градуировочной зависимости**

В 7 мерных колб вместимостью 50 см^3 вносят последовательно вносят 0,00; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00 см^3 стандартного раствора метилового эфира салициловой кислоты с коцентрацией 3,00 мг/см^3. В каждую колбу добавляют при перемешивании 2,00 см^3 2% рабочего раствора хлорида железа (III), доводят до метки водой и тщательно перемешивают. Концентрация метилового эфира салициловой кислоты в полученных растворах соответственно равна 0,00; 0,06; 0,12; 0,18; 0,24; 0,30 и 0,36 мг/см^3.

После выдержки в 10 минут градуировочные растворы фотометрируют в кювете 10 мм при длине волны 530 нм относительно холостого раствора (раствор, не содержащий метилового эфира салициловой кислоты).

По полученным данным строят график зависимости оптической плотности от концентрации метилового эфира салициловой кислоты. Выводят на график уравнение линии тренда и коэффициент корреляции, который должен быть больше 0,9900. В противном случае градуировочные растворы следует переготовить.

6. **Подготовка пробы**

Навеску анализируемого препарата, эквивалентную 50 мг метилового эфира салициловой кислоты отвешивают на аналитических весах, количественно переносят изопропиловым спиртом в мерную колбу, вместимостью 50 см3, доводят до метки спиртом и тщательно перемешивают. Ставят в шейкер и выдерживают около 10 минут. Затем, часть содержимого колбы, достаточную для проведения анализа (около 30 см^3), отфильтровывают через мембранный фильтр с размером пор 0.22 μм.

Проведение определений

10,00 см3, приготовленной по п.6, пробы вносят в мерную колбу вместимостью 50 см3. Добавляют при перемешивании 2,00 см3 2% рабочего раствора хлорида железа (III), доводят до метки водой и тщательно перемешивают. После выдержки в 10 минут пробу фотометрируют в кювете 10 мм при длине волны 530 нм относительно холостого раствора (раствор, не содержащий метилового эфира салициловой кислоты).

Определение проводят не менее двух раз.

Обработка результатов анализа

За результат принимается среднее арифметическое из двух параллельных определений, расхождение между которыми не превышает 4%.

Результат представляют в виде $(X_{ср} \pm \Delta)$ $^{мг}/_{см^3}$, при $P = 0{,}95$ и $n = 2$

где, $\Delta = \delta * 0{,}01 * X_{ср}$

$\delta = 10\%$