

Шифр “Нефопам”

**ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ НЕФОПАМУ
ТА ЙОГО МЕТАБОЛІТУ**

2019/2020

Зміст

	АНОТАЦІЯ	3
	ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	4
	ВСТУП	5
1.	ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	7
2.	МЕТОДИКА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ	11
2.1.	Апаратура і реагенти	11
2.2.	Об'єкти дослідження	13
3.	РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	14
3.1.	Дослідження оптимальних умов окиснення нефопаму з використанням калій пероксимоносульфату	14
3.1.1.	<i>Вплив рН</i>	15
3.1.2.	<i>Вплив тривалості окиснення і співвідношення концентрації реагентів</i>	17
3.1.3.	<i>Вплив потенціалу і часу акумуляції</i>	18
3.1.4.	<i>Вплив швидкості розгортки напруги поляризації</i>	18
3.2.	Механізм електрохімічної реакції відновлення N-оксиду нефопаму	21
3.3.	Використання результатів дослідження в аналізі	22
3.3.1.	<i>Методика одержання градуювальних розчинів</i>	22
3.3.2.	<i>Методика кількісного визначення нефопаму в лікарському засобі</i>	25
3.3.3.	<i>Методика кількісного визначення нефопаму в зразках сечі людини</i>	25
	ВИСНОВКИ	27
	СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	28

АНОТАЦІЯ

Нефопам – алкалоїд групи похідних бензооксазопіну, який належить до ненаркотичних анальгетиків центральної дії. Його широко застосовують в багатьох країнах світу для лікування гострого та хронічного болювих синдромів різної етіології. Однак, у літературі відома обмежена кількість методів визначення нефопаму у лікарських засобах і біологічних рідинах.

Ми розробили нові методики вольтамперометричного визначення нефопаму, які ґрунтуються на окисненні нефопаму до його N-оксиду. Головною особливістю методики визначення нефопаму з використанням N-оксиду як аналітичної форми є можливість прямого визначення метаболіту нефопаму. Для розроблених методик характерні широкі межі лінійності (1,5-2 порядки), низька межа визначення (на рівні 10^{-6} моль/л), достатня точність і селективність, низька вартість, швидка, портативна й адекватна концепція рутинного фармацевтичного аналізу. Методики апробовано під час аналізу розчину для ін'єкції “Нефопам” виробництва корпорації «COOPER.S.A.» (Athens, Greece), а також способом “уведено-знайдено” зразків сечі людини.

Сучасний аспект цієї роботи полягає у застосуванні твердого полірованого електрода на основі амальгами срібла (p-AgSAE), який ефективно замінює ртутні електроди та хімічно модифіковані електроди.

Предмет дослідження: нефопам у формі N-оксиду, який є метаболітом нефопаму і може бути аналітичною формою.

Методи дослідження: вольтамперометрія (циклічна, лінійна зі швидкою розгорткою) з використанням різних робочих електродів, рН-метрія.

Обсяг і структура роботи: робота складається зі вступу, трьох розділів, висновків, переліку посилань. Її викладено на 31 сторінці тексту без додатків, список використаної літератури займає чотири сторінки. Рукопис містить 13 рисунків та 3 таблиці.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ВА – вольтамперометрія;

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія;

КПМС – калій гідрогенпероксимоносульфат;

РДЗ – розчин досліджуваного зразка;

р.к.е. – ртутний краплинний електрод;

РСЗ – розчин стандартного зразка;

РХ з ЕД – рідинна хроматографія з електрохімічним детектуванням;

СФ – спектрофотометрія;

УФ-СФ – спектрофотометрія в ультрафіолетовому діапазоні хвиль;

ТШХ – тонкошарова хроматографія;

УБС – універсальна буферна суміш;

р-AgSAE – стаціонарний твердий полірований електрод на основі амальгами срібла.

ВСТУП

Актуальність теми дослідження. Алкалоїди – велика група речовин рослинного походження, які містять один чи більше атомів Нітрогену, найчастіше у складі гетероциклічного кільця; виявляють основні властивості, більшість з них чинить виражену фармакологічну дію на організм людини і тварин. Алкалоїди здебільшого малорозчинні у воді і добре розчинні в органічних розчинниках. Солі алкалоїдів, зазвичай, розчинні у воді і малорозчинні в органічних розчинниках. Зараз алкалоїди широко застосовують для лікування різних захворювань.

Тривалий час біологічні функції алкалоїдів у організмі людини не були з'ясовані, їх вважали кінцевими продуктами обміну речовин. Пізніше було встановлено, що алкалоїди активно залучаються до обмінних процесів. Під час метаболізму в організмі людини відбувається окиснення алкалоїдів до пероксиду, який у свою чергу переходить у форму N-оксиду.

Вважають, що між процесами перенесення електронів, які відбуваються на електроді та в клітинах живого організму, існує певна подібність. Знання окисно-відновних властивостей лікарських речовин дає змогу оцінити і прогнозувати шляхи їхнього метаболізму під час редокс-реакцій *in vivo*, а також їхню фармакологічну активність. Тому для дослідження властивостей біологічно активних молекул доцільно використовувати метод вольтамперометрії (ВА). Однак ВА є не тільки потужним методом дослідження, а й ефективним методом аналізу, оскільки більшість діючих речовин (активних фармацевтичних інгредієнтів), на відміну від допоміжних речовин лікарських засобів, є електрохімічно активними – відновлюються або окиснюються на електродах. Електрохімічні методи, а найбільше ВА, поєднують в собі високу селективність та чутливість, не потребують дорогого обладнання та є швидкими у використанні, можуть бути автоматизовані, а також задовольняють вимогам зеленої хімії, оскільки не потребують використання великих кількостей органічних розчинників. Особливістю методу ВА є також можливість одночасного визначення декількох речовин у складних матрицях, а

також метаболітів у біологічних рідинах. Багато розроблених ВА методик дають змогу визначати активні компоненти без їхнього попереднього вилучення і відокремлення від матриці. В результаті зменшуються затрати на пробопідготовку і підвищується експресність аналізу. Це дає змогу розглядати ВА певною мірою як альтернативу хроматографії, більш того, відомо про розроблення ВА детекторів для хроматографії. Тому ВА дослідження фармацевтично-активних алкалоїдів та розроблення на цій основі нових методик їх визначення є **актуальними**. Для дослідження обрали алкалоїд нефопам, N-оксид якого метаболітом і може бути аналітичною формою для вольтамперометрії.

Мета роботи: Розробити методики вольтамперометричного визначення нефопаму в об'єктах різної природи. Для реалізації мети треба було вирішити такі **завдання**:

- використовуючи реакцію окиснення одержати N-оксид нефопаму, здатний до відновлення на електродах на основі ртуті;
- перевірити можливість використання стаціонарних амальгамних електродів для визначення нефопаму;
- визначити оптимальні умови відновлення N-оксиду нефопаму;
- розробити методики ВА визначення нефопаму в складних лікарських засобах та в біологічних рідинах;
- перевірити розроблені методики на реальних об'єктах.

У роботі використано методи циклічної ВА і катодної ВА зі швидкою лінійною розгорткою з різними робочими електродами, а також рН-метрію.

1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

Лікарські рослини – це рослини, які використовують у медицині та ветеринарії як лікувальні або профілактично-оздоровчі засоби. Їхні властивості зумовлені наявністю комплексу біологічно-активних (алкалоїдів, сапонінів, глікозидів, фітонцидів, вітамінів та ін.) і баластних (таких, що вважаються неактивними) речовин. Рослини, які містять алкалоїди, використовувались людиною як лікарські та отруйні з давніх часів, але вперше були виділені діючі речовини лише наприкінці XVIII – на початку XIX ст. з них.

Алкалоїди – нітрогеновмісні сполуки основного характеру, які містять у своєму складі мінімум один гетероцикл. Це речовини рослинного походження, які, здебільшого, виявляють сильну біологічну дію на організм людини. Алкалоїди не є гомологічною групою речовин і різняться за хімічними, біохімічними і фармакологічними властивостями. В основу класифікації алкалоїдів можуть бути покладені різні принципи, тому розрізняють різні класифікації:

- ботанічна класифікація – ґрунтується на тому, до якого сімейства або роду належать рослини, які містять певні алкалоїди;
- фармакологічна класифікація ґрунтується на різній дії алкалоїдів на організм людини (знеболювальна, заспокійлива, гіпотензивна, знижують внутрішньочинний тиск);
- біогенетична класифікація, або класифікація за Хегнауером. В основі цієї класифікації, якій воліють слідувати біохіміки, лежить уявлення про амінокислоти – попередники алкалоїдів;
- хімічна класифікація – за хімічною будовою нітрогеновмісного гетероциклу. Ця класифікація запропонована академіком О.П.Ореховим. Її найчастіше використовують у фармакології [1].

Нефопам гідрохлорид (рис.1) був синтезований на початку 1970-х років як антидепресант, який також використовували як міорелаксант для лікування спазмів м'язів. Належить до сильних і швидкодіючих ненаркотичних анальгетиків центральної дії, пригнічує (інгібує) зворотне захоплення

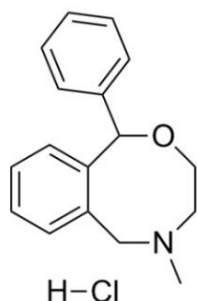


Рис. 1. Структурна формула нефопаму гідрохлориду.

серотоніну, норадреналіну й дофаміну. Повністю відрізняється від інших болезаспокійливих препаратів, таких як морфін, кодеїн, пентазоцин: під час клінічних досліджень не виявлено ефекту звикання до нефопаму впродовж лікування. Цей препарат широко застосовують в багатьох країнах світу для лікування гострого й хронічного больових синдромів злоякісної й незлоякісної етіології, запобігання м'язовому тремтінню та його терапії, лікування гикавки нейрогенного походження, післяопераційного знеболювання, знеболювання пологів, зубного болю, міальгії ниркових та печінкових колік [2]. Зокрема, в Головному військово-медичному клінічному центрі “Головний військовий клінічний госпіталь” Міністерства оборони України використовують з моменту реєстрації лікарський засіб “Акупан”, головною діючою речовиною якого є нефопам. Спочатку його використовували виключно для боротьби з синдромом післяопераційного м'язового тремтіння, але з часом почали використовувати і в схемах мультимодальної анестезії і після операційної аналгезії [3].

Нефопам не чинить протизапальної або антипіретичної дії, не пригнічує дихання і не впливає на перистальтику кишківника, володіє незначним антихолінергічним ефектом [4]. Входить до складу таких лікарських засобів: розчини для ін'єкцій “Нефопам” (Фарма Медіатерранія, С. Л., Іспанія/США), “Акупан” (Біокодекс, Франція), “Нефальжик” (Біокодекс, Франція), “Нефопам” (“КУПЕР.ЕС.ЕЙ.”, Греція) і таблетки “НЕФОПАМ” (“ЕІПКО”, Єгипет) [5].

За хімічною будовою нефопам – це алкалоїд групи похідних бензооксазоцину (рис. 1). Для визначення нефопаму гідрохлориду в фармацевтичних препаратах та біологічних матеріалах відомо обмежена

кількість методів (табл. 1). Для ідентифікації нефопаму у субстанціях і простих лікарських засобах використовують спектрофотометрію і тонкошарову хроматографію [6-8]. Зокрема, для спектрофотометричного визначення нефопаму у розчинах для ін'єкцій та таблетках автори [5] використовували алізарин та його похідні, які утворювали іонні асоціати з нефопамом. Селективність такого визначення порівняно низька.

Найбільш селективними методами для визначення нефопаму і його метаболітів є хроматографічні методи, зокрема високо ефективна рідинна хроматографія [9-10]. Зауважимо, що автори [9] для визначення нефопаму у плазмі крові людини методом рідинної хроматографії з електрохімічним детектуванням застосували пробопідготовку, яка полягала в переведенні нефопаму в його N-оксид. Для окиснення використовували 3-хлоропероксибензену кислоту в розчині з етилацетатом, а як елюент – ацетонітрил в суміші з амоніачним буферним розчином.

Таблиця 1.

Коротка характеристика методів кількісного визначення нефопаму

Метод	Межі лінійності	Межа визначення	Межа виявлення	Об'єкти аналізу	Літ-ра
СФ	0,5–30 мкг/мл	1,96 мкг/мл	0,49 мкг/мл	Таблетки, розчини для ін'єкцій	[6]
УФ-СФ	50-400 мкг/мл	–	–	Полімерні наносфери	[7]
ТШХ	0,05 – 1,00 мг/мл	3,16 мкг	0,95 мкг	Таблетки	[8]
РХ з ЕД	1-100 нг/мл	1 нг/мл	–	Плазма крові	[9]
ВЕРХ	1– 60 нг/мл	1 нг/мл	–	Плазма крові	[10]
	2– 25 нг/мл	1 нг/мл		Білки	
	25–250 нг/мл	5 нг/мл		Сеча	

Багатьом із відомих методів визначення нефопаму характерна низка недоліків: довготривалість, використання органічних розчинників і дорогих

реагентів, суттєвий вплив допоміжних та інших діючих речовин на аналітичний сигнал нефопаму тощо.

Вольтамперометрія набуває зараз все більшої популярності у фармацевтичному аналізі як простий, експресний метод, який задовольняє вимогам зеленої хімії [11-12]. Багато розроблених ВА методик дають змогу визначати активні компоненти без їхнього попереднього відокремлення від матриці. В результаті зменшуються затрати на пробопідготовку і підвищується експресність аналізу. Це дає змогу розглядати ВА певною мірою як альтернативу хроматографії, більш того, відомо про розроблення ВА детекторів для хроматографії [13]. У таких детекторах найчастіше використовують метод ВА з лінійною швидкою розгорткою, який розглядають як скринінговий метод, для якого характерні швидкий відклик і низька межа визначення. Тому ВА дослідження фармацевтично-активних алкалоїдів та розроблення на цій основі нових методик їх визначення є актуальними.

Раніше повідомляли про полярографічне визначення анестетиків групи амідів, яке ґрунтується на одержанні в реакції окиснення полярографічно активних їхніх похідних – N-оксидів [14]. Третинний атом Нітрогену нефопаму також легко окиснюється до відповідного N-оксиду, що вже використовували автори [9] для розроблення хроматографічної методики визначення цього алкалоїду. Крім того, відомо, що одним з метаболітів нефопаму є його N-оксид. Отже, N-оксид нефопаму є перспективною аналітичною формою для вольтамперометрії.

Ми розробили методику, яка ґрунтується на окисненні нефопаму гідрохлориду до його N-оксиду за допомогою калій пероксимоносульфату, потім N-оксид нефопаму відновлюється на поверхні електрода [15].

2. МЕТОДИКА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Апаратура і реагенти

Для вольтамперометричних досліджень використовували цифрові вольтамперометричні установки MTech OVA-410 з трьохелектродною електролітичною коміркою (робочий ртутний краплинний електрод (р.к.е.), насичений каломелевий електрод порівняння (н.к.е.), платиновий допоміжний електрод) і MTech UVA-410 [16] з трьохелектродною електролітичною коміркою де робочий електрод – стаціонарний твердий полірований електрод на основі амальгами срібла (р-AgSAE), аргентумхлоридний електрод порівняння і платиновий допоміжний електрод. Характеристики р. к. е.: $m = 5,9 \cdot 10^{-4}$ г/с, $\tau_k = 10$ с у 0,2 М розчині NH_4Cl без накладання напруги поляризації. Підготовлені до вимірювання розчини переносили в комірку, очищеним аргонном видаляли розчинений кисень впродовж 10 хв, та реєстрували вольтамперограми в межах від $-0,5$ до $-1,5$ В.

Тверді амальгамні електроди є нетоксичною альтернативою традиційним ртутним електродам. Для яких також характерні широкий катодний діапазон робочих потенціалів, низький фоновий сигнал, висока відтворюваність результатів, а також проста конструкція та легка регенерація поверхні електрода. Крім того, AgSAE механічно стійкі, тому їх можна використовувати для безперервного контролю у потоці [17-21].

Для досліджень ми використали циклічну ВА, а для розроблення аналітичної методики – метод ВА зі швидкою розгорткою, який можна розглядати як метод скринінгу, для якого характерні низька межа визначення і швидкий відклик. Якщо не вказано іншого, то вимірювання виконували із швидкістю накладання напруги поляризації $V=0,5$ В/с. Точність вимірювання потенціалу становить 1 мВ. Невизначеність вимірювання струму – 0,1 % .

Значення рН контролювали потенціометрично рН-метром MV 870 DIGITAL-pH-MESSGERÄT з аргентумхлоридним електродом порівняння.

Попередня підготовка поверхні амальгамного електрода. Перед початком роботи р-AgSAE механічно активували – полірували протягом 1 хв

дрібнодисперсним оксидом алюмінію. Перед кожним вимірюванням поверхня р-AgSAE була електрохімічно регенована безпосередньо в робочому розчині, який складався з аналіту та фонового електроліту ($E_{\text{reg}} = -1100$ мВ, $t_{\text{reg}} = 20$ с). За допомогою цієї процедури поверхня р-AgSAE очищається від речовин, які можуть адсорбуватися на поверхні електрода і пасивувати її.

У роботі використовували субстанцію нефопаму гідрохлориду (Genkevilliers, France, с. 1701040039) з кількісним вмістом діючої речовини не менше, ніж 99 %. Для приготування робочого розчину стандартного зразка (РСЗ) точну наважку субстанції (розрахована наважка становить 0,0284 г) кількісно переносили в мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняли у 70 мл дистильованої води, доводили об'єм до позначки за 20 °С і ретельно перемішували. У такому разі концентрація робочого РСЗ становить $1,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Розчин РСЗ зберігали у холодильнику не довше, ніж два тижні.

Виготовлення розчину універсальної буферної суміші (УБС). Розчиняли 20,2 г $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, додавали 28,7 мл льодяної CH_3COOH та 17,6 мл концентрованої H_3PO_4 . За допомогою розчину 2,5 моль/л натрій гідроксиду доводили до рН 8,0 (рН контролювали на рН-метрі). Далі розбавляли розчин дистильованою водою до 1 л.

Виготовлення розчину KHSO_5 (КПМС). Як реагент використовували комерційну потрійну сіль кислоти Каро – Оксон – $2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$ (ACROS ORGANICS, “extra pure”, CAS 70693-62-8). Активною речовиною є калій гідрогенпероксимоносульфат (KHSO_5 , КПМС) (CAS 10058-23-8). Вибір реагенту зумовлений його доступністю, задовільною розчинністю у воді, високою окиснювальною здатністю ($E_{\text{HSO}_5^-/\text{HSO}_4^-}$ змінюється від $1,82 \pm 0,03$ В за рН 0 до 1,44 В за рН 11 [22], а також достатньою стійкістю під час застосування та зберігання [DuPont™ Oxone®] [23-25]. На аналітичній вазі зважували Оксон (обчислена наважка 0,6148 г), кількісно переносили в колбу на 100,0 мл, розчиняли у 70 мл дистильованої води при перемішуванні і доводили об'єм дистильованою водою до позначки. Концентрація такого розчину становить $1,0 \cdot 10^{-2}$ моль/л.

2.2. Об'єкти дослідження

Для перевірки розробленої нами методики використали розчин для ін'єкцій “Нефопам” корпорації «COOPER.S.A.» (Athens, Greece). Розчин міститься у скляних ампулах місткістю 1 мл, по 3 ампули в касеті, по 1 касети в картонній коробці. Згідно з нормативними документами розчин для ін'єкцій “Нефопам” повинен містити нефопаму 19-21 мг/мл. Згідно із сертифікатом якості, виданим випробувальною лабораторією Державної адміністрації України з лікарських засобів, розчин для ін'єкцій “Нефопам” містить 20,48 мг/мл нефопаму.

Приготування розчину досліджуваного зразка. Розчин досліджуваного зразка (РДЗ) готували так: вміст трьох ампул виливали у склянку на 25 мл, піпеткою відбирали 2,00 мл розчину, переносили в мірну колбу місткістю 100,0 мл, розводили водою до позначки і перемішували. Концентрація такого РДЗ згідно сертифікату якості на ці ліки становить $1,38 \cdot 10^{-3}$ М.

Отримання розчину N-оксиду нефопаму. У мірну колбу на 25 мл послідовно вносили 4 мл УБС з рН 8,0; РСЗ для одержання заданої концентрації (наприклад, 5,00 мл для $2,0 \cdot 10^{-4}$ М) і 1,0 мл $1,0 \cdot 10^{-2}$ М КПМС. Витримували впродовж 10 хв, потім розчином НСІ доводили до рН 5,5 (за рН-метром), розбавляли до позначки дистильованою водою.

Приготування зразків сечі. Зразки сечі людини, яка не використовувала нефопаму, брали в одного здорового добровольця (жінка, 20 років, не курить) натще в день експерименту. Під час експериментів і за кілька днів до цього волонтер не проходив жодного лікування лікарськими чи мультівітамінними препаратами. Зауважимо, що ці експерименти були проведені за поінформованою згодою, отриманою від волонтера до експериментів.

Зразки сечі готували так: у мірну колбу на 25,0 мл послідовно вносили 1,0 мл свіжої сечі, 4 мл УБС з рН 5,5 і 0,2 мл $1,0 \cdot 10^{-2}$ М КПМС, 1 мл насиченого розчину КСІ. Після цього до розчину додавали аліквоти розчину N-оксиду нефопаму, який отримали попередньо, так, щоб його концентрація в готовому розчині була в діапазоні $4,0 \cdot 10^{-6}$ – $2,0 \cdot 10^{-5}$ М, далі доводили до позначки водою.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Дослідження оптимальних умов окиснення нефопаму з використанням калій пероксимоносульфату

На рис. 2а зображено полярограми у розчині нефопаму до окиснення за відсутності КПМС (1), у розчині КПМС, що не містить нефопаму (2), а також у розчині після окиснення нефопаму (3). На рис. рис. 2б зображено ВА криві, отримані в аналогічних умовах на р-AgSAE. Вольтамперограми 1 і 2 практично відповідають вольтамперограмам у розчинах фоновому електроліту. Стрілка ↑ на рисунку 2 означає, що вольтамперограми 2 і 3 зміщено вгору по осі ординат для кращого вигляду. Відновленню деривату нефопаму на р.к.е. відповідає два піки за потенціалів $-0,92$ В і $-1,24$ В (полярограма 3 на рис. 2а). Вигляд вольтамперограми на р-AgSAE подібний. Відсутність анодних піків свідчить про необоротність процесу. Зі зміною умов не спостерігали змін на анодній ділянці вольтамперограм. Тому для вибору оптимальних умов і для визначення аналітичних параметрів ми використали катодну ВА зі швидкою лінійною розгорткою потенціалу.

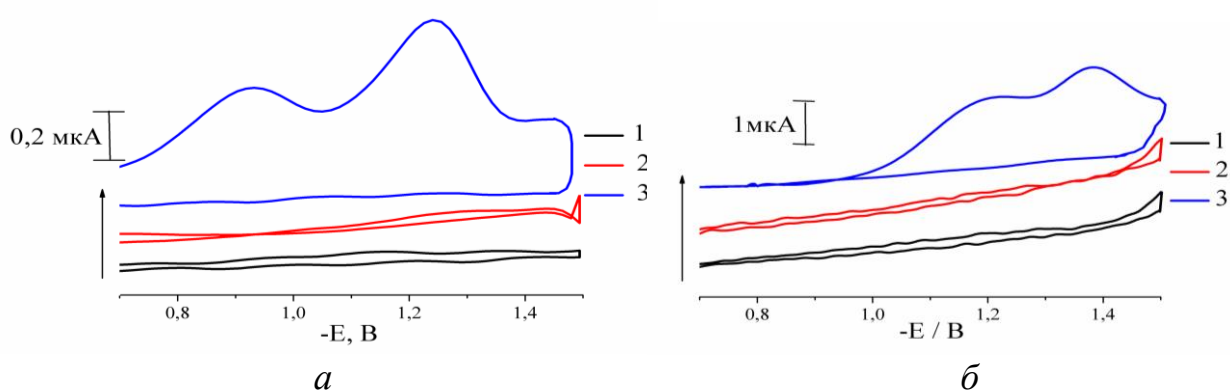


Рис. 2. Вольтамперограми у розчинах нефопаму до (1) та після (3) окиснення, а також у розчині КПМС, який не містить нефопаму (2) на фоні УБС, $C_{\text{КПМС}} = 1,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{УБС}} = 0,4$ М, $\text{pH} = 5,5$. Для р.к.е. $V = 0,5$ В/с, $C_{\text{нефопам}} = 4,0 \cdot 10^{-5}$ М (а); для р-AgSAE $V = 3,0$ В/с, $C_{\text{нефопам}} = 1,0 \cdot 10^{-6}$ М (б).

3.1.1. Вплив рН

N-оксиди третинних амінів утворюються в лужному середовищі. Підкисленням реакційної суміші зупиняють процес окиснення. Оптимальним рН для окислення ($\text{pH}_{\text{окис}}$) нефопаму є рН 8,0 (рис. 3а).

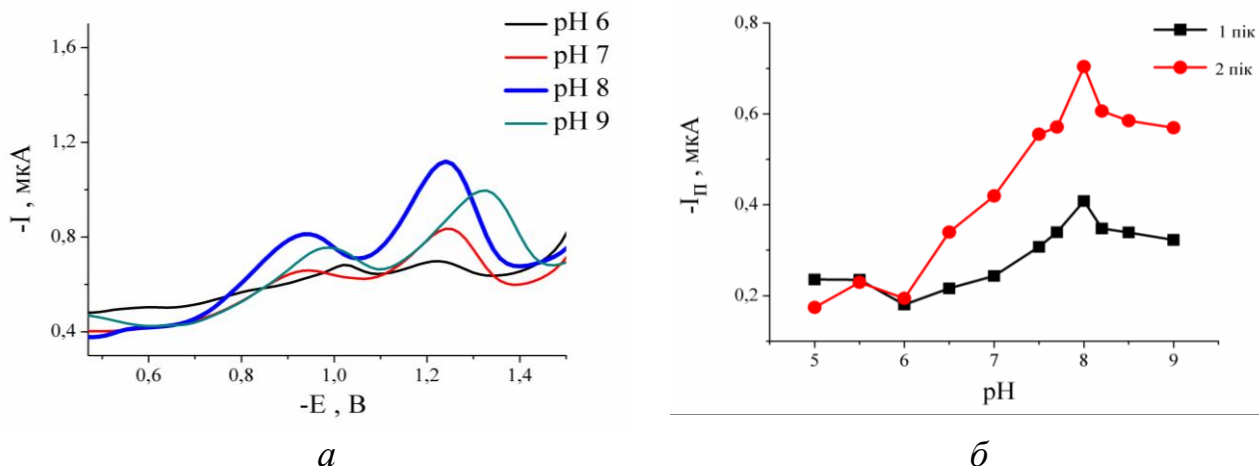


Рис. 3. Полярограми (а) та залежність струму відновлення N-оксиду нефопаму гідрохлориду від рН окиснення (б). Умови: $C_{\text{нефопам}} = 4,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{кпмс}} = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $t_{\text{окис}} = 10 \text{ хв}$; $\text{pH}_{\text{пол}} = 5,5$

На вигляд полярограм, струм і потенціал відновлення деривату нефопаму впливає рН, за якого отримують полярограми ($\text{pH}_{\text{пол}}$, рис. 4). Із збільшенням рН до 7 струм відновлення збільшується, а за рН 8 і більше – різко зменшується і при рН 9 практично зникає. Потенціали піків зі збільшенням рН зміщуються до негативніших значень. Найменше змінюється вигляд полярограм в межах рН 5–6 (рис. 4а), тому для подальших вимірювань ми обрали рН 5,5.

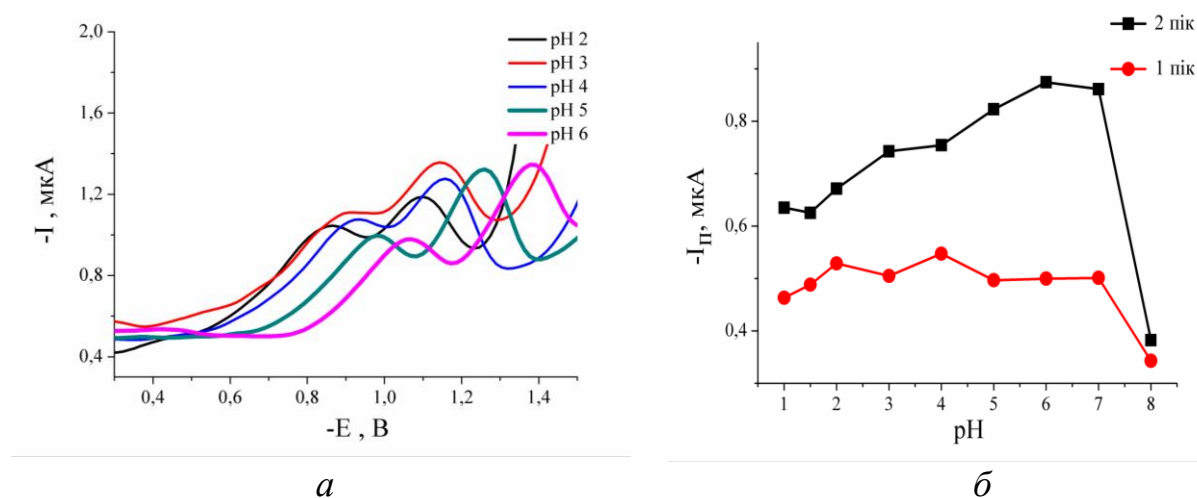


Рис. 4. Полярограми (а) та залежність струму відновлення N-оксиду нефопаму (б) від $\text{pH}_{\text{пол}}$ Умови: $C_{\text{нефопам}} = 4,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{кпмс}} = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $t_{\text{окис}} = 10 \text{ хв}$; $\text{pH}_{\text{окс}} = 8,0$.

Отже, для того, щоб отримати чіткі і високі піки на полярограмі, треба окиснювати нефопам за рН 8.0, потім підкислити розчин до рН 5,5 і тоді реєструвати полярограму.

Потенціали піків відновлення N-оксиду нефопаму зміщуються в негативну ділянку із збільшенням рН_{пол.} (рис. 5). Це свідчить про те, що електрохімічний процес включає стадію перенесення протонів. Залежності, зображені на рис. 5, побудовано за експериментальними полярограми, що на рис. 4а.

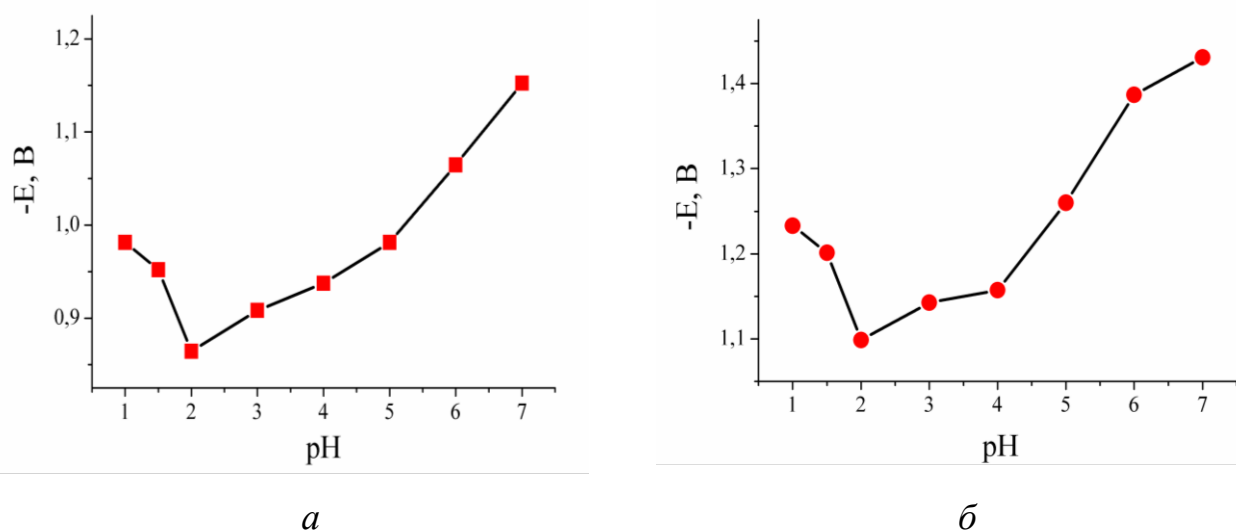


Рис 5. Залежність $-E$, В від рН для першого (а) та для другого (б) піку відновлення. Умови: $C_{\text{нефопам}} = 4,0 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{КПМС}} = 1,0 \cdot 10^{-4}$ М, $t_{\text{окис}} = 10$ хв; рН_{окис}=8,0

На залежності $-E$, В від рН можна простежити три лінійних діапазони, які можна описати рівняннями прямої (табл. 2). Найбільш строгою є лінійна залежність $-E$, В від рН для діапазону рН від 5 (для піку 1) чи 4 (для піку 2) до рН 7.

Рівняння лінійної залежності $-E$, В від рН на фоні УБС

Пік	рН ділянка	Рівняння	Коефіцієнт кореляції, R
1	1–2	$E = (1,11 \pm 0,05) + (-0,12 \pm 0,03) \text{ рН}$	0,8464
	2–5	$E = (0,789 \pm 0,008) + (0,038 \pm 0,002) \text{ рН}$	0,9912
	5–7	$E = (0,553 \pm 0,008) + (0,0854 \pm 0,0013) \text{ рН}$	0,9995
2	1–2	$E = (1,38 \pm 0,06) + (-0,13 \pm 0,04) \text{ рН}$	0,8313
	2–4	$E = (1,04 \pm 0,03) + (0,029 \pm 0,008) \text{ рН}$	0,8451
	4–7	$E = (0,79 \pm 0,07) + (0,094 \pm 0,012) \text{ рН}$	0,9536

3.1.2. Вплив тривалості окиснення і співвідношення концентрацій реагентів

Кількісний вихід деривату нефопаму залежить від тривалості окиснення. Окиснення повинно тривати не менше 10 хвилин (рис. 6а). Після 30 хв окиснення струм піку дещо зменшується. Це, імовірно, пов'язано з утворенням іншого продукту окиснення. Отже, для отримання найліпших результатів (найвищого струму відновлення) хімічне окиснення нефопаму повинно тривати від 10 до 30 хв.

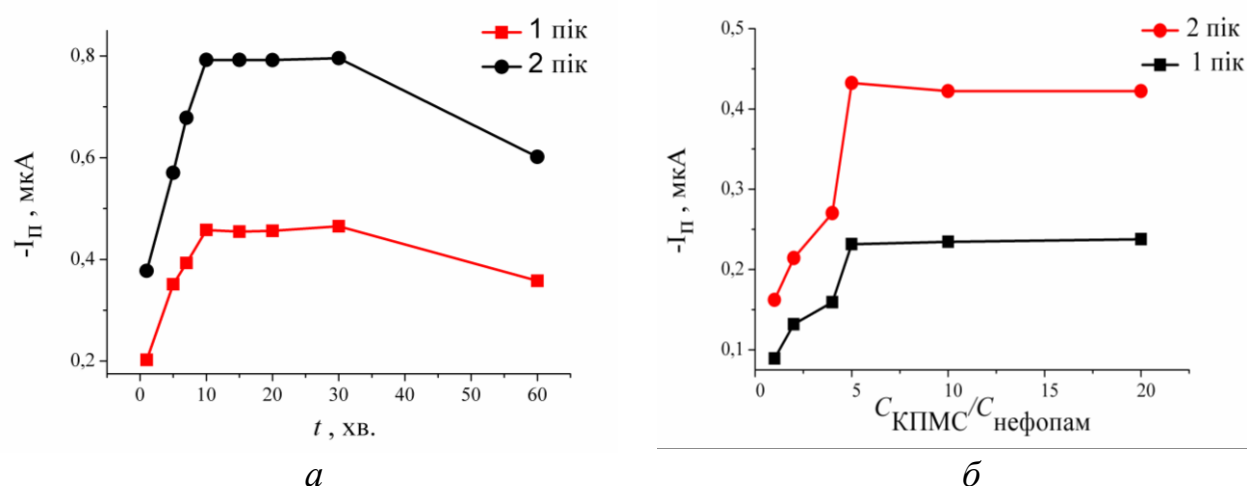


Рис. 6. Вплив тривалості окиснення (а) та молярного співвідношення реагентів реакції (б) на струм відновлення. Умови: $\text{pH}_{\text{пол}} = 5,5$; $\text{pH}_{\text{окис}} = 8,0$; $C_{\text{нефопам}} = 4,0 \cdot 10^{-5} \text{ М}$.

Іншим важливим чинником є надлишок окиснювача. Як видно з рис. 5б, максимальний вихід продукту може бути досягнутий за не менше, ніж 5-кратного надлишку КПМС. Однак бажано, щоб концентрація КПМС у кінцевому робочому розчині не перевищувала 10^{-4} моль/л, оскільки при більш високих концентраціях КПМС збільшується залишковий струм та спотворюється лінія фону.

3.1.3. Вплив потенціалу і часу акумуляції

Для р-AgSAE дослідили вплив на аналітичний сигнал потенціалу і часу акумуляції. Потенціал акумуляції (E_{acc}) досліджували в межах від -150 до -900 мВ, найбільшого струму відновлення було досягнуто за $E_{\text{acc}} = -750$ мВ (рис. 7а). Струм відновлення лінійно збільшується зі збільшенням часу акумуляції (t_{acc}) від 40 с до 120 с. що свідчить про адсорбцію N-оксиду нефопаму на поверхні електрода (рис. 7б).

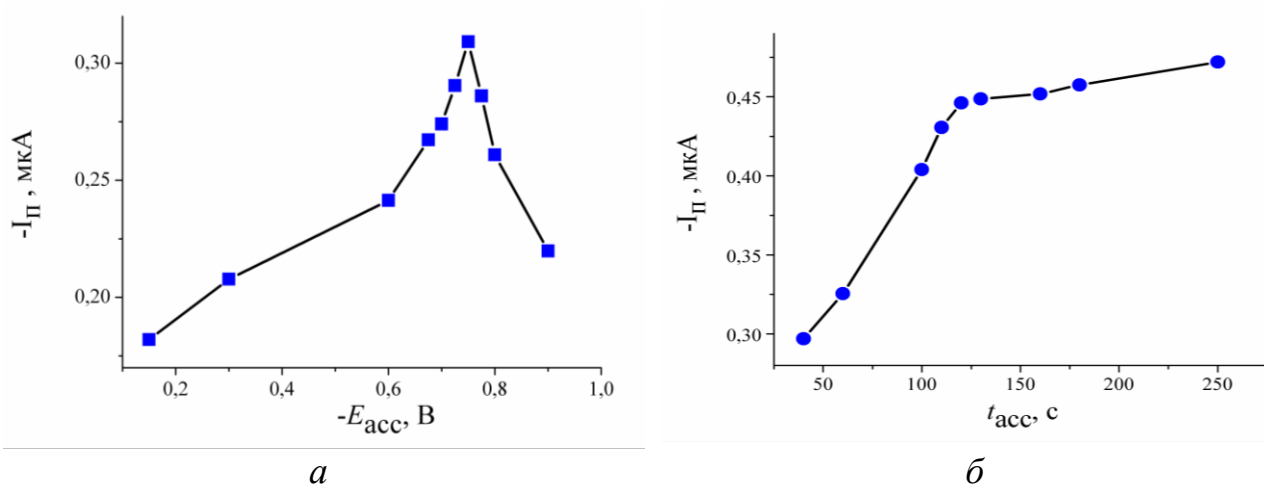


Рис. 7. Вплив потенціалу акумуляції (а) та часу акумуляції (б) на струм відновлення N-оксиду нефопаму на р-AgSAE. Умови: $C_{\text{нефопам}} = 4,0 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{КПМС}} = 1,0 \cdot 10^{-4}$ М, $t_{\text{окис}} = 10$ хв; $\text{pH}_{\text{пол}} = 5,5$; $\text{pH}_{\text{окис}} = 8,0$; $V = 1,0$ В/с

3.1.4. Вплив швидкості розгортки напруги поляризації

Щоб з'ясувати природу струму відновлення N-оксиду нефопаму досліджували залежність струму від швидкості накладання напруги поляризації

(розгортки, V). Вольтамперограми були отримані за різних швидкостей сканування від 0,3 до 4,0 В/с на р.к.е. (рис. 8а) і від 0,1 до 5,0 В/с на р-AgSAE (рис. 8б). Із збільшенням швидкості накладання напруги поляризації, висота піків збільшується, а потенціали зсуваються в катодну область.

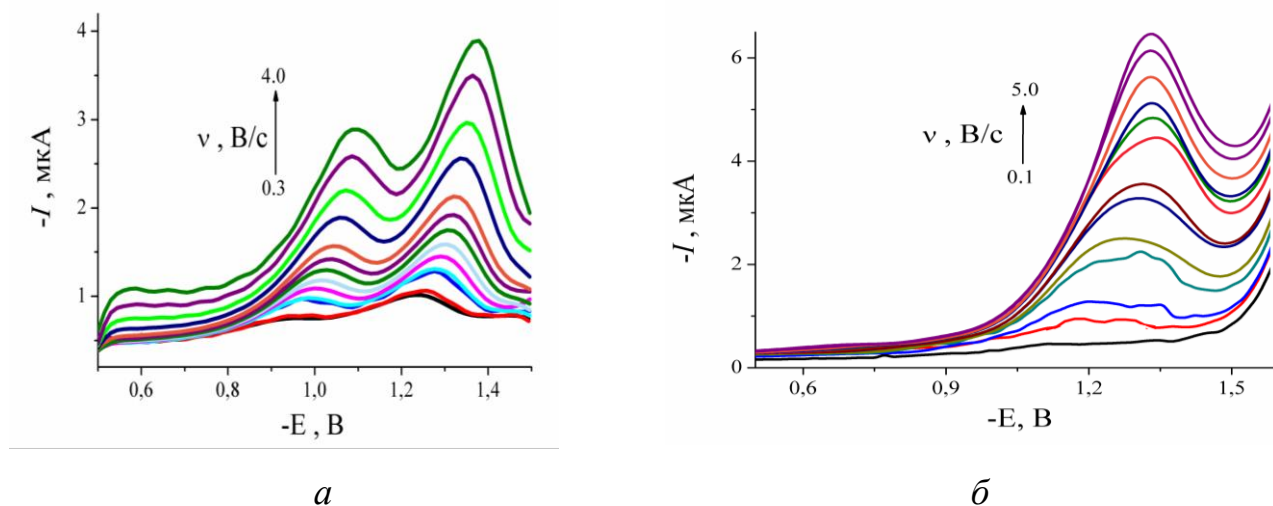
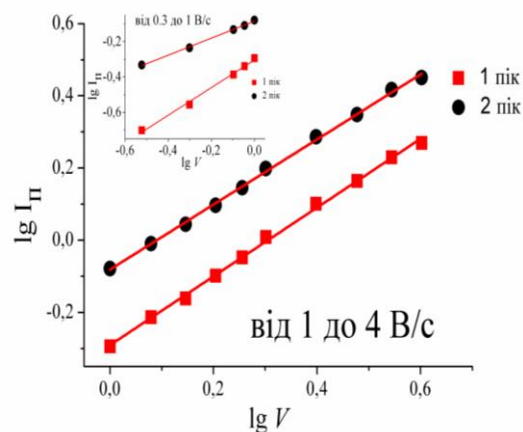


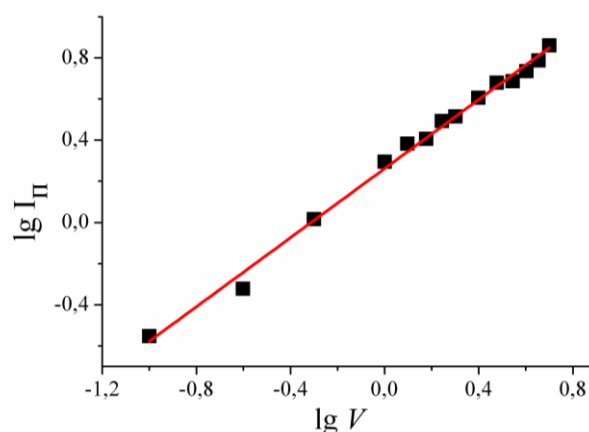
Рис. 8. Вплив швидкості розгортки на вигляд катодних полярограм у розчині N-оксиду нефопаму на р.к.е (а) та на р-AgSAE (б) на фоні УБС. Умови: $C_{\text{нефопам}} = 2,0 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{кпмс}} = 1,0 \cdot 10^{-4}$ М, $t_{\text{окис}} = 10$ хв; $\text{pH}_{\text{пол}} = 5,5$; $\text{pH}_{\text{окис}} = 8,0$

Це свідчить про необоротний процес відновлення. Більше того, не було зареєстровано жодних сигналів окиснення, що свідчить про необоротність електрохімічного процесу. За концентрації нефопаму $C_{\text{нефопам}} \geq 1,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л та $V \geq 1$ В/с для р-AgSAE два піки відновлення зливаються в один, а потенціал максимального струму становить приблизно $-1,3$ В (залежно від V).

На залежності логарифму струму від логарифму швидкості сканування для р.к.е. для двох піків простежуємо по дві лінійні ділянки (рис. 9а). Цей факт вказує на те, що зі зміною швидкості сканування змінюється природа струму відновлення. Тангенс кута нахилу залежності $\lg I - \lg V$ на р.к.е. для діапазону від 0,3 до 1 В/с становить 0,55 для першого піку і 0,39 для другого піку, що свідчить про дифузійну природу струму з незначними кінетичними утрудненнями (за другим піком).



а

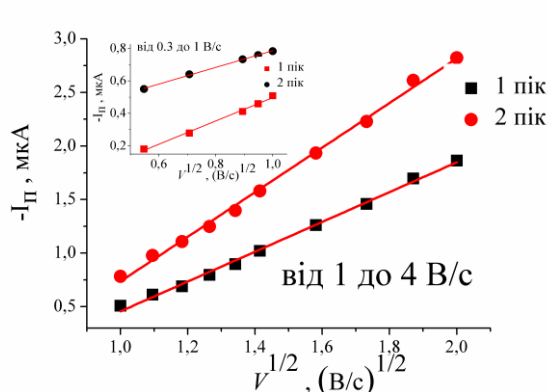


б

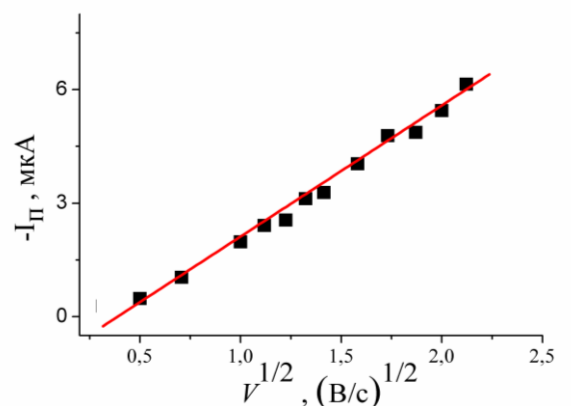
Рис. 9. Залежність $\lg I$ від $\lg V$ на р.к.е (а) та на p-AgSAE (б).

Умови: $C_{\text{нефопам}} = 2,0 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $C_{\text{КПМС}} = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $t_{\text{окис}} = 10 \text{ хв}$; $\text{pH}_{\text{пол}} = 5,5$; $\text{pH}_{\text{окис}} = 8,0$

Відповідно до рівняння Рендлса-Шевчика [26] для необоротних реакцій лінійна зміна струму із зміною $V^{1/2}$ свідчить про дифузійно-контрольований електрохімічний процес. Крім того, невелике значення параметра a у рівнянні прямої залежності $I_{\text{п}} = f(V^{1/2}) - 0,036$ (для першого піку) і $-0,13$ (для другого піку) свідчить про незначний вклад адсорбції в електрохімічний процес.



а



б

Рис. 10. Залежність I від $V^{1/2}$ на р.к.е (а) та на p-AgSAE (б) відновлення N-оксиду нефопаму на фоні УБС. Умови: $C_{\text{нефопам}} = 2,0 \cdot 10^{-5} \text{ М}$, $C_{\text{КПМС}} = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $t_{\text{окис}} = 10 \text{ хв}$; $\text{pH}_{\text{пол}} = 5,5$; $\text{pH}_{\text{окис}} = 8,0$

Однак зі збільшенням швидкості сканування вклад адсорбції збільшується: для діапазону від 1 до 4 В/с тангенс кута нахилу залежності $\lg I - \lg V$ дорівнює 0,96 для першого піку і 0,91 для другого піку відповідно.

Логарифм струму лінійно залежить від логарифму швидкості сканування від 0,1 до 5,0 В/с на р-AgSAE (рис. 9б). Тангенс кута нахилу цієї залежності становить 0,84. Адсорбційна природа струму за великих швидкостей сканування сприяє використанню адсорбційної вольтамперометрії для нагромадження аналіту на поверхні електрода і поліпшення аналітичних параметрів методики визначення.

3.2. Механізм електрохімічної реакції відновлення N-оксиду нефопаму

З кількісних параметрів полярограми можна обчислити кількість електронів n , які беруть участь у електродному процесі [27]:

$$\alpha n = -47,7 / (E_p - E_{p/2}) \text{ (мВ)}, \quad (1)$$

де, α - коефіцієнт перенесення заряду, n - кількість електронів, які беруть участь в електрохімічній стадії. Коефіцієнт α для необоротних систем дорівнює 0,5.

Ми обчислювали n за полярограмами, одержаними за різних умов (різне рН окиснення від 7,0 до 9,0, різне рН реєстрації полярограм від 2,0 до 7,0, а також різна концентрація нефопаму). Обчислені значення n коливалися від 0,7 до 1,3 для кожного з піків.

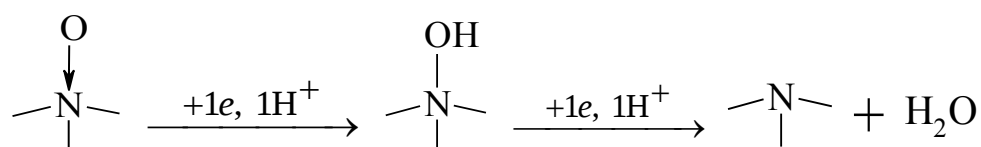
Кількість електронів можна обчислити також із залежності $E_p = f(\lg V)$, де кутовий коефіцієнт цієї залежності дорівнює $(2,3RT/\alpha nF)$. Для діапазону 0,3-1,0 В ми отримали значення 0,9 і для першого і другого піку, а для діапазону 1,0-4,0 В для першого піку $n = 0,7$ і для другого піку $n = 0,8$. Тому ми вважаємо, що два піки на полярограмі відповідає двом одноелектронним стадіям відновлення N-оксиду нефопаму.

Кількість іонів H^+ (zH^+), які беруть участь у електрохімічному процесі, обчислено з кута нахилу залежності потенціалу піка від рН за рівнянням:

$$dE/pH = (2,3RT \cdot zH^+)/\alpha nF \quad (2)$$

Для першого піку zH^+ становить 1,1, а для другого піку – 1,2. Для p-AgSAE за кутовим коефіцієнтом кількість електронів становить 0,702.

У літературі описано можливі механізми відновлення N-оксидів інших речовин, зокрема 37 похідних індолу і ди-N-оксидів похідних хіноксалін-2-карбоксаміду [28-29]. Автори проаналізували дані, отримані в апротонних розчинниках. Їхні результати свідчать про перенесення одного електрона під час відновлення N-оксидів з утворенням стабільного нітроксид радикал-аніона. У разі додавання невеликих кількостей води відновлення N-оксидів похідних індолу полегшується, що пояснено протонізацією нітроксид радикал-аніона [29]. Автори пропонують ЕС механізм відновлення, тобто приєднання одного електрона далі супроводжується реакцією протонізації за участю одного протона. В апротонних розчинниках аніон-радикал може залишатися стабільним. За наявності води аніон-радикал нестабільний і зазнає швидкого перетворення внаслідок приєднання протона. Однак у водному середовищі за кислого рН реакція протонування Оксигену N-оксиду нефопаму передуює перенесенню електрона. Друга стадія відновлення N-оксиду нефопаму також супроводжується перенесенням одного електрона і одного протона. Тому ми вважаємо, що відновлення N-оксиду нефопаму відбувається за схемою [30]:



Ця схема механізму електрохімічної реакції відновлення N-оксиду нефопаму цілком узгоджується з механізмом електрохімічної реакції відновлення інших лікарських речовин, які містять у свій будові третинний атом Нітрогену, про які ми повідомляли раніше [31].

3.3. Використання результатів дослідження в аналізі

3.3.1. Методика одержання градувальних розчинів

У мірну колбу на 25,0 мл вносили аліквоту РСЗ для одержання розчину заданої концентрації, далі в колбу додавали 4 мл УБС з рН 8,0 і 0,2 мл 10^{-2} М

КПМС. Суміш перемішували і витримували 10 хв, потім додавали 0,37 мл 2,5 М розчину HCl, щоб рН розчину зменшилося до 5,5 (контролювали рН-метром), далі доводили об'єм дистильованою водою до позначки. Переносили розчин до комірки, видаляли кисень аргонном протягом 10 хв та реєстрували вольтамперограми в інтервалі потенціалів від $-0,5$ до $-1,5$ В. Для одержаних кривих вимірювали значення струму для обох піків (рис. 11-12).

На рис. 11а "0" позначено фонову лінію, а 1–8 – порярограми, які відповідають концентраціям від $1,0 \cdot 10^{-6}$ – $2,0 \cdot 10^{-5}$ М. Аналогічно на рис. 12а "0" – фонові лінії, а 1–5 вольтамперограми, які відповідають концентраціям від $1,0 \cdot 10^{-7}$ – $8,0 \cdot 10^{-7}$ М. Параметри лінійної залежності обчислювали методом найменших квадратів, використовували пакет інструментів програми Origin. Обчислені таким чином аналітичні параметри наведено в табл. 3. LOD та LOQ для визначення обчислювали, відповідно, як $3,3S_a/b$ і $10S_a/b$, де S_a – залишкове стандартне відхилення параметра a у рівнянні прямої лінійної залежності I , мкА – C , моль/л; b – кутовий коефіцієнт цієї залежності) [32].

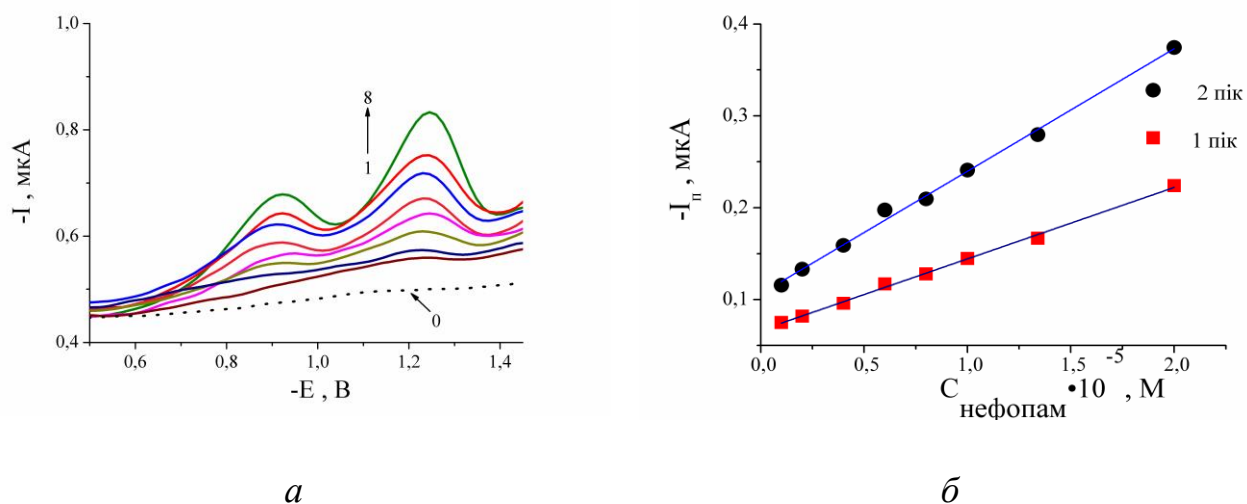


Рис. 11. Вигляд полярограм, одержаних на р.к.е. (а) та градувальні графіки (б) для двох піків відновлення N-оксиду нефопаму на фоні УБС. Умови: $\text{pH}_{\text{пол}} = 5,5$; $\text{pH}_{\text{окис}} = 8,0$; $C_{\text{КПМС}} = 1,0 \cdot 10^{-4}$ М; $t_{\text{окис}} = 10$ хв, $V = 0,5$ В/с.

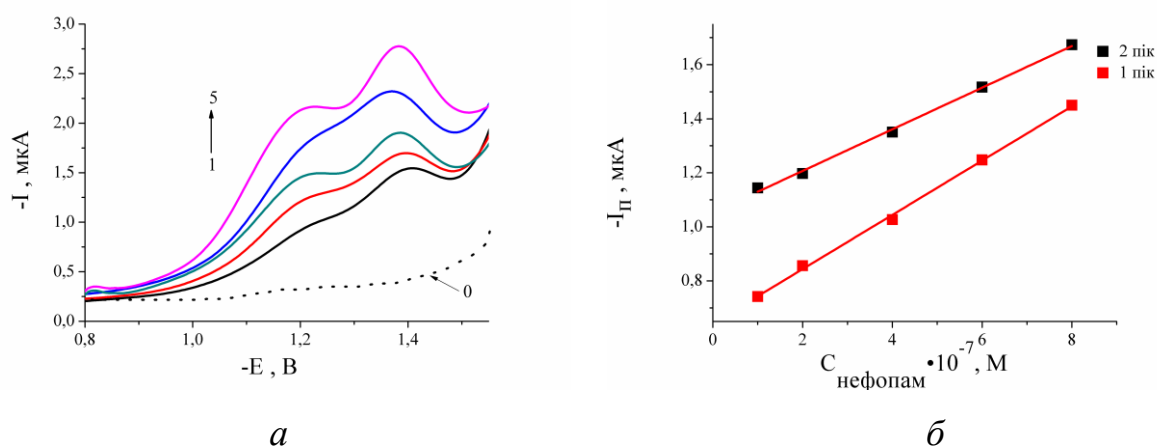


Рис. 12. Вигляд полярограм (а) та градуювальвані графіки на р-AgSAE для двох піків відновлення N-оксиду нефопаму (б) на фоні УБС Умови: $\text{pH}_{\text{пол}} = 5,5$; $\text{pH}_{\text{окис}} = 8,0$; $C_{\text{кпімс}} = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $t_{\text{окис}} = 10 \text{ хв}$, $V = 3,0 \text{ В/с}$. $E_{\text{асс}} = -0,75 \text{ В}$, $t_{\text{асс}} = 120 \text{ с}$.

Таблиця 3

Аналітичні характеристики вольтамперометричного визначення N-оксиду нефопаму на різних електродах

Аналітичні параметри	р.к.е.		р-AgSAE	
	1 пік	2 пік	1 пік	2 пік
Швидкість розгортки $V, \text{ В/с}$	0,5		3,0	
Потенціал піку $E, \text{ В}$	-0,92	-1,24	-1,26	-1,38
Межі лінійності, М	$1,0 \cdot 10^{-6} - 2,0 \cdot 10^{-5}$		$1,0 \cdot 10^{-7} - 8,0 \cdot 10^{-7}$	
Параметр $b \pm \Delta b$, мкА/М	$(7,78 \pm \pm 0,15) \cdot 10^3$	$(1,33 \pm 0,03) \cdot 10^4$	$(1,16 \pm 0,05) \cdot 10^6$	$(8,9 \pm 0,3) \cdot 10^5$
Параметр $a \pm \Delta a$, мкА	$0,0777 \pm 0,0015$	$0,106 \pm 0,003$	$0,50 \pm 0,03$	$0,962 \pm 0,015$
Коефіцієнт кореляції, R	0,9975	0,9957	0,9951	0,9971
RSD	0,01706	0,05024	0,0212	0,0125
Межа визначення (LOQ), М	$1,9 \cdot 10^{-6}$	$2,5 \cdot 10^{-6}$	$2,2 \cdot 10^{-7}$	$1,7 \cdot 10^{-7}$
Межа виявлення (LOD), М	$6,2 \cdot 10^{-7}$	$8,2 \cdot 10^{-7}$	$7,3 \cdot 10^{-8}$	$5,6 \cdot 10^{-8}$

3.3.2. Методика кількісного визначення нефопаму в лікарському засобі

Для перевірки розробленої нами методики використали розчин для ін'єкцій “Нефопам” виробництва корпорації «COOPER.S.A.» (Athens, Greece) [30, 33]. Приготування РДЗ описано в п. 2.2. Визначали концентрацію нефопаму способом градувального графіка за двома піками окремо, використовували р.к.е. Сполуки в розчині для ін'єкцій не заважають визначенню. Наші результати у мг/мл такі: за першим піком $19,4 \pm 0,7$ ($S_r = 1,4 \%$), а за другим піком $19,8 \pm 0,5$ ($S_r = 1,0 \%$). Вимірюючи два піки окремо ми отримали близькі результати, які потрапляють в допустимий інтервал вмісту нефопаму (п. 2.2). Однак, для результату за другим піком надійний інтервал є вузьким і значення ближче до номінального вмісту 20 мг/мл. Для того, щоб порівняти ці результати між собою як незалежні, ми використали критерій Стюдента і обчислили $t_{\text{екс}} = 1,675$, що є значно менше від критичного значення $t(P=0,95; f=2)$. Тому ці дві вибірки є характеристикою однієї сукупності.

Ми також порівняли наші результати з результатом випробувальної лабораторії (п. 2.2). У сертифікаті зазначено вміст нефопаму 20,48 мг/мл, значення сертифікату якості використали як дійсне значення вмісту нефопаму. У цьому випадку наш результат за першим піком 19,4 мг/мл суттєво

відхиляється від дійсного значення $Z = \frac{C_{\text{експ}}}{C_{\text{дійсн}}} \cdot 100 \% = 94,7 \%$. На наш погляд це

закономірно, оскільки перший пік відновлення за малих концентрацій нефопаму є нечіткий (“розмитий”). Це утруднює вимірювання струму і зменшує точність. Тому для аналітичних визначень доцільно використовувати

тільки другий пік, для якого $Z = \frac{C_{\text{експ}}}{C_{\text{дійсн}}} \cdot 100 \% = 96,7 \%$.

3.3.3. Методика кількісного визначення нефопаму в зразках сечі людини

На фоні сечі N-оксид нефопаму відновлюється на р.к.е. з утворенням тільки одного піку при потенціалі $-1,12$ В, очевидно, через вплив матриці. На

рисунку 13а “0” позначено фонову лінію (без уведеного N-оксиду нефопаму), а 1 – 6 полярограми, одержані для розчинів з концентраціями N-оксиду від $4,0 \cdot 10^{-6}$ до $2,0 \cdot 10^{-5}$ М. Струм фонової лінії зразка сечі досить різко збільшується зі збільшенням негативного потенціалу електрода, але ніяких піків нема (рис. 13а). Це сприяє селективності визначення, однак негативно впливає на чутливість і межу визначення. Мінімальна кількість нефопаму гідрохлориду, яку можна виявити таким методом становить $1,03 \cdot 10^{-6}$ М або 7,3 мкг на 1 мл сечі. LOQ відповідно дорівнює $3,1 \cdot 10^{-6}$ М або 22,5 мкг на 1 мл сечі. Ми вводили в сечу модельний стандартний розчин N-оксиду нефопаму і порівнювали отриману експериментально методом добавок кількість з уведеною кількістю. Виявили, що для вмісту N-оксиду нефопаму 25-40 мкг на 1 мл сечі $Z = \frac{C_{\text{уведено}}}{C_{\text{знайдено}}} \cdot 100\%$ становило $\geq 110\%$. Для вмісту N-оксиду 55-100 мкг на 1 мл сечі – коливалося на рівні 105-95 %. Поліпшити всю аналітичну продуктивність методики можна було б увівши стадію відокремлення [30].

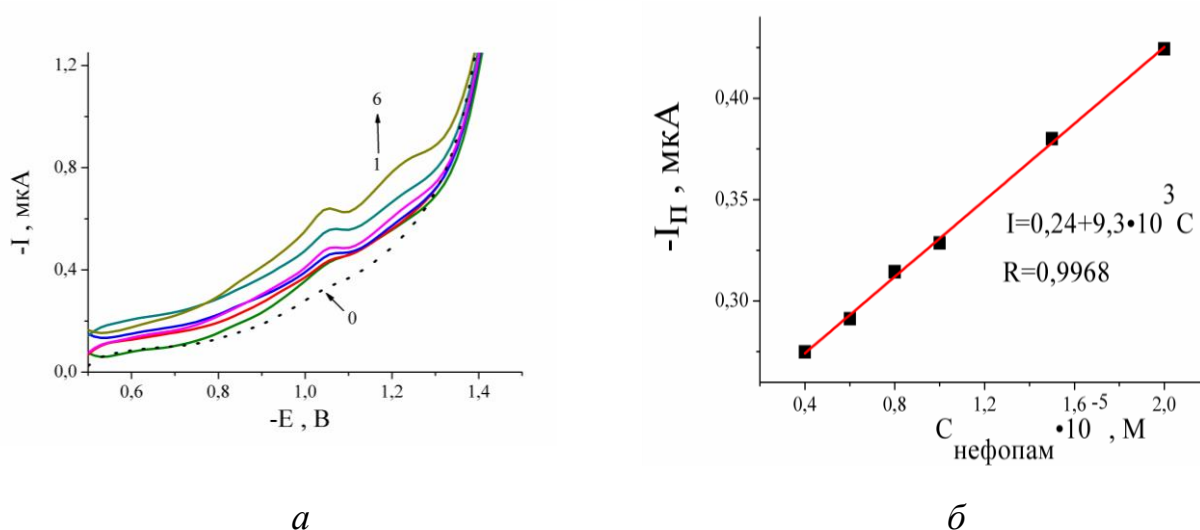


Рис. 13. Вигляд полярограм (а) та градувальний графік (б) визначення N-оксиду нефопаму в сечі на р.к.е. Умови: $\text{pH}_{\text{пол}} = 5,5$; $\text{pH}_{\text{окис}} = 8,0$; $C_{\text{кпмс}} = 1,0 \cdot 10^{-4}$ М; $t_{\text{окис}} = 10$ хв, $V = 0,5$ В/с.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено нові методики вольтамперометричного визначення алкалоїду нефопаму. Встановлено, що для них характерні широкі межі лінійності (1,5-2 порядки), низька межа визначення (на рівні 10^{-6} моль/л), достатня точність і селективність, низька вартість, швидка, портативна й адекватна концепція рутинного фармацевтичного аналізу.
2. Запропоновані методики за чутливістю та селективністю переважають існуючі спектрофотометричні методики визначення нефопаму, а також є експресними й економічно вигіднішими, ніж хроматографічні методики.
3. Методику апробовано під час аналізу розчину для ін'єкції "Нефопам" виробництва корпорації «COOPER.S.A.» (Athens, Greece), а також зразків сечі людини способом "уведено-знайдено".
4. Головною особливістю методики визначення нефопаму з використанням N-оксиду як аналітичної форми є можливість прямого визначення метаболіту нефопаму.
5. Сучасний аспект цієї роботи полягає у застосуванні р-AgSAE, який ефективно замінює ртутні електроди та хімічно модифіковані електроди.
6. Запропоновані методики можуть бути використані для розроблення аналітичної нормативної документації на лікарський засіб, а саме для кількісного визначення нефопаму гідрохлориду в ін'єкційному розчині, у практиці державних лабораторій з контролю якості лікарських засобів та заводських лабораторій фармацевтичних підприємств.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ніжник Г. Фармацевтична Хімія / Г. Ніжник – К.: ВСВ “Медицина”, 2015. – 352с.
2. Бондар М. Маловідомі риси давно відомого препарату: в центрі уваги – Нефопам / М. Бондар, М. Пилипенко, Д. Арешніков, В. Мельник, Ф. Ващук// Медицина неотложных состояний, 2018. – № 5 – С. 71-74.
3. Мельник В. Багаторічний досвід використання нефопаму в анестезіологічній практиці ГВМКЦ «Головний військовий клінічний госпіталь» МО України / В. Мельник, В. Ложкін // Медицина неотложных состояний., 2013. – № 5. – С. 60-64.
4. Ушко Н. Особливості знеболювання після видалення пухлин щелеп / Н. Ушко // Сімейна медицина, 2013 – №4 – С.73-74.
5. Душна О. Полярографічне відновлення деривату нефопаму, одержаного за допомогою калій пероксимоносульфату / О. Душна, О. Сарахман, Л. Дубенська // II Міжнародна (XII Українська) наукова конференція студентів, аспірантів і молодих учених « Хімічні проблеми сьогодення » (ХПС-2019) – Вінниця, 2019 – С. 9.
6. Shama S. Spectrophotometric microdetermination of nefopam, mebeverine and phenylpropanolamine hydrochloride in pharmaceutical formulations using alizarins / S. Shama, A. Amin // Spectrochimic Acta, Part A, 2004 – №60 – P. 1769–1774.
7. Singh S. Development and validation of UV-Spectrophotometric method for quantitative estimation of nefopam hydrochloride in polymethacrylate nanospheres / S. Singh, N. Sharma, Y. Singla, S. Arora. // Int. J. Pharm. Pharm. Sci., 2016 – Vol. 8 – P. 414-419.
8. Starek M. Analysis of Nefopam by TLC-densitometry. A Study of Degradation Mechanism in Solutions Under Stress Conditions / M. Starek, M. Dabrowska, M. Tarsa. // Acta Chim. Slov., 2011– №58 – P. 262–269

9. Burton L. Determination of plasma nefopam by liquid chromatography and electrochemical detection / L. Burton, N. Loftus, D. Vere, R. Whelpton. // *J. Chrom.*, 1990 – № 526 – P.159-168.
10. Aymard G. Sensitive determination of nefopam and desmethyl-nefopam in human biological fluids by HPLC / G. Aymard, D. Warot, P. Démolis, I. Laville, B. Diquet // *Pharm. Biomed. Anal.*, 2002 – № 30 – P. 1013–21.
11. Dubenska L. Voltammetric methods for the determination of pharmaceuticals. / L. Dubenska, M. Blazhejevskyj, S. Plotycya, M. Pylypets, O. Sarahman // *Methods and Objects Chem. Anal.*, 2017–Vol. 12 – P. 61–75.
12. Ozkan S. From mercury to nanosensors: Past, present and the future perspective of electrochemistry in pharmaceutical and biomedical analysis. / S. Ozkan, B. Uslu // *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2016 – Vol. 130 – P. 126–140.
13. Flanagan R. Electrochemical detection in HPLC analysis of drugs and poisons. / R. Flanagan, D. Perrett, R. Whelpton. – *The Royal Society of Chemistry (RS•C)*, 2005 – P. 239.
14. Plotycya S. Determination of local anesthetics of amide group in pharmaceutical preparations by cyclic voltammetry / S. Plotycya, L. Dubenska, M. Blazhejevskyj et al. // *Electroanalysis*, 2016 – Vol. 28, №10– P. 2575–2581.
15. Душна О. Методика полярографічного визначення нефопаму гідрохлориду / О. Душна, С. Івах, Л. Дубенська // **Тез. доп. XVII наук. конференц. “Львівські хімічні читання – 2019” – Львів, 2019 – С. А1.**
16. Новини лабораторії MTech <http://chem.lnu.edu.ua/mtech/devices.htm>
17. Yosypchuk B. Analytical applications of solid and paste amalgam electrodes. / B. Yosypchuk, J. Barek // *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2009 – №39 – P.189–203.
18. Yosypchuk B. Electrodes of nontoxic solid amalgams for electrochemical measurements. / B. Yosypchuk, L. Novotny // *Electroanalysis*, 2002 – №14 – P. 1733–1738.
19. Yosypchuk B. Nontoxic electrodes of solid amalgams. / B. Yosypchuk, L. Novotny // *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2002 – №32– P.141–151.

20. Yosypchuk J. Preparation and properties of reference electrodes based on silver paste amalgam. / B. Yosypchuk J. Barek, O. Yosypchuk // *Electroanalysis*, 2011 – №23 – P. 2226–2231.
21. Yosypchuk B. Analytical Applications of Solid and Paste Amalgam Electrodes / B. Yosypchuk, J. Barek // *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2009 – №39 – P.189-203.
22. Blazheyevskiy M. Application of derivatization by means of peroxy acid oxidation and perhydrolysis reactions in pharmaceutical analysis. Monograph, Ivan Franko National University of L'viv/ M. Blazheyevskiy – Lviv, Ukraine, 2017 –106 pp.
23. Belej J. Recent thermodynamic data for some reactions of peroxomonosulphate ion / J. Belej // *J. Electroana. Chem. Interfacial Electrochem.*, 1986 – Vol. 214. №.1-2 – P.481–483.
24. Steele W. The standard enthalpy of formation of peroxymonosulfate (HSO_5^-) and the standard electrode potential of the peroxymonosulfate-bisulfate couple / W. Steele, E. Appelman // *J. Chem. Thermodynamics*, 1982–.Vol. 14, №. 4 – P. 337–344.
25. Zinchuk V. The properties and using of peroxomonosulfate acid in analysis, / V. Zinchuk, O. Mytsuk, and O. Stadnichuk // *Visnyk of the Lviv University. Series Chemistry*, 2004–vol. 44 – P. 107–114. <http://chem.lnu.edu.ua/visn44.htm>
26. Brett A. *Electrochemistry Principles, Methods, and Applications*, first ed. Oxford Science Publications / A. Brett, C. Brett Oxford, New York, 1993.
27. Gosser D. *Cyclic voltammetry: Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms*. New York: / D. Gosser // VCH Publishers, Inc.; 1999.–161pp.
28. Reybier K. Electrochemical behavior of indolone-N-oxides: Relationship to structure and antiplasmodial activity / Reybier K., Nguyen Y., Ibrahim H. et al. // *Bioelectrochem.* 2012. –Vol. 88– P. 57–64
29. Moreno E. 1,4-Di-N-oxide quinoxaline-2-carboxamide: Cyclic voltammetry and relation between electrochemical behavior, structure and anti-tuberculosis activity / E. Moreno, S. Pérez-Silanesa, Sh Gouravaram. et al // *Electrochim. Acta*, 2011– Vol. 56 – P. 3270–3275.

30. Dubenska L. A new approach for voltammetric determination of nefopam and its metabolite / L. Dubenska, O. Dushna, S. Pysarevska, M. Blazheyevskiy // *Electroanalysis*, 2019 – Vol. 31. Doi: <https://doi.org/10.1002/elan.201900595>
31. Плотиця С. Про механізм відновлення на р.к.е. N-оксидів деяких анестезуючих речовин місцевої дії з третинним аміном // С. Плотиця, С. Писаревська, О. Душна, Л. Дубенська / *Вісн. Львів. ун-ту. Сер. хім.* – 2019 – Т. 60 – Ч. 1- С.191–199. Doi: <http://dx.doi.org/10.30970/vch.6001.191>
32. Ermer J. Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice / J. Ermer, J. Miller // WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2006.
33. Івах С. Спосіб полярографічного визначення нефопаму гідрохлориду / С. Івах, О. Душна. Науковий керівник: доц. Л. Дубенська // *Звітна студентська наукова конференція. Пленарне засідання.* – Львів, 2019 – С. 2.