© Український журнал клінічної та лабораторної медицини, 2012
УДК 615.074: 547.575: 547.565.2

Розробка та валідація методик якісного аналізу компонентів в екстемпоральній лікарській формі

О.А.Євтіфєєва, К.І.Проскуріна, М.О.Хмельова, Л.В.Вепрецька

Національний фармацевтичний університет, кафедра якості, стандартизації та сертифікації ліків,
Донецький національний медичний університет ім. М.Горького, кафедра управління та економіки фармації,
Державна науково-дослідна лабораторія з контролю якості лікарських засобів
Харків, Донецьк, Україна

Визначено оптимальну схему та умови виконання методик ідентифікації резорцину та саліцилової кислоти в лікарській формі аптечного виготовлення. Розроблено методику ідентифікації саліцилової кислоти за методом флуорометрії. Для обраних методик проведено валідацію за параметрами специфічність та достовірність ефекту реакції. За даними статистичної обробки результатів та «кривих ефективності» доведено, що методики можуть бути коректно відтворені та придатні для використання в умовах аптек.

Ключові слова: валідація методик ідентифікації, резорцин, саліцилова кислота, екстемпоральні лікарські засоби.

ВСТУП

Сучасна тенденція до модернізації та гармонізації національної системи забезпечення якості лікарських засобів до європейських вимог підіймає на високий рівень контроль якості лікарських засобів як промислового, так і аптечного виготовлення. За останні декілька років проведено у великій кількості експериментальні дослідження з вдосконалення методик аналізу та їх валідації. Завдяки чому отримано придатні та коректні методики для аналізу монокомпонентних екстемпоральних лікарських форм (ЕЛФ) [7]. Об'єктом даної роботи обрано двокомпонентну ЕЛФ — спиртовий розчин саліцилово-резорциновий.

Резорцин та саліцилова кислота виявляють собою похідні ароматичних вуглеводнів. Наявність гідроксильних груп та схожа хімічна будова даних речовин ускладнюють їх аналіз у спільній присутності в ЕЛФ. При аналізі нормативної документації на обрані компоненти виявлено, що ідентифікацію резорцину в субстанції ДФУ, Європейська, Американська та Британська фармакопеї пропонують проводити за визначенням температури плавлення [2, 5, 8], ІК-спектром [6], за реакцією з калію гідрофталатом й розчином натрію гідроксиду розведеного [2, 5, 8], за реакцією з розчином заліза (III) хлориду [6], за реакцією з розчином натрію гідроксиду концентрованого та хлороформом [2, 5, 6, 8]. Ідентифікацію саліцилової кислоти фармакопеї [2, 5, 6, 8] пропонують проводити за температурою плавлення, ІК-спектром, реакцією з розчином заліза (III) хлориду. Отже, в умовах аптек при наявності саліцилової кислоти ідентифікацію резорцину можна провести лише за деякими фармакопейними хімічними реакціями. Ідентифікацію саліцилової кислоти в присутності резорцину за фармакопейними методиками здійснити неможливо. Тому перед нами постає завдання підібрати специфічні методики ідентифікації компонентів при спільній присутності в лікарській формі, які повинні бути економічними по відношенню до ЕЛФ та реактивів, нетрудомісткими, які можливо виконати в умовах аптек. Експериментально перевірити достовірність та специфічність обраних методик для кожного компонента в присутності іншого.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для проведення досліджень використовували субстанції виробництва China Jiangsu Medicines & Health Products Import & Export (Group) Corporation саліцилової кислоти (серія №1004020) та резорцину (серія №HF20100701), які відповідають вимогам ДФУ [8].

ТАБЛИЦЯ 1

Результати реакцій ідентифікації резорцину та саліцилової кислоти

Реактив	Спостереження	
	резорцин	саліцилова кислота
Заліза хлорид (III)	синє-фіолетове забарвлення	синє-фіолетове забарвлення
Бром Br_2	білий осад	білий осад
Гідроксид натрію та хлороформ	червоне забарвлення	жовте забарвлення
Калію гідрофталат	зелена флуоресценція	забарвлення та флуоресценція відсутні
Реактив Маркі	червоне забарвлення	червоне забарвлення
Міді(II) сульфату розчин	забарвлення відсутнє	зелене забарвлення

Для роботи застосовували мірний посуд класу А, реактиви, які відповідають вимогам ДФУ, аналітичні ваги AB 204 S/A METTLER TOLEDO, PB-11, фірми «Sartorius AG» (Німеччина).

Для експерименту була виготовлена лікарська форма 4% спиртового розчину саліцилово-резорцинового, враховуючи правила аптечної технології, за прописом:

Саліцилової кислоти 4,0 г

Резорцину 0,4 г

Спирту 70% до 100 мл

Методика ідентифікації резорцину з калію гідрофталатом Р. 0,20 мл препарату поміщають у фарфорову чашу та випарюють на водяній бані, до сухого залишку додають близько 10 мг калію гідрофталату Р та ретельно змішують. Отриману суміш нагрівають на полум'ї до появи оранжево-жовтого забарвлення. Потім охолоджують, додають 1 мл розчину натрію гідроксиду розведеного Р, 10 мл води Р і збовтують до розчинення. В отриманому розчині виявляється інтенсивна зелена флуоресценція.

Методика ідентифікації резорцину з розчином натрію гідроксиду концентрованого Р та хлороформом Р. До 0,50 мл препарату додають 0,5 мл розчину натрію гідроксиду розведеного Р, 2-3 краплі хлороформу та нагрівають до кипіння. З'являється червоне забарвлення розчину.

Методика ідентифікації саліцилової кислоти з розчином міді (II) сульфату. До 1,00 мл препарату додають 2,0 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду, 1,0 мл розчину міді (III) сульфату. З'являється зелене забарвлення розчину.

Методика ідентифікації саліцилової кислоти з 2% розчином спиртовим алюмінію хлориду. До 0,50 мл препарату додають 1 мл 2% спиртового розчину алюмінію хлориду та збовтують. В отриманому розчині виявляється інтенсивна фіолетово-голуба флуоресценція.

ТАБЛИЦЯ 2

Параметри статистичної оцінки результатів реакції ідентифікації резорцину в ЕЛФ

Модельний розчин, %	Реакція з розчином натрію гідроксиду конц. та хлороформом			Реакція з калію гідрофталатом		
	Середні значення *					
	Частота невиявлення $\overline{\alpha}$	Ймовірність виявлення, $\overline{P}_{(C)}$	Достовірність R, %	Частота невиявлення $\overline{\alpha}$	Ймовірність виявлення, $\overline{P}_{(C)}$	Достовірність R, %
80,00	0,03	0,97	96,67	0,00	1,00	100,00
90,00	0,03	0,97	96,67	0,02	0,98	98,33
100,00	0,00	1,00	100,00	0,00	1,00	100,00
110,00	0,02	0,98	98,33	0,00	1,00	100,00
120,00	0,00	1,00	100,00	0,00	1,00	100,00
Холостий	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00
Загальне середнє	0,02	0,98	98,33	0,00	1,00	99,67

Примітки: ** — значення достовірності є середнім значенням достовірності ефекту реакції за даними трьох лабораторій (n=300).*

ТАБЛИЦЯ 3

Параметри статистичної оцінки результатів реакції ідентифікації саліцилової кислоти в ЕЛФ

Модельний розчин, %	Частота не виявлення, б			Середні значення *		
	лаб. 1	лаб. 2	лаб. 3	$\overline{\alpha}$	$\overline{P}_{(C)}$	$\overline{R}$, %
	$б_1$	$б_2$	$б_3$			
80	0,05	0,05	0,05	0,05	0,95	95,00
90	0,05	0,05	0,05	0,05	0,95	95,00
100	0	0	0	0,00	1,00	100,00
110	0	0,05	0,05	0,03	0,97	96,67
120	0	0	0,05	0,02	0,98	98,33
Холостий	1	1	1	1,00	0,00	0,00
Загальне середнє				0,03	0,97	97,00

Примітки: ** — значення достовірності є середнім значенням достовірності ефекту реакції за даними трьох лабораторій (n=300).*

Готували п'ять модельних розчинів згідно з діапазоном застосування методики [9] в концентраціях: 80,00%, 90,00%, 100,00%, 110,00%, 120,00% від номінальної. Точні наважки резорцину та саліцилової кислоти (m, г) поміщали в мірну колбу ємністю 100,00 мл та доводили спиртом 70% до 100,00 мл.

Статистичну обробку експериментальних даних проводили відповідно до стандартизованого підходу до оцінки хімічних методів ідентифікації [9].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Наявність у будові резорцину та саліцилової кислоти бензольного ядра та фенольного гідроксилу зменшує кількість реакцій, які можливо використати для ідентифікації саліцилової кислоти [10] в умовах аптеки. Тому проведено експериментальне дослідження ефекту хімічних реакцій при аналізі лікарської форми та окремих речовин, завдяки чому,обрано специфічні методики ідентифікації компонентів у спільній присутності (табл. 1).

В основу хімічних методик ідентифікації резорцину в ЕЛФ покладено визначення резорцину в субстанції [8], яке базується на реакції з розчином натрію гідроксиду концентрованого Р і хлороформом та на реакції з калію гідрофталатом. Оптимальну аліквоту лікарської форми обирали, враховуючи кількість субстанції для випробування відповідно до вимог ДФУ. При здійсненні експериментальних досліджень з'ясовано, що наявність у розчині саліцилової кислоти не запобігає повноті перебігу реакцій та отриманню достовірних результатів.

При валідації методик ідентифікації резорцину, згідно зі стандартизованою процедурою [9], було проведено експериментальне дослідження реакцій у діапазоні застосування 80,00-120,00% методик, результати якого свідчать, що достовірність реакцій дорівнює 98,33% та 99,67% (табл. 2).

Для подальших досліджень було обрано реакцію саліцилової кислоти з 2 мл 0,1 М розчином натрію гідроксиду та 1 мл розчином міді (II) сульфату [10]. Для цієї методики здійснено дослідження достовірності виявлення саліцилової кислоти, результати (табл. 3) якого доводять, що методика є прийнятною для подальшого використання.

Враховуючи те, що для ідентифікації резорцину використовується реакція утворення флуоресцеїну, вирішено для ідентифікації салі-

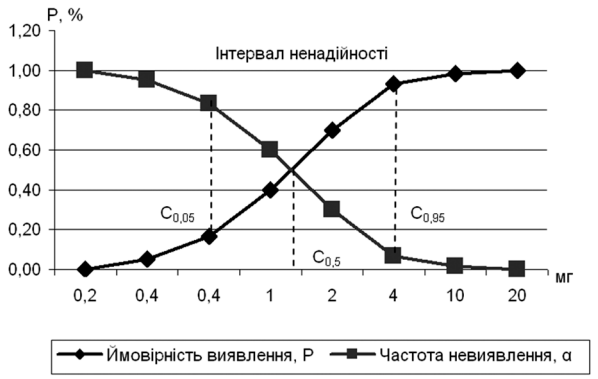

Рис. 1. Крива ефективності реакції утворення флуоресціюючої комплексної сполуки при взаємодії саліцилової кислоти з розчином спиртовим алюмінію хлориду.

ТАБЛИЦЯ 4

Результати дослідження достовірності ефекту реакції саліцилової кислоти з розчином спиртовим алюмінію хлориду

Модельний розчин, %	Середні значення *		
	$\overline{\alpha}$	$\overline{P}_{(C)}$	$\overline{R}$, %
80	0,00	1,00	100,00
90	0,02	0,98	98,33
100	0,02	0,98	98,33
110	0,02	0,98	98,33
120	0,00	1,00	100,00
Холостий	1,00	0,00	0,00
Загальне середнє	0,01	0,99	99,00

Примітки: ** — значення достовірності є середнім значенням достовірності ефекту реакції за даними трьох лабораторій (n=300).*

цилової кислоти також підібрати визначення за утворенням флуоресціюючих комплексних сполук. Метод флуорометрії достатньо широко використовується для визначення саліцилової кислоти завдяки утворенню флуоресціюючих хелатів з іонами різних металів [1, 4]. В якості реагента реакції запропоновано використовувати 2% розчин спиртовий алюмінію хлориду. Для вивчення реакції побудовано криву ефективності та визначено інтервал ненадійності, нижня та верхня межі якого дорівнюють 0,4 мг та 4,0 мг (рис. 1.)

На підставі отриманих даних визначено оптимальні аліквоти ЕЛФ — 0,50 мл та 2% розчину спиртового алюмінію хлориду — 2 мл. За проведеною процедурою валідації даної методики встановлено, що достовірність ефекту реакції складає 99,00% (табл. 4).

ВИСНОВКИ

Обрано специфічні методики для ідентифікації резорцину та саліцилової кислоти у спільній присутності. Встановлено оптимальні умови виконання даних методик при аналізі екстемпоральних лікарських форм. Для обраних методик проведено валідацію за параметрами специфічність та достовірність ефекту реакції. За допомогою статистичної обробки результатів доведено, що методики можуть бути коректно відтворені та придатні для використання в умовах аптек.

Розроблено методику ідентифікації саліцилової кислоти за методом флуорометрії. При валідації методики за допомогою «кривих ефективності» визначено оптимальні умови проведення та встановлено, що достовірність виявлення складає 99,00%.

ЛІТЕРАТУРА

1. Analysis of salicylic acid based on the fluorescence enhancement of the As(III)–salicylic acid system / M.M.Karim, H.S.Lee, Y.S.Kim, H.S.Bae [et. al.] // Analytica Chimica Acta. — 2006. — Vol. 576 (Is. 1). — P. 136-139.
2. British Pharmacopoeia Secretariat. — London, 2009. — Vol. 1. — P. 10952.
3. Cha Ki-W. Determination of iron(III) with salicylic acid by the fluorescence quenching method / Ki-W.Cha, K.-W.Park // Talanta. — 1998. — Vol. 46 (Is. 6). — P. 1567-1571.
4. Enhanced fluorescence of Tb(III), Dy(III) perchlorate by salicylic acid in bis(benzoylmethyl) sulfoxide complexes and luminescence mechanism / W.-X.Li, Y.-S.Zheng, X.-J.Sun, W.-J.Chai [et. al.] // Journal of Luminescence. — 2010. — Vol. 130 (Is. 8). — P. 1455-1462.
5. European Pharmacopoeia. — 6th ed. — Strasbourg : European Directorate for the Quality of Medicines, 2008. — Vol. 2. — 3308 p.
6. The USP Pharmacists' Pharmacopoeia. — 2-nd ed. — Rockville, 2008. — 1519 p.
7. Валідація титриметричної методики кількісного визначення розчинів пілокарпіну гідрохлориду аптечного виготовлення / О.А.Євтіфєєва, К.І.Проскуріна, В.А.Георгіянц // Медична хімія. — 2009. — Т.11, №4. — С. 24-28.
8. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. — С. 556 с., Доп. 1. — Харків: РІРЕГ, 2004. — 520 с., Доп. 2. — Харків: РІРЕГ, 2008. — 608 с.
9. Євтіфєєва О.А. Стандартизація підходів до оцінки хімічних методів ідентифікації речовин, які входять до складу екстемпоральних лікарських препаратів / О.А.Євтіфєєва // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. — 2010. — №1. — С. 19-24.
10. Максютина Н.П. Методы идентификации лекарственных препаратов / Н.П.Максютина, Ф.Е.Каган, Ф.А.Митченко и др. — К.: Здоров'я, 1978. — 240 с.

О.А.Евтифеева, К.И.Проскурина, М.О.Хмелёва, Л.В.Вепрецкая. Разработка и валидация методик качественного анализа компонентов в экстемпоральной лекарственной форме. Харьков, Донецк, Украина.

Ключевые слова: *валидация методик идентификации, резорцин, салициловая кислота, экстемпоральные лекарственные средства.*

Определены оптимальная схема и условия выполнения методик идентификации резорцина и салициловой кислоты в лекарственной форме аптечного приготовления. Разработана методика идентификации салициловой кислоты методом флуорометрии. Для данных методик проведена валидация по параметрам специфичность и достоверность эффекта реакции. По данным статистической обработки результатов и «кривых эффективности» доказано, что методики могут быть корректно воспроизведены и пригодные для использования в условиях аптек.

O.A.Evtifeyeva,K.I.Proskurina,M.O.Hmeleva, L.V.Vepretska. Development and validation of identification techniques of ingredient***s in extemporaneous preparations. Kharkiv, Donetsk, Ukraine.***

Key words: *validation of identification techniques, resorcinol, salicylic acid, extemporaneous preparations.*

The optimum scheme and execution condition of identification techniques of resorcinol and salicylic acid in extemporaneous compounding have been determined. The identification technique of salicylic acid by method fluorimetry has been developed. The validations by parameters specificity and reliability have been carried out. An estimation of statistical processing results and «efficiency curves» the methods can be correctly reproduced and are appropriate for further using in the conditions of chemistry.

Надійшла до редакції 20.11.2011 р.