



Є.І. Бисага, О.А. Євтіфеева, В.А. Георгіянц

Вибір реакцій для якісного контролю прокаїну гідрохлориду в лікарських формах аптечного виготовлення

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: екстемпоральна рецептура, ідентифікація, прокаїну гідрохлорид.

Ключевые слова: экстемпоральная рецептура, идентификация, прокаина гидрохлорид.

Key words: extemporal dosage forms, identification, procaine hydrochloride.

Проведено аналіз можливих реакцій якісного визначення прокаїну гідрохлориду в лікарських формах аптечного виготовлення. Вивчено специфічність досліджуваних реакцій ідентифікації та проведено їх валідацію, відповідно до вимог ДФУ. Обрано реакції, які дозволяють достовірно підтвердити наявність прокаїну гідрохлориду в лікарських формах аптечного виготовлення.

Проведен анализ возможных реакций качественного определения прокаина гидрохлорида в лекарственных формах аптечного приготовления. Изучена специфичность исследуемых реакций и проведена их валидация, в соответствии с требованиями ГФУ. Выбраны реакции, которые позволяют достоверно подтвердить наличие прокаина гидрохлорида в лекарственных формах аптечного приготовления.

The analysis of the possible reactions for the identification of the procaine hydrochloride in the extemporal dosage forms is conducted. The specificity of the reactions was studied and validation of the proposed reactions in accordance to the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine was conducted. The reactions which allow to confirm reliably the presence of the procaine hydrochloride in extemporal drugs are chosen.

Виходячи з визначення ІСН [10], що валідація є підтвердженням придатності методики для певних цілей, слід підходити до вибору реакцій ідентифікації з урахуванням того, що лікарські засоби, виготовлені в аптеці, здебільшого являють собою одна-та багатоконпонентні порошки, розчини, мазі та інші лікарські форми. Тому реакції ідентифікації інгредієнтів мають бути специфічними з урахуванням складу пропису, достатньо чутливими для прописаної концентрації іону, який визначається, або функціональної групи та характеризуватись достовірністю на рівні вірогідності 95%.

Мета роботи

Вибір оптимальних реакцій ідентифікації прокаїну гідрохлориду в лікарських формах аптечного виготовлення, вивчення їх специфічності та валідація обраних методик.

Для вибору реакцій ідентифікації прокаїну гідрохлориду в лікарських формах аптечного виготовлення нами було проаналізовано фармакопейні реакції, наведені у Європейській, Британській, Японській і Американській фармакопеях та ДФУ [2,7,9,11,12].

Монографії на субстанцію прокаїну гідрохлориду містять в підрозділі «Перша ідентифікація» фізико-хімічні методи дослідження – температуру плавлення (ідентифікація А) [2,9], УФ- [11] та ІЧ-спектроскопію (ідентифікація В) [2,7,9,11,12], що не можуть бути застосовані у водних розчинах та виконані в умовах аптеки.

Серед хімічних реакцій ідентифікації фармакопейними є реакції, що ґрунтуються на окисно-відновних властивостях прокаїну, а саме виникнення коричнево-червоного забарвлення після мінералізації азотною кислотою, розчинення залишку в ацетоні та додавання до одержаного розчину калію гідроксиду спиртового розчин (ідентифікація С). Відзначимо, що ця реакція, перевагою якої є достатньо висока специфічність для

прокаїну гідрохлориду [2,9], не зовсім зручна для виконання в умовах аптеки, оскільки вимагає попереднього упарювання, використання димлячої азотної кислоти та передбачає застосування прекурсорю – ацетону.

Завдяки наявності аміногрупи основа прокаїну здатна вступати у реакції окиснення. Ці властивості молекули прокаїну гідрохлориду використовуються в реакції ідентифікації D. Реакція традиційно використовується в експрес-аналізі прокаїну гідрохлориду [1] завдяки своїй високій чутливості та простоті виконання. Методика полягає у взаємодії з розведеною сірчаною кислотою та калію перманганатом, який миттєво знебарвлюється у кислому розчині прокаїну гідрохлориду. Ця реакція наведена і у монографії Європейської фармакопеї та ДФУ [2,9]. Єдиним недоліком цієї реакції є використання перманганату калію, який, як і ацетон, належить до списку прекурсорів.

Як відомо, деякі ароматичні аміни здатні окиснюватись навіть під дією кисню повітря з утворенням забарвлених продуктів. Крім того, використовують і інші окиснювачі – хлорамін, білільне вапно, дихромат калію в кислому середовищі. У більшості методик визначення прокаїну гідрохлориду в аптечних лікарських формах наводиться реакція ідентифікації, у якій в якості окиснювача використовується пергідроль у присутності концентрованої сірчаної кислоти, при цьому поступово з'являється бузкове забарвлення [4,5].

В основі ідентифікації фармакологічно активної частини молекули – основи прокаїну – лежать реакції, засновані на утворенні азобарвника [1-3,9,12] або основ Шиффа [1,3]. Реакція утворення азобарвника є груповою реакцією на первинні ароматичні аміни. В результаті реакції спостерігається утворення вишнево-червоного забарвлення. Реакція утворення основи Шиффа не є фармакопейною і використовується здебільшого для

якісного експрес-аналізу ароматичних амінів в аптеках. Методика цієї реакції ґрунтується на взаємодії речовин з групи ароматичних амінів з ароматичними альдегідами, що входять до складу газетного паперу [1,3], в результаті чого спостерігається поява жовтогарячого забарвлення паперу.

Оскільки прокаїн є гідрохлоридом, серед хімічних реакцій, що пропонує ДФУ та інші фармакопії для його ідентифікації, є реакція на хлориди з срібла нітратом (ідентифікація E) [2,7,9,11,12]. При визначенні прокаїну гідрохлориду в однокомпонентній лікарській формі позитивна реакція на хлорид-іони може підтвердити, що в розчині є сіль хлористоводневої кислоти, що відрізняє прокаїну гідрохлорид від деяких похідних ароматичних амінів, наприклад, анестезину, n-аміносаліцилату, стрептоциду, норсульфазолу, сульфацил-натрію, уросульфану. При визначенні прокаїну гідрохлориду в ізотонічній або стабілізованій хлористоводневою кислотою лікарській формі реакція, внаслідок своєї не специфічності, не може слугувати поставленим завданням.

До нефармакопейних реакцій належить реакція утворення основи прокаїну (безбарвна масляниста рідина) після додавання розчину натрію гідроксиду. Ця реакція є специфічною для прокаїну і використовується в методиках визначення прокаїну гідрохлориду в аптечних лікарських формах [3,5].

У ході експерименту були проведені всі наведені реакції, визначена можливість їх використання для ідентифікації прокаїну гідрохлориду в екстемпоральних лікарських формах та здійснена перевірка їх специфічності.

Експериментальна частина

У ході досліджень використовувалась субстанція прокаїну гідрохлориду: фірма «Bierfeld Siemensgluss International GmbH» Hamburg, Німеччина, серія №040220, яка задовольняє вимоги ВР 98/USP 24/ДФУ. Для проведення контрольного дослідження – РСЗ серії №031233. Для роботи використовувалися реактиви, які відповідають вимогам ДФУ [2].

Методика проведення реакції утворення азобарвника: до 4 мл розчину (для 0,25% розчину), 2 мл розчину (для 0,5% розчину), 1 мл розчину (для 1% розчину), 0,5 мл розчину (для 2% розчину) прокаїну додають 1 краплю кислоти хлористоводневої та 0,2 мл розчину нітриту натрію Р і через 1–2 хвилини – 1 мл розчину β-нафтолу Р; утворюється осад вишнево-червоного кольору.

Контрольний дослід: 2,5 г субстанції розчиняють у воді, вільній від вуглецю діоксиду, Р, об'єм розчину доводять до 50 мл. Далі 1 мл розчину доводять водою Р до об'єму 100 мл. До 2 мл одержаного розчину додають 1 краплю кислоти хлористоводневої та 0,2 мл розчину нітриту натрію Р і через 1–2 хвилини додають 1 мл розчину β-нафтолу Р; утворюється осад вишнево-червоного кольору.

Методика проведення реакції нітрування з подальшим утворенням калієвої солі ацинітроформи орто-хіноїдної будови: до 2 мл розчину (0,25%), 1 мл розчину (0,5%), 0,5 мл розчину (1% та 2%) прокаїну додають

0,5 мл кислоти азотної димлячої Р, упарюють насухо на водяній бані, охолоджують і залишок розчиняють у 5 мл ацетону Р. До одержаного розчину додають 1 мл 0,1 М розчину калію гідроксиду спиртового; з'являється тільки коричнювато-червоне забарвлення.

Контрольний дослід: до близько 5 мг субстанції додають 0,5 мл кислоти азотної димлячої Р, упарюють насухо на водяній бані, охолоджують і залишок розчиняють у 5 мл ацетону Р. До одержаного розчину додають 1 мл 0,1 М розчину калію гідроксиду спиртового; з'являється тільки коричнювато-червоне забарвлення.

Методика проведення реакції з калію перманганатом: до 4 мл розчину (0,25%), 2 мл розчину (0,5%), 1 мл розчину (1% та 2%) прокаїну додають 2 мл води Р, 0,5 мл кислоти сірчаної розведеної Р і збовтують. До одержаного розчину додають 1 мл розчину 1 г/л калію перманганату Р; забарвлення відразу зникає.

Контрольний дослід: 2,5 г субстанції розчиняють у воді, вільній від вуглецю діоксиду Р, доводять об'єм розчину до 50 мл. До 0,2 мл розчину S додають 2 мл води Р, 0,5 мл кислоти сірчаної розведеної Р і збовтують. До одержаного розчину додають 1 мл розчину 1 г/л калію перманганату Р; забарвлення відразу зникає.

Методика проведення реакції з пергідролем: до 2 мл розчину (0,25%, 0,5%), 1 мл розчину (1% та 2%) прокаїну додають 1–2 краплі пергідролу та 3–5 крапель концентрованої сірчаної кислоти, поступово з'являється бузкове забарвлення.

Методика проведення реакції з натрію гідроксидом: при додаванні до 2 мл водного розчину прокаїну гідрохлориду 2 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду виділяється безбарвний маслянистий осад основи прокаїну.

Контрольний дослід: 2,5 г субстанції розчиняють у воді, вільній від вуглецю діоксиду Р, доводять об'єм розчину до 50 мл. До 2 мл одержаного розчину додають 2 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду, виділяється безбарвний маслянистий осад основи прокаїну.

Холостий дослід: для кожного випробуваного розчину реакцію проводять відповідно наведеної вище методики, однак замість аліквоти лікарської форми використовують воду очищену Р.

Випробуваний та модельні розчини готували в умовах аптеки за правилами аптечної технології, використовуючи однаково віддалений розкид концентрації прокаїну гідрохлориду на всьому діапазоні застосування методики ±20% (відповідно 80%; 90%; 100%; 110%; 120%). В двокомпонентних лікарських формах кількість стабілізатору або натрію хлориду в усіх модельних розчинах однакова та відповідає пропису.

Для якісних методів аналізу, на відміну від кількісного аналізу, точність не може бути виражена як стандартне відхилення або відносне стандартне відхилення, результат проведення методу дає відповідь у вигляді «так/ні» [12]. Тому характеристику обраних методик ідентифікації на всьому діапазоні концентрації від 80 до 120% ми проводили за такою схемою: результат реакції

досліджували на кожному з випробуваних розчинів лікарської форми 80%, 90%, 100%, 110%, 120% на 10 копіях. Додатково для візуального порівняння ефекту реакції з очікуваним проводили дослід із субстанцією прокаїну гідрохлориду за фармакопейною методикою. З метою запобігання проходження помилково-позитивної реакції проводили холостий дослід.

Результати дослідження та їх обговорення

Оскільки реакції, що наводяться у фармакопеї, не вимагають валідації, а повинні бути тільки верифіковані з урахуванням концентрації випробуваного розчину, ми провели дослідження результатів реакції розчинів прокаїну гідрохлориду 0,25%, 0,5%, 1% та 2% за методикою ДФУ [2].

На наш погляд, з наведених реакцій ідентифікації прокаїну заслуговує уваги реакція утворення азобарвника. Для перевірки специфічності цієї реакції ми провели паралельне дослідження результатів цієї реакції для розчинів інших ароматичних амінів такої ж концентрації. В якості лікарських препаратів для перевірки специфічності нами обрані розчинні у воді первинні ароматичні аміни з групи лікарських засобів, які часто застосовуються для виготовлення лікарських форм в аптеці. Результати дослідження наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Результати взаємодії фармацевтичних субстанцій

№ за/п	Розчини	Результат реакції утворення азобарвника
1.	Прокаїну г/х	вишнево-червоне забарвлення та осад
2.	Натрію ПАСК	вишнево-червоне забарвлення
3.	Норсульфазол натрію	оранжево-червоне забарвлення та осад
4.	Сульфацил натрію	вишнево-червоне забарвлення
5.	Уросульфан	оранжево-червоне забарвлення та осад
6.	Анестезин	вишнево-червоне забарвлення та осад
7.	Стрептоцид	оранжево-червоне забарвлення та осад

Результати дослідження реакції на первинну ароматичну аміногрупу для усіх модельних розчинів кожної концентрації позитивні. Модельні розчини від 80 до 120% випробуваного 0,25% розчину при проведенні реакції дають вишнево-червоне забарвлення, з часом випадає вишнево-червоний осад. Отже, проведений дослід достовірно дає позитивну реакцію в обраному діапазоні концентрацій для усіх досліджуваних розчинів прокаїну гідрохлориду.

Дослідження реакції з калію перманганатом показало, що усі модельні розчини за даних умов реакції дають зникнення фіолетового забарвлення розчину калію перманганату. Ця реакція може бути використана для ідентифікації прокаїну гідрохлориду в його розчинах.

Щодо реакції утворення основ Шиффа, то на сьогодні вона не може бути приведена до стандартних

умов, оскільки, замість зручності у виконанні, повинна містити додаткові вимоги щодо марки паперу. Тому ми провели вивчення специфічності реакції утворення основ Шиффа з основою прокаїну використовуючи розчини ароматичних альдегідів, наведених у розділі «реактиви» ДФУ [2]. Необхідність відповідності реакцій вимогам ДФУ, зазначена у наказі МОЗ №626, вимагає використання реактивів, наведених у ДФУ. У переліку реактивів ДФУ серед ароматичних альдегідів наведені бензальдегід, анісовий (*n*-метоксибензальдегід), ванілін (*n*-гідрокси-*m*-метоксибензальдегід), диметиламінобензальдегід, нітробензальдегід (2-нітробензальдегід), саліциловий (2-гідроксибензальдегід), фталевий альдегід, фурфурол. Тому для вивчення реакції розчинів прокаїну гідрохлориду аптечного виготовлення нами була досліджена реакція утворення основ Шиффа з використанням саме цих реактивів, виготовлених відповідно до вимог ДФУ [2]. Для вивчення специфічності реакції нами було проаналізовано перелік лікарських форм, що виготовляються в аптеках про запас, концентратів та напівфабрикатів для вибору інших речовин з групи первинних ароматичних амінів, що також можуть утворювати забарвлені сполуки з ароматичними альдегідами. Для якісного аналізу водних розчинів прокаїну гідрохлориду при перевірці специфічності враховувались тільки водорозчинні субстанції у відповідних концентраціях. Результати дослідження наведено в таблиці 2.

Таблиця 2

Результати взаємодії фармацевтичних субстанцій з ароматичними альдегідами

№ за/п	Розчини	Отриманий колір забарвлення розчину						
		бензальдегід	ванілін	диметиламінобензальдегід	2-нітробензальдегід	саліциловий	анісовий	фталевий
1.	Прокаїну г/х 2%	жовто-оранжеве						
2.	Натрію ПАСК	жовто-оранжеве						
3.	Норсульфазол натрію	оранжево-червоне						
4.	Сульфацил натрію	оранжево-червоне						
5.	Уросульфан	оранжево-червоне						
6.	Анестезин	жовто-оранжеве						
7.	Стрептоцид	оранжево-червоне						

Дослідження реакції з кислотою азотною димлячою з подальшим додаванням калію гідроксиду для модельних розчинів усіх концентрацій показало, що водні розчини прокаїну гідрохлориду не дають чіткого та стійкого

ефекту реакції. Тобто аналізована реакція не дозволяє з достовірністю 95% виявити прокаїну гідрохлорид при свідомій його присутності.

Результати дослідження реакції ідентифікації з пергідролем в середовищі концентрованої сірчаної кислоти показали, що для випробуваних розчинів 0,25% та 0,5% ефект реакції не є чітким. Для випробуваного 1% розчину результати дев'яти копій 80% модельного розчину можна характеризувати як невизначені. Для 90% модельного розчину з десяти копій нечітка реакція спостерігалася у двох пробах. В інших модельних розчинах реакцію в усіх пробах можна характеризувати як позитивну. Для 2% випробуваного розчину ефект реакції для всіх копій модельних розчинів позитивний.

При проведенні досліджень для реакції з натрію гідроксидом для випробуваних розчинів 0,25%, 0,5% та 1% виділення безбарвної маслянистої рідини основи прокаїну не помітне. Для 2% випробуваного розчину результати неоднозначні: для 80% та 90% модельних розчинів із десяти копій в сімох ефект реакції був невизначений, в двох із десяти копій – негативний і тільки в одній копії з п'яти – позитивний. Для 100% модельного розчину в 2 копіях із десяти ефект реакції невизначений, в інших копіях – позитивний. Для модельних розчинів 110% та 120% в усіх копіях ефект реакції позитивний. Тобто, ця реакція для ідентифікації прокаїну гідрохлориду в досліджуваних нами розчинах не дає достовірної відповіді.

До недоліків реакції з натрію гідроксидом можна віднести невелику чутливість (мала кількість маслянистої рідини погано розпізнається в безбарвному водному розчині) та дуже повільне протікання у часі.

Таким чином, для якісного аналізу лікарських форм аптечного виготовлення, які містять прокаїну гідрохлорид, можна рекомендувати: реакцію азосполучення, що доводить наявність в молекулі прокаїну первинної ароматичної аміногрупи; реакцію на хлорид-іон відповідно до статті ДФУ 2.3.1., що доводить наявність молекули хлористоводневої кислоти; реакцію з калію перманганатом, яка в сукупності з двома попередніми гарантує достатній рівень специфічності при ідентифікації. При аналізі 1 і 2% розчинів реакцію з калію перманганатом можна замінити реакцією з пергідролем, яка теж є досить специфічною для прокаїну.

Висновки

1. Проведено аналіз існуючих методик ідентифікації прокаїну гідрохлориду в лікарських формах аптечного виготовлення. Для обраних методик вивчено їх специфічність з урахуванням речовин, які дають схожий ефект реакції, та достовірність у залежності від концентрації випробуваних розчинів.

2. Встановлено, що при аналізі лікарських форм з прокаїну гідрохлоридом достатній рівень специфічності гарантує виконання трьох хімічних реакцій: азосполучення, на хлорид-іон відповідно до статті ДФУ 2.3.1. та реакції з калію перманганатом.

Література

1. Беликов В.Г. Фармацевтическая химия: В 2-х ч. Ч. 2. Специальная фармацевтическая химия / В. Г. Беликов. – Пятигорск, 1996 – 608 с.
2. Державна Фармакопея України // Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.
3. Максютин Н. П. Методы анализа лекарств. / Н. П. Максютин, Ф. Е. Каган, Л. А. Кириченко, Ф. А. Митченко. – К.: Здоров'я, 1984. – 224 с.
4. Руководство к лабораторным занятиям по фармацевтической химии / [Аксенова Э. Н., Андрианова О. П., Арзамасцев А. П. и др.]; под ред. А. П. Арзамасцева. – М.: Медицина, 1987. – 304 с.; ил.
5. Справочник провизора-аналитика / Под ред. Д. С. Волоха, Н. П. Максютинной. – К.: Здоров'я, 1989. – 200 с.
6. Фармацевтическая химия: Учеб. Пособие / Под ред. А. П. Арзамасцева. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 604 с.
7. British Pharmacopoeia. – 1999. – Electronic version.
8. EURACHEM / CITAC Guide: Guide to Quality in Analytical Chemistry (An Aid to Accreditation). – Edition 2002. – 57 p.
9. European Pharmacopoeia. – 5th ed. – Electronic version. – 2779 p.
10. ICH-Q2B «Validation on Analytical Procedures»: Methodology: Geneva, (1995).
11. The Japanese Pharmacopoeia, XIII ed. – The Ministry of Health and Welfare, 1996. – P. 1071.
12. The United States Pharmacopoeia, XXIV ed. – United States Pharmacopoeia Convention, Inc, 2000. – 2149 p.

Відомості про авторів:

Георгіянец В.А., НФаУ, директор Державного підприємства «Державний науковий центр лікарських засобів».

Бисага С.І., Ужгородський державний університет, керівник виробничої практики фармацевтичного факультету.

Євтіфеева Ольга Анатоліївна, Національний фармацевтичний університет, доц. каф. якості, стандартизації та сертифікації ліків.

Адреса для листування:

Георгіянец Вікторія Акіпівна, 61166, м. Харків, вул. Новгородська, б. 44, кв. 189