

УДК 615.074:615.212:615.356:577.164:615.451.2

В. В. ПРОКОПЕЦЬ, О. А. ЗДОРИК, Є. О. ГУРА, Н. В. ДОЛІБОЖКО, В. А. ГЕОРГІЯНЦЬ

Національний фармацевтичний університет

МОЖЛИВІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ ТЕСТ-ЗАСОБІВ ІЗ РЕАКТИВОМ ЗАЛІЗА (III) ХЛОРИДУ ДЛЯ ЕКСПРЕС-АНАЛІЗУ ВОДНИХ РОЗЧИНІВ ПІРИДОКСИНУ ГІДРОХЛОРИДУ ТА МЕТАМІЗОЛУ НАТРІЮ АПТЕЧНОГО ВИГОТОВЛЕННЯ

Запропоновані тест-системи на основі фільтрувального паперу, модифікованого хромогенними реагентами розчинами $FeCl_3$ різної концентрації, приготованими у відповідності до вимог Державної фармакопеї України. Проведено визначення інтервалів ненадійності виявлення піридоксину гідрохлориду та метамізолу натрію за допомогою даних тест-систем та побудовано графічне відображення даних інтервалів – «кривих ефективності». Враховуючи результати дослідження, оптимальною тест-системою для ідентифікації досліджуваних зразків слід вважати тест-систему, приготовану шляхом іммобілізації реактиву $FeCl_3$ розчину P_3 на фільтрувальному папері.

Ключові слова: екстемпоральні лікарські засоби; хімічні тест-системи; піридоксину гідрохлорид; метамізол натрію

ВСТУП

Сьогодні аптечне виготовлення лікарських засобів відроджується швидкими темпами. Разом з цим у практику аптечного виготовлення ліків та контролю їх якості стрімко входять поняття стандартизації та управління якістю [7, 15]. За часів Радянського Союзу у внутрішньоаптечному контролі екстемпоральних лікарських засобів (ЕЛЗ) широко використовувався експрес-аналіз, що дозволяв значною мірою заощаджувати час, реактиви та власне виготовлений засіб. На теперішній час використання цього виду аналізу потребує стандартизації не тільки процесу аналізу, але й використовуваних тест-систем. Одним з найбільш перспективних шляхів створення нових хімічних тест-систем є пошук нових матриць та способів іммобілізації реагентів на них [3, 12, 13]. Одним із факторів, які впливають на придатність тест-систем або тест-засобів для аптечного контролю є чутливість та вибірковість для активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) лікарських засобів аптечного виготовлення.

Мета даної роботи – розробка хімічних тест-засобів, що містить у своєму складі реактив заліза (III) хлориду, та визначення за допомогою інтервалів ненадійності її чутливості та відповідно, можливості застосування для експрес-аналізу ЕЛЗ, що містять піридоксину гідрохлорид та метамізол натрію.

Для розробки тест-системи велике значення має матриця, в яку іммобілізується реагент. З огляду на економічність в умовах аптеки найбільш доцільно використовувати різноманітні папери. Найбільш доступною та дешевою основою для виготовлення хімічних тест-систем є фільтрувальний папір (ФП), який завдяки гідрофільності та інертності використовується в аптеках та лабораторіях з контролю якості лікарських засобів не тільки як фільтр, але й як засіб для проведення кількісного визначення (хроматографія, гравіметрія), та створення тест-засобів заводського виробництва (більшість індикаторних папірців). ФП – одна з основних матриць для тест-систем промислового виготовлення (РІП – реактивні індикаторні папірці) [3, 13, 14].

Важливим кроком під час виготовлення хімічного тест-засобу є підбір реактиву та його концентрації. Під час дослідження ми звернули особливу увагу на реактив заліза (III) хлориду. Це доступний реагент, який має широке застосування в сфері аналізу лікарських засобів (використовується для виявлення більш ніж 30 компонентів сучасних ЕЛЗ) [2, 5]. Для виготовлення тест-систем були використані фармакопейні реактиви заліза (III) хлориду: водний розчин P_1 та спиртовий розчин P_3 [2].

Для тест-систем, що можуть бути виготовлені в аптечних умовах, оптимально застосовувати фізичну іммобілізацію реагентів, яку здійснювали наступним чином – матрицю занурювали в реактив

© Колектив авторів, 2014

Таблиця 1

**ДАНИ ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕРВАЛІВ НЕНАДІЙНОСТІ ВІЯВЛЕННЯ
ПІРИДОКСИНУ ГІДРОХЛОРИДУ ЗА ДОПОМОГОЮ 4 ТЕСТ-СИСТЕМ**

№	мг/мл	α/P	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,55	$C_{0,05}$, мг/мл	$C_{0,95}$, мг/мл	ΔC , мг/мл	$\Delta C / C_{0,05}$
2	Зразок 1	\overline{P}_{ck}	0	0,07	0,25	0,37	0,5	0,63	0,77	0,93	1,00	0,18	0,52	0,34	1,83
		$\widehat{\alpha}_k$	1,00	0,93	0,75	0,63	0,5	0,37	0,23	0,07	0				
4	Зразок 2	\overline{P}_{ck}	0	0,05	0,2	0,35	0,55	0,7	0,95	1,00	1,00	0,20	0,45	0,25	1,25
		$\widehat{\alpha}_k$	1,00	0,95	0,8	0,65	0,45	0,3	0,05	0	0				

всією площиною на певний, суворо регламентований час [11].

Керуючись усіма вищезгаданими рекомендаціями, ми створили тест-засоби із реактивом FeCl_3 різної концентрації, закріпленим на фільтрувальному папері методом фізичної іммобілізації.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Матриця: фільтрувальний папір листовий марки «Ф».

Реагенти та субстанції: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (ч.) № партії 187-226 Україна; метамізол натрію: № серії 0610008, виробник Shandong, Xinhua Pharm. Co. Ltd Китай, піридоксину гідрохлорид № серії 120214, виробник Jiangxi Sentai Pharm. Co., Ltd Китай; 96 % спирт: № серії 081013, виробник ТОВ «Панацея» Україна.

Для приготування водних розчинів використовували воду очищену P . Вихідні 0,2 % водний розчин піридоксину гідрохлориду та 1 % водний розчин метамізолу натрію готували розчиненням точних наважок субстанцій у воді очищеній P . Модельні зразки піридоксину гідрохлориду та метамізолу натрію готувалися шляхом розведення вихідних розчинів водою очищеною P до заданої концентрації. Розчини заліза (III) хлориду готували у відповідності до вимог ДФУ [2] – розчини P_1 (105 г/л води очищеної P) та P_3 (2 г/100 мл 96 % спирту). Точну концентрацію розчинів FeCl_3 визначали йодометрично за допомогою методу визначення окисників після відновлення останнього калію йодидом із використанням крохмалю як індикатора [15].

Приготування тест-систем. Приготовані за методикою [2] реактивами FeCl_3 розчин P_1 та розчин P_3 поміщають у чашки Петрі. Попередньо вирізані прямокутники ФП розміром 5 × 8 см поміщають у чашку Петрі з реактивом FeCl_3 розчин P_1 на 2 хв та з реактивом FeCl_3 розчин P_3 на 5 хв. Після замочування папірці висушують у темному місці. Отримані тест-системи повинні мати рівномірне жовте (FeCl_3 розчин P_1) та лимонне (FeCl_3 розчин P_3) забарвлення.

Після сушки прямокутники розрізають на тест-смужки розміром 0,5 × 5 см і упаковують для зберігання в темній ємності, що щільно закривається.

Позначення тест-систем. Було створено 2 зразки тест-засобу, кожен з яких отримав назву, що складалася з аббревіатур компонентів за принципом: основа, реактив, його концентрація:

1) Зразок 1: ФП FeCl_3 P_1 – тест-система, приготована шляхом іммобілізації реактиву FeCl_3 розчин P_1 на фільтрувальному папері;

2) Зразок 2: ФП FeCl_3 P_3 – тест-система, приготована шляхом іммобілізації реактиву FeCl_3 розчин P_3 на фільтрувальному папері.

Виконання експрес-аналізу. Досліджувані розчини наносились на тест-системи за допомогою скляної палички. Забарвлення досліджуваних зразків порівнювали із забарвленням холостого (вода очищена P) і контрольного дослідів. Колір та інтенсивність забарвлення фіксували протягом 5-30 с після виконання дослідів.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При нанесенні досліджуваного 0,2 % розчину піридоксину гідрохлориду на тест-системи спостерігалось утворення червоного забарвлення (у порівнянні з червоним кольором контрольного дослідів [5] та жовтим холостого), при просушуванні забарвлення ставало яскравішим.

При нанесенні 1 % розчину метамізолу натрію спостерігалось утворення синього забарвлення, що з часом переходить у фіолетове, далі в червоне і зникає при висушуванні. Контрольний дослід – синє забарвлення, що переходить у фіолетове, далі в червоне і зникає з часом [5]; холостий – жовте.

Контрольні дослідів були виконані у відповідності до методик [5, 6] з деякими змінами, в холостих дослідів замість досліджуваного розчину використовувалась вода очищена P .

За основу контрольного дослідів для виявлення піридоксину гідрохлориду були взяті дослідів, описані в [1, 6], з деякими змінами:

Одну краплю досліджуваного розчину поміщають на предметне скло і додають 1 краплю реактиву FeCl_3 розчин P_1 (для зразка 1) або FeCl_3 розчин P_3 (для зразка 2). Спостерігається утворення червоного забарвлення.

**ДАНІ ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕРВАЛІВ НЕНАДІЙНОСТІ ВІЯВЛЕННЯ
МЕТАМІЗОЛУ НАТРІЮ ЗА ДОПОМОГОЮ ТЕСТ-СИСТЕМ З FeCl₃**

№		α/P	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	$C_{0,05}$, мг/мл	$C_{0,95}$, мг/мл	ΔC , мг/мл	$\Delta C /$ $C_{0,05}$
1	Зразок 1	\overline{P}_{ck}	0	0,02	0,12	0,28	0,42	0,57	0,73	0,9	1,00	1,00	1,00	1,00	2,15	5,25	3,1	1,44
		$\widehat{\alpha}_k$	1,00	0,98	0,88	0,72	0,58	0,43	0,27	0,1	0	0	0	0				
2	Зразок 2	\overline{P}_{ck}	0	0	0	0,05	0,2	0,37	0,48	0,62	0,85	0,98	1,00		3,5	6,38	2,88	0,82
		$\widehat{\alpha}_k$	1,00	1,00	1,00	1,00	0,95	0,8	0,63	0,52	0,38	0,15	0,02	0				

Заміна реагентів пояснюється низькою чутливістю та відповідно неможливістю використання для експрес-аналізу зразків тест-засобу, виготовлених із використанням реактиву FeCl₃ розчин P₂. Зменшення кількості компонентів реакції – наближення її умов до умов проведення реакцій із досліджуваними тест-системами.

За основу контрольного дослідження для виявлення метамізолу натрію було взято [5] з наступними змінами:

Одну краплю досліджуваного розчину поміщають на предметне скло і додають 1 краплю розчину хлористоводневої кислоти розведеної та 1 краплю реактиву FeCl₃ розчин P₁ (для зразка 1) або FeCl₃ розчин P₃ (для зразка 2). Спостерігається характерна зміна забарвлення: синє – фіолетове – червоне – знебарвлення розчину.

Методики із використанням хімічних тест-систем за принципом дії відносяться до методик бінарного відгуку [11], тому вони потребують вивчення достовірності їх відтворення – визначення так званих інтервалів ненадійності [2, 11].

Дослідження інтервалу ненадійності виявлення піридоксину гідрохлориду та метамізолу натрію за допомогою тест-систем проводились за стандартною процедурою, описаною в [2], з достовірністю виявлення не нижче 95 %, загальна кількість дослідів для

однієї точки в умовах 3-х лабораторій склала 60, кількість точок – 9. За результатами досліджень були побудовані «криві ефективності» – графічне відображення інтервалів ненадійності.

Виявлення піридоксину. Результати представлені в табл. 1 та на рисунку. Як видно з табл. 1, обидві тест-системи дозволяють виявити піридоксину гідрохлорид, присутній в розчині з 95 % достовірністю, починаючи з концентрації 0,45-0,50 мг/мл. Це обумовлює придатність даних тест-систем для виявлення піридоксину гідрохлориду в ЕЛЗ (для порівняння взято концентрацію 0,2 % водного розчину піридоксину гідрохлориду – 2 мг/мл). Найменшим інтервалом ненадійності, а отже і кращою достовірністю відтворення результатів характеризується зразок 2 $\Delta C = 0,25$ мг/мл, для зразка 1 інтервал ненадійності склав 0,34 мг/мл. Перевагою зразка 2 є також більша контрастність забарвлення – перехід від лимонного до червоного, а також дещо менше вимивання реактиву із тест-системи за рахунок використання розчинника 96 % спирту.

Виявлення метамізолу натрію. В табл. 2 представлені результати визначення інтервалу ненадійності для метамізолу натрію.

Зразок 2 характеризується меншим значенням інтервалу ненадійності $\Delta C = 2,88$ мг/мл проти 3,10 мг/мл

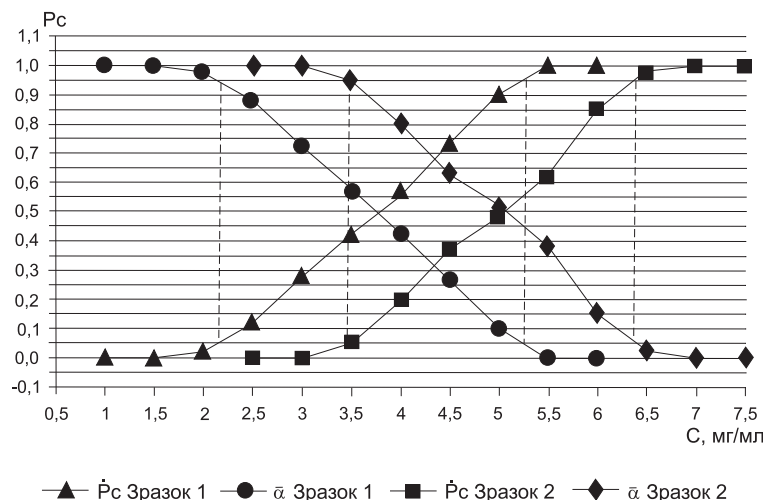


Рис. «Криві ефективності» виявлення піридоксину гідрохлориду за допомогою тест-систем із FeCl₃.

у зразку 1, натомість інтервал ненадійності зразка 2 знаходиться в діапазоні 3,50-6,38 мг/мл, в той час як для зразка 1 цей діапазон складає 2,15-5,25 мг/мл. Концентрація 1 % водного розчину метамізолу натрію складає 10 мг/мл, отже застосування даних зразків тест-систем можливе для виявлення метамізолу натрію в діапазоні 80-120 % від вихідної концентрації (8-12 мг/мл). З огляду на те, що інтервал ненадійності менший у зразка 2, достовірність відтворення результатів буде вищою, отже як пріоритетний можна використовувати тест-засіб на основі спиртового розчину FeCl_3 .

ВИСНОВКИ

1. Виготовлено 2 зразки тест-систем із розчинами заліза (III) хлориду різної концентрації, закріпленими на матриці методом фізичної іммобілізації для використання у внутрішньоаптечному контролі якості ЕЛЗ.
2. Визначення інтервалів ненадійності виявлення піридоксину гідрохлориду та метамізолу натрію за допомогою розроблених тест-систем показало, що запропоновані тест-засоби можуть бути використані для виконання поставлених завдань, але пріоритетною є тест-система, приготована шляхом іммобілізації реактиву FeCl_3 розчин P_3 на фільтрувальному папері (ФП $\text{FeCl}_3 P_3$).
3. Тест-системи зарекомендували себе як ефективний аналітичний засіб, що робить можливим їх використання для проведення внутрішньоаптечного контролю ряду лікарських засобів.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Государственная фармакопея СССР. – 10-е изд. – М.: Медицина, 1968. – 1079 с.
2. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х.: ПІРЕГ, 2001. – 556 с. Доп. 1. – Х.: ПІРЕГ, 2004. – 520 с. Доп. 2. – Х.: ПІРЕГ, 2008. – 608 с.
3. 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.
4. Золотов Ю. А. Химические тест-методы анализа / Ю. А. Золотов, В. М. Иванов, В. Г. Амелин. – М.: Едиториал УРСС, 2002. – 304 с.
5. Мелентьева Г. А. Фармацевтическая химия / Г. А. Мелентьева, Л. А. Антонова. – М.: Медицина, 1985. – 480 с.
6. Прокопець В. В. Хімічний контроль лікарських засобів аптечного виготовлення, що містять піридоксину гідрохлорид / [В. В. Прокопець, О. А. Здорик, О. А. Євтіфєєва та ін.] // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. – 2012. – № 3 (23). – С. 15-20.
7. Dungchai W. A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing / W. Dungchai, O. Chailapakul, Ch. S. Henry // Analyst. – 2011. – Vol. 136. – P. 77-82.
8. European Pharmacopoeia. – 8-th ed. – Electronic version. – 3638 p.
9. Krska R., Molinelli A. Rapid test strips for analysis of mycotoxins in food and feed // Analytical and Bioanalytical Chem. – 2009. – Vol. 393, № 2. – P. 67-71.
10. Landis B. N. "Taste Strips" – A rapid, lateralized, gustatory bedside identification test based on impregnated filter papers / [B. N. Landis, A. Welge-Luessen, A. Brämerson et al.] // J. of Neurol. – 2009. – Vol. 256. – P. 242-248.
11. Loginova L. P. Test films for test-determinations on the base of reagents, immobilized in gelatinous gel / L. P. Loginova, O. Yu. Konovalova // Talanta. – 2008. – Vol. 77, № 2. – P. 915-923.
12. Rios A. Reliability of binary analytical response / A. Rios, H. Téllez // Trends Analytical Chem. – 2005. – Vol. 24, № 6. – P. 509-515.
13. Trullols E. Validation of qualitative analytical methods / E. Trullols, I. Ruisanchez, X. Rius // TrAC Trends in Analytical Chem. – February 2004. – Vol. 23, Issue 2. – P. 137-145.
14. Zakir Hossain S. M. Multiplexed paper test strip for quantitative bacterial detection / [S. M. Zakir Hossain, Cory Ozimok, Clémence Sicard et al.] // Analytical and Bioanalytical Chem. – 2012. – Vol. 403. – P. 1567-1576.
15. Zdoryk O. A. Compounding in Ukraine / O. A. Zdoryk, V. A. Georgiyants, O. I. Gryzodub, R. Schnatz // Intern. J. of Pharm. Compounding. – 2013. – Vol. 17 (2). – P. 124-127.

УДК 615.074:615.212:615.356:577.164:615.451.2**В. В. Прокопец, О. А. Здорик, Е. О. Гура, Н. В. Долибожко, В. А. Георгиянц****ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТЕСТ-СРЕДСТВ С РЕАКТИВОМ ЖЕЛЕЗА (III) ХЛОРИДА ДЛЯ ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗА ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ПИРИДОКСИНА ГИДРОХЛОРИДА И МЕТАМИЗОЛА НАТРИЯ АПТЕЧНОГО ИЗГОТОВЛЕНИЯ**

Предложены тест-системы на основе фильтровальной бумаги, модифицированной хромогенными реагентами растворами FeCl_3 различной концентрации, приготовленными в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Украины. Проведено определение интервалов ненадежности идентификации пиридоксина гидрохлорида и метамизола натрия с помощью данных тест-систем, построено графическое отображение данных интервалов – «кривых эффективности». Учитывая результаты исследования, оптимальной тест-системой для идентификации исследуемых образцов следует считать тест-систему, приготовленную путем иммобилизации реактива FeCl_3 раствор P_3 на фильтровальной бумаге.

Ключевые слова: экстреморальные лекарственные средства; химические тест-системы; пиридоксина гидрохлорид; метамизол натрия

UDC 615.074:615.212:615.356:577.164:615.451.2**V. V. Prokopets, O. A. Zdoryk, E. O. Gura, N. V. Dolibozhko, V. A. Georgiyants****THE POSSIBILITY FOR RAPID ANALYSIS OF WATER SOLUTIONS OF PYRIDOXINE HYDROCHLORIDE AND SODIUM METAMIZOL USING TEST KITS WITH REAGENT IRON (III) CHLORIDE**

The test systems based on filter paper and reagent FeCl_3 in different concentrations which had been prepared in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine were proposed. The procedure of determination of the unreliability intervals identification of pyridoxine hydrochloride and metamizol sodium were conducted with using test kits. "The efficiency curves" – a graphical display of the unreliability intervals had been constructed. Considering the results of the research test-kit prepared by immobilization reagent FeCl_3 on the filtration paper is the most reasonable to identify the samples that were analyzed.

Key words: extemporal medicines; chemical test-kits; pyridoxine hydrochloride; sodium metamizol

Адреса для листування:

61166, м. Харків, вул. Тимурівців, 35, к. 428.

Тел. (096) 245-35-07.

E-mail: Wolf_Prokopetz@ukr.net.

Прокопец В. В.

Надійшла до редакції

17.07.2014 р.