

УДК 615.07: 54.062: 543.422

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЕТАКРИДИНУ ЛАКТАТУ В 0,02 % ВОДНОМУ РОЗЧИНІ АПТЕЧНОГО ВИГОТОВЛЕННЯ

О. А. Євтіфєєва¹, А. Ю. Бочкарьова¹, О. А. Здорик¹, В. А. Георгіянц¹,
Є. І. Бисага²

¹Національний фармацевтичний університет

²Ужгородський державний університет

Ключові слова: фармацевтичний аналіз, валідація аналітичних методик, екстемпоральні лікарські засоби, розчин етакридину лактату 0,02 %

Роботу присвячено розробці та валідації спектрофотометричної аналітичної методики кількісного визначення етакридину лактату у 0,02% водному розчині, виготовленому в аптеці. Валідація аналітичної методики проводилася відповідно до вимог Державної фармакопеї України та сучасної нормативної документації.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

Завданням аптек, що виготовляють лікарські засоби є швидке виробництво та відпуск ліків належної якості. Згідно з сучасними вимогами ДФУ [4-6], Наказу МОЗ України № 626 від 15.12.2004 «Про затвердження правил виробництва (виготовлення) лікарських засобів в умовах аптеки» [9] та іншої аналітичної нормативної документації України при виробництві та відпуску екстемпоральних форм ліків необхідно проводити належний контроль якості, який включає в себе різні види контролю, в тому числі і хімічний [1, 2]. Як відомо, на хімічний аналіз екстемпоральних лікарських засобів слід витрачати

невелику кількість препарату, щоб ліки після аналізу можна було відпустити пацієнту. Крім того, робота з невеликими кількостями певної лікарської форми забезпечує швидкість аналізу і мінімальну витрату реактивів. Обов'язковою вимогою до методик кількісного та якісного визначення є проведення валідації методик, яку проводять відповідно до статті ДФУ «Валідація аналітичних методик і випробувань^N» [6].

АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Показав, що в сучасній нормативній документації [4-6], в основному, наведені методики контролю якості субстанцій та лікарських засобів заводського виготовлення.

ВИДІЛЕННЯ НЕВИРШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ

Тому у даній роботі розглянуті методики кількісного визначення етакридину лактату у 0,02 % водному розчині та обґрунтована можливість використання у фармацевтичному аналізі аптеками та лабораторіями з контролю якості лікарських засобів спектрофотометричної методики аналізу методом стандарту.

ФОРМУЛЮВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ

Метою даної роботи є валідація фотометричних аналітичних методик кількісного виз-

Євтіфєєва О. А. — доц. кафедри якості, стандартизації та сертифікації ліків Національного фармацевтичного університету, к.фарм.н., доц.

Бочкарьова А. Ю. — ст. лаборант кафедри якості, стандартизації та сертифікації ліків Національного фармацевтичного університету

Здорик О. А. — асп. кафедри якості, стандартизації та сертифікації ліків Національного фармацевтичного університету

Георгіянц В. А. — зав. кафедрою якості, стандартизації та сертифікації ліків Національного фармацевтичного університету, д.хім.н., проф.

Бисага Є. І. — керівник виробничої практики фармацевтичного факультету Ужгородського державного університету

начення етакридину лактату у водному 0,02 % розчині.

ВИКЛАД ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для проведення досліджень використовували такі прилади: фотоколориметр КФК-3, спектрофотометр 46 «Ломо», спектрофотометр «SPECORD 200», рН-метр РВ-11 «Sartorius AG», ваги АВ S/A Mettler Toledo. Дослідження проводили з використанням мірного посуду класу А та реактивів, що відповідають вимогам ДФУ; субстанції етакридину лактату («Shangai Sunve Pharmaceutical Co., Ltd», Китай, номер серії 200610018 від 14.05.2007 р., сертифікат аналізу №14ф від 31.05.2007 р.), що відповідає вимогам Британської [12] та Європейської [13] фармакопей.

Для кількісного визначення 0,02 % розчину етакридину лактату в аналітичній літературі рекомендується *фотоколориметрична методика* [8]: 5 мл розчину етакридину лактату 0,02 % поміщають до колби місткістю 50 мл, додають 1 мл 0,1 М розчину хлористоводневої кислоти та 0,3 мл 0,1 М розчину натрію нітриту, перемішують протягом 2 хвилин та водою доводять об'єм до мітки. Розчин захищають від дії світла. Вимірюють оптичну густину за довжини хвилі близько до 520 нм в кюветі з товщиною шару 20 мм. Паралельно проводять реакцію з 1 мл 0,1 % стандартного розчину етакридину лактату (0,001 г) та вимірюють оптичну густину.

Оскільки розчин етакридину лактату поглинає в ультрафіолетовій та видимій областях спектру, в якості методики вибору було вирішено розробити *спектрофотометричну методику* кількісного визначення. Вивчивши залежність інтенсивності поглинання від довжини хвилі розчину етакридину та розрахувавши розведення, запропоновано наступну методику: 5 мл 0,02 % розчину етакридину лактату переносять у мірну колбу 100 мл та доводять водою Р до мітки. Відразу після приготування за довжини хвилі 363 нм вимірюють величину оптичної густини (A_x) відносно розчинника — вода Р. Вимірювання оптичної густини проводять тричі з вийманням кювети. Паралельно визначають оптичну густину 0,1 % розчину стандарту (A_{st}) аналітичний розчин якого готують таким чином: 1 мл розчину поміщають в мірну колбу 100 мл та доводять водою Р до мітки.

Приготування модельних розчинів. Було приготовано 5 модельних розчинів етакридину лактату з точними наважками таких концентрацій: 70 %; 85 %; 100 %; 115 %; 130 %. Розчини готували за такою схемою: точну наважку поміщали у мірну колбу місткістю 100 мл і додавали близь-

ко 70 мл води Р, після розчинення субстанції доводили об'єм розчину до 100 мл.

Приготування аналітичних розчинів за фотоколориметричною методикою. З кожного модельного розчину та розчину стандарту готували по три аналітичні розчини, за методикою наведеною вище, таким чином сумарна кількість випробувань становила $n=15$.

Приготування аналітичних розчинів за спектрофотометричною методикою. Готували по три розведення для кожного модельного розчину та розчину стандарту за методикою.

Розчин плацебо № 1 для фотоколориметричної методики готували таким чином: у колбу місткістю 50 мл додавали 1 мл 0,1 М розчину хлористоводневої кислоти та 0,3 мл 0,1 М розчину натрію нітриту, об'єм доводили до мітки водою.

Розчин плацебо № 2 для спектрофотометричної методики — вода Р.

Розчин робочого стандарту. 0,1000 г (точна наважка) поміщають у мірну колбу 100 мл, додають 70 мл воли Р. Після повного розчинення кристалів етакридину лактату доводять водою Р до мітки та знову перемішують.

Концентрацію розчинів обчислювали за формулою:

$$X = \frac{A_x \times C_t}{A_t}$$

Валідацію методик проводили відповідно до вимог ДФУ та згідно зі стандартною процедурою валідації методик кількісного визначення екстемпоральних лікарських засобів в умовах аптеки та лабораторій з контролю якості [6, 7]. Під час проведення процедури розглядалися такі параметри: діапазон застосування методики, стабільність, специфічність, робастність, збіжність, внутрішньолабораторна точність (прецизійність), правильність, відтворюваність.

Щоб оцінити похибку пробопідготовки модельних розчинів та розчину робочого стандарту, були розраховані теоретичні значення невизначеності аналітичних операцій [3, 4, 7]. Повна невизначеність пробопідготовки для фотоколориметричної та спектрофотометричної методик становлять: $\Delta_{sp}=1,32\%$, $\Delta_{sp}=1,30\%$ відповідно.

При валідації фотометричних методик кількісного визначення етакридину першими розглядалися такі валідаційні параметри, як стабільність аналітичного розчину у часі, лінійність, збіжність та правильність. Дослідження обох методик проводили за однакових умов: в один день, на одному приладі, одним і тим самим аналітиком. Перевірку *стабільності* розчинів проводили протягом 30 хвилин для фотоколориметричної та 60 хвилин для спектрофотометричної методик, аналізуючи розчин робочого стандарту

Таблиця 1

**ВИВЧЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ АНАЛІТИЧНОГО РОЗЧИНУ
ДЛЯ ФОТОКОЛОРИМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ**

№ розчину	Термін дослідження стабільності, t, хв.					середнє	RSDt, %	Δt, %	Max δ, %
	2,5	5	10	15	30				
A _{st} *	0,4840	0,4817	0,4747	0,4623	0,4457	0,4678	3,4163	7,283	1,54
A _x *	0,4787	0,4770	0,4667	0,4567	0,4413	0,4641	3,3361	7,112	

Таблиця 2

**ВИВЧЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ АНАЛІТИЧНОГО РОЗЧИНУ
ДЛЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ**

№ розчину	Термін дослідження стабільності, t, хв.					середнє	RSDt, %	Δt, %	maxδ, %
	0	15	30	45	60				
A _{st} *	0,4117	0,4107	0,4120	0,4130	0,4140	0,4123	0,3105	0,6619	1,54
A _x *	0,4057	0,4043	0,4077	0,4053	0,4053	0,4057	0,2985	0,6363	

Таблиця 3

**СТАТИСТИЧНІ ПОКАЗНИКИ МЕТРОЛОГІЧНИХ
ХАРАКТЕРИСТИК ФОТОМЕТРИЧНИХ МЕТОДИК**

Метрологічні характеристики	Фотоколориметрична методика	Спектрофотометрична методика
Збіжність та правильність		
Середнє, Z, %	101,17	99,63
Відносне стандартне відхилення, Szi, %	4,83	0,83
Відносний довірчий інтервал, Δz, %	8,50	1,46
Критичне значення для збіжності результатів, Δas, %	4,80	4,80
Систематична похибка, δ	1,17	-0,37
Критерій невизначеності систематичної похибки	1,54	1,54
Лінійність		
Кутовий коефіцієнт лінійної залежності, b	1,1932	0,9691
Sb	0,0617	0,0129
Вільний член лінійної залежності, a	-17,3389	2,5450
Критичне значення для вільного члена, a	5,1200	5,1200
Sa	6,3161	1,3228
Коефіцієнт кореляції методики, r	0,9960	0,9997
Критерій лінійного коефіцієнту кореляції, Rc	0,9924	0,9924
Висновок:	не відповідає	відповідає

Таблиця 4

ВПЛИВ pH НА ПОГЛИНАННЯ ОПТИЧНОЇ ГУСТИНИ АНАЛІТИЧНИМИ РОЗЧИНАМИ

Розчин №	Оптичні густини A _i середнє трьох вимірів			середнє	SrpH	RSDpH, %	ΔpH, %	maxδ, %
	випробування							
	1— 0,01 М HCl	2 — без додавання	3—0,01 М NaOH					
2	0,320	0,325	0,330	0,3253	0,0048	0,4842	1,41	1,54
3	0,376	0,381	0,388	0,3828	0,0047	0,4671	1,36	
4	0,454	0,458	0,463	0,4587	0,0045	0,4509	1,32	

та модельний розчин №3. (A_{st}* та A_x* — середнє значення оптичних густин трьох результатів для стандартного та модельного розчинів).

Дані таблиць вказують на те, що аналітичний розчин фотоколориметричної методики стабільний лише протягом 5 хвилин, що викликає

певні труднощі у проведенні дослідів, тому всі результати за даною методикою отримані протягом перших п'яти хвилин після приготування. Нестабільність аналітичних розчинів може призводити до відхилення від закону Бугера-Ламберта-Бера та отримання невірних результатів

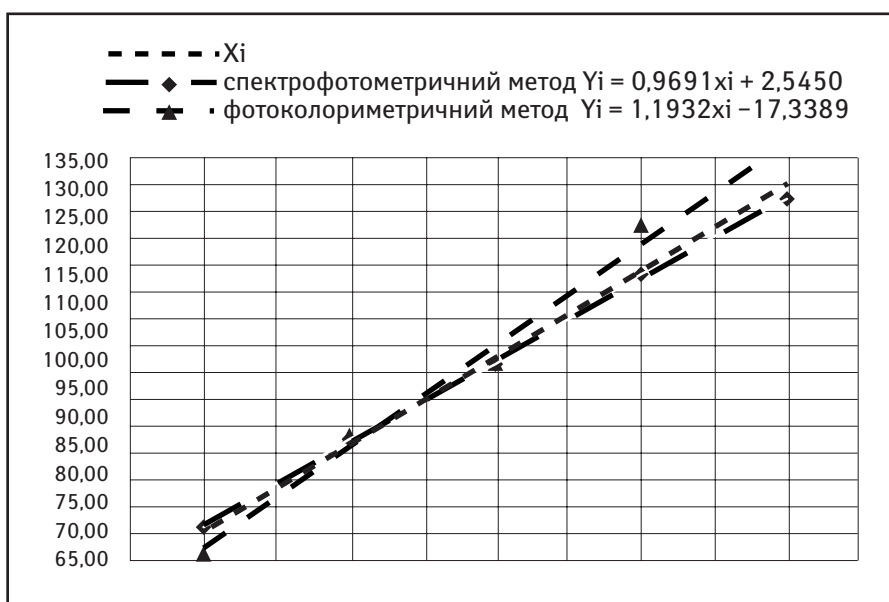


Рис. 1. Графік лінійної залежності оптичної густини від концентрації етакридину в нормалізованих координатах

Таблиця 5

РЕЗУЛЬТАТИ ПЕРЕВІРКИ ВНУТРІШНЬОЛАБОРАТОРНОЇ ТОЧНОСТІ

№ модельного розчину	введено у % до концентрації розчину порівняння ($X_{\text{факт}}$, %)		знайдено у % до концентрації розчину порівняння (Y_i , %)		знайдено у % до введеного $Z_i=100(Y_i/X_i)$	
	випробування		випробування		випробування	
	1	2	1	2	1	2
1	70,00	70,00	71,78	70,70	102,55	101,00
2			70,79	69,73	101,13	99,62
3			71,29	70,70	101,84	101,00
4	86,00	85,00	86,88	85,96	101,02	101,13
5			86,63	85,71	100,74	100,84
6			86,88	85,96	101,02	101,13
7	100,00	100,00	98,76	98,79	98,76	98,79
8			98,51	98,79	98,51	98,79
9			99,26	98,55	99,26	98,55
10	115,00	115,00	115,84	115,25	100,73	100,22
11			116,34	114,29	101,16	99,38
12			116,09	115,01	100,95	100,01
13	130,00	130,00	129,70	128,09	99,77	98,53
14			129,46	128,33	99,58	98,71
15			130,69	130,37	100,53	100,28
Середнє					100,50	99,87
Об'єднане середнє, Z					100,18	
Відносне стандартне відхилення, S_{zi} , %					1,1198	1,0176
Відносний довірчий інтервал, ΔZ , %					0,1315	0,1195
Об'єднана середня систематична похибка, δ					-0,1848	
Критерій невизначеності систематичної похибки					1,54	

[10]. У даному випадку на стабільність розчину впливають такі фактори: швидкість перебігу колориметричної реакції; умови в яких проводиться визначення та ступінь освітлення робочої кімнати; рН, концентрація етакридину та реактивів; властивості діазосполуки [11]; зміна

ступеня дисоціації сполуки в розчині при розведенні. Таким чином для уникнення похибки при використанні фотоколориметричної методики велике значення має спосіб приготування аналітичних розчинів. Аналітичний розчин спектрофотометричної методики стабільний протягом

**ВІДТВОРЮВАНІСТЬ МЕТОДИКИ В РІЗНИХ ЛАБОРАТОРІЯХ
ТА ПРИБОРАХ РІЗНОЇ ТОЧНОСТІ ТА ЧУТЛИВОСТІ**

№ розчину	Величини Zi		
	Лабораторія № 1	Лабораторія № 2	Лабораторія № 3
Середнє	100,26	101,16	99,58
Об'єднане середнє, Ztransfer, %	100,33		
Szitransfer, %	1,9658	1,8364	2,1251
SDz, %	1,9793		
Δtransfer, %	1,2294		

години, чого цілком достатньо для визначення оптичної густини.

Для підтвердження *специфічності* методики розраховували систематичну похибку, яку вносять розчинник та реактиви, тобто вклад плацебо. Для кожного з методів вимірювали оптичну густину розчинів плацебо та робочого стандарту. Отримані значення оптичних густин розчину плацебо №1 та стандарту для фотоколориметричної методики: $A_{\text{blank}}=0,001$; $A_{\text{st}}=0,389$, отже $\delta_{\text{exc}}=100 \cdot 0,001/0,389=0,26\%$. Вплив розчину плацебо №2 на результати спектрофотометричної методики становить: $A_{\text{blank}}=0,001$; $A_{\text{st}}=0,468$, $\delta_{\text{exc}}=0,21\%$, що підтверджує відсутність вагомого впливу на результати вимірів для обох методик.

Для оцінки *лінійності* та *точності* було отримано 15 значень оптичних густин модельних розчинів та 4 значення оптичних густин для розчину стандарту. Отримані результати представлені в таблиці 3 та на рис.1. Розраховували відношення середніх значень оптичних густин для кожного з 15 розчинів до середнього значення оптичної густини розчину порівняння, одержуючи величини $X_i=C_i/C_{\text{st}} \cdot 100\%$, $Y_i=(A_i/A_{\text{st}}) \cdot 100$. Працювали в нормалізованих координатах, подаючи концентрації та аналітичний сигнал у відсотках до номінальних значень. Знаходили також величину $Z=100 \cdot (Y_i/X_i)$, яка є знайденою концентрацією у відсотках до введеної.

Отримані результати свідчать про те, що фотоколориметрична методика не відповідає сучасним критеріям до аналітичних методик кількісного визначення за такими параметрами, як стабільність, точність та лінійність, тому інші валідаційні параметри (робасність, збіжність та міжлабораторна точність) визначалися тільки для спектрофотометричної методики.

Оцінку *робастності* проводили з урахуванням типу методики, тобто у нашому випадку для спектрофотометричного методу вивчають такі параметри: стійкість у часі аналітичних розчинів, приготованих за методикою (описано вище); вплив рН середовища на стабільність оптичного поглинання розчину етакридину.

Отримані результати вивчення стабільності аналітичних розчинів спектрофотометричної методики протягом години, наведені в таблиці 2 та свідчать про стійкість аналітичних розчинів, нерівність $\Delta_i \% \leq 0,32 \cdot \max \Delta_{A_{\text{st}}} = \max \delta$ виконується.

Для вивчення впливу рН середовища до досліджуваних розчинів (85 %; 100 %; 115 %) додавали по 1-2 краплі 0,01 М розчину HCl або 0,01 М розчину NaOH, щоб відтворити коливання рН $\pm 10\%$ (від 5,5 до 7,0). Для отриманих модельних розчинів вимірювали оптичну густину при обраній довжині хвилі. Статистична оцінка впливу рН на результат аналізу наведена у таблиці 4.

Внутрішньолабораторну точність (прецизійність) оцінювали за результатами аналізу 15 модельних зразків різних серій, які проводили у два різні дні та різними аналітиками, в умовах однієї лабораторії. Для приготування двох різних серій були взяті різні наважки у нашому концентраційному діапазоні. Для приготування розведень цих серій використовували різний лабораторний мірний посуд. Під час підготування розчинів та проведення методики було можливе коливання температури, вологості повітря, атмосферного тиску та інших внутрішньолабораторних факторів впливу на проведення аналізу.

Методика є коректною, оскільки для Δ_z , розрахованої за відношенням, виконуються вимоги: $\Delta_z \% \leq \max \Delta_{A_{\text{st}}} = 4,8\%$. Методика не має значущої систематичної похибки.

Щоб дослідити *відтворюваність даної методики в умовах інших лабораторій*, були проведені вимірювання оптичної густини розчинів однієї серії модельних розчинів етакридину лактату на різному обладнанні, в різні дні, в трьох різних лабораторіях [3, 6].

Отримані результати наведені у таблиці 6 та являють собою результати порівняння статистичних відхилень трьох різних експериментів, об'єданого середнього значення та єдиного відносного стандартного відхилення. Отримані метрологічні дані свідчать, що дана методика може бути відтворена в інших лабораторіях з довірчою вірогідністю 95 % відхилення одичного значення $100 \pm 1,23\%$.

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ РОЗВІДОК

1. Валідаційні характеристики фотоколориметричної методики показали, що методика не відповідає сучасним вимогам нормативної документації за такими параметрами: стабільність, лінійність, точність.

2. Розроблено та провалідовано спектрофотометричну методику кількісного визначення етакридину лактату в водному розчині. Встановлено, що спектрофотометрична методика характеризується прийнятною відтворюваністю в умовах різних лабораторій і може бути використана для контролю якості у аптечних закладах та лабораторіях з контролю якості ліків.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Вимоги до виготовлення нестерильних лікарських засобів в умовах аптек: Методичні рекомендації (затверджено наказом МОЗ України від 3 серпня 2005р. № 391). — 2-е вид. — Київ: МОЗ України, 2005. — 98 с.
2. Вимоги до виготовлення стерильних та асептичних лікарських засобів в умовах аптек: Методичні рекомендації (затверджено наказом МОЗ України від 3 серпня 2005р. № 391). — 2-е вид. — Київ: МОЗ України, 2005. — 80 с.
3. Воспроизводимость фармакопейных спектрофотометрических методик количественного определения лекарственных средств в разных лабораториях / А. И. Гризодуб, Н. Н. Зволинская, Н. Н. Архипова, [и др.] // Фармаком. — 2004. — № 2. — С. 20-34.
4. Державна Фармакопея України/Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: PIPEG, 2001. — 556с. — ISBN 966-95824-1 — 5.
5. Державна Фармакопея України/Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». Доповнення 1. — Харків: PIPEG, — 2004. — 494с. — ISBN 966-95824-3-1.
6. Державна Фармакопея України/Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — Доповнення 2. — Харків: PIPEG. — 2008. — 608с. — ISBN 966-96478-1-9.
7. Стандартная процедура валидации методик количественного определения экстенпоральных лекарственных средств в условиях аптек и лабораторий по контролю качества / О. А. Евтифеева, В. А. Георгиянц // Фармаком. — 2006. — № 1. — С. 69-81.
8. М. И. Кулешова. Анализ лекарственных форм, изготовленных в аптеках / М. И. Кулешова, Л. Н. Гусева, О. К. Сивицкая. — Москва: Медицина, 1989. — 288с. — ISBN 5-225-01520-4.
9. Наказ МОЗ України № 626 від 15.12.2004 р. (із змінами та доповненнями). «Про затвердження правил виробництва (виготовлення) лікарських засобів в умовах аптеки» // Юридичні аспекти фармації. — X., 2006. — Т. 3. — С. 49-59.
10. Пешкова В. М. Методы абсорбционной спектроскопии в аналитической химии: учеб пособие для ун-тов. / В. М. Пешкова, М. И. Громова — М., «Высшая школа», 1976. — 280 с.
11. Шабаров Ю. С. Органическая химия: в 2-х кн. / Ю. С. Шабаров — М.: Химия, 1994. Часть 2: Циклические соединения. — 1994. — 848 с.: ил. — ISBN 5-7245-0991-1.
12. British Pharmacopoeia. — London: HMSO, 2001. — Vol. 1. — 1359 p.
13. European Pharmacopoeia. — 5-th ed. — Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2006. — 2779 p.

Адреса для листування:

61104 м. Харків, пл. Повстання 17.

Кафедра якості, стандартизації та сертифікації лікарських засобів ІПКСФ НФаУ.

Тел. 8 (057) 731-92-76

Надійшла до редакції: 07. 10. 2008 р.