

УДК 615.074:543.061:577.164.12

О.А. Здорик, О.А. Євтіфєєва, В.В. Прокопець, В.А. Георгіянц

Національний фармацевтичний університет

ІДЕНТИФІКАЦІЯ РИБОФЛАВІНУ У РОЗЧИНАХ АПТЕЧНОГО ВИГОТОВЛЕННЯ ЗГІДНО З ВИМОГАМИ ДЕРЖАВНОЇ ФАРМАКОПЕЇ УКРАЇНИ

Для ідентифікації рибофлавіну відповідно до вимог ДФУ у розчинах аптечного виготовлення запропоновані флуориметричний метод та метод, що ґрунтується на відновленні рибофлавіну цинком у середовищі хлористоводневої кислоти. Проведено валідацію та визначено достовірність запропонованих методів якісного визначення рибофлавіну на модельних розчинах.

Ключові слова: фармацевтичний аналіз; хімічні методи ідентифікації; рибофлавін; екстемпоральна рецептура

ВСТУП

Важливою ланкою в системі забезпечення якості екстемпоральних лікарських засобів є контроль якості їх виготовлення, який включає в себе якісний та кількісний аналіз. У роботах [3, 5] наведено обґрунтування можливості використання методів кількісного визначення рибофлавіну у розчинах аптечного виготовлення згідно з вимогами сучасної нормативної документації та ДФУ, тому запропонована стаття присвячена ідентифікації рибофлавіну. У літературі описано безліч методик якісного визначення рибофлавіну, але не всі з них відповідають стандартам та нововведенням, передбаченим ДФУ. Також слід враховувати можливості проведення аналізу в аптечних умовах — обмеженість у сучасних приладах, які на сьогодні широко використовуються при фармацевтичному аналізі (спектрофотометри, хроматографи та ін.). Це значно ускладнює процес аналізу екстемпоральної рецептури з водорозчинними вітамінами в умовах роботи аптек. Перед нами було поставлено завдання розробки та валідації методик якісного визначення рибофлавіну у розчині концентрату та ізотонічних очних краплях аптечного виготовлення.

Виходячи із завдань, які стоять перед аналітиком при ідентифікації компонентів в екстемпоральних лікарських засобах при аналізі розчинів рибофлавіну, необхідно підтвердити наявність саме досліджуваної речовини. Розчини рибофлавіну, забарвлені у зеленувато-жовтий колір, що є характерною ознакою, яка значно звужує коло речовин, які необхідно відрізнити

за допомогою якісного аналізу. Так, наприклад, розчини рибофлавіну за забарвленням можна сплутати з розчинами фурациліну або етакридину лактату. Тому у першу чергу нас цікавлять випробування, що будуть специфічними саме для вітаміну В₂. Щоб довести можливість використання наведених фармакопейних та альтернативних методів для визначення рибофлавіну у внутрішньоаптечній заготовці та очних краплях, необхідно провести валідацію методик ідентифікації.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для проведення досліджень використовували субстанцію рибофлавіну, яка відповідає вимогам ДФУ та Європейської фармакопеї. Для роботи застосовували мірний посуд класу А, реактиви, які відповідають вимогам ДФУ, аналітичні ваги АВ 204 S/A METTLER TOLEDO, рН-метр РВ-11 фірми «Sartorius AG» (Німеччина), спектрофотометр «SPECORD 200», спектрофотометр 46 «Ломо».

Флуориметричне визначення рибофлавіну

Розчин рибофлавіну (5 мл) поміщають у мірну колбу 50 мл та доводять водою Р до мітки; 5 мл одержаного розчину поміщають у пробірку — розчин має бліде зелено-жовте забарвлення, у відбитому світлі або у світлі УФ-лампи розчин виявляє інтенсивну жовто-зелену флуоресценцію, що зникає при додаванні мінеральних кислот або лугів.

Контрольний дослід: близько 1 мг субстанції розчиняють у 100 мл води Р. Одержаний розчин у світлі, що проходить, має бліде зелено-жовте забарвлення, у відбитому світлі розчин виявляє

інтенсивну жовто-зелену флуоресценцію, що зникає при додаванні мінеральних кислот або лугів [4].

Холостий дослід: 4 мл води Р або 0,9% розчину натрію хлориду поміщали у пробірку та порівнювали з ефектом контрольного дослідів та дослідів модельних розчинів.

Відновлення рибофлавіну цинком у середовищі хлористоводневої кислоти.

До 1 мл препарату додають 0,5 мл хлористоводневої кислоти розведеної Р1 та 4–10 мг цинку — розчин набуває рожевого забарвлення, потім знебарвлюється. З часом розчин знову набуває жовто-зеленого кольору.

Контрольний дослід: до 1 мл розчину додають 0,5 мл розведеної хлористоводневої кислоти, близько 5–10 мг цинкового пилю або 1-2 гранули цинку; з'являється рожеве забарвлення [1].

Холостий дослід: дослід відтворювали з 1 мл води Р або 0,9% розчину натрію хлориду, порівнюючи із забарвленням, що утворюється при відтворенні контрольного дослідів та дослідів на модельних розчинах.

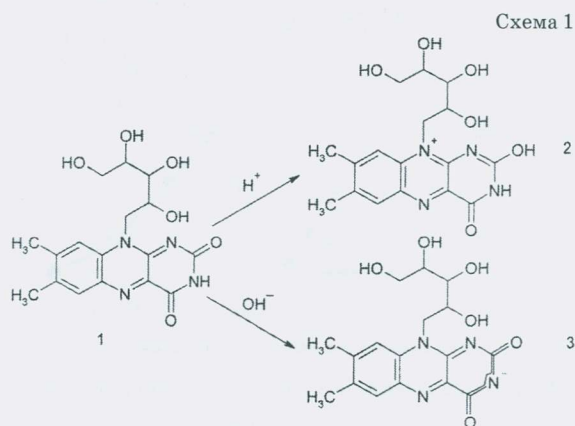
Модельні розчини готували за методиками, що описані у [3, 5].

Валідацію хімічних методів ідентифікації рибофлавіну у розчинах аптечного виготовлення проводили за процедурою, описаною у роботі [6].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Здатність розчинів рибофлавіну (1) до флуоресценції знайшла застосування в аналітичній практиці як для ідентифікації за кольором люмінесцентного випромінювання, так і для кількісного аналізу за визначенням інтенсивності флуоресценції.

При додаванні до розчинів рибофлавіну розчинів кислоти або лугу флуоресценція розчину зникає у результаті утворення катіона (2) або аніона (3) рибофлавіну [7], причому зберігаються забарвлення та прозорість розчинів (схема 1). За допомогою випробування на флуоресценцію



підкислених та підлужених розчинів рибофлавіну його можна відрізнити від схожих за забарвленням сполук, оскільки розчини фурациліну не мають флуоресценції, а при додаванні до розчину етакридину лактату розчину лугу випадає жовтий осад основи етакридину. Отже, дане випробування є досить специфічним, нескладним у виконанні і може бути використане для ідентифікації рибофлавіну в умовах аптеки.

Важливим критерієм для методик якісного визначення є рівень надійності або достовірності. Для того, щоб підтвердити відтворюваність та імовірність виявлення рибофлавіну $P(C_k)$ за даною методикою, були проведені дослідів в умовах трьох різних лабораторій (різні дні, різні реактиви, різні аналітики) на модельних розчинах рибофлавіну у діапазоні застосування 70–130% від прописаної кількості рибофлавіну у прописах. Дослід відтворювався у кожній лабораторії по 20 разів ($N_k=20$), таким чином, сумарна кількість спостережень для кожного модельного розчину складає 60 ($N=60$). Вивчення експериментальних даних в умовах трьох лабораторій з варіюванням умов реакцій дозволяє зробити висновок, які фактори впливають на достовірність ідентифікації. Отримувані ефекти у ході випробування модельних розчинів порівнювали з ефектом контрольного та холостого дослідів.

Даний дослід полягає у приготуванні розчину рибофлавіну з концентрацією $1 \cdot 10^{-5}$ г/мл і спостереженні забарвлення і флуоресценції у відбитому світлі. При додаванні розчинів мінеральних кислот або лугів флуоресценція зникає. У якості мінеральної кислоти використовували хлористоводневу кислоту розведену, а лугу — натрію гідроксиду розчин розведений.

При дослідженні модельних розчинів різних концентрацій визначали наступні величини: n_k — число негативних результатів в одній лабораторії при свідомій присутності рибофлавіну в аліквоті; $\alpha = \frac{n_k}{N_k}$ — частоту невиявлення в кожній серії розчинів при свідомій присутності рибофлавіну; $\hat{\alpha}$ — середнє значення частоти невиявлення у трьох лабораторіях; $P(C_k) = 1 - \frac{n_k}{N_k}$ — імовірність виявлення рибофлавіну в кожній серії; $\overline{P(C_k)}$ — середнє значення імовірності виявлення для трьох лабораторій; $R = 100 \cdot \overline{P(C_k)}$ — достовірність результату. За n_k вважали дослід, у якому не спостерігався ефект як у контрольному розчині за умови свідомої його присутності. Отримані результати наведені в табл. 1.

Отримані експериментальні дані свідчать, що дане випробування дозволяє виявити рибофлавін у рамках діапазону застосування (від 0,014 до 0,026 мг/мл). Дослід проведений у трьох лабораторіях і характеризується 100% імовірністю

ПЕРЕВІРКА НАЯВНОСТІ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ РОЗЧИНІВ РИБОФЛАВІНУ

№ розчину	Моделльний розчин, %	C, мг/мл	0,02 % розчин рибофлавіну										$\overline{P(C_k)}$	R, %
			спостереження флуоресценції			зникнення флуоресценції після додавання кислоти			зникнення флуоресценції після додавання лугу					
			$\hat{\alpha}$	P(C _k)	R, %	$\hat{\alpha}$	P(C _k)	R, %	$\hat{\alpha}$	P(C _k)	R, %			
1	70	0.014	0	1		0	1		0	1		1	100	
2	85	0.017	0	1	100	0	1	100	0	1	100	1	100	
3	100	0.020	0	1	100	0	1	100	0	1	100	1	100	
4	115	0.023	0	1	100	0	1	100	0	1	100	1	100	
5	130	0.026	0	1	100	0	1	100	0	1	100	1	100	
6	Холостий	0	1	0	100	1	0	100	1	0	100	0	0	
7	Контрольний	0.01	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	100	

виявлення рибофлавіну у розчині концентрату та ізотонічному розчині.

У якості другої реакції ми обрали реакцію відновлення рибофлавіну з цинком у хлористоводневому середовищі. Враховуючи факти утворення рожевого забарвлення розчину та створення хлористоводневого кислого середовища, в результаті даної реакції спочатку утворюється родофлавіну гідрохлорид (4), який у розведеному розчині обумовлює рожеве забарвлення розчину [2]. При подальшому відновленні рибофлавіну утворюється безбарвна сполука — лейкорибофлавін (5) (схема 2). Через низку змін забарвлень така реакція є специфічною, за її допомогою рибофлавін можна відрізнити від інших сполук. Натрію хлорид не заважає ідентифікації рибофлавіну в ізотонічному розчині за допомогою даної реакції.

Як і для попереднього випробування, цю методику випробували на модельних розчинах рибофлавіну у діапазоні визначення від 70% до 130% від прописаної кількості у прописах в умовах трьох різних лабораторій. Експериментальним шляхом було встановлено, що ефект реакції, який спостерігається, залежить від кількості цинкового пилу, яку додають у пробірку з розчином рибофлавіну, підкисленого хлористоводневою кислотою. Тому при валідації даної методики суттєвим фактором, що впливає на ефект реакції, є кількість цинкового пилу, яку беруть для ідентифікації.

Контрольний дослід проводили з 1 мл 0,02% розчину рибофлавіну та ізотонічного 0,02% розчину рибофлавіну, використовуючи 10 мг цинкового пилу за методикою [1]. Оцінку достовірності результатів методики біля «межі виявлення» проводили за допомогою побудови «кривих ефективності» [8], що відображають залежність імо-

вірності виявлення рибофлавіну від кількості пилу металевого цинку, яку брали для аналізу; результати наведені у табл. 2 та на рисунку.

При кількості цинкового пилу від 3,8 мг до 12,2 мг за даною методикою рибофлавін можна ідентифікувати у водних розчинах аптечного виготовлення з достовірністю 95%. Межами інтервалу ненадійності є верхня та нижня граничні концентрації цинкового пилу $C_{0,95}$ і $C_{0,05}$, для

Схема 2

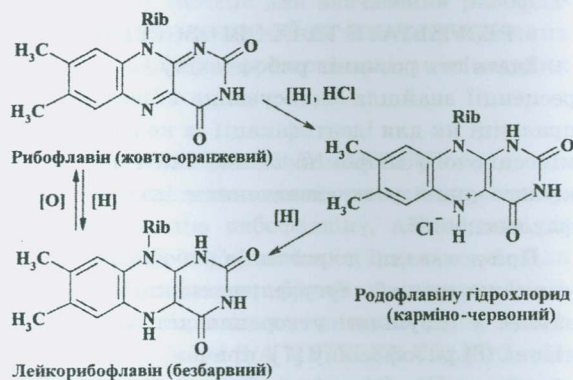


Рис. Крива ефективності реакції відновлення рибофлавіну.

Таблиця 2

ЙМОВІРНІСТЬ ВИЯВЛЕННЯ РИБОФЛАВІНУ ЗА РЕАКЦІЄЮ ВІДНОВЛЕННЯ

№ п/п	Рибофлавін, мг/мл	m(Zn), мг	лаб.1 (n)	лаб.2 (n)	лаб.3 (n)	Частота виявлення			Середнє $\bar{\alpha}$	Ймовірність виявлення, Р	Достовірність R, %
						лаб.1 α_1	лаб.2 α_2	лаб.3 α_3			
1	0,2	4	0	0	0	0	0	0	0	1	100,00
2		8	0	0	0	0	0	0	0	1	100,00
3		12	0	1	1	0	0,05	0,05	0,03	0,97	96,67
4		16	8	9	6	0,4	0,45	0,3	0,38	0,62	61,67
5		20	13	15	11	0,65	0,75	0,55	0,65	0,35	35,00
6		24	19	17	17	0,95	0,85	0,85	0,88	0,12	11,67
7		28	20	20	20	1	1	1	1	0	0,00

яких ймовірності виявлення рибофлавіну складають менше 95%. З рисунка можна побачити, що для проведення надійної ідентифікації за даною методикою з 1 мл досліджуваного розчину рибофлавіну кількість цинкового пилу має складати 4–10 мг. При використанні даної кількості цинкового пилу у зазначених умовах дана реакція дає чіткий ефект і дозволяє з достовірністю 100% ідентифікувати рибофлавін у розчинах.

ВИСНОВКИ

1. Вперше проведено валідацію та визначено достовірність хімічних методів ідентифікації рибофлавіну у розчинах аптечного виготовлення.
2. Встановлено, що за допомогою наведених методів можна ідентифікувати рибофлавін у розчині концентрату та ізотонічному 0,02% розчині рибофлавіну аптечного виготовлення відповідно до вимог ДФУ.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ
ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Банний І.П. Аналіз очних крапель в умовах аптеки: [навч. посіб. з фармац. аналізу] / І.П. Банний, М.В. Рахімова, О.А. Євтіфеева. — Х.: Вид-во НФаУ, 2000. — 68 с.
2. Березовский В.М. Химия витаминов / В.М. Березовский. — М.: Пищевая промышленность, 1973. — 633 с.

3. Георгіянц В.А. Валідація фотокolorиметричної методики кількісного визначення рибофлавіну в розчинах аптечного виготовлення / В.А. Георгіянц, О.А. Євтіфеева, О.А. Здорик // Фармац. журн. — 2008. — № 2. — С. 87–93.
4. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». Доп. 1. — Х.: РІРЕГ, 2004. — 494 с.
5. Евтифеева О.А. 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.
6. Євтіфеева О.А. Стандартизація підходів до оцінки хімічних методів ідентифікації речовин, які входять до складу екстенпоральних лікарських препаратів / О.А. Євтіфеева // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. — 2010. — №1. — С. 19–24.
7. Deutsches Arzneibuch Kommentar 9th ed. — Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH., 1986. — P. 2978-2984.
8. Valcarcel M. Vetrology of qualitative chemical analysis / M. Valcarcel, D. Barcelo, S. Cardenas et al. — Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2002. — 166 p.

УДК 615.074:543.061:577.164.12

А.А. Здорик, О.А. Евтифеева, В.В. Прокопец, В.А. Георгиянц

ИДЕНТИФИКАЦИЯ РИБОФЛАВИНА В РАСТВОРАХ АПТЕЧНОГО ПРИГОТОВЛЕНИЯ СОГЛАСНО ТРЕБОВАНИЯМ ДФУ

Для идентификации рибофлавина в соответствии с требованиями ГФУ в растворах аптечного приготовления предложен флуориметрический метод и метод, который основан на восстановлении рибофлавина цинком в среде хлористоводородной кислоты. Проведена валидация и определена достоверность предложенных методов качественного определения рибофлавина на модельных растворах.

Ключевые слова: фармацевтический анализ; химические методы идентификации; рибофлавин; экстенпоральная рецептура

UDC 615.074:543.061:577.164.12

O.A. Zdoryk, O.A. Yevtifeyeva, V.V. Prokopets, V.A. Georgiyants

THE IDENTIFICATION OF THE RIBOFLAVIN IN PHARMACY MANUFACTURED SOLUTIONS ACCORDING TO THE REQUIREMENTS OF THE SPU

The fluorimetric method and method which is based on reduction of the riboflavin by zinc in the medium of hydrochloric acid is offered for identification of the riboflavin in solutions of pharmacy manufactured preparation in accordance with the requirements of the SPU. Validation is carried out and reliability is established for the offered methods of the identification of the riboflavin on the model solutions.

Key words: the pharmaceutical analysis; chemical methods of identification; riboflavin; extemporaneous preparations

Адреса для листування:

м. Харків, пр. 50-річчя СРСР, 20, кв. 140.

Євтифеева О.А.

Тел: (057) 731-92-76.

Надійшла до редакції: 14.05.10