

ВАЛІДАЦІЯ ХІМІЧНИХ МЕТОДІВ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЕТАКРИДИНУ ЛАКТАТУ В ЛІКАРСЬКІЙ ФОРМІ АПТЕЧНОГО ВИГОТОВЛЕННЯ

Здійснено підбір хімічних методів якісного визначення етакридину лактату в лікарській формі аптечного виготовлення відповідно до вимог сучасної нормативної документації. Проведено вивчення метрологічних характеристик обраних методів ідентифікації, використовуючи принцип "виявлення з бінарним відгуком". Рекомендовано методики, що дають можливість достовірно підтвердити присутність аналізованої речовини у препараті.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ідентифікація, етакридину лактат, валідація.

ВСТУП. Етакридину лактат широко застосовують у лікарській практиці. Водні розчини аптечного виробництва використовують як антисептичний засіб у різних галузях медицини (хірургії, гінекології, урології, оториноларингології, дерматології та ін.). Але як етакридину лактат сприяє якісному поліпшенню здоров'я людини, так і важливою є саме його якість. За це відповідають методики контролю якості. Сучасний стан нормативної документації вимагає проведення валідації аналітичних методик ідентифікації та кількісного визначення [2, 4].

Тому метою нашого дослідження є підбір та валідація методик ідентифікації водного розчину етакридину лактату 0,02 %, що користується попитом в аптечній рецептурі [1].

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. При проведенні дослідження використовували субстанцію етакридину лактату ("Shangai Sunve Pharmaceutical Co., Ltd", Китай, номер серії 200610018 від 14.05.2007 р., сертифікат аналізу № 14 від 31.05.2007 р.), що відповідає вимогам Європейської Фармакопеї [7], ваги АВ 204 S/A METTLER TOLEDO, реактиви, що відповідають вимогам ДФУ [2].

Методика проведення реакції флуоресценції. 2 мл препарату поміщають у мірну колбу ємністю 100 мл і доводять водою Р до мітки. Розчин набуває жовто-зеленого забарвлення та за довжини хвилі 365 нм спостерігається флуоресценція. Після додавання 5 мл розчину 1 М хлористоводневої кислоти або 5 мл

1 М розчину натрію гідроксиду флуоресценція зникає.

Методика проведення реакції на лактат-іон. До 10 мл препарату додають 8-10 крапель розчину натрію гідроксиду, розведеного до утворення осаду жовтого кольору. Осад фільтрують і додають 5-7 крапель розведеної сірчаної кислоти Р. При додаванні до підкисленого фільтрату 1 краплі розчину калію перманганату розчин знебарвлюється під час нагрівання.

Випробуваний та модельні розчини. Модельні розчини лікарської форми готували за правилами аптечної технології, використовуючи рівномірний розкид концентрації етакридину лактату від номінальної на всьому діапазоні застосування методики від 70 до 130 % (допуск вмісту становить $\pm 15\%$) [4].

Щоб уникнути впливу фактора суб'єктивності на якість результатів, дослідження виконували в трьох різних лабораторіях, використовуючи нові лікарські форми, різні реактиви, аналіз проводили різні аналітики.

У кожній серії модельних розчинів для кожної окремої концентрації (70, 85, 100, 115, 130 %) проводили 20 дослідів ($N_k=20$). Таким чином, для кожного значення концентрації отримували 60 результатів трьох серій спостережень ($\overline{N}_k = 60$). Щоб уникнути можливості хибної позитивної реакції відсутньої речовини, паралельно проводили дослідження з використанням "холостого" дослідження, який містить усі реактиви, крім аналіту. Ефект кожної реакції порівнювали з ефектом, який дає дана речовина за стандартною методикою.

Далі розраховували частоти виявлення речовини в кожній серії за формулою: $\alpha_k = n_k / N_k$, де n_k – число негативних результатів при свідомій присутності аналіту в аліквоті, N_k – загальна кількість розчинів з аналітом в аліквоті для концентрації C_k . Оскільки нас більше цікавить вірогідність виявлення етакридину лактату за умов даної методики, то її значення розраховували для кожної із серій за формулою: $P(C_k) = 1 - (\alpha_k / N_k)$. Далі розраховували ймовірність виявлення аналіту $P_{(C_k)} = 1 - \alpha_k$ та

$$\overline{P_{C_k}} = \frac{1}{m} \times \sum_{i=1}^m P_{C_k}^i$$

середні значення $\overline{P_{C_k}}$ між лабораторіями в межах однієї концентрації (де m – кількість лабораторій). Побудову “кривих ефективності” проводили, використовуючи значення концентрації аналіту по осі абсцис, а отримані середні значення $\overline{P_{C_k}}$ і $\overline{P_{(C_k)}}$ – по осі ординат.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Державна Фармакопея України (ДФУ) пропонує проведення валідації методики ідентифікації за одним єдиним параметром – специфічність. Підбір специфічних методів ідентифікації здійснювали відповідно до загальних принципів, що сформульовані у ДФУ [2].

За хімічною будовою етакридину лактат являє собою сіль молочної кислоти і 2-етоксидіаміноакридину [6].

З метою ідентифікації етакридину лактату використовують здатність водних розчинів флуоресцювати, утворювати кольоровий осад з розчином йоду або йодидом, реакцію на присутність аніона молочної кислоти – лактат-іона. Наявність ароматичної аміногрупи у положенні 6 акридинового циклу підтверджують створенням діазосполучення вишнево-червоного кольору за умови додавання натрію нітриту в кислому середовищі [5].

На наш погляд, для підтвердження специфічності етакридину лактату в його 0,02 % розчині (аптечний пропис) достатньо провести дві реакції. Перша реакція – це перевірка наявності флуоресценції, яка дозволить відрізнити етакридину лактат від інших лікарських речовин, що не характеризуються флуоресценцією. Також за допомогою випробування на флуоресценцію підкисленого розчину етакридину лактату його можна відрізнити від інших сполук, схожих за забарвленням. Так, схожими сполуками є фурацилін, розчини якого не мають флуоресценції, та рибофлавін,

флуоресценція розчинів якого зникає при додаванні розчину лугу. Навпаки, при додаванні до розчину етакридину лактату розчину лугу випадає жовтий осад основи етакридину. Отже, дане випробування досить специфічне, нескладне за виконанням і може бути використане для ідентифікації етакридину лактату в умовах аптеки.

Друга реакція – це підтвердження наявності лактат-іона, що дозволить відрізнити етакридину лактат від акрихіну, водні розчини якого теж мають флуоресценцію. До того ж, акрихін є сіллю хлористоводневої кислоти.

Умови проведення обох реакцій наведено в монографії на субстанцію етакридину лактат у розділі “друга ідентифікація” ЄФ [7].

Фармакопейна методика: 0,1 мл 2,0 % розчину поміщають у мірну колбу ємністю 100 мл та доводять водою Р до мітки. Розчин має жовто-зелений колір та при 365 нм спостерігається флуоресценція. Після додавання 5 мл 1 М розчину хлористоводневої кислоти флуоресценція зникає. Концентрація етакридину лактату в даному розчині дорівнює 0,002 %, або 20 мг/л (10 ppm) [7].

Концентрація випробуваного розчину складає 0,02 %. При розведенні 1 мл цього розчину в мірній колбі ємністю 100 мл вона буде дорівнювати 0,0002 %, або 2 мг/л (1 ppm). Тобто концентрація випробуваного розчину в 10 разів менша. Використовувати для проведення реакції ідентифікації 10 мл випробуваного розчину не практично при аналізі лікарської форми. Тому метою даного дослідження було вивчити, якої аліквоти лікарської форми достатньо для коректного проведення реакції ідентифікації.

Реакція на лактат-іон Д за монографією ЄФ [7] на етакридину лактат: до 50 мл 2 % розчину додають 10 мл розчину натрію гідроксиду розведеного. Осад, що утворюється, фільтрують. До 5 мл фільтрату додають 1 мл розведеної сірчаної кислоти. 5 мл розчину дають реакцію на лактат-іон 2.3.1 [2, 7]. Аліквота 5 мл містить 0,025 г лактат-іона.

Реакція на лактат-іон у загальній статті 2.3.1. наводиться із вмістом лактат-іона 5 мг на 5 мл або 0,005 г на 5 мл, що в 5 разів менше [2, 7].

В умовах аптеки ця реакція дуже трудомістка та потребує багато часу. В довідковій методичній літературі з аналізу аптечних лікарських форм наведено модифіковану реакцію на лактат-іон, що базується на знебарвленні розчину калію перманганату в середовищі розведеної сірчаної кислоти після додавання його до отриманого фільтрату.

Концентрація лактат-іона в 5 мл нашої лікарської форми складає 0,25 мг, тобто в 100 разів менша, ніж за методикою ЄФ, та в 20 разів нижча щодо вимог статті 2.3.1.

Отже, щоб виконати фармакопейні методи-ки, розчин потрібно концентрувати, аліквота для аналізу може варіювати від 100 до 500 мл.

Тому було вирішено перевірити модифіко-вану реакцію на лактат-іон.

Вивчення достовірності обраних методів якісного аналізу проводили за стандартизо-ваним підходом, що описаний у роботі [3].

Результати дослідження ефекту першої реакції в умовах різних лабораторій наведе-но в таблиці 1. За статистично обробленими даними побудовано графік впливу концент-рації етакридину лактату на достовірність ефекту реакції (рис. 1).

Таблиця 1 – Результати дослідження ефекту реакції флуоресценції

С етакри-дину, мг/л	Число негативних результатів			Частота невиявлення α			Частота неви-явлення $\bar{\alpha}$	Ймовірність виявлення, \bar{P}	Досто-вірність R, %
	лаб.1 (n)	лаб.2 (n)	лаб.3 (n)	лаб.1	лаб.2	лаб.3			
				α_1	α_2	α_3			
14	8	4	7	0,40	0,20	0,35	0,32	0,68	68
17	4	3	2	0,20	0,15	0,10	0,15	0,85	85
20	1	0	0	0,05	0,00	0,00	0,02	0,98	98
23	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	100
26	0	1	0	0,00	0,05	0,00	0,02	0,98	98
28	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	100
34	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	100
40	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	100
46	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	100
52	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	100
0	20	20	20	1	1	1	1,00	0,00	0

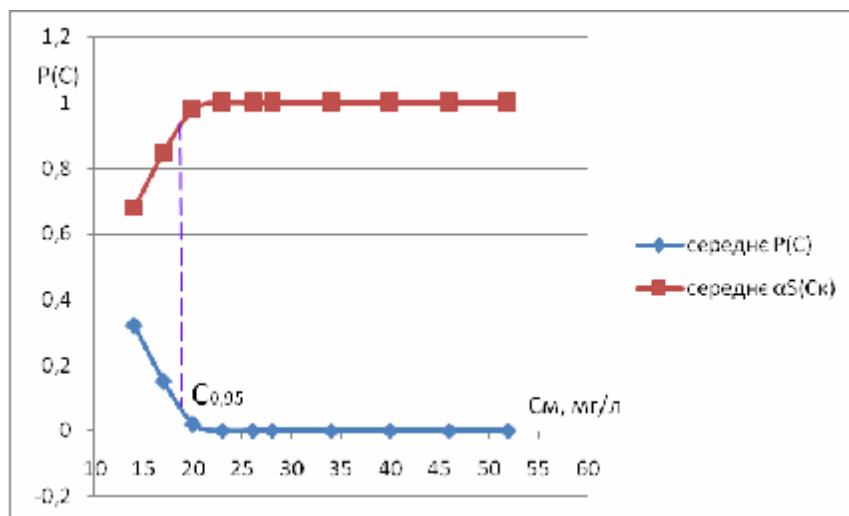


Рис. 1. Крива ефективності реакції флуоресценції.

Отримані експериментальні дані свідчать про те, що реакція є високочутливою. При даному розведенні визначити ширину інтервалу ненадійності неможливо. З метою визначення ширини інтервалу ненадійності та його відносної величини необхідно розширювати об'єм дослідження. Однак для проведення надійної ідентифікації за цією методикою в даній лікарській формі достатньо концентрації $C_{0,95}$, яка дорівнює 20 мг/л, за умови присутності аналізованої речовини дана реакція дає

чіткий ефект і дозволяє з довірчою 95 % ймовірністю виявити етакридин. При використанні 1 мл лікарської форми та розведенні за умовами реакції до 100 мл ця реакція в межах діапазону застосування від 70 до 130 % дасть достовірний результат для розчинів від 100 %, а нижче – результат буде сумнівним. Тому для проведення ідентифікації етакридину лактату в даній лікарській формі рекомендовано використовувати аліквоту 2 мл з подальшим розведенням у мірній колбі ємністю 100 мл.

Результати дослідження модифікованої реакції на лактат-іон та їх статистичної обробки наведено в таблиці 2. На рисунку 2 зображено криву ефективності, що дає можливість наочно представити інтервал ненадійності методики, який характеризує ті концентрації етакридину лактату, що дають сумнівний результат при проведенні реакції.

Наведені в таблиці 2 результати точно вказують на те, що запропонована реакція іден-

тифікації є чутливою та дає достовірні результати при аліквоті лікарської форми 10 мл у межах всього діапазону застосування методики. При значенні концентрації етакридину лактату 0,35 мг/мл та вище методика характеризується довірою 97 % ймовірністю. Тож, реакцію ідентифікації з розчином калію перманганату рекомендуємо проводити, використовуючи 10 мл лікарської форми, щоб остаточно впевнитись у результатах.

Таблиця 2 – Результати дослідження ефекту реакції на лактат-іон

С лактат-іона, мг/л	Число негативних результатів			Частота невиявлення α			Частота невияв- лення $\bar{\alpha}$	Ймовірність виявлення, \bar{P}	Досто- вірність R, %
	лаб.1 (n)	лаб.2 (n)	лаб.3 (n)	лаб.1	лаб.2	лаб.3			
				α_1	α_2	α_3			
0,17	20	20	20	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0
0,21	20	20	19	1,00	1,00	0,95	0,98	0,02	2
0,25	16	14	18	0,80	0,70	0,90	0,80	0,20	20
0,29	6	4	7	0,30	0,20	0,35	0,28	0,72	72
0,33	2	1	3	0,10	0,05	0,15	0,10	0,90	90
0,35	0	1	1	0,00	0,05	0,05	0,03	0,97	97
0,43	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	100
0,50	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	100
0,58	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	100
0,65	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	100
0	20	20	20	1	1	1	1,00	0,00	0

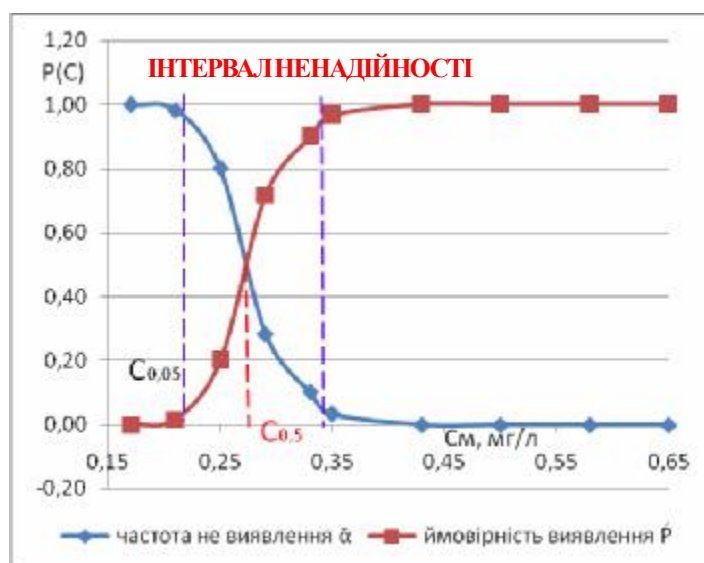


Рис. 2. Крива ефективності реакції на лактат-іон.

ВИСНОВКИ. 1. Проведено аналіз та здійснено вибір оптимальних методик ідентифікації етакридину лактату в його аптечній лікарській формі. Встановлено, що для підтвердження присутності етакридину лактату достатньо прийнятні результати дають реакції, що основані на здатності водних розчинів етакридину лактату до флуоресценції, та на наявність лактат-іона.

2. Вивчено специфічність і чутливість обраних методик та підбрано коректні аліквоти для аналізу. Проведена валідація обраних методик ідентифікації експериментально доводить їх прийнятність для виконання в умовах аптек та лабораторій з аналізу якості лікарських засобів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вимоги до виготовлення нестерильних лікарських засобів в умовах аптек: Методичні рекомендації (затверджено наказом МОЗ України № 391 від 3.08.2005 р.). – 2-ге вид. – К.: МОЗ України, 2005. – 98 с.
2. Державна Фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.; Доповнення 1. – Харків: РІРЕГ, 2004. – 494 с.; Доповнення 2. – Харків: РІРЕГ, 2008. – 608 с.
3. Євтіфеева О.А. Стандартизація підходів до оцінки хімічних методів ідентифікації речовин, які входять до складу екстемпоральних лікарських препаратів // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. – 2010. – № 1 (7). – С. 19-24.
4. Про затвердження правил виробництва (виготовлення) лікарських засобів в умовах аптеки: Наказ МОЗ України № 626 від 15.12.2004 р. (зі змінами та доповненнями) // Юридичні аспекти фармації. – Х., 2006. – Т. 3. – С. 49-59.
5. Фармацевтическая химия: Учеб. пособие / Под ред. А.П. Арзамасцева. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 604 с.
6. Шабаров Ю.С. Органическая химия: В 2-х кн.: Часть 2. Циклические соединения: Учебник для вузов. – М.: Химия, 1994. – 848 с.
7. European Pharmacopoeia. – 5th ed. – Electronic version. – 2779 p.

А.Ю. Бочкарёва, О.А. Евтифеева, О.А. Здорик, В.А. Георгиянц
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

ВАЛИДАЦИЯ ХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЭТАКРИДИНА ЛАКТАТА В ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ АПТЕЧНОГО ИЗГОТОВЛЕНИЯ

Резюме

Осуществлен подбор химических методов качественного определения этакридина лактата в лекарственной форме аптечного изготовления в соответствии с требованиями современной нормативной документации. Проведено изучение метрологических характеристик выбранных методов идентификации, используя принцип “обнаружение с бинарным отзывом”. Рекомендовано методики, которые дают возможность достоверно подтвердить присутствие анализированного вещества в препарате.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **идентификация, этакридина лактат, валидация.**

A.Yu. Bochkarova, O.A. Yevtifeyeva, O.A. Zdoryk, V.A. Heorhiyants
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

VALIDATION OF THE CHEMICAL METHODS OF IDENTIFICATION OF ETHACRIDINI LACTATE IN THE EXTEMPORAL DOSAGE FORMS

Summary

The selection of chemical methods of quality determination of ethacridini lactate in the medical forms of the pharmacy making is carried out in accordance with the requirements of modern normative documents. The study of metrological characteristics of selected methods identification is implemented, using principle of “exposure with a binary review”. The methods that enable certainly to confirm presence of analyzed substance in preparation are recommended.

KEY WORDS: **identification, ethacridini lactate, validation.**

Отримано 01.07.10

Адреса для листування: В.А. Георгіянц, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, Харків, 61002, Україна.