Рекомендована д. фармац. наук, проф. С. О. Васюк
УДК 615.281:54.061

ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ХЛОРАМФЕНІКОЛУ У СКЛАДІ ЕКСТЕМПОРАЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ФОРМ

©А. Ю. Мордінсон, О. А. Євтіфєєва, К. І. Проскуріна, В. А. Георгіянц

Національний фармацевтичний університет, Харків

Резюме: здійснено валідацію методики ідентифікації хлорамфеніколу в лікарських формах аптечного виготовлення. Встановлено мінімальну граничну концентрацію хлорамфеніколу, що дає аналітичний ефект, в випробуваних екстемпоральних лікарських формах (ЕЛФ), оптимальне співвідношення реагентів, при якому достовірність ефекту досліджуваної реакції на всьому мінімальному діапазоні концентрації ±20,00 % від номінальної за прописом перевищує регламентований ДФУ рівень 95,00 %.

Ключові слова: валідація, випробування на ідентифікацію, хлорамфенікол.

Вступ. Серед нововведень в національній частині Державної фармакопеї України (ДФУ), необхідною умовою для проведення фармацевтичного аналізу є використання тільки валідованих аналітичних методик. Склад, приготування реактивів, індикаторів та стандартних розчинів повинні відповідати вимогам ДФУ.

Валідацію випробування на ідентифікацію хлорамфеніколу в ЕЛФ проводили за характеристиками «специфічність» та «достовірність». Під «специфічністю» для випробування на ідентифікацію мають на увазі таку характеристику, за якою можливо відрізняти активну речовину та допоміжні з подібною структурою [2, 6]. Для підтвердження специфічності лікарських речовин в ЕЛФ необхідно зробити акцент на виборі прийнятних хімічних реакцій, які забезпечують перевірку, що при виготовленні взято інгредієнти відповідно до пропису й не була допущена «груба» помилка.

ДФУ, ЄФ, Британська, Німецька фармакопеї рекомендують для ідентифікації субстанції хлорамфеніколу досить специфічну реакцію взаємодії хлорамфеніколу із феруму (III) хлоридом у присутності бензоїлхлориду після попереднього відновлення цинковим порошком у присутності кальцію хлориду [1, 2, 3, 6].

Серед ЕЛФ з хлорамфеніколом попитом користуються аптечні форми для зовнішнього застосування у вигляді очних крапель 0,10% у суміші з борною кислотою; водних розчинів 0,01, 0,02%; ізотонічних розчинів 0,20, 0,25, 0,30 %, які й були обрані для проведення дослідження [4,5].

Методи дослідження. При проведенні дослідження використовували субстанцію хлорамфеніколу (виробництво фірми «Lachema a.s.», Чехія), яка відповідає вимогам ВР 98, Eur. Ph. 2008; субстанцію кислоти борної (виробництво ЗАТ «ГХК Бор»), яка відповідає ДФУ; субстанцію натрію хлориду (виробництво ЗАТ «Хімреактив»), яка відповідає ДФУ; ваги АВ 204 S/A METTLER TOLEDO, реактиви, що відповідають вимогам ДФУ [6]. *Методика визначення хлорамфеніколу з феруму (II) хлоридом (розділ ДФУ «Друга ідентифікація» для субстанції хлорамфеніколу):* близько 10 мг субстанції розчиняють в 1 мл спирту (50 % об./об.) Р, додають 3 мл розчину 10 г/л кальцію хлориду Р і 50 мг цинку порошку Р і нагрівають на водяній бані протягом 10 хв. Одержаний гарячий розчин фільтрують, охолоджують, додають 0,1 мл бензоїлхлориду Р і струшують протягом 1 хв. Потім додають 0,5 мл розчину заліза (III) хлориду Р1 і 2 мл хлороформу Р і струшують; водний шар має забарвлюватися у колір від світло-фіолетово-червоного до пурпурового.

При плануванні експерименту було розраховано аліквоту, яка містить 10 мг хлорамфеніколу, як зазначено у методиці ДФУ (табл. 1) [6].

Для розчинів із концентрацією 0,10 мг/мл та 0,20 мг/мл аліквоти 100,00 мл та 50,00 мл для аналізу не використовують. Для дослідження можливості застосування цієї реакції ідентифікації хлорамфеніколу в зазначених аптечних прописах необхідно визначити: 1) мінімально граничну концентрацію хлорамфеніколу, яка дає аналітичний ефект реакції як за методикою; 2) вплив надлишку води на характер перебігу реакції. Реакцію проводили відповідно до методики, однак враховуючи надлишок води, застосовували 1,00 мл 96 % спирту етилового. За отриманими результатами треба було підібрати оптимальну аліквоту для проведення реакції ідентифікації для кожної ЕЛФ та вивчити достовірність ефекту реакції на всьому діапазоні застосування аналітичної методики від номінальної концентрації. Дослідження залежності ефекту реакції від вмісту аналіту для обраних

Таблиця 1. Вміст хлорамфеніколу в ЕЛФ порівняно із вмістом за методикою

ЛФ хлорамфеніколу	Вміст хлорамфеніколу у випробовуваному розчині		Аліквота для аналізу, яка містить 10,00 мг хлорамфеніколу, мл
Розчини, %	г/мл	мг/мл	
0,01	0,0001	0,10	100,00
0,02	0,0002	0,20	50,00
0,10	0,0010	1,00	10,00
0,20	0,0020	2,00	5,00
0,25	0,0025	2,50	4,00
0,30	0,0030	3,00	3,33

аптечних розчинів хлорамфеніколу 0,02 та 0,20 % проводили, використовуючи аліквоти розчинів: 1) *для 0,02 %:* 0,50 мл, 1,00 мл, 2,00 мл, 3,00 мл, 4,00 мл, 5,00 мл; 2) *для 0,20 %:* 0,50 мл, 1,00 мл, 1,50 мл, 2,00 мл, 2,50 мл, 3,00 мл.

Результати й обговорення. Для розрахунку результатів методику досліджували в 3 різних лабораторіях, з різним набором реактивів, різними аналітиками на 3 різних серіях модельних розчинів (по 20 дослідів ($N_k = 60$)). Статистичну оцінку отриманих даних експерименту проводили з розрахунком частоти невиявлення речовини в кожній серії за формулою $\alpha_1 = n_к/N_k$, де $n_к$ – число негативних результатів при свідомій присутності аналіту в аліквоті. Вірогідність виявлення хлорамфеніколу за умовами цієї методики розраховували значення для кожної з серій за формулою $P_{(C_k)} = 1-(n_k / N_k)$ та середні значення $\bar{a}$ і $\overline{P_{(C_k)}}$ між лабораторіями в межах однієї концентрації $\overline{P_{(C_k)}} = \frac{1}{m} \times \sum_{i=1}^{m} P_{C_K}^i$, де m – кількість серій випробовування $\bar{a} = 1 - \overline{P_{(C_k)}}$ [7]. Результати дослідження наведено в таблиці 2.

Таблиця 2. Результати дослідження ефекту реакції з феруму (III) хлоридом з 0,50 мл 0,10, 0,20, 0,25 та 0,30 % розчинів

Вміст хлорамфеніколу, мг	Аліквота, мл	Число негативних результатів, n			Частота невиявлення, α			$\bar{\alpha}$	$\bar{P}$	*R, %*
		лаб. 1	лаб. 2	лаб. 3	α_1	α_2	α_3			
0,10 % розчин хлорамфеніколу										
0,40	0,40	1	0	1	0,05	0,00	0,05	0,03	0,97	96,67
0,5	0,50	1	1	0	0,05	0,05	0,00	0,03	0,97	96,67
0,60	0,60	1	0	0	0,05	0,00	0,00	0,02	0,98	98,33
0,20 % розчин хлорамфеніколу										
0,80	0,40	1	0	1	0,05	0,00	0,05	0,03	0,97	96,67
1,00	0,50	0	0	1	0,00	0,00	0,05	0,02	0,98	98,33
1,20	0,60	1	0	0	0,05	0,00	0,00	0,02	0,98	98,33
0,25 % розчин хлорамфеніколу										
1,00	0,40	0	1	1	0,00	0,05	0,05	0,03	0,97	96,67
1,25	0,50	0	0	1	0,00	0,00	0,05	0,02	0,98	98,33
1,50	0,60	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	100,00
0,30 % розчин хлорамфеніколу										
1,20	0,40	0	1	0	0,00	0,05	0,00	0,02	0,98	98,33
1,50	0,50	0	0	1	0,00	0,00	0,05	0,02	0,98	98,33
1,80	0,60	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	100,00

Зазначимо, що вміст хлорамфеніколу в 5,00 мл 0,02 % розчину і в 0,50 мл 0,20 % розчину однаковий і дорівнює 1,00 мг. У першому досліді результат реакції негативний, а у другому – позитивний. На наш погляд, цей результат можна пояснити різницею концентрацій в аліквоті 0,02 % розчину, якої недостатньо для перебігу реакції утворення забарвленого продукту з феруму (III) хлоридом.

У результаті дослідження визначили, що для 0,01 і 0,02 % розчинів аналітичний ефект цієї реакції ідентифікації хлорамфеніколу не спостерігається. Для інших випробовуваних аптечних розчинів оптимальна аліквота для аналізу дорі-

внює 0,50 мл. Для 0,10 % водного розчину хлорамфеніколу та 0,20, 0,25, 0,30 % ізотонічних розчинів , які містять у складі борну кислоту та натрію хлорид, відповідно, експериментально було доведено, що ці компоненти не впливають на результат і не заважають проведенню досліджуваної методики ідентифікації хлорамфеніколу.

Результати дослідження наведено в таблиці 3 і підтверджують коректність використання цієї методики ідентифікації хлорамфеніколу в його аптечних водних розчинах.

Висновки. 1. З метою ідентифікації хлорамфеніколу у складі ЕЛФ досліджено хімічну методику із встановленням мінімальної граничної концентрації хлорамфеніколу, що дає аналітичний ефект реакції; оптимального співвідношення аліквот ЛФ та реагентів, при якому достовірність ефекту досліджуваних реакцій на всьому мінімальному діапазоні застосування перевищує регламентований ДФУ рівень 95,00 %.

2. Проведено валідацію специфічної методики ідентифікації хлорамфеніколу за методикою ДФУ та експериментально доведено прийнятність їх для виконання в умовах аптек та лабораторій з аналізу якості лікарських засобів.

Література

1. British Pharmacopoeia / The British Pharmacopoeia Secretariat. – London, 2009. – Vol. 1. – P. 10952.
2. Deutsches Arzneibuch.: Kommentar. – 9-th ed. – Stuttgart: Wissenschaftliche VerlagsgesellschaftmbH, 2000. – P. 3941–3943.
3. European Pharmacopoeia. – 6th ed. – Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines, 2007. – 3308 p.
4. Вимоги до виготовлення нестерильних лікарських засобів в умовах аптек / за ред. проф. О. І. Тихонова, проф. Т. Г. Ярних. – К., 2005. – 98 с.
5. Вимоги до виготовлення стерильних та асептичних лікарських засобів в умовах аптек / за ред. проф. О. І. Тихонова, проф. Т. Г. Ярних. – К. : МОЗ України, 2005. – 76 с.
6. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-ше вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.; – Доповнення 2. – Харків: РІРЕГ. – 2008. – 608с.
7. 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(7). – С. 19–24.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЛОРАМФЕНИКОЛА В СОСТАВЕ ЭКСТЕМПОРАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

А. Ю. Мординсон, О. А. Евтифеева, К. И. Проскурина, В. А. Георгиянц

Национальный фармацевтический университет, Харьков

Резюме: осуществлена валидация методики идентификации хлорамфеникола в лекарственных формах аптечного приготовления. Установлено минимальную граничную концентрацию хлорамфеникола, которая дает аналитический эффект, в исследуемых экстемпоральных лекарственных формах (ЭЛФ), оптимальное соотношение реагентов, при котором достоверность эффекта исследуемой реакции на всем минимальном диапазоне концентрации ±20,00 % от номинальной по прописи превышает регламентируемый ГФУ уровень 95,00 %.

Ключевые слова: валидация, испытание на идентификацию, хлорамфеникол.

VALIDATION OF METHODS OF IDENTIFICATION OF CHLORAMPHENICOL IN THE EXTEMPORANEOUS DOSAGE FORMS

A. Yu. Mordinson, O. A. Yevtifieyeva, K. I. Proskurina, V. A. Heorhiyants

National University of Pharmacy, Kharkiv

Summary: the validation of methods of identification of chloramphenicol in the medical forms of the pharmacy making is carried out. The minimum value of concentration of chloramphenicol that shows analytical effect is established, the optimal quantity proportion of reagents is established and it means that the authenticity of effect of reaction during all the range of application of concentration ±20,00 % is exceeded the regulated level in 95,00 % by State Pharmacopeia of Ukraine.

Key words: validation, test of identification, chloramphenicol.