© Український журнал клінічної та лабораторної медицини, 2012
УДК 615.07: 543.061: 543.062

Аналіз прокаїну гідрохлориду та бензокаїну в розчині аптечного виготовлення

Л.П.Савченко, О.А.Євтіфєєва,
В.А.Георгіянц, О.А.Здорик, Є.І.Бисага

Національний фармацевтичний університет, Ужгородський національний університет
Харків, Ужгород, Україна

Запропоновано схему аналізу лікарської форми аптечного виготовлення з прокаїном та бензокаїном. У процесі дослідження обрано оптимальні методики якісного та кількісного визначення її компонентів. Здійснена валідація обраних методик та доведено можливість їх застосування для аналізу даної лікарської форми.

Ключові слова: валідація аналітичних методик, якісний аналіз, кількісний аналіз, прокаїну гідрохлорид, бензокаїн.

ВСТУП

В асортименті екстемпоральних лікарських форм (ЕЛФ) велика кількість прописів містить прокаїну гідрохлорид. Серед розчинів аптечного виготовлення зустрічаються однокомпонентні та комбіновані лікарські форми (ЛФ) (ізотонічний розчин, розчини, стабілізовані кислотою хлористоводневою та інші). До складу багатьох прописів екстемпоральної рецептури прокаїн входить в суміші з бензокаїном. Це розчини для зовнішнього застосування, мазі, супозиторії. Одним із таких розчинів є розчин, який користується попитом в аптечній практиці та випускається промисловістю під назвою «Меновазин»:

Rp.: Novocaini 1,0
Anaesthesini 1,0
Mentholi 2,5
Spiritus aethylici 70% ad 100 ml
M.D.S.

Метою дослідження був вибір та валідація методик якісного та кількісного аналізу прокаїну гідрохлориду та бензокаїну в даній лікарській формі.

Оскільки обидва компоненти відносяться до первинних ароматичних амінів, більшість методик їх якісного та кількісного аналізу будуть однаковими, тому необхідно обрати специфічні реакції, які дозволять провести аналіз ЛФ. Проведені раніше дослідження щодо реакцій ідентифікації прокаїну гідрохлориду [1] доводять, що реакція з калію перманганатом та реакція утворення азобарвника є неспецифічними та не дозволяють розрізнити наявність прокаїну та бензокаїну в досліджуваній ЛФ. В якості можливих специфічних реакцій для ідентифікації прокаїну гідрохлориду були обрані реакції на хлорид-іон, реакція з водню пероксиду розчином 30%, для ідентифікації бензокаїну — реакція з хлораміном та ефіром.

ДФУ, ДФ СРСР X вид. та Європейська Фармакопея рекомендують проводити кількісне визначення прокаїну гідрохлориду та бензокаїну методом нітритометрії [2, 3, 8], який і був обраний нами для визначення кількісного вмісту суми компонентів. Для визначення кількісного вмісту прокаїну в даній ЛФ використовували метод аргентометрії за методом Фаянса [7].

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для проведення досліджень використовували субстанцію бензокаїну виробництва «Shanghai Chengfu Chemicals Co. LTD», Китай, серія №20060917, яка відповідає вимогам ДФУ; субстанцію прокаїну гідрохлориду виробництва «Biesterfeld Siemsgluss International GmbH», Hamburg, Німеччина, серія №040220, яка задовольняє вимоги ВР 98/USP 24/ДФУ. Для роботи застосовували мірний посуд класу А, реактиви, які відповідають вимогам ДФУ [3], аналітичні ваги AB 204 S/A METTLER TOLEDO.

ТАБЛИЦЯ 1

Результати валідації методик ідентифікації компонентів ЛФ

Діапазон конц-й	Частота виявлення			Частота невиявлення			середнє a€	$\overline{P(C_K)}$	R, %
	Лаб.1	Лаб. 2	Лаб. 3	б$_1$	б$_2$	б$_3$			
Реакція на хлорид-іони (прокаїну гідрохлорид)									
80-120%	20	20	20	0	0	0	0	1	100
холостий	0	0	0	1	1	1	1	0	0
контрольний	20	20	20	0	0	0	0	1	100
Реакція на бензокаїн									
80-120%	20	20	20	0	0	0	0	1	100
холостий	0	0	0	1	1	1	1	0	0
контрольний	20	20	20	0	0	0	0	1	100

Приготування досліджуваного розчину. Розчин готували масо-об'ємним способом: у колбу на 100,00 мл вміщують 1,0000 г бензокаїну (т. н.), 1,0000 г прокаїну (т. н.) та 2,5000 г ментолу (т. н.). Доводять об'єм розчину спиртом 70% до мітки та перемішують до розчинення.

Модельні розчини для проведення валідації методик аналізу готували аналогічно: 5 розчинів з урахуванням розкиду наважок прокаїну та бензокаїну (0,8000; 0,9000; 1,0000; 1,1000; 1,2000), що становить 80%, 90%, 100%, 110% та 120% відносно вмісту прокаїну та бензокаїну в прописі.

Якісні реакції на прокаїну гідрохлорид [7]:

1. Реакція з водню пероксиду розчином 30% — до 1 мл ЛФ додають 1-2 каплі водню пероксиду розчину 30% та 3-5 крапель кислоти сірчаної концентрованої. Спостерігається поява бузкового забарвлення.

2. Реакція на хлориди — до 1 мл ЛФ додають декілька крапель кислоти азотної концентрованої та 0,4 мл розчину срібла нітрату Р1, перемішують. З'являється білий сирнистий осад.

Якісна реакція на бензокаїн [7]:

1. Реакція з ефіром та хлораміном: до 1 мл ЛФ додають 5 крапель розведеної соляної кислоти та 2 мл розчину хлораміну. Через 2-3 хвилини додають 2 мл ефіру та збовтують. Ефірний шар забарвлюється в жовтогарячий колір.

Методика кількісного визначення прокаїну методом аргентометрії за методом Фаянса: до 8,00 мл ЛФ додають 2-3 краплі розчину бромфенолового синього та по краплям кислоту оцтову до отримання зеленувато-жовтого забарвлення, після чого титрують 0,05 М розчином срібла нітрату до синьо-фіолетового забарвлення.

1 мл 0,05 М розчину срібла нітрату відповідає 13,64 мг прокаїну.

Методика кількісного визначення бензокаїну методом нітритометрії: до 8,00 мл ЛФ додають 2 мл розчину кислоти хлористоводневої Р, 0,2 г калію броміду Р, перемішують. Проводять визначення, титруючи виготовленим 0,1 М розчином натрію нітриту до переходу забарвлення від червоно-фіолетового до блакитного, використовуючи змішаний індикатор (2 краплі розчину тропеоліну 00 і 1 крапля розчину метиленового синього).

1 мл 0,1 М натрію нітриту відповідає 16,52 мг бензокаїну.

Вміст бензокаїну розраховували за різницею об'ємів титрованого розчину натрію нітриту, витраченого на титрування суми прокаїну та бензокаїну і срібла нітрату, витраченого на титрування прокаїну гідрохлориду.

Діапазон застосування методики: у кожній лабораторії брали по 15 аліквот ЛФ в діапазоні 80-120% відносно об'єму ЛФ для аналізу, а саме по три об'єми для концентрацій 80%, 90%, 100%, 110% та 120% за рекомендаціями ДФУ [3]. Статистичну обробку експериментальних даних проводили відповідно до статті ДФУ «Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту»^{N} [3].

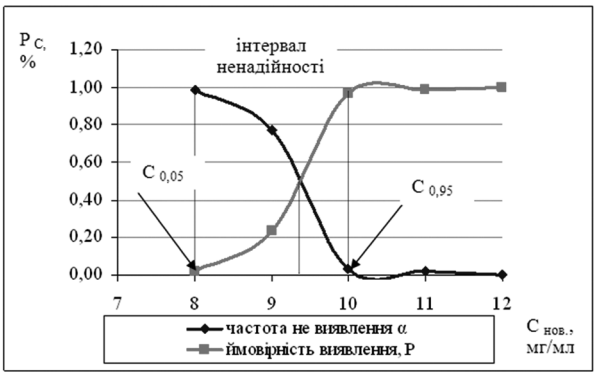

Рис. 1. Крива ефективності реакції прокаїну гідрохлориду з водню пероксиду розчином 30%.

ТАБЛИЦЯ 2

Результати дослідження лінійності методик визначення вмісту компонентів у ЛФ

Валідаційні характеристики	Аргентометрія (прокаїну гідрохлорид)		Нітритометрія (бензокаїн)	
	Лаб.1	**Лаб.2**	**Лаб.1**	**Лаб.2**
b	0,9937	0,9929	0,9931	0,9936
(b-1)	0,0063	0,0071	0,0069	0,0064
a	0,6089	1,2830	1,1448	1,0321
S_{rest}	0,68	0,37	0,43	0,64
r	0,9990	0,9997	0,9996	0,9991
Критерій статистичної невизначеності b ($\lvert b-1 \rvert \le 1{,}02 \times S_b$)				
	≤0,0124	≤0,0068	≤0,0079	≤0,012
	викон.	не викон.	викон.	не викон.
Критерій статистичної невизначеності a ($a \le 1{,}02 \times S_a$)				
	≤1,25	≤0,69	≤0,81	≤1,21
	викон.	викон.	не викон.	викон.
Критерій практичної невизначеності систематичної похибки $\delta_{RL,80;120} \le \frac{2}{3} \times \max\Delta_{AS} = 2{,}13$				
$\delta_{RL,80}$	0,13	0,90	0,74	0,65
$\delta_{RL,120}$	0,12	0,36	0,26	0,22
	викон.	викон.	викон.	викон.
Вимоги до залишкового стандартного відхилення $S_0 \le 0{,}3 \times \max\Delta_{AS} = 1{,}06$				
	0,13≤1,06	0,90≤1,06	0,43≤1,06	0,64≤1,06
	викон.	викон.	викон.	викон.
Критичне значення коефіцієнта кореляції (min r): $R_c \ge 0{,}9978$				
	викон.	викон.	викон.	викон.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для доведення можливості використання обраних реакцій ідентифікації в аналізі ЛФ вони були валідовані [4]. При проведенні реакції холостого досліду в процесі валідації обраних методик ідентифікації як для прокаїну гідрохлориду, так і для бензокаїну було доведено, що ментол не впливає на достовірність ефекту реакції.

Проведення валідації реакції на хлорид-іон з прокаїну гідрохлоридом довело, що на всьому діапазоні концентрацій спостерігався ефект реакції з достовірністю 100% (поява білого сирнистого осаду) (табл. 1). При дослідженні реакції з водню пероксиду розчином 30% були побудовані криві ефективності (рис. 1), з яких видно, що проведення реакції в концентрації прокаїну гідрохлориду 10 мг/мл та вище гарантує отримання чіткого ефекту реакції з достовірністю 100%. Отримані результати дозволяють рекомендувати дані реакції для ідентифікації прокаїну гідрохлориду в досліджуваній ЛФ.

Результати валідації реакції ідентифікації бензокаїну також свідчать про можливість її використання для аналізу (табл. 1). На всьому діапазоні концентрацій (0,008-0,012 г/мл) спостерігався чіткий ефект реакції з достовірністю 100%. У процесі дослідження встановлено, що важливим для отримання чіткого ефекту реакції є додавання ефіру через 2-3 хвилини після додавання до розчину ЛФ хлораміну.

Перед проведенням валідації методик кількісного визначення було здійснено оптимальний підбір аліквоти ЛФ для аналізу з метою зменшення величини невизначеності аналізу та з урахуванням об'єму титранту, який буде витрачено під час аналізу. Номінальний об'єм титрування суми компонентів складає V_T=7,77 мл, номінальний об'єм титрування прокаїну методом аргентометрії — V_T=5,87 мл, що відповідає вимогам щодо об'єму використання бюретки при титруванні [6].

Також було проведено теоретичний розрахунок прогнозованої невизначеності резуль-

ТАБЛИЦЯ 3

Результати дослідження прецизійності й правильності методик визначення вмісту компонентів у ЛФ

Валідаційні характеристики	Аргентометрія (прокаїну гідрохлорид)		Нітритометрія (бензокаїн)	
	Лаб.1	Лаб.2	Лаб.1	Лаб.2
$\overline{Z_i}$	100,00	100,60	100,48	100,40
S_Z	0,66	0,41	0,48	0,68
Δ_{AS}	1,17	0,73	0,84	1,20
δ_z	0	0,60	0,48	0,40
об'єднане $\overline{Z}_{\text{int } ra}$	100,30		100,44	
$S_{\text{int } ra}$	0,73	0,51	0,48	0,68
об'єднане $RSD_{\text{int } ra}$	0,63		0,59	
$\Delta_{Z_{\text{int } ra}}$	0,29		0,28	
$\delta_{Z_{\text{int } ra}}$	0,30		0,44	
Критичне значення	±10 ($\delta \leq 2,13$)			
	0,30≤2,13		0,44≤2,13	
	виконується		виконується	
Критичне значення	±10 ($\Delta_R \leq 1,06$)			
	0,29≤1,06		0,28≤1,06	
	виконується		виконується	

татів аналізу [6]. Розрахована теоретична невизначеність результатів аналізу обох компонентів дорівнює Δ_{sp}=0,77% для прокаїну та Δ_{sp}=0,92% для бензокаїну і не перевищує максимально припустиму невизначеність для допусків вмісту ±10% (max D_{As}=3,2%).

Перед початком експерименту було проведено перевірку молярної концентрації стандартних розчинів на відповідність вимогам ДФУ. Результати аналізу показали, що отримані розчини натрію нітриту ($КП_1 NaNO_2$=1,0019, Δst_1=0,17; $КП_2 NaNO_2$=0,9996, Δst_2=0,14) та срібла нітрату ($КП_1 AgNO_3$=1,0107, Δst_1=0,18; $КП_2 AgNO_3$=0,9989, Δst_2=0,13) відповідають вимогам ДФУ ($\Delta st \leq 0,20$).

Вивчення валідаційних характеристик та їх оцінка. Спочатку була проведена валідація методики кількісного визначення прокаїну методом аргентометрії за методом Фаянса [5, 6].

Для обраної методики виконуються вимоги до критичної статистичної невизначеності до вільного члена лінійної залежності *a* (табл. 2) та до кутового коефіцієнта лінійної залежності *b* (крім другої лабораторії). Вимоги до критерію практичної невизначеності систематичної похибки також виконуються при дослідженні лінійності методики в обох лабораторіях. Для концентрації 80% в обох лабораторіях отримане більше значення систематичної похибки. Залишкові стандартні відхилення для кожної серії визначення не перевищують критичне значення. Значення коефіцієнта кореляції, отримане в обох лабораторіях, також не перевищує свого критичного значення.

Одночасно з вивченням лінійності проводилось вивчення правильності та прецизійності з використанням отриманих даних за стандартизованою процедурою, а також відтворюваності досліджуваної методики [5, 6] (табл. 3). При проведенні кількісного визначення в обох лабораторіях був отриманий результат вмісту прокаїну гідрохлориду в ЛФ, який відповідає пропису. Показники відносного стандартного відхилення в обох лабораторіях відрізняються незначно і є досить низькими.

Розрахований довірчий інтервал не перевищує критичне значення в обох лабораторіях, як і систематична похибка. Методика характеризується доброю відтворюваністю, оскільки отримані об'єднані значення валідаційних параметрів не перевищують свого критичного значення. Тому обраний метод титрування може використовуватись для визначення кіль-

кісного вмісту прокаїну гідрохлориду в досліджуваній ЛФ.

Далі проводили валідацію методики визначення бензокаїну методом нітритометрії. Оцінку лінійної залежності проводили на всьому діапазоні застосування методики для кожного з досліджуваних п'яти об'ємів ЛФ (табл. 2). Отримані дані не перевищують розрахованих критичних значень.

Дослідження правильності та прецизійності аналітичної методики проводили за результатами аналізу тих самих модельних розчинів. Для визначення відтворюваності методики в умовах двох різних лабораторій розраховували середнє значення концентрації бензокаїну в ЛФ за експериментальними даними двох лабораторій Z_{intra},, об'єднане відносне стандартне відхилення RSD_{intra}, міжлабораторну систематичну похибку $д_Z$, відносний довірчий інтервал середнього значення $Д_{intra}$ (табл. 3).

Оцінку отриманих валідаційних характеристик методики проводили шляхом порівняння з критеріями прийнятності. Отримані значення свідчать про можливість використання даного ходу аналізу для визначення кількісного вмісту прокаїну гідрохлориду та бензокаїну в досліджуваній ЛФ.

ВИСНОВКИ

1. Обрано оптимальні методики якісного та кількісного визначення прокаїну гідрохлориду та бензокаїну в екстемпоральних лікарських формах та проведено їх валідацію.

2. Отримані результати свідчать, що обрані методики ідентифікації компонентів та хід кількісного визначення можуть бути використані в аналізі в умовах аптек та лабораторій з аналізу якості лікарських засобів під час аналізу досліджуваної лікарської форми.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бисага Є.І. Вибір реакцій для якісного контролю прокаїну гідрохлориду в лікарських формах аптечного виготовлення / Є.І.Бисага, О.А.Євтіфєєва, В.А.Георгіянц // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. — 2010. — Вип. XXIII, №1. — С. 14-17.
2. Государственная фармакопея СССР. — 10-е изд. — М.: Медицина, 1968. — 1080 с.
3. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. — 556 с.; Доп. 2. — Харків: РІРЕГ, 2008. — 608 с.
4. Євтіфєєва О.А. Стандартизація підходів до оцінки хімічних методів ідентифікації речовин, які входять до складу екстемпоральних лікарських засобів / О.А.Євтіфєєва // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. — 2010. — №1 (9). — С. 19-24.
5. Евтифеева О.А. Стандартизованная процедура валидации методик количественного определения экстемпоральных лекарственных средств в условиях аптек и лабораторий по контролю качества / О.А.Евтифеева, В.А.Георгиянц // Фармаком. — 2007. — №1. — С. 69-81.
6. Евтифеева О.А. Титриметрический метод анализа в условиях аптек и лабораторий по контролю качества лекарственных средств: проблемы и подходы / О.А.Евтифеева, В.А.Георгиянц // Фармаком. — 2008. — №2. — С. 65-77.
7. Максютина Н.П. Методы анализа лекарств / Н.П.Максютина, Ф.Е.Каган, Л.А.Кириченко, Ф.А.Митченко. — К.: Здоров'я, 1984. — 224 с.
8. European Pharmacopoeia. — 6th ed. — Strasbourg : European Directorate for the Quality of Medicines, 2008. — Vol. 2.1. — 1115 p. — Vol. 2.2. — 1107 p.

Л.П.Савченко, О.А.Евтифеева, В.А.Георгиянц, А.А.Здорик, Е.И.Бисага. Анализ прокаина гидрохлорида и бензокаина в растворе аптечного приготовления. Харьков, Ужгород, Украина.

Ключевые слова: *валидация аналитических методик, качественный анализ, количественный анализ, прокаина гидрохлорид, бензокаин.*

Осуществлен анализ лекарственной формы аптечного приготовления с прокаина гидрохлоридом и бензокаином. В процессе исследования выбраны оптимальные методики качественного и количественного анализа ее компонентов. Осуществлена валидация данных методик и доказана возможность их использования для анализа данной лекарственной формы.

L.P.Savchenko, O.A.Yevtifeyeva, V.A.Georgiyants, O.A.Zdoryk, E.I.Bisaga. Analysis of procaine hydrochloride and benzocaine in the extemporal solution. Kharkiv, Uzhgorod, Ukraine.

Key words: *validation of analytical methods, qualitative analysis, quantitative analysis, procaine hydrochloride, benzocaine.*

The analysis of extemporal dosage form with procaine hydrochloride and benzocaine was done. The optimal qualitative and quantitative methods for the determination of the components of the dosage form were chosen during the research. The validation of the methods was done and it proved their fitness for the analysis of chosen dosage form.

Надійшла до редакції 16.11.2011 р.