

УДК 543.426:615.07

І. І. ЛЕОНЕНКО, канд. хім. наук, Ю. В. СКРИПИНЕЦЬ, канд. хім. наук,

Г. В. АНЕЛЬЧИК, Д. І. АЛЕКСАНДРОВА, канд. хім. наук,

А. В. ЄГОРОВА, канд. хім. наук, доцент

Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України, м. Одеса

ВИСОКОЧУТЛИВЕ ЛЮМІНЕСЦЕНТНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ФЛУПІРТИНУ МАЛЕАТУ

Ключові слова: люмінесценція, флупіртину малеат, очищення фармацевтичного обладнання

Згідно з правилами GMP (Good Manufacturing Practice) обладнання, яке використовують під час виробництва фармацевтичних препаратів, має бути належним чином очищено, щоб уникнути перехресного забруднення наступної партії продукції. Процедура очищення включає відбір зразків та випробування на допустимі залишкові кількості активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ), які відрізняються фізико-хімічними та фармакологічними властивостями [7, 8].

У контролі якості очищення застосовують аналіз проб, змитих з поверхні обладнання за допомогою аплікаторів, або аналіз останньої порції промивної рідини [2].

Зазвичай допустимі межі вмісту АФІ на поверхнях фармацевтичного обладнання розраховують, виходячи з критеріїв ризику, пов'язаного із залишковими кількостями АФІ [4].

Флупіртину малеат (ФМ) являє собою аналгетик центральної дії, ефект якого якісно відрізняється від усіх використовуваних в клінічній практиці знеболювальних препаратів. Він поєднує безпечні та міорелаксуючі властивості, що особливо важливо у разі лікування опорно-рухового апарату і м'язових спазмів.

Відома низка методик визначення ФМ у дозованих лікарських формах і біооб'єктах з використанням спектрофотометрії [3] та високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [5, 6].

Спектрофотометричний метод визначення ФМ є оптимальним у дозованих лікарських формах [3]. Його здійснюють в метанольному середовищі: вода, метанол, диметилсульфоксид (ДМСО), етанол та хлороформ. Детектування проводять за $\lambda_{\text{пол}} = 250$ нм, з відповідним інтервалом лінійності 5,0–50,0 мкг/мл.

Концентрацію ФМ розраховують, виходячи з формули:

$$Y = 0,004 + 0,045 X; \quad R = 0,997,$$

де Y – оптична густина,

X – концентрація ФМ, мкг/мл.

Показана можливість визначення ФМ та його метаболіту в плазмі крові і в сечі з використанням обернено-фазового варіанту ВЕРХ з подальшим флуоресцентним детектуванням [5, 6]. В колонці використовують наповнювач октадецилсілан C_{18} . Інтервал лінійності для флупіртину малеату становить 0,01–10,0 мкг/мл, для метаболіту 0,5–25,0 мкг/мл ($R = 0,990$) [6].

У разі визначення ФМ у плазмі крові [5] використовують колонку Diamonsil C_{18} , як мобільну фазу фосфатний буферний розчин–ацетонітрил (55:45). Детектування здійснюють за $\lambda_{\text{збудж}} = 323$ нм і $\lambda_{\text{люм}} = 370$ нм. Інтервал лінійності 0,01–1,50 мкг/мл ($R = 0,999$) з нижньою межею визначення 0,01 мкг/мл.

© Колектив авторів, 2013

Запропоновані методики трудомісткі, потребують використання токсичних органічних розчинників (метанол, ацетонітрил), вартісного обладнання та не завжди забезпечують потрібну точність та експресність визначення.

Мета цієї роботи – розроблення методики люмінесцентного визначення залишкових кількостей АФІ флупіртину малеату у змивах для контролю повноти його видалення під час очищення технологічного обладнання.

Матеріали та методи дослідження

Для приготування розчинів використовували 0,1 М хлористоводневу кислоту і воду очищену, а також субстанцію флупіртину малеату (фарм.) (Jewim Pharmaceutical Co., Ltd-Китай).

Стандартний розчин ФМ (1 000 мкг/мл) готували розчиненням точної наважки субстанції в 0,1 М хлористоводневій кислоті. Точну наважку ФМ ~ 0,1 г вмішували в колбу на 100 мл, додавали ~ 70 мл 0,1 М хлористоводневої кислоти та перемішували за допомогою мішалки 15 хв до повного розчинення субстанції. Доводили до мітки 0,1 М хлористоводневою кислотою та перемішували.

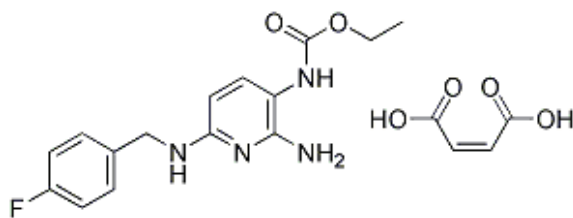
Робочі розчини ФМ (100,0, 10,0 та 1,0 мкг/мл) готували розведенням стандартного розчину ФМ (1 000,0 мкг/мл) 0,1 М хлористоводневою кислотою.

Спектри збудження та люмінесценції реєстрували за допомогою спектрофлуориметру Cary Eclipse «Varian» (Австралія) з ксеноновою лампою 150 W. Електронні спектри поглинання реєстрували на спектрофотометрі UV-2401 PC «Shimadzu» (Японія) з використанням кварцових кювет ($l = 1$ см). Всі вимірювання здійснювали за кімнатної температури (21–23 °С).

Результати дослідження та обговорення

Спектрально-люмінесцентні характеристики флупіртину малеату

Флупіртину малеат – етиловий ефір [2-аміно-6-(4-фторбензіламіно)-піридин-3-іл] карбамінової кислоти малеат.



Флупіртину малеат

Нами встановлено, що субстанція ФМ практично не розчиняється у воді. В етанолі та в 0,1 М хлористоводневій кислоті відбувається повне розчинення субстанції ФМ, але при цьому оптична густина розчину ФМ в етанолі нижча, ніж у 0,1 М хлористоводневій кислоті. Спостерігається батохромний зсув максимуму поглинання на 5 нм в етанольному середовищі (рис. 1, А).

Спектр поглинання ФМ у 0,1 М хлористоводневій кислоті характеризується наявністю інтенсивних смуг в УФ-області спектра з максимумами за $\lambda = 245$ нм ($\epsilon = 1,23 \cdot 10^4$ л · моль⁻¹ · см⁻¹) та за $\lambda = 345$ нм ($\epsilon = 1,90 \cdot 10^4$ л · моль⁻¹ · см⁻¹).

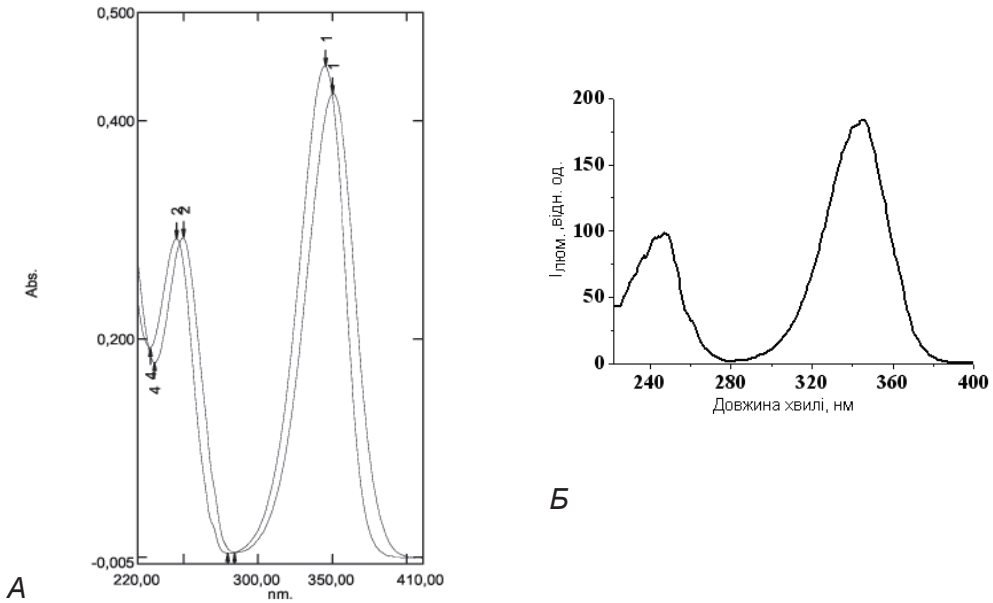


Рис. 1. Спектри поглинання (А) розчинів флупіртину малеату у 0,1 М хлористоводневій кислоті та етанолі ($C_{\text{ФМ}} = 10,0$ мкг/мл, $l = 1$ см) та збудження люмінесценції (Б) розчину ФМ ($C_{\text{ФМ}} = 1,0$ мкг/мл, щілини 5-5, $\lambda_{\text{еміс}} = 427$ нм, посилення 600)

Визначення константи іонізації флупіртину малеату

Стандартним спектрофотометричним [1] та люмінесцентним методами визначено константи іонізації флупіртину малеату. Готували серію розчинів постійної концентрації $C_{\text{ФМ}} = 10,0$ мкг/мл в інтервалі значень рН 1–11. Для створення рН середовища використовували ацетатно-аміачні буферні розчини. Спектри поглинання та люмінесценції розчинів ФМ за різних значень рН подано на рис. 2, А та рис. 3, А. Відповідні залежності оптичної густини та інтенсивності люмінесценції ($I_{\text{люм}}$) від рН наведено на рис 2, Б і 3, Б відповідно.

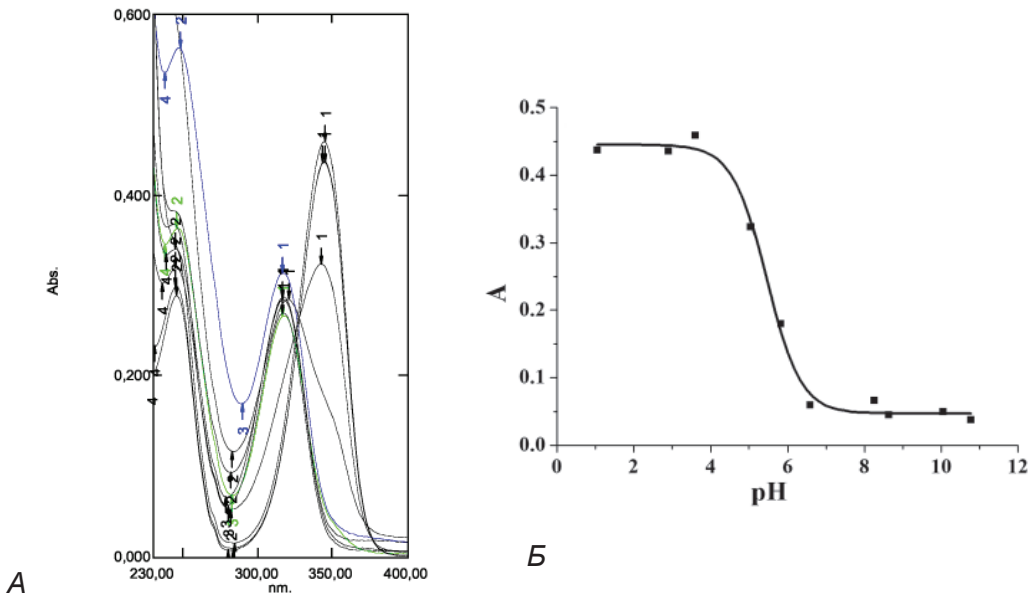


Рис. 2. Спектри поглинання розчинів ФМ (А) за різних значень рН та залежність оптичної густини (Б) від кислотності середовища

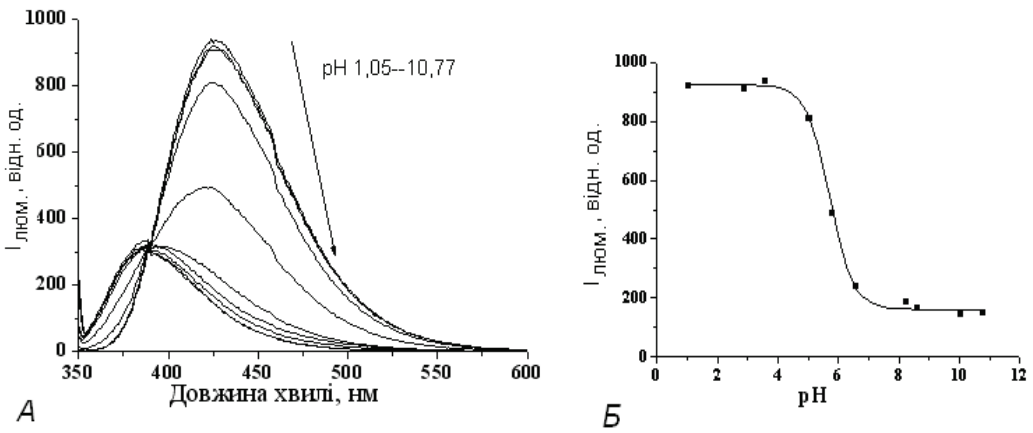


Рис. 3. Спектри власної люмінесценції ФМ (А) (щілини 5-5, $\lambda_{\text{збудж}}=345$ нм, посилення 600) в інтервалі рН 1,05-10,77 та залежність $I_{\text{люм}}$ ФМ (Б) від рН

Зі збільшенням рН в ацетатно-аміачному буферному розчині спостерігали зменшення як поглинання (~ 2 рази) так і власної інтенсивності люмінесценції ФМ (в ~ 3 рази) з гіпсохромним зсувом максимуму на 27 нм та 35 нм відповідно. Для подальших досліджень обрано розчинення субстанції в 0,1 М хлористоводневої кислоти, оскільки в цьому випадку $I_{\text{люм}}$ розчину ФМ максимальна.

Значення рК ФМ, обчислених у програмі Origin 7.5 на підставі даних люмінесцентного та спектрофотометричного методів, становлять $5,71 \pm 0,03$ та $5,45 \pm 0,02$ відповідно. Отримані дані вказують на задовільне узгодження результатів, одержаних двома різними методами.

На рис. 1, Б подано спектр збудження люмінесценції розчину ФМ, який практично збігається з його спектром поглинання (рис. 1, А). Виявлено, що зі збільшенням концентрації ФМ в середовищі 0,1 М хлористоводневої кислоти відбувається пряmlinейне збільшення його власної люмінесценції в інтервалах від 0,01 до 0,5 мкг/мл (рис. 4, А). Нами запропоновано визначати ФМ за його власною люмінесценцією в середовищі 0,1 М хлористоводневої кислоти.

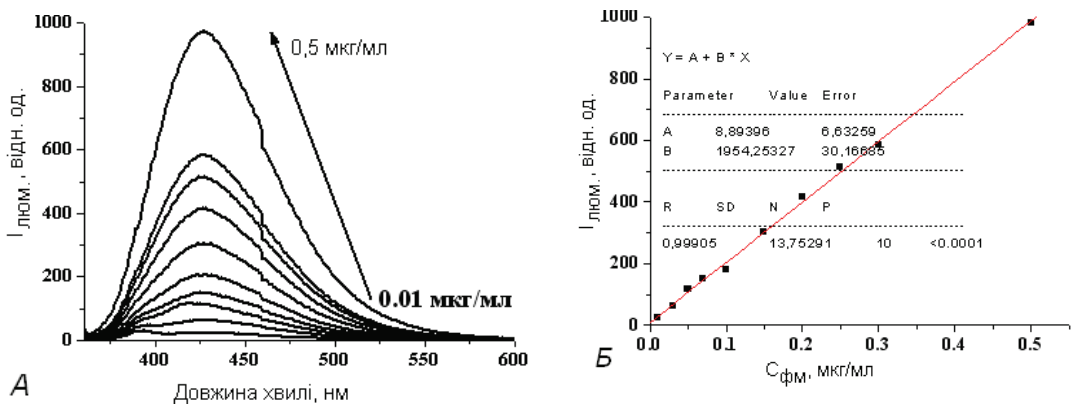


Рис. 4. Спектри власної люмінесценції розчинів ФМ (А) (щілини 10-10, $\lambda_{\text{збудж}}=345$ нм, посилення 600) та градувальний графік(Б) для його люмінесцентного визначення

Вивчено вплив на власну люмінесценцію розчину ФМ органічних розчинників різної природи (рис. 5). Встановлено, що за об'ємних вмістак 50% метанол та диметилсульфоксид практично не впливають на люмінесценцію ФМ, решта розчинників збільшують його $I_{\text{люм}}$ в 1,8–2,9 раза, з максимальним збільшенням $I_{\text{люм}}$ ФМ у диметилформаміді в 3,2 раза.

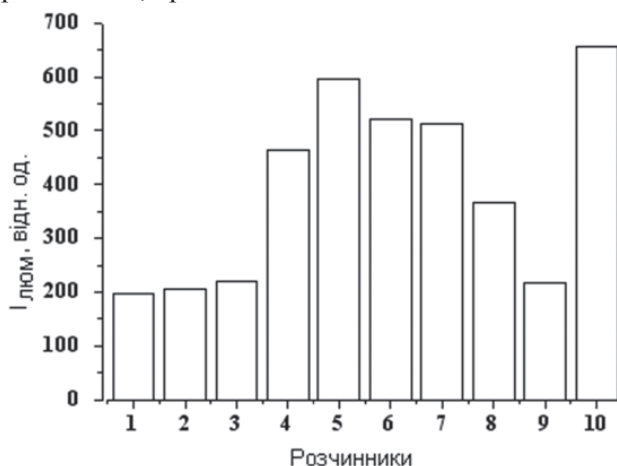


Рис. 5. Вплив органічних розчинників на інтенсивність люмінесценції розчину

ФМ ($C_{\text{ФМ}}=0,1$ мкг/мл, щільності 10–10, $\lambda_{\text{збудж}} = 345$ нм, посилення 600),

1 – вода очищена, 2 – 0,1 Н хлористоводнева кислота, 3 – метанол, 4 – етанол, 5 – н-пропанол, 6 – ізопропанол, 7 – ацетон, 8 – ацетонітрил, 9 – диметилсульфоксид, 10 – диметилформамід

Для побудови градууювального графіка в ряд мірних колб ємністю 10,0 мл вносили по 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 1,0 мл робочого розчину ФМ (1,0 мкг/мл); 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 1,0 мл робочого розчину ФМ (10,0 мкг/мл) та 0,2, 0,3 мл робочого розчину ФМ (100,0 мкг/мл). Розчини доводили до 10,0 мл 0,1 М хлористоводневої кислоти та перемішували. Через 5 хв вимірювали $I_{\text{люм}}$ за $\lambda_{\text{еміс}} = 427$ нм ($\lambda_{\text{збудж}} = 345$ нм).

Залежність $I_{\text{люм}}$ від $C_{\text{ФМ}}$ описується рівнянням:

$$I_{\text{люм}} = 8,89 + 1954,25 C_{\text{ФМ}}, \quad (R = 0,99905),$$

де $I_{\text{люм}}$ – інтенсивність люмінесценції, відн. од.;

$C_{\text{ФМ}}$ – концентрація ФМ, мкг/мл.

Вона є лінійною в інтервалі концентрацій ФМ 0,01–0,5 мкг/мл (рис. 4, Б). Межа виявлення становить 0,003 мкг/мл, що на 2 порядки нижче порівняно з методикою спектрофотометричного визначення (0,35 мкг/мл).

Методика визначення флупіртину малеату у змивах з поверхні фармацевтичного обладнання

Аплікатор зі змивом забруднення обладнання (площа змиву – 100,0 см²) вміщували в склянку ємністю 25,0 мл, додавали 5 мл 0,1 М хлористоводневої кислоти та здійснювали десорбцію упродовж 10 хв. Одержаний розчин кількісно переносили у мірну колбу ємністю 10,0 мл, доводили до позначки тим самим розчинником та перемішували. У разі необхідності розчин розбавляли.

Концентрацію (мкг/мл) ФМ у досліджуваному розчині визначали за градууювальним графіком.

Вміст ФМ (X) у змиві, в мікрограмах, розраховували за формулою:

$$X = C \cdot V \cdot 2,$$

де C – знайдений вміст ФМ, мкг/мл;

V – об'єм розчинника, яким здійснювали десорбцію, мл;

2 – розведення.

Визначення ступеня вилучення флупіртину maleату

У модельних дослідах під час валідації методики робили змиви аплікатором, змоченим 0,1 М кислотою хлористоводневою, з поверхні (100 см²), на яку штучно наносили 0,1 мг, 1,5 мг та 10,0 мг субстанції ФМ. Далі вилучення ФМ здійснювали за методикою. В отриманому розчині люмінесцентним методом визначали вміст флупіртину maleату.

Результати кількісного вилучення ФМ подано в таблиці.

Т а б л и ц я

Ступінь вилучення флупіртину maleату з поверхні моделі

Нанесено ФМ на поверхню моделі, мг	Ступінь вилучення ФМ, %				
	1	2	3	4	5
0,1	96,15	95,54	97,03	96,18	95,18
1,5	97,05	96,85	96,17	97,31	97,73
10,0	97,08	98,10	97,06	97,52	98,17

В и с н о в о к

Розроблено методику високочутливого люмінесцентного визначення залишкових кількостей флупіртину maleату у змивах з поверхонь фармацевтичного обладнання. Запропонована проста та експресна методика, яка характеризується задовільними метрологічними характеристиками. Ступінь вилучення флупіртину maleату з аплікаторів та поверхонь фармацевтичного обладнання становить більш ніж 95%.

Розроблена методика може бути рекомендована для визначення залишкових кількостей флупіртину maleату під час контролю якості очищення обладнання на фармацевтичних підприємствах.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Булатов М. И., Калинин И. П. Практическое руководство по фотометрическим и спектрофотометрическим методам анализа. 4-е изд. – Л.: Химия, 1976. – С. 243–247.

2. Шкляев С. А. Аналітичне забезпечення процедури очищення технологічного обладнання від залишків активних інгредієнтів на фармацевтичному підприємстві // Фармац. журн. – 2012. – № 5. – С. 33–37.

3. Amal D., Aneesh T. P. Method development and validation for the estimation of flupirtine maleate in bulk and pharmaceutical dosage forms using UV-VIS spectrophotometry // Inter. Res. J. Pharm. – 2011. – V. 12. – P. 179–182.

4. Fourman G. L., Mullen M. V. Determining cleaning validation acceptance limits for pharmaceutical manufacturing operations // Pharmac. Technol. – 1993. – V. 17, N 4. – P. 54–60.

5. Liu L-X., Xia D-Y., Guo T. Determination of the concentration of flupirtine in human plasma by RP-HPLC // J. Shenyang Pharmac. University. – 2010. – V. 27, N 7. – P. 559–562.

6. Narang P. K., Tourville J. F., Chatterji D. C., Gallelli J. F. Quantitation of flupirtine and its active acetylated metabolite by reversed-phase high-performance liquid chromatography using fluorometric detection // J. Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. – 1984. – V. 305. – P. 135–143.

7. PIC/S document PI006-2. Recommendations on Validation Master Plan, Installation and Operational Qualification. Non Sterile Process Validation, Cleaning Validation; July 2004.

8. U. S. Food and Drug Administration. Guide to inspections validation of cleaning processes; July 1993.

Надійшла до редакції 01. 10. 2013.

*И. И. Леоненко, Ю. В. Скрипинец, А. В. Анельчик, Д. И. Александрова, А. В. Егорова
Физико-химический институт им. А. В. Богатского НАН Украины, г. Одесса*

ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЕ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЛУПИРТИНА МАЛЕАТА

Ключевые слова: люминесценция, флупиртина малеат, очистка фармацевтического оборудования

А Н Н О Т А Ц И Я

Определение активных фармацевтических ингредиентов в смывах с поверхностей фармацевтического оборудования необходимо во избежание перекрестного загрязнения следующей партии продукции. Цель этой работы – разработка методики люминесцентного определения остаточных количеств активного фармацевтического ингредиента флупиртина малеата в смывах для контроля полноты его удаления при очистке технологического оборудования.

В работе использовали субстанцию флупиртина малеата и 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты. Спектры возбуждения и люминесценции регистрировали с помощью спектрофлуориметра Cary Eclipse «Varian». Электронные спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре UV-2401 PC «Shimadzu».

Спектр поглощения флупиртина малеата в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты характеризуется наличием интенсивных полос в УФ-области спектра с максимумами при $\lambda = 246$ нм и при $\lambda = 345$ нм. Спектр возбуждения люминесценции раствора флупиртина малеата практически совпадает с его спектром поглощения.

Стандартным спектрофотометрическим и люминесцентным методами определены константы ионизации флупиртина малеата. Значения рК флупиртина малеата, вычисленные в программе Origin 7.5, составляют $5,45 \pm 0,02$ и $5,71 \pm 0,03$ соответственно, что указывает на удовлетворительное согласование результатов, полученных двумя разными методами.

Установлена степень извлечения флупиртина малеата из аппликаторов, составляющая более 95%.

Разработана высокочувствительная и простая экспресс-методика определения флупиртина малеата по его собственной люминесценции в среде 0,1 М раствора

хлористоводородной кислоты ($\lambda_{\text{возб}} = 345 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{лом}} = 427 \text{ нм}$) в смывах с поверхностей фармацевтического оборудования. Градуировочный график линеен в интервале концентраций флупиртина малеата 0,01–0,5 мкг/мл. Предел обнаружения составляет 0,003 мкг/мл.

Разработанная методика может быть рекомендована для определения остаточных количеств флупиртина малеата при контроле качества очистки оборудования на фармацевтических предприятиях.

*I. I. Leonenko, Yu. V. Scrypnets, A. V. Anelchuk, D. I. Aleksandrova, A. V. Yegorova
A. V. Bogatsky Physico-chemical institute of National Academy of Sciences of Ukraine,
Odessa*

HIGHLY SENSITIVE LUMINESCENCE DETERMINATION OF FLUPIRTINE MALEATE

Key words: luminescence, flupirtine maleate, cleaning of pharmaceutical equipment

ABSTRACT

Identification of the active pharmaceutical ingredients in washings from surfaces of pharmaceutical equipment is necessary to avoid cross-contamination of the next batch of products. The aim of this work – the development of the method of luminescence determination of residual active pharmaceutical ingredients flupirtine maleate in washings to monitor the completeness of its removal for cleaning technologic equipment.

In this work the flupirtine maleate substance and 0.1 M hydrochloric acid were used. The excitation spectra and luminescence spectra were recorded on a spectrofluorimeter Cary Eclipse «Varian». Electronic absorption spectra were recorded on a spectrophotometer UV-2401 PC «Shimadzu».

The absorption spectrum of an flupirtine maleate in 0.1 M hydrochloric acid solution characterized by intense bands in the UV region of the spectrum with maxima at $\lambda = 246 \text{ nm}$ and $\lambda = 345 \text{ nm}$. Luminescence excitation spectrum of the flupirtine maleate solution almost the same as its absorption spectrum.

The ionization constants of flupirtine maleate by the standard spectrophotometric and fluorescent methods were determined. pK values of flupirtine maleate were calculated in the program Origin 7.5, are 5.45 ± 0.02 and 5.71 ± 0.03 , respectively, and indicate satisfactory correlation results obtained by the two different methods.

The recovery rates of flupirtine maleate from swabs was more than 95%.

The highly sensitive, simple and rapid method for determination of flupirtine maleate by its own luminescence in the 0.1 M solution of hydrochloric acid ($\lambda_{\text{ex}} = 345 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{lum}} = 427 \text{ nm}$) in washings from surfaces of pharmaceutical equipment was developed. Calibration curve was linear over the concentration range of the flupirtine maleate 0.01–0.5 $\mu\text{g/ml}$. The limit of detection is 0.003 $\mu\text{g/ml}$.

The developed method can be recommended for the determination of residual amounts of flupirtine maleate in the quality control of pharmaceutical equipment cleaning.

Електронна адреса для листування з авторами: yegorova@interchem.com.ua