

УДК 543.426:615.07

**А. В. Егорова¹, Ю. В. Скрипинец¹, И. И. Леоненко¹, А. В. Анельчик¹,
Е. В. Малинка²**¹Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины,
Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080, Украина²Одесская национальная академия пищевых технологий, Канатная, 112, Одесса,
65039, Украина

ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭТОДОЛАКА

Определение активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) в смывах с поверхностей фармоборудования необходимо во избежание перекрестного загрязнения следующей партии продукции. Разработана и валидирована высокочувствительная, простая и экспрессная методика определения нестероидного противовоспалительного препарата – этодолака (Эт). Оптимизированы условия регистрации собственной люминесценции этодолака. В качестве аналитического сигнала использована интенсивность люминесценции водно-пропанольных растворов Эт ($\lambda_{\text{возб}} = 274 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{люм}} = 350 \text{ нм}$). Градуировочный график линеен в интервале концентраций Эт $0.014\text{--}2.3 \text{ мкг/мл}$, предел обнаружения 5 нг/мл .

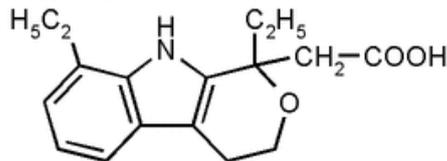
Разработанная методика может быть рекомендована для определения остаточных количеств этодолака при контроле качества очистки фармоборудования. Степень извлечения этодолака с аппликаторов и поверхностей фармоборудования составляет более 95%.

Ключевые слова: люминесценция, этодолак, очистка фармоборудования.

Согласно правилам GMP («Good Manufacturing Practice», Надлежащая производственная практика) оборудование, используемое при производстве фармацевтических препаратов, должно быть надлежащим образом очищено во избежание перекрестного загрязнения следующей партии продукции. Процедура очистки включает отбор образцов и испытания на допустимые остаточные количества активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) на поверхностях фармоборудования. В контроле качества очистки применяют анализ проб, смываемых с поверхности оборудования с помощью аппликаторов, или анализ последней порции промывной жидкости [1–3].

Нестероидные противовоспалительные препараты – одна из основных групп препаратов, которые применяются сегодня для снятия болевого синдрома и воспаления. Они успешно используются при лечении артритов, артрозов, воспалительных системных заболеваний. Механизм действия НПВП заключается в том, что они нарушают нормальную химическую реакцию, в результате которой образуются вещества, стимулирующие ощущение боли – простагландины [4].

Большинство НПВП – производные уксусной, пропионовой, антралиновой кислот. Этодолак (Эт) – нестероидный противовоспалительный препарат:



1,8-диэтил-1,3,4,9-тетрагидропирано[3,4-*b*]индол-1-уксусная кислота;
рацемическая смесь *R*- и *S*-изомеров

Широкое применение в медицинской практике НПВП обуславливает необходимость разработки простых, экспрессных и высокочувствительных методик их определения в лекарственных формах, биожидкостях, смывах с фармооборудования.

Фармакопейным методом определения этодолака в его субстанции является потенциометрическое титрование с использованием тетраметиламмония гидроксида [5].

Для определения Эт в его лекарственных формах предложены спектрофотометрические (СФ) [6, 7], спектрофлуориметрические (СФл) [8, 11, 12] и хроматографические (ВЭЖХ) методики [13–15].

СФ определение основано на взаимодействии этодолака с *p*-диметиламинобензальдегидом и хлоридом железа (III) в присутствии серной кислоты с образованием окрашенного продукта. Детектирование проводят при $\lambda = 591.5$ нм в интервале концентраций 10–80 мкг/мл [8]. Предложена методика СФл определения этодолака по его собственной люминесценции в среде этанола ($\lambda_{\text{эмис}} = 345$ нм, $\lambda_{\text{возб}} = 235$ нм) с интервалом линейности 96–640 нг/мл.

Сенсибилизированная люминесценция Eu(III) применена для совместного определения этодолака (I), моксеприла хлорида (II) и фексофенадина хлорида (III) (детектирование препаратов проводят при $\lambda_{\text{эмис}} = 667$ нм для (I), $\lambda_{\text{эмис}} = 615$ нм для (II) и (III) при $\lambda_{\text{возб}} = 276$ нм) с соответствующими интервалами линейности 20–280, 40–240 и 30–80 нг/мл и пределами обнаружения 0.93; 0.92 и 0.95 мкг/мл [11].

Разработана и валидирована спектрофлуориметрическая методика определения этодолака и диклофенака натрия, основанная на их взаимодействии с 7-фтор-4-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом при pH 8.5 с образованием желтого флуоресцирующего продукта. Интервал линейности 40–600 нг/мл и 200–500 нг/мл, соответственно. Пределы обнаружения 0.071 нг/мл и 0.055 нг/мл [12].

Разработана ВЭЖХ-методика совместного определения толперизона гидрохлорида и этодолака с использованием колонки phenomenax C-18 и мобильной фазы: фосфатный буфер (pH 5.5) : метанол : ацетонитрил : триэтиламин (40:40:20:1.5) с дальнейшим спектрофотометрическим детектированием при $\lambda = 257$ нм [13].

Некоторые условия и возможности СФ, СФл и ВЭЖХ методик определения Эт приведены в таблице 1.

Существенно, что во всех описанных методиках не ставились задачи повышения чувствительности определения Эт, контроля его остаточных количеств при очистке оборудования. В данной работе оптимизированы условия регистрации собственной люминесценции этодолака, на основании которых разработана новая методика его высокочувствительного определения в смывах с поверхностей фармооборудования.

Материалы и методы

Исходный раствор этодолака (1000 мкг/мл) готовили растворением точной навески соответствующей субстанции в воде с подщелачиванием 0.1 М раствором NaOH до pH 7.5–8.0. Рабочие растворы (2.88 мкг/мл; 10.0 мкг/мл; 28.8 мкг/мл) готовили соответствующим разбавлением водой.

Трис-НСI буферный раствор 0.1 моль/л, готовили растворением Трис-основания (1.211 г) («Merck») в 90 мл воды, с последующим добавлением 0.1 моль/л HCl до pH 7.5 и доведением полученного раствора водой до объема 100 мл.

Таблица 1

Методики определения этодолака

Метод	Условия	$\lambda_{\text{макс}}$ (нм)	Интервал линейности (мкг/мл)	Литера- тура
СФ	<i>p</i> -диметиламинобензальдегид/ H ₂ SO ₄ /FeCl ₃	591.5	10-80	[8]
СФ	Fe(III)/ <i>o</i> -фенантролин Fe(III)/2,2'-бипиридил Fe(III)/феррицианид	510	0.5-8.0	[7]
		520	1.0-10.0	
		725	2.0-18.0	
СФ	Fe(III)/2,2'-бипиридил	500	0.5-25.0	[9]
СФ	Cu(II)ацетат	684	2.0-9.0	[10]
	FeCl ₃	385	500-2000	
СФл	Этанол	345 235	0.096-0.64	[8]
СФл	Eu(III)	667 276	0.020-0.280	[11]
СФл	7-фтор-4-нитробензо-2-окса-1,3- диазол	521 461	0.040-0.600	[12]
ВЭЖХ	подвижная фаза: фосфатный буферный раствор (рН 5,5): метанол: ацетонитрил:триэтиламин (40:40:20:1.5)	257	8.0-56.0	[13]
СФл	<i>n</i> -пропанол (70 об/об)	350	0.014–2.30	данная работа

В работе использовали реактивы квалификации ч.д.а. и х.ч., вода – бидистиллированная.

Электронные спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре UV-2401 PC «Shimadzu» (Япония) с использованием кварцевых кювет ($l = 1$ см).

Спектры возбуждения люминесценции и люминесценции регистрировали с помощью спектрофлуориметра Cary Eclipse «Varian» (Австралия) с ксеноновой лампой 150 W.

Значения рН растворов измеряли с помощью рН-метра Lab 850 (Schott Instruments GmbH, Germany) со стеклянным электродом, калибровку которого проводили с помощью стандартных буферных растворов. Все измерения проводили при комнатной температуре (21–23°C).

Результаты и их обсуждение

На рис. 1. представлены спектры поглощения (а) и возбуждения люминесценции (б) водного раствора Эт.

Спектр поглощения Эт (рис. 1, а) характеризуется наличием двух полос в УФ-области спектра с максимумами поглощения при $\lambda = 224$ нм ($\epsilon = 2.3 \times 10^4$ л × моль⁻¹ × см⁻¹), $\lambda = 274$ нм ($\epsilon = 0.5 \times 10^4$ л × моль⁻¹ × см⁻¹). Спектр возбуждения люминесценции Эт подобен спектру его поглощения.

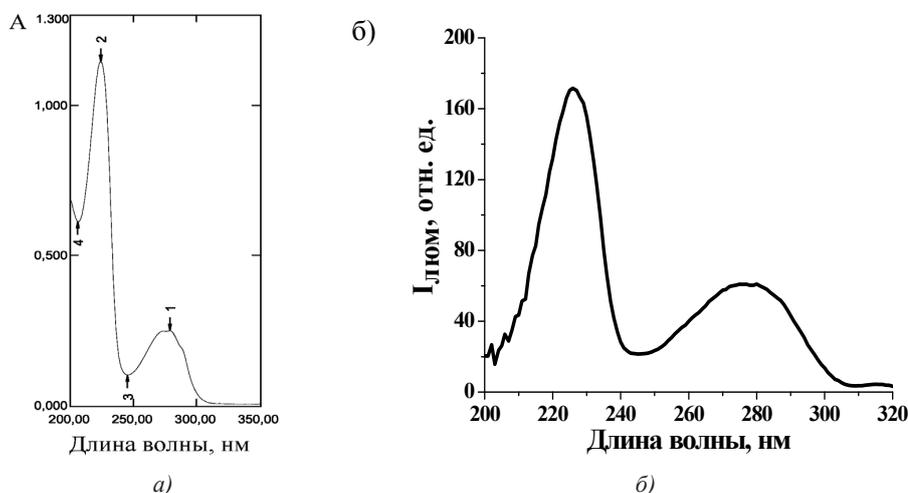


Рис. 1. Спектры поглощения ($C_{Эт} = 5 \times 10^{-5}$ моль/л) (рис. 1, а) и возбуждения люминесценции (рис. 1, б) водного раствора этодолака ($C_{Эт} = 1 \times 10^{-6}$ моль/л, $pH = 7.5$; $\lambda_{эмис} = 350$ нм; щели 10-10; усиление 540).

Изучено влияние на интенсивность люминесценции ($I_{люм}$) Эт метанола, этанола, ацетона, ацетонитрила, диметилформаида, диметилсульфоксида (70 об/об). Установлено, что органические растворители увеличивают $I_{люм}$ в 3-5 раз (метанол, этанол, ацетонитрил, изопропанол, диметилсульфоксид, диметилформамид). В то же время ацетон практически тушит $I_{люм}$ Эт. Максимальная люминесценция Эт наблюдается в среде н-пропанола (рис. 2).

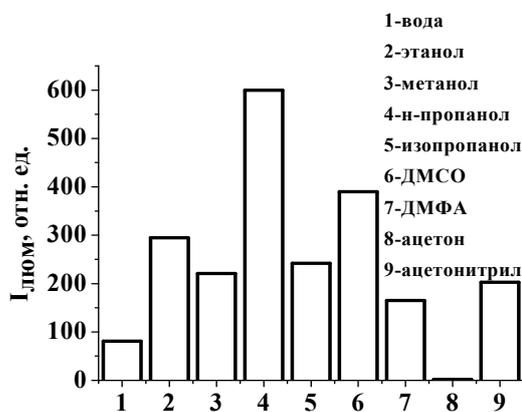


Рис. 2. Зависимость интенсивности люминесценции Эт от типа растворителей ($C_{Эт} = 1 \times 10^{-6}$ моль/л, $pH = 7.5$; $\lambda_{возб} = 274$ нм; щели 10-10; усиление 480).

Обнаружено, что в среде н-пропанола с увеличением концентрации этодолака наблюдается прямолинейное увеличение его собственной люминесценции (рис. 3, а).

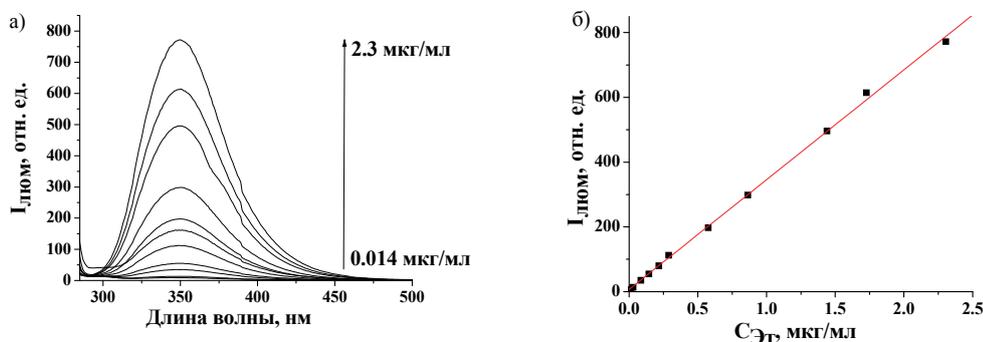


Рис. 3. Спектры собственной люминесценции Эт (а); градуировочный график для люминесцентного определения Эт (б) ($\lambda_{\text{возб}} = 274 \text{ нм}$; щели 10-10; усиление 480).

Зависимость $I_{\text{люм}}$ от $C_{\text{Эт}}$ описывается уравнением $A = 7.543 + 0.34C_{\text{Эт}}$ ($R = 0.99941$) и линейна в интервале концентраций Эт 0.014–2.30 мкг/мл (рис. 3, б). Предел обнаружения составляет 5 нг/мл. Это указывает на то, что предлагаемая методика определения Эт наиболее чувствительная из всех известных.

Люминесцентное определение этодолака по собственной люминесценции

Градуировочный график

Для построения градуировочного графика в ряд мерных колб объемом 10.0 мл вносили по 0.05; 0.1; 0.3; 0.5; 0.7 мл рабочего раствора Эт (2.88 мкг/мл), 0.1; 0.2; 0.3; 0.5; 0.6; 0.8 мл рабочего раствора Эт (28.8 мкг/мл). В каждую пробирку вносили 1.0 мл трис-НСI буферного раствора, 7.0 мл н-пропанола. Растворы доводили до 10.0 мл водой. Через 5 минут измеряли $I_{\text{люм}}$ при $\lambda_{\text{эмис}} = 350 \text{ нм}$ ($\lambda_{\text{возб}} = 274 \text{ нм}$). По полученным данным строили градуировочный график (рис. 3).

Методика определения этодолака в смывах с поверхности фармоборудования

Аппликатор со смывом загрязнения оборудования (площадь смыва – 100.0 см²) помещают в мерный стакан вместимостью 25.0 мл, прибавляют 1.0 мл трис-НСI буферного раствора, 2.0 мл воды, 2.0 мл н-пропанола и проводят десорбцию в течение 10 мин. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу объемом 10.0 мл, доводят до метки н-пропанолом и перемешивают. При необходимости раствор разбавляют.

Концентрацию (мкг/мл) этодолака в исследуемом растворе определяют по градуировочному графику.

Содержание Эт (X), в микрограммах в смыве, рассчитывают по формуле:

$$X = C \cdot V \cdot b$$

где: V – объем растворителя, которым проводят десорбцию, мл;

b – разбавление;

C – найденное содержание этодолака, мкг/мл.

Определение степени извлечения этодолака

В модельных опытах в ходе валидации методики искусственно наносили на поверхность (100.0 см²) аликвоты 0.1 мл, 1.0 мл, 2.0 мл рабочего раствора (10 мкг/мл), что соответствует нанесениям 1 мкг; 10 мкг и 20 мкг этодолака. После испарения растворов делали смывы смоченным водой аппликатором с соответствующих поверхностей. Далее извлечение Эт проводили по методике. В полученном растворе люминесцентным методом определяли содержание этодолака.

Результаты количественного извлечения этодолака (из пяти параллельных нанесений) представлены в таблице 2.

Таблица 2

Степень извлечения этодолака с поверхности

Нанесено Эт, мкг	Степень извлечение Эт, %					
	1	2	3	4	5	S _r , %
1.0	92.45	96.75	96.89	97.11	98.22	2.31
10.0	94.45	96.64	95.93	97.28	98.15	1.45
20.0	97.01	95.41	97.15	96.31	95.05	0.97

Предлагаемая методика характеризуется удовлетворительными метрологическими характеристиками и простотой выполнения.

Выводы

Впервые разработана простая, экспрессная и высокочувствительная методика люминесцентного определения остаточных количеств этодолака в смывах с поверхностей фармоборудования. Степень извлечения этодолака с аппликаторов и поверхностей фармоборудования составляет более 95%. Разработанная методика может быть рекомендована для определения остаточных количеств этодолака при контроле качества очистки фармоборудования.

Литература

1. PIC/S document PI006-2. Recommendations on Validation Master Plan, Installation und Operational Qualification. Non Sterile Process Validation, Cleaning Validation; July 2004.
2. U.S. Food and Drug Administration. Guide to inspections validation of cleaning processes; July 1993.
3. Fourman G.L., Mullen M.V. Determining cleaning validation acceptance limits for pharmaceutical manufacturing operations. *Pharmaceutical Technology*, 1993, vol. 17, pp. 54–60.
4. Dieppe P.A., Frankel S.J., Toth B. Is research into the treatment of osteoarthritis with non-steroidal anti-inflammatory drugs misdirected? *The Lancet*, 1993, vol. 341, pp. 353–354.
5. *British Pharmacopoeia*, 2009, Monograph 1422.
6. Insuyu P.D., Atila A., Kadioglu Y., Turan A. Quantitative determination of etodolac by UV spectrophotometric method in bulk drug and commercial formulations. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2013, vol. 4, no. 8, pp. 2927–2932.
7. Gouda A.A., Hassan W.S. Spectrophotometric determination of etodolac in pure form and pharmaceutical formulations. *Chemistry Central Journal*, 2008, vol. 14, pp. 2–7.
8. El Kousy N.M. Spectrophotometric and spectrofluorimetric determination of etodolac and aceclofenac. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1999, vol. 20, no. 1, 2, pp. 185–194.
9. Hu, Q., Li Y., Yang X., Wei Q., Huan Z. Study on spectrophotometric determination of etodolac. *Chemical Journal on Internet*, 2008, vol. 10, no. 1, pp. 31–35.

10. Amer S.M., El-Saharty Y.S., Metwally F.H., Younes K.M. Spectrophotometric study of etodolac complexes with copper (II) and iron (III). *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*, 2005, vol. 88, no. 6, pp. 1637–1643.
11. Abd El-Hay S.S., Colyer C.L., Hassan W.S., Shalaby A. Spectrofluorimetric determination of etodolac, moxepiril HCl and fexofenadine HCl using europium sensitized fluorescence in bulk and pharmaceutical preparations. *Journal of Fluorescence*, 2012, vol. 22, pp. 247–252.
12. Ulu S.T. New and sensitive spectrofluorimetric method for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs, etodolac and diclofenac sodium in pharmaceutical preparations through derivatization with 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2011, vol. 19, no. 1, pp. 94–101.
13. Patel M.J., Badmanaban R., Patel C.N. Reversed phase-high performance liquid chromatographic method for simultaneous estimation of tolperisone hydrochloride and etodolac in a combined fixed dose oral formulations. *Pharmaceutical Methods*, 2011, vol. 2, no. 2, pp. 124–129.
14. Lee H.S., Kang I.M., Lee H.W., Seo J.H., Ryu J.H., Choi S.J., Lee M.J., Jeong S.Y., Cho Y.W., Lee K.T. Development and validation of a high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of etodolac in human plasma. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2008, vol. 863, pp. 158–162.
15. Ficarra R., Ficarra P., Calauro M.L., Costantino D. Quantitative high performance liquid chromatographic determination of etodolac in pharmaceutical formulations. *Farmaco (rome)*, 1991, vol. 46, pp. 403–407.

Стаття надійшла до редакції 17.02.14

**А. В. Єгорова¹, Ю. В. Скрипинець¹, І. І. Леоненко¹, Г. В. Анельчик²,
О. В. Малинка²**

¹Фізико-хімічний інститут ім. О.В.Богатського НАН України,
Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна

²Одеська національна академія харчових технологій, Канатна, 112, Одеса, 65039,
Україна

ЛЮМІНЕСЦЕНТНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЕТОДОЛАКУ

Розроблено високочутливу, просту та експресну методику визначення нестероїдного протизапального препарату – етодолаку (Ет) у змивах з поверхонь фармообладнання. В якості аналітичного сигналу використана інтенсивність власної люмінесценції водно-н-пропанольних розчинів Ет ($\lambda_{\text{збудж}} = 274$ нм; $\lambda_{\text{люм}} = 350$ нм). Градувальний графік лінійний в інтервалі концентрацій 0.014-2.3 мкг/мл, межа виявлення дорівнює 5 нг/мл.

Ключові слова: люмінесценція, етодолак, очистка фармообладнання

**A. V. Yegorova¹, Yu. V. Skrypynets¹, I. I. Leonenko¹, G. V. Anelchik¹,
E. V. Malinka²**

¹A. V. Bogatsky Physico-Chemical Institute of the National Academy of Sciences of
Ukraine, Lustdorfskaya doroga, 86, Odessa, 65080, Ukraine

²Odesskaya National Academy of Food Technologies, Kanatnaya, 112, Odessa, 65039,
Ukraine

LUMINESCENCE DETERMINATION OF ETODOLAC

A highly sensitive, simple and rapid method for determination of non-steroidal anti-inflammatory drug – etodolac (Et) in washings from surfaces of pharmaceutical equipment have been proposed. The intensity of native luminescence of water-n-propanol solutions of etodolac ($\lambda_{\text{ex}} = 274$ nm; $\lambda_{\text{lum}} = 350$ nm) was used as the analytical signal. The calibration graph is linear in the concentration range 0.014-2.3 $\mu\text{g/ml}$, the limit of detection is 0.5 ng/ml.

Key words: luminescence, etodolac, cleaning pharmaceutical equipment.