

Е. П. Портная, С. А. Васюк

## ПРИМЕНЕНИЕ НАТРИЕВОЙ СОЛИ 1,2-НАФТОХИНОН-4-СУЛЬФОКИСЛОТЫ ДЛЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТАУРИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ

Запорожский государственный медицинский университет, Запорожье, Украина, 69035, пр-т Маяковского, 26; e-mail: Kate-portnaya@ukr.net

Разработана и валидирована новая спектрофотометрическая методика количественного определения таурина в лекарственных формах, основанная на измерении абсорбции водных растворов таурина при 470 нм. Методика отвечает требованиям ГФУ, предъявляемым к методикам количественного анализа лекарственных веществ, и может быть корректно воспроизведена и рекомендована для использования в лабораториях Государственной инспекции контроля качества лекарственных веществ, а также ОТК химико-фармацевтических предприятий.

**Ключевые слова:** таурин; методика количественного определения; контроль качества лекарственных веществ.

Таурин (2-аминоэтансульфоновая кислота) — продукт метаболизма серусодержащей аминокислоты L-цистеина и ее производных. Таурин принимает непосредственное участие в метаболических процессах углеводного и белкового обмена, поддержании гомеостаза внутриклеточной концентрации кальция и натрия, стабилизации клеточной мембраны, нейромодуляции, вазодилатации, сердечной деятельности [1]. Таурин оказывает гипотензивное действие [2]. Для современного фармацевтического анализа актуальной проблемой является разработка точных, экспрессных и доступных методик количественного определения действующих веществ в лекарственных формах.

Фармакопея Соединенных Штатов (USP) рекомендует определять таурин в субстанции по методу Кьельдаля [3], а Японская Фармакопея — “формольным” титрованием с потенциометрическим фиксированием конечной точки титрования [4]. Несмотря на высокую точность титриметрических методов анализа, для определения лекарственных веществ в лекарственных средствах чаще используются инструментальные методы, как более чувствительные. Описаны хроматографические [5–7] и оптические [8–11] методы анализа таурина. Для определения таурина в напитках [10] и скелетных мышцах [11] предложен экстракционно-фотометрический метод, основанный на реакции с 2,4-динитрофторбензеном, экстракции полученного продукта хлороформом и измерении абсорбции при 358 нм. Для спектрофотометрического определения таурина в лекарственных формах использована его реакция с 1,3-диметилаллоксаном при нагревании в среде N,N-диметилформамида [8]. Для повышения чувствительности определения к полученному окрашенному продукту добавляют хлорид кадмия. Недостатком описанной методики является недоступность реагента в связи с тем, что он не выпускается химической промышленностью. Для определения алифатических аминокислот (аминалона, кислоты аминокaproновой) ис-

пользуют реакцию с 1 % спиртовым раствором нингидрина в среде фосфатного буферного раствора с pH от 6,4 до 7,6 в присутствии 1 мг аскорбиновой кислоты. После нагревания реакционной смеси в течение 25 мин на кипящей водяной бане окрашенный раствор охлаждают и измеряют оптическую плотность при длине волны 568 нм [9].

Некоторые из предложенных методов сложны в выполнении, другие — длительны, в отдельных случаях используются недоступные реагенты. Таким образом, целесообразность разработки новых, простых, валидных методов количественного определения таурина не вызывает сомнений.

Целью работы является изучение оптимальных условий протекания реакции между таурином и натриевой солью 1,2-нафтохинон-4-сульфокислоты, установление коэффициентов стехиометрических соотношений в системе “лекарственное вещество — реагент” и разработка валидной, чувствительной, простой в выполнении методики количественного определения таурина в лекарственных формах.

### Экспериментальная часть

Для проведения эксперимента были использованы: субстанция таурина (каталог Blackburn distributions LTD); лекарственные препараты — глазные капли “Тауфон” 4 % — 10 мл (ОАО “Фармак”, Украина) и “Тауфон” 4 % — 5 мл, № 3 (ООО ОЗ “ГНЦЛС”, Украина), серий 511212 и 10112 соответственно, таблетки “Кратал” 0,867 г таурина (ЗАО НПЦ “БОРЩАГОВСКИЙ ХФЗ”, Украина), серия 370513.

В качестве реактивов и растворителя использовали натриевую соль 1,2-нафтохинон-4-сульфокислоты квалификации х.ч., 0,01 М раствор NaOH, воду очищенную.

Аналитическое оборудование: спектрофотометр Specord 200, весы электронные АВТ-120-5DM, водяная баня Memmert WNB 7-45, мерная посуда класса А.

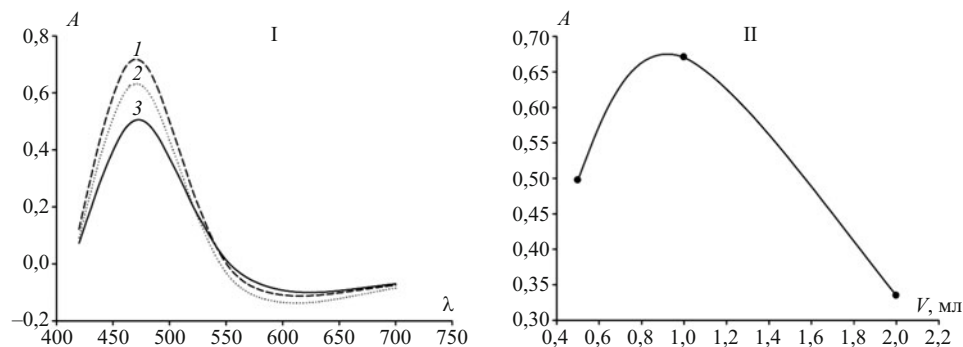


Рис. 1. Зависимость оптической плотности: I — от количества 1 % раствора натриевой соли 1,2-нафтохинон-4-сульфоукислоты (1 – 2,00 мл реагента; 2 – 1,00 мл; 3 – 0,50 мл); II — от количества 0,01 М раствора NaOH.

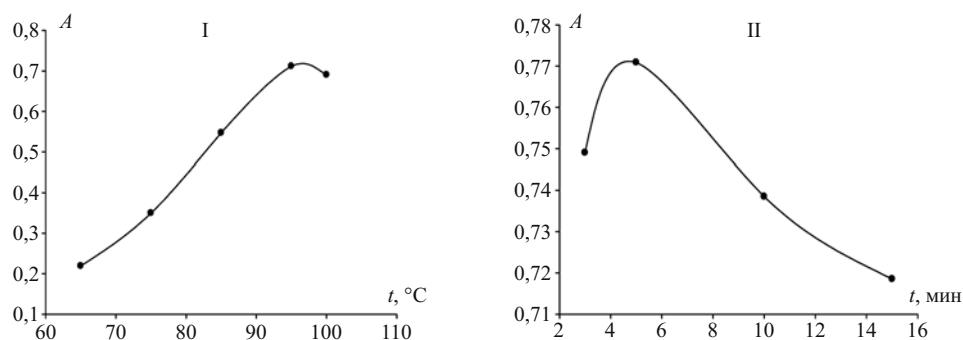


Рис. 2. Зависимость оптической плотности: I — от температуры нагревания реакционной смеси; II — от времени нагревания при 95 °С.

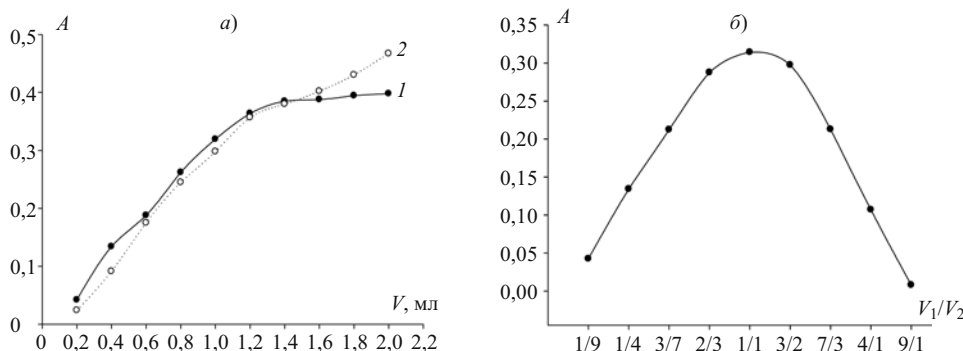


Рис. 3. Кривые насыщения таурина (а) при постоянной концентрации реагента (1) и реагента при постоянной концентрации таурина (2); б) график зависимости величины оптической плотности от состава изомольярного раствора ( $V_1$  – 0,005 М раствор натриевой соли 1,2-нафтохинон-4-сульфоукислоты,  $V_2$  – 0,005 М раствор таурина).

**Общая методика количественного определения таурина.** Аликвотную часть водного раствора таурина (0,434 – 1,01 мг) помещают в мерную колбу объемом 25,00 мл, обрабатывают 0,50 мл 1 % водного раствора натриевой соли 1,2-нафтохинон-4-сульфоукислоты, добавляют 1,00 мл 0,01 М раствора NaOH, перемешивают. Полученную реакционную смесь нагревают 5 мин на водяной бане при температуре 95 °С, охлаждают и доводят очищенной водой до метки. Оптическую плотность измеряют на фоне компенсационного раствора, не содержащего исследуемого вещества, при 470 нм. Параллельно проводят определение с 1,00 мл стандартного раствора таурина. Стандартный раствор

таурина (0,0725 %) готовят путем растворения точной навески в очищенной воде. Раствор реагента (1 %) готовят путем растворения навески в очищенной воде.

**Определение таурина в лекарственных формах.** При количественном определении таурина в глазных каплях 0,90 мл лекарственной формы помещают в мерную колбу объемом 50,00 мл, доводят водой очищенной до метки. Аликвотные части полученного раствора (0,70 – 1,30 мл) переносят в мерные колбы объемом 25,00 мл и анализируют согласно общей методике количественного определения таурина. При анализе исследуемого вещества в таблетках точную навеску измельченной таблеточной массы (0,0143 – 0,0318 г)

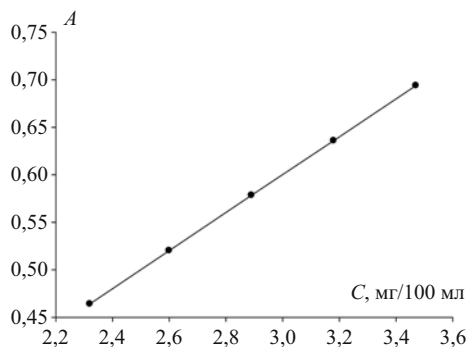


Рис. 4. График зависимости оптической плотности от концентрации таурина.

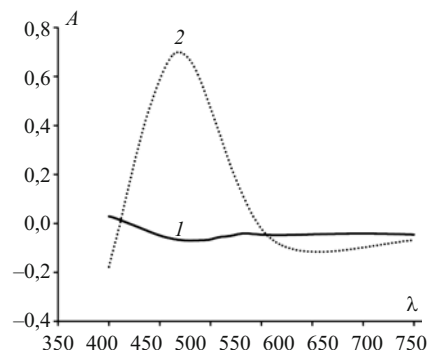


Рис. 5. Спектры поглощения раствора «плацебо» (1) и стандартного раствора таурина (2).

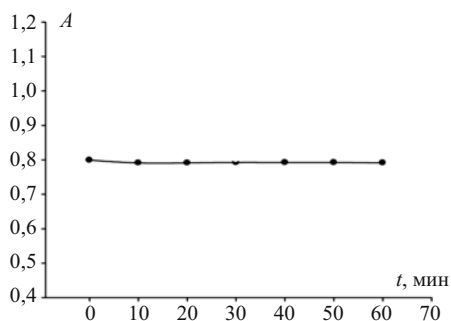


Рис. 6. Зависимость оптической плотности продукта реакции таурина с натриевой солью 1,2-нафтохинон-4-сульфоукислоты от времени.

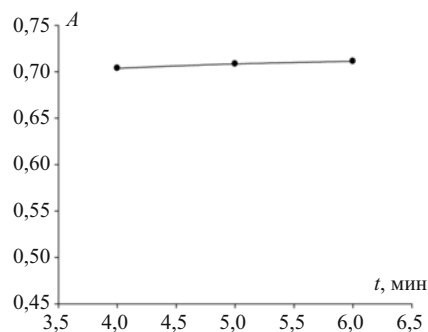


Рис. 7. Зависимость оптической плотности от времени нагревания ( $\pm 20\%$  от оптимального).

помещают в мерную колбу объемом 25,00 мл и доводят водой очищенной до метки. Полученный раствор фильтруют, отбрасывая первые порции фильтрата, а из последующих отбирают 1,00 мл и анализируют по общей методике количественного определения таурина. Расчет содержания действующего вещества в 1 таблетке или в глазных каплях проводят методом стандарта по общепринятым формулам [12].

### Результаты и их обсуждение

На результаты проведения аналитических реакций влияют различные факторы, поэтому объективный выбор оптимальных условий количественного спектрального анализа можно осуществить только после проведения предварительных исследований. При выборе растворителя учитывались, прежде всего, растворимость определяемого вещества, реагента и максимальные значения оптической плотности полученных растворов. Экспериментально установлено, что реагент взаимодействует с таурином в водной среде с образованием окрашенного соединения с максимумом абсорбции при 470 нм. Влияние количества прибавленного реагента на значение оптической плотности приведено на рис. 1. Кроме того, установлено, что создание щелочной среды с последующим нагреванием реакционной смеси значительно увеличивает значение оптической плотности. Оптимальное количество 0,01 М раствора NaOH (рис. 1), время (рис. 2) и темпе-

ратура нагревания (рис. 2) были установлены экспериментально, согласно максимальным значениям оптической плотности.

Таким образом, интенсивность окрашивания продуктов реакции натриевой соли 1,2-нафтохинон-4-сульфоукислоты с таурином зависит от объема реагента, 0,01 М раствора NaOH, температуры и времени нагревания.

В оптимальных условиях подчиняемость закону Бера находится в пределах концентраций 1,80–4,00 мг/100 мл. Определяемый минимум, рассчитанный общепринятым методом [12], составляет 1,74 мкг.

Экспериментально установленные оптимальные условия протекания реакции таурина с натриевой солью 1,2-нафтохинон-4-сульфоукислоты положены в основу разработки спектрофотометрических методик количественного определения таурина в лекарственных формах.

**Установление стехиометрических соотношений компонентов реакционной смеси «таурин — натриевая соль 1,2-нафтохинон-4-сульфоукислоты».** Для определения соотношения стехиометрических коэффициентов между таурином и реагентом использовали метод молярных отношений (метод насыщения), метод непрерывных изменений (метод изолярных серий) [12].

Стехиометрические коэффициенты реагирующих компонентов «таурин — натриевая соль 1,2-нафтохи-

Определение сходимости результатов количественного определения таурина в лекарственных формах

Лекарственная форма	$\bar{X} (n = 9)$	$S$	RSD%	$\Delta_x$	$\Delta_{As}\%$
“Тауфон” 4 %, Фармак	0,0399	$2,88 \cdot 10^{-4}$	0,722	1,34	3,20
“Тауфон” 4 %, ОЗ “ГНЦЛС”	0,0405	$6,57 \cdot 10^{-4}$	1,62	3,01	3,20
“Кратал”, 0,867 г / 1,105 г	0,867	$4,72 \cdot 10^{-3}$	0,544	1,01	1,60

Таблица 2

Определение правильности результатов количественного определения таурина в лекарственных формах

Лекарственная форма	$Z (n = 9)$	RSD%	$\Delta\bar{Z}$	$\bar{Z} - 100$
“Тауфон” 4 %, Фармак	99,78	0,491	0,305	0,223
“Тауфон” 4 %, ОЗ “ГНЦЛС”	100,1	0,288	0,178	0,160
“Кратал”, 0,867 г / 1,105 г	100,0	0,688	0,427	0,0500

нон-4-сульфокислоты”, полученные вышеупомянутыми методами, однозначно согласуются между собой и составляют 1:1 (рис. 3).

**Определение некоторых валидационных характеристик.** Государственная фармакопея Украины (ГФУ) устанавливает необходимость проведения процедуры валидации для методик, включаемых в аналитическую нормативную документацию. Такие основные валидационные характеристики, как линейность, прецизионность, правильность и робастность для разработанной методики были установлены согласно стандартизованной процедуре валидации методом стандарта [13].

**Линейность.** Полученная зависимость (рис. 4) описывается уравнением линейной регрессии  $y = 0,1999x + 0,0003$ , коэффициент корреляции  $r$  и остаточное стандартное отклонение  $S_p$ , рассчитанные методом наименьших квадратов, составляют 1,0000 и 0,0519 соответственно.

**Специфичность.** Практически в каждой лекарственной форме присутствуют действующие и вспомогательные вещества, которые могут оказывать влияние на протекание реакции и приводить к систематическим ошибкам. Для определения специфичности применяемой реакции относительно остальных действующих и вспомогательных веществ, входящих в состав лекарственных форм, измеряли оптическую плотность растворов “плацебо” и стандартного раствора таурина (рис. 5). Результаты свидетельствуют о практическом отсутствии влияния действующих (экстракты боярышника и пустырника) и вспомогательных веществ на величину оптической плотности таурина.

**Прецизионность.** Прецизионность была определена на уровне сходимости. Для этого для каждой из лекарственных форм проведено по 9 определений, охватывающих диапазон применения методики (3 концентрации / 3 определения для каждой). Согласно ГФУ, методика является точной на уровне сходимости, если относительный доверительный интервал ( $\Delta_x$ ) не превышает максимально допустимую относительную не-

Таблица 3

Зависимость оптической плотности продукта реакции от изменения количеств добавленных реагентов ( $\pm 10 - 20$  % от оптимального)

Реагент	Количество реагента		$A$
	объем, мл	% от оптимального	
Натриевая соль 1,2-нафтохинон-4-сульфокислоты	0,40	80	0,7113
	0,50	100	0,7131
	0,60	120	0,7133
0,01 М NaOH	0,90	90	0,7122
	1,00	100	0,7124
	1,10	110	0,7124

определенность результатов количественного определения ( $\Delta_{As}\%$ ). Исходя из данных, приведенных в табл. 1, методика является точной.

**Правильность.** Правильность устанавливали для 3 лекарственных форм методом добавок (табл. 2). Результаты определений являются правильными, если отсутствует значащая систематическая ошибка, то есть истинное значение определяемой величины попадает в установленный доверительный интервал ( $\Delta Z$ ).

**Робастность.** Оценку робастности проводили на стадии разработки методики. Установлено, что исследуемые окрашенные растворы устойчивы не менее чем 60 мин (рис. 6), колебания количеств добавленных реагентов (табл. 3) в пределах  $\pm 10 - 20$  % и изменение времени нагревания (рис. 7) не влияют на значение оптической плотности, что позволяет получать надежные результаты анализа даже при небольших изменениях параметров методики.

Таким образом, разработанная методика количественного определения таурина, согласно основным валидационным характеристикам (линейность, прецизионность, правильность и робастность), является валидной, отличается простотой выполнения, доступностью и может быть рекомендована для контроля качества его лекарственных форм.

## ЛИТЕРАТУРА

1. S. Roysommuti, A. Suwanich, D. Jirakulsomchok, et al., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **13** (2009).
2. Y. J. Xu, A. S. Arneja, P. S. Tappia, et al., *Exp. Clin. Cardiol.*, **13**(2), 57 – 65 (2008).
3. *United States Pharmacopeia 26*, USP Convention Inc., Rockville (2003).
4. *Japanese Pharmacopoeia 15*, The National Institute of Health Sciences (2007).
5. Zilin Chen, Gang Xu, Karl Specht, et al., *Anal. Chim. Acta*, **296**(3), 249 – 253 (1994).
6. Emilia Marchei, Manuela Pellegrini, Roberta Pacifici, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **37**(3), 499 – 507 (2005).
7. Св. М. Коваленко, С. А. Шкляєв, С. М. Коваленко, *Управління економіки та забезпечення якості в фармацевції*, **4**(24), 19 – 24 (2012).
8. А. С. Коржова, *Автореф. дис. канд. фарм. наук*, Запоріжжє (2005).
9. Патент России 2167410; ru-patent.info (2001).
10. Aono Motomu, Soga Hideki, *Sci. Rep. Fac. Agriculture*, Meijo University, **37**, 109 – 117 (2001).
11. J. Charles, Jr. Parker, *Anal. Biochem.*, **108**(2), 303 – 305 (1980).
12. М. И. Булагов, И. П. Калинин, *Практическое руководство по фотометрическим методам анализа*, Химия, Ленинград, (1986), сс. 51 – 103, 239 – 289, 301 – 328.
13. *Державна Фармакопея України*, РІРЕГ, Харків (2001), сс. 56 – 67, 187, 233, 296.

Поступила 24.12.13

## SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF TAURINE IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS WITH THE AID OF 1,2-NAPHTHOQUINONE-4-SULFONIC ACID SODIUM SALT

K. P. Portna\* and S. O. Vasyuk

Zaporizhzhye State Medical University, 69035 Zaporizhzhye, Ukraine

\* e-mail: Kate-portnaya@ukr.net

A new spectrophotometric method for the quantitative determination of taurine in pharmaceutical formulations has been developed. This method is based on the measurement of aqueous taurine solution absorption at 470 nm. The proposed method obeys the validation requirements of Ukrainian Pharmacopeia. According to the experimental data, the technique can be correctly reproduced and is suitable for use in laboratories of the State Inspection for Quality Control of Medicines and QCDs of chemico-pharmaceutical enterprises.

**Keywords:** taurine; quantitative determination; drug quality control