



А. О. Донченко, С. О. Васюк, К. П. Портна

Використання 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону для спектрофотометричного визначення ацетилцистеїну в лікарських препаратах

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова:

спектрофотометрія, ацетилцистеїн, 2,3-дихлор-1,4-нафтохінон, кількісне визначення, валідація.

Актуальною проблемою сучасного фармацевтичного аналізу є створення ефективних та економічних методик кількісного визначення лікарських речовин. Мета роботи полягала в розробці та валідації нової спектрофотометричної методики кількісного визначення ацетилцистеїну в лікарських формах. Встановили, що ацетилцистеїн реагує із 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном з утворенням забарвленого продукту реакції з максимумом абсорбції при 425 нм. Запропонована методика відповідає вимогам Державної Фармакопеї України щодо методик кількісного аналізу лікарських речовин. Результати дослідження свідчать, що методика є високочувствительною, точною, простою у виконанні та придатною для використання в лабораторіях Державної інспекції з контролю якості лікарських речовин, а також відділах технічного контролю хіміко-фармацевтичних підприємств.

Применение 2,3-дихлор-1,4-нафтохинона для спектрофотометрического определения ацетилцистеина в лекарственных препаратах

А. А. Донченко, С. А. Васюк, Е. П. Портная

Актуальной проблемой современного фармацевтического анализа является создание эффективных и экономичных методик количественного определения лекарственных веществ. Цель работы – разработка и валидация новой спектрофотометрической методики количественного определения ацетилцистеина в лекарственных формах. Установлено, что ацетилцистеин реагирует с 2,3-дихлор-1,4-нафтохиноном с образованием окрашенного продукта реакции с максимумом абсорбции при 425 нм. Предложенная методика отвечает требованиям Государственной Фармакопеи Украины, предъявляемым к методикам количественного анализа лекарственных веществ. Результаты исследования показывают, что методика является высокочувствительной, точной, простой в выполнении и пригодной для использования в лабораториях Государственной инспекции по контролю качества лекарственных веществ, а также отделах технического контроля химико-фармацевтических предприятий.

Ключевые слова: *спектрофотометрия, ацетилцистеин, 2,3-дихлор-1,4-нафтохинон, количественное определение, валидация.*

Актуальные вопросы фармацевтической и медицинской науки и практики. – 2015. – № 1 (17). – С. 36–39

Spectrophotometric determination of acetylcysteine in pharmaceutical formulations using 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone

A. O. Donchenko, S. O. Vasyuk, K. P. Portna

Creation of effective and economical methods for quantitative determination of drugs is an actual problem of modern pharmaceutical analysis.

The aim of research was the development and validation of spectrophotometric method for acetylcysteine assay in pharmaceutical formulations.

Methods and results. The colored products were quantified spectrophotometrically at 425 nm with 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone. The proposed method is valid according to the validation requirements of Ukrainian Pharmacopeia. The results of the study showed that the proposed method is sensitive, simple, accurate and it is suitable for using in laboratories of the State Inspection for Quality Control of Medicines and QCD of the chemical-pharmaceutical enterprises.

Key words: *Spectrophotometry, Acetylcysteine, 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone, Analysis, Validation Studies.*

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2015; № 1 (17): 36–39

Ацетилцистеїн (N-Ацетил-L-цистеїн) є ацетилованим варіантом амінокислоти L-цистеїну. Використовується у клінічній практиці понад 30 років передусім як муколітичний засіб.

Муколітичний ефект препарату має хімічну природу. Унаслідок вільної сульфгідрильної групи ацетилцистеїн розриває дисульфідні зв'язки кислих мукополісахаридів, що призводить до деполімеризації мукопротеїдів і до зменшення в'язкості слизу, та сприяє відхаркуванню й відходженню бронхіального секрету [1].

Крім муколітичної дії, доведена висока антиоксидантна активність ацетилцистеїну, що пов'язана з активацією системи внутрішньоклітинного глутатіону, а це значно

розширює спектр його використання. Препарати ацетилцистеїну призначають для профілактики ускладнень хіміотерапії та променевої терапії злоякісних захворювань, лікування ВІЛ-інфекцій, серцевих захворювань [2].

Для визначення ацетилцистеїну в фармацевтичних препаратах використовують електрохімічні [3], флуориметричні [4], хемілюмінесцентні [5] та високоефективні рідинні хроматографічні (ВЕРХ) методи [6,7].

Британська та Європейська фармакопеї рекомендують зміст основної речовини в субстанції ацетилцистеїну визначати методом йодиметрії, у розчині для ін'єкцій – методом ВЕРХ [8,9]. Фармакопея США описує метод ВЕРХ з УФ-детектором [10]. Деякі з цих методів є до-

волі складними у виконанні або потребують дорогого устаткування. Інші відомі методи характеризуються недостатньою селективністю та чутливістю. Тому актуальним залишається створення нових високочутливих методик кількісного визначення ацетилцистеїну. Саме спектрофотометричний метод аналізу є найширше використовуваним, економічним і доступним методом фармацевтичного аналізу для більшості лабораторій контролю якості.

Мета роботи

Розробка та валідація методики кількісного визначення ацетилцистеїну в лікарських формах на основі реакції з 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном.

Матеріали і методи дослідження

Протягом експерименту використали субстанцію ацетилцистеїну; лікарські препарати – порошок для орального розчину «АЦЦ 200» 200 мг (Салютас Фарма ГмбХ, ФРН) серії 50026151, таблетки шипучі «Флуімуцил» 600 мг (Замбон С. П. А., Італія) та «АЦЦ ЛОНГ» 600 мг (Салютас Фарма ГмбХ, ФРН) серії 321284 та ДН2740 відповідно, розчин для ін'єкцій «Флуімуцил» 100 мг/мл (Замбон С. П. А., Італія) серії 28002492.

Як реактив і розчинник використовували 2,3-дихлор-1,4-нафтохінон та ДМФА кваліфікації «х.ч.а.».

Аналітичне обладнання: спектрофотометр Specord 200, ваги електронні АВТ-120-5DM, водяна баня Memmert WNB 7-45, мірний посуд класу А, кварцові кювети із шаром завтовшки 1 см.

Загальна методика кількісного визначення ацетилцистеїну. 1,00 мл 0,16% стандартного розчину ацетилцистеїну обробляли 0,50 мл 4% розчину 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону, перемішували. Реакційну суміш нагрівали 10 хв на водяній бані за температури 95°C. Після охолодження розчин кількісно переносили в мірну колбу ємністю 25,00 мл і доводили розчином ДМФА до позначки. Оптичну густина вимірювали на фоні компенсаційного розчину, що не містить досліджуваної речовини, при 425 нм.

Визначення ацетилцистеїну в лікарських формах

Методика кількісного визначення ацетилцистеїну в порошку для орального розчину. Весь вміст пакетика (0,2 г/3,0 г) переносили в мірну колбу на 100,0 мл, доводили розчином ДМФА до позначки, перемішували. Надалі 0,80 мл розчину переносили в мірну колбу на 25,00 мл.

Методика кількісного визначення ацетилцистеїну в шипучих таблетках. Шипучу таблетку, що містить 0,60 г ацетилцистеїну, вміщували в мірну колбу на 500,0 мл, доводили розчином ДМФА до позначки, отриманий розчин фільтрували. 1,40 мл розчину вміщували у мірну колбу на 25,00 мл.

Методика кількісного визначення ацетилцистеїну в розчині для ін'єкцій. 1,00 мл ін'єкційного розчину вміщували в мірну колбу ємністю 100,0 мл та доводили розчином ДМФА до позначки. 1,60 мл розчину переносили в мірну колбу на 25,00 мл.

Надалі розчини обробляли 0,50 мл 4% розчину 2,3-дихлор-1,4-нафтохінону, нагрівали 10 хв на водяній бані за температури 95°C, охолоджували та доводили розчином ДМФА до позначки. Оптичну густина вимірювали на фоні компенсаційного розчину. Розрахунок здійснили за типовою формулою.

Результати та їх обговорення

Для досягнення високої відтворюваності та правильності результатів спектрофотометричного аналізу велике значення має оптимальний вибір умов проведення аналітичних реакцій: концентрації речовин, що реагували, температури, часу нагрівання, розчинника.

Експериментально встановлено, що реагент взаємодіє з ацетилцистеїном у середовищі ДМФА з утворенням забарвленої сполуки з максимумом абсорбції 425 нм. На рис. 1 наведена залежність оптичної густини розчинів, котрі дослідили, від кількості доданого реагенту.

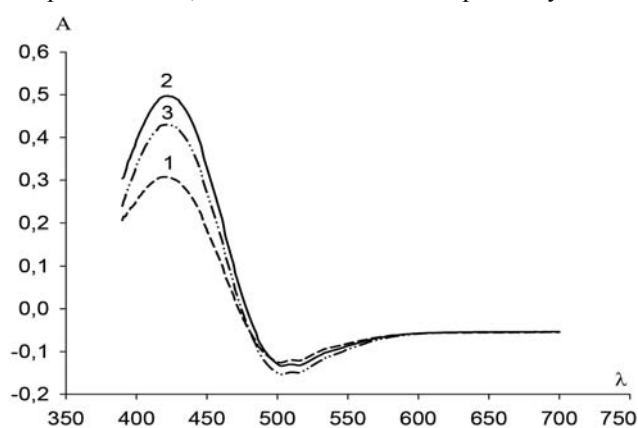


Рис. 1. Залежність оптичної густини від кількості реагенту (1 – 0,50 мл; 2 – 1,00 мл; 3 – 1,50 мл).

Також дослідження вказали на необхідність нагрівання реакційної суміші протягом 10 хв за температури 95°C (рис. 2).

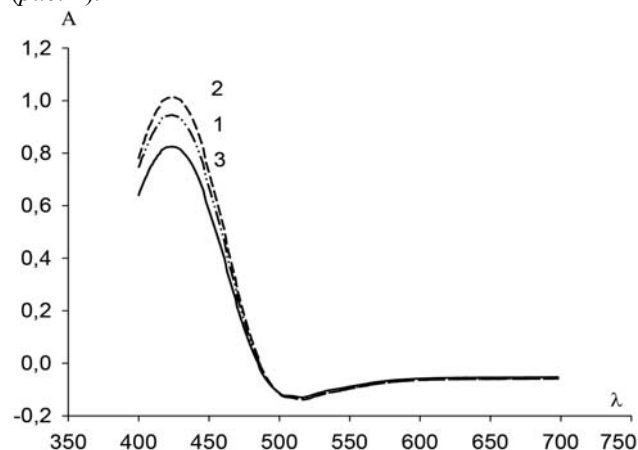


Рис. 2. Залежність оптичної густини від часу нагрівання (1 – 5 хв; 2 – 10 хв; 3 – 15 хв).

Межа виявлення за оптимальних умов становить 0,88 мкг/мл, що свідчить про високу чутливість реакції.

Визначення валідаційних характеристик

Усі аналітичні методики і випробування, що включені в нормативні документи, мають бути валідованими.

Валідацію методики виконали відповідно до вимог Державної Фармакопеї України (ДФУ), згідно зі стандартизованою процедурою валідації методом стандарту [11]. Встановили основні валідаційні характеристики: лінійність, прецизійність, правильність, робасність і діапазон застосування.

Лінійність визначали у межах концентрацій, в яких спостерігається підпорядкування закону Бера – 4,48–8,40 мг/100мл. За результатами побудували графік залежності оптичної густини від концентрації ацетилцистеїну (рис. 3).

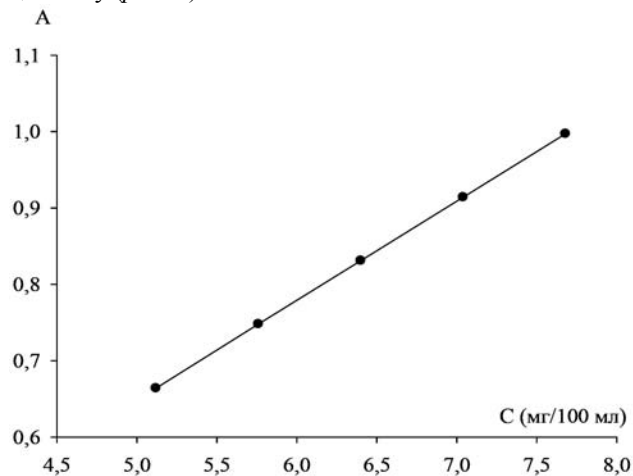


Рис. 3. Графік залежності оптичної густини від концентрації ацетилцистеїну.

Параметри лінійної залежності розраховували за допомогою регресійного аналізу методом найменших квадратів (табл. 1).

Розраховані числові показники свідчать, що параметри лінійної залежності відповідають усім вимогам ДФУ. Діапазон застосування методики становить 70–130%.

Прецизійність визначена на рівні збіжності. Проаналізували 9 проб, концентрації яких рівномірно розподілені в досліджуваному діапазоні методики (плюс розчин порівняння, концентрація якого близька до номінальної). Згідно з вимогами ДФУ до прецизійності, методика є точною на рівні збіжності, якщо однобічний довірчий інтервал (Δx) не перевищує максимальну припустиму невизначеність аналізу ($\Delta A_s\%$). Дані, що наведені в таблиці 2, свідчать про точність розробленої методики.

Для встановлення правильності методики використовували метод добавок: до трьох рівних проб лікарської форми додавали різні кількості стандартного розчину ацетилцистеїну та тричі аналізували. Результати визначень є правильними, оскільки відсутня значуща систематична похибка, тобто справжнє значення величини потрапляє у встановлений довірчий інтервал (табл. 3).

Робасність оцінили на стадії розробки методики. Для цього дослідили стабільність аналітичних розчинів у часі. Випробовуваний розчин і розчин порівняння є стійкими протягом щонайменше 30 хв.

Таблиця 1

Числові показники лінійної залежності

Величина	Значення	Критерії	Висновок
$b \pm (s_b)$	0,1300±(0,0002)	–	–
$a \pm (s_a)$	0,0003±(0,0005)	$ a \leq \Delta a = t(95\%;3) \cdot s_a = 0,00117$	відповідає
$s_{x,0}(\%)$	0,480	$\leq \Delta_{As}(\%) / t(95\%;3) = 1,360$	відповідає
r	1,0000	$\geq 0,9560$	відповідає

Таблиця 2

Визначення збіжності результатів кількісного визначення ацетилцистеїну в лікарських формах (n=9, p=0,95)

Лікарська форма	Вміст	Метрологічні характеристики				
		\bar{X}	S	RSD	$\Delta_{x,r}$	$\Delta_{As}\%$
«АЦЦ 200», порошок для орального розчину	0,2 г	0,196	$2,52 \cdot 10^{-3}$	1,28	2,39	3,20
«АЦЦ ЛОНГ», таблетки шипучі	0,6 г	0,597	$8,82 \cdot 10^{-3}$	1,47	2,74	3,20
«Флуімуцил», таблетки шипучі	0,6 г	0,595	$3,37 \cdot 10^{-3}$	0,566	1,05	3,20
«Флуімуцил», розчин для ін'єкцій	100 мг/мл	0,103	$4,41 \cdot 10^{-4}$	1,28	2,38	3,20

Таблиця 3

Результати визначення правильності методом добавок

Лікарський препарат	ΔZ	RSD	$\bar{\Delta Z}$	$ \bar{Z} - 100 $
«АЦЦ 200», порошок для орального розчину	99,31	1,50	0,935	0,690
«АЦЦ ЛОНГ», таблетки шипучі	99,23	1,27	0,791	0,770
«Флуімуцил», таблетки шипучі	101,09	1,76	1,09	1,09
«Флуімуцил», розчин для ін'єкцій	100,37	1,48	0,917	0,370

Висновки

Експериментально встановили оптимальні умови перебігу реакції ацетилцистеїну із 2,3-дихлор-1,4-нафтохіноном: нагрівання реакційної суміші протягом 10 хв за температури 95°C у середовищі ДМФА.

Розроблена та валідована методика кількісного спектрофотометричного визначення ацетилцистеїну в лікарських формах – порошку для орального розчину, шипучих таблетках, розчинів для ін'єкцій.

Довели, що опрацьована методика відповідає вимогам ДФУ за основними валідаційними характеристиками: лінійністю, діапазоном застосування, прецизійністю, правильністю та робастністю.

Запропонована методика є високочутливою, економічною, експресною, не потребує складного апаратурного оснащення та є придатною для використання в лабораторіях Державної інспекції з контролю якості лікарських речовин, а також відділах технічного контролю хіміко-фармацевтичних підприємств.

Список літератури

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. – 16-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: Новая Волна, 2012. – 1216 с.
2. Симонова О.И. Применение ацетилцистеина для лечения респираторных заболеваний у детей младшего возраста / О.И. Симонова, О.И. Горинова // Фарматека. – 2014. – №1. – С. 87–90.
3. Kukoc-Modun L. Spectrophotometric determination of N-Acetyl-L-Cysteine and N-(2-Mercaptopropionyl)-Glycine in pharmaceutical preparations / L. Kukoc-Modun, N. Radić // International Journal of Analytical Chemistry. – 2011. – №2011. – P. 1–6.
4. Fluorimetric determination of some sulfurcontaining compounds through complex formation with terbium (Tb⁺³) and uranium (U⁺³) / E.A. Taha, N.Y. Hassan, F.A. Aal, L.E.S.A. Fattah // Journal of Fluorescence. – 2007. – Vol. 17. – №3. – P. 293–300.
5. Li H. Sensitive chemiluminescence determination of three thiol compounds based on Cu(II)-catalyzing luminol reaction in the absence of an oxidant / H. Li, J. Du // Analytical Letters. – 2009. – Vol. 42. – №13. – P. 2131–2140.
6. Jyothi N. Development and validation of a new RP-HPLC method for simultaneous estimation of N-Acetylcysteine and L-Arginine in combined dosage form / N. Jyothi, S. Pasha // Oriental Journal of Chemistry. – 2014. – Vol. 30. – №3. – P. 1371–1378.
7. Development and validation of RP-HPLC method for the estimation of N-Acetylcysteine in wet cough syrup / S. Sana, A. Rajani, A. Sumedha et al. // International Journal of Drug Development & Research. – 2012. – Vol. 4. – №2. – P. 284–293.
8. British Pharmacopeia. – Vol. 1–4. – London: The Stationary Office, 2009. – 10952.
9. United States Pharmacopeia 36. – USP Convention Inc. – Rockville, 2013. – 5640.
10. European Pharmacopoeia. – 6th-ed. Council of Europe. – Strasbourg, 2007. – 3857.
11. Державна Фармакопея України. – 1-е вид. – Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – Доповнення 2. – 2008. – 620 с.

References

1. Mashkovskij, M. D. (2012). *Lekarstvennye sredstva [Drugs]*. Moscow: Novaya Volna. [in Russian].
2. Simonova, O. I., & Gorinova, O. I. (2014). *Primenenie acetylcysteina dlya lecheniya respiratornykh zabolovaniy u detej mladshhego vozrasta [The use of acetylcysteine for the treatment of respiratory diseases in young children]*. *Farmateka*, 1(274), 87–90.
3. Kukoc-Modun, L., & Radić, N. (2011). Spectrophotometric determination of N-Acetyl-L-Cysteine and N-(2-Mercaptopropionyl)-Glycine in pharmaceutical preparations. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2011, 1–6. doi: 10.1155/2011/140756.
4. Taha, E., Hassan, N., Aal, F., & Fattah, L. (2007). Fluorimetric determination of some sulfur containing compounds through complex formation with Terbium (Tb⁺³) and Uranium (U⁺³). *Journal of Fluorescence*, 17(3), 293–300. doi: 10.1007/s10895-007-0172-6.
5. Li, H., & Du, J. (2009). Sensitive chemiluminescence determination of three thiol compounds based on Cu(II)-catalyzing luminol reaction in the absence of an oxidant. *Analytical Letters*, 42(13), 2131–2140. doi: 10.1080/00032710903082754.
6. Jyothi, N., & Pasha, S. (2014). Development and validation of a new RP-HPLC method for simultaneous estimation of N-Acetylcysteine and L-Arginine in combined dosage form. *Oriental Journal of Chemistry*, 30(3), 1371–1378.
7. Sana, S., Rajani, A., Sumedha, N., Pravin, P., & Shripad, N. (2012). Development and validation of RP-HPLC method for the estimation of N-Acetylcysteine in wet cough syrup. *International Journal of Drug Development & Research*, 4(2), 284–293.
8. (2009). British Pharmacopeia. London: The Stationary Office, 109–113.
9. (2013). United States Pharmacopeia. Rockville: USP Convention Inc., 2334.
10. (2007). European Pharmacopoeia. Strasbourg: Council of Europe, 1100.
11. (2008). *Derzhavna farmakopeia Ukrainy. Dopovnennia 2. [Ukrainian Pharmacopoeia. Addition 2]*. Kharkiv: Naukovo-ekspertnyi farmakopeyniy tsentr. [in Ukrainian].

Відомості про авторів:

Донченко А.О., ст. лаборант каф. аналітичної хімії, Запорізький державний медичний університет, E-mail: anastasia2013@inbox.ru.
Васюк С.О., д. фарм. н., професор, зав. каф. аналітичної хімії, Запорізький державний медичний університет.
Портна К.П., очний аспірант каф. аналітичної хімії, Запорізький державний медичний університет.

Сведения об авторах:

Донченко А.А., ст. лаборант каф. аналитической химии, Запорожский государственный медицинский университет, E-mail: anastasia2013@inbox.ru.
Васюк С.А., д. фарм. н., профессор, зав. каф. аналитической химии, Запорожский государственный медицинский университет.
Портная Е.П., очный аспирант каф. аналитической химии, Запорожский государственный медицинский университет.

Information about the authors:

Donchenko A.O., Laboratory Assistant of the Department of Analytical Chemistry, Zaporizhzhia State Medical University, E-mail: anastasia2013@inbox.ru.
Vasyuk S.O., D.hab., Professor, Head of the Department of Analytical Chemistry, Zaporizhzhia State Medical University.
Portna K.P., Postgraduate of the Department of Analytical Chemistry, Zaporizhzhia State Medical University.

Надійшла в редакцію 20.01.2015 р.