

# OZNACZANIE SUBSTANCJI CZYNNEJ W PREPARACIE LECZNICZYM TECHNIKĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ Z DETEKcją FLUORESCENCYJNĄ

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych opracowana w Katedrze Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego

## CZĘŚĆ LITERATUROWA

### I. Wprowadzenie

W ostatnich latach obserwuje się rosnące zainteresowanie analizą leków, wynikające z jej roli w kontroli jakości farmaceutyków oraz w wykonywaniu i identyfikacji szeroko pojętych środków biologicznie czynnych takich jak środki psychotropowe, anaboliki, czy środki dopingujące. Analiza preparatów leczniczych z uwagi na różnorodność ich postaci farmaceutycznych i niejednokrotnie złożoną budowę chemiczną jest często dużym wyzwaniem dla chemika, wymagającym od niego wszechstronnego przygotowania teoretycznego i eksperymentalnego dotyczącego przeprowadzenia analizy substancji czynnej w próbce. Wykorzystanie znajomości istotnych elementów struktury chemicznej badanych związków oraz ich właściwości fizykochemicznych jest bardzo istotne podczas projektowania procedury kontroli jakości.

Procedury kontroli jakości leków obejmują:

- ustalenie tożsamości i czystości substancji leczniczej na drodze analizy chemicznej, chromatograficznej i spektralnej;
- analizę jakościową i ilościową zawartości substancji leczniczej;
- projektowanie toku oraz przeprowadzenie analizy jakościowej polegającej na rozróżnianiu kilku związków biologicznie aktywnych, które należą do jednej grupy strukturalnej (np. barbituranów, steroidów, peptydów, tetracyklin).

Czystość substancji stosowanych w produkcji farmaceutycznej jest problemem niezwykle istotnym. Zanieczyszczające je substancje mogą pochodzić z różnych źródeł, m.in. od substratów użytych do syntezy, z rozpuszczalników, lub mogą być wynikiem reakcji ubocznych towarzyszących syntezie. Zmiany w składzie preparatu farmaceutycznego mogą wynikać również z niewłaściwego przechowywania lub działania na niego czynników zewnętrznych przyspieszających rozkład, takich jak wilgoć lub światło słoneczne. Podczas

badania czystości substancji leczniczej należy zwrócić uwagę na typ zanieczyszczenia. Do kontroli tego etapu produkcji leku wymagane jest użycie wielu metod identyfikacyjnych, gdyż zanieczyszczenia mogą być pochodzenia organicznego i nieorganicznego. Badanie zawartości substancji czynnej jest działaniem rutynowym w procesie produkcji preparatu farmaceutycznego, ale techniki używane do tej analizy są różnorodne. Wybór techniki analitycznej zależy nie tylko od składu leku, ale również od ilości próbki jaką dysponujemy i jej trwałości. Metody charakteryzujące się jak najkrótszym czasem przygotowania próbki oraz krótkim czasem analizy są szczególnie cenione w analizie leków. Ważnym kryterium wyboru metody analitycznej jest koszt aparatury i odczynników oraz rodzaj informacji oczekiwanej po analizie (dokładność, precyzja, czułość, selektywność). Zawartość badanej substancji oraz odchylenia od wartości teoretycznej są ściśle określone normami. Szczególnie ważny jest dobór takich metod analitycznych, które gwarantują oznaczanie substancji aktywnej oraz ewentualnych jej zanieczyszczeń na poziomie mikrogramów i niższych.

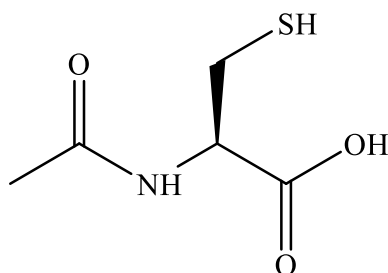
W Polsce za weryfikację bezpieczeństwa i jakości produktów leczniczych, wyrobów medycznych i produktów biobójczych statutowo odpowiedzialny jest Narodowy Instytut Leków, w którym decyzją Ministra Zdrowia wydaną w grudniu 2005 roku powołano Narodowe Laboratorium Kontroli Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (NLKPLW MiPB). Kontrola wybranych produktów, jest też zgodnie z kompetencjami wykonywana przez Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego- Państwowy Zakład Higieny, Instytut Hematologii, Państwowy Instytut Weterynarii oraz Instytut Żywności i Żywienia. Konieczność ciągłego kontrolowania wyrobów medycznych niezależnie od kraju pochodzenia czy stosowanego w nim systemu zapewniają procedury good manufacturing practice-dobra praktyka produkcyjna (GMP) oraz kontroli jakości sprecyzowane przez Międzynarodową Organizację Normalizacyjną (ISO).

Negatywne wyniki analiz produktów leczniczych badanych w Instytutach są między innymi związane z niewłaściwie wykonaną postacią leku, zanieczyszczeniem surowców lub finalnego wyrobu, oraz kontaminacją mikrobiologiczną. Do głównych przyczyn będących powodem usunięcia leku z rynku należą zarówno te niegroźne dla pacjenta takie jak kruszenie się tabletek, przebarwienia jak i te bardzo groźne, dotyczące kontaminacji chemicznej i mikrobiologicznej.

## **II. N-acetylocysteina**

N-acetylocysteina (NAC), pochodna aminokwasu cysteiny, należy do grupy leków tiolowych. Leki te stosuje się w przypadku nadmiernej produkcji lepkiego śluzu w drogach

oddechowych. NAC dzięki obecności wolnych grup zawierających atomy siarki ma zdolność rozbijania glikoprotein śluzu na mniejsze cząsteczki oraz upłynniania go i zmniejszania jego lepkości. Dzięki temu ułatwia odkrztuszanie wydzieliny zalegającej w drogach oddechowych oraz poprawia czynność nabłonka oddechowego. Stosuje się ją w ostrym i przewlekłym zapaleniu oskrzeli i oskrzelików, mukowiscydozie, rozedmie płuc oraz innych chorobach dróg oddechowych charakteryzujących się dużą ilością gęstej wydzieliny śluzowej. NAC wykazuje także działanie przeciwutleniające, dzięki któremu neutralizuje wolne rodniki w zmienionych zapalnie lub niedotlenionych komórkach.. Jest też stosowana jako odtrutka w przypadku zatrucia paracetamolem, gdyż inaktywuje toksyczne metabolity paracetamolu i chroni wątrobę przed uszkodzeniem. Od niedawna NAC znalazła również zastosowanie w terapii zaburzeń psychicznych m.in. schizofrenii oraz terapii zakażeń wirusem HIV. Związek ten jako główny składnik leków występuje w komercyjnie dostępnych preparatach farmaceutycznych takich jak: ACC, Nacecis, Tussicom. Po podaniu doustnym NAC dobrze wchłania się z przewodu pokarmowego, osiągając maksymalne stężenie w drogach oddechowych po 0,5-3h. Wykazuje szczególne powinowactwo do tkanki płucnej i wydzieliny oskrzelowej. Metabolizowana jest głównie w wątrobie i wydalana z moczem.



**Rysunek 1.** Wzór strukturalny n-acetylocysteiny.

## **CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA**

**Celem ćwiczenia** jest oznaczenie NAC w tabletkie za pomocą techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fluorymetryczną i porównanie jej zawartości z wartością deklarowaną przez producenta w preparacie farmaceutycznym ACC.

### **I. 1. Aparatura**

- chromatograf cieczowy Hewlett-Packard 1100 z detektorem spektrofluorymetrycznym,
- kolumna chromatograficzna Phenomenex, Polymer X (150x4,6mm, 5  $\mu$ m),
- waga analityczna,
- zestaw pipet automatycznych wielomiarowych o pojemności w zakresie 10 - 100  $\mu$ l, 100 -1000  $\mu$ l oraz 1 - 5 ml.

### **I. 2. Odczynniki**

- acetonitryl (ACN),
- 0,0025M wodorotlenek sodu (NaOH),
- 0,0025M aldehyd o-ftalowy (OPA),
- 0,1M roztwór standardowy N- acetylocysteiny (NAC) przygotowany w wodzie,
- 0,5M bufor Tris-HCl pH=9,
- 1M butyloamina (B-NH<sub>2</sub>) przygotowana w wodzie,
- 0,25M tris(2-karboxyetylo)fosfina (TCEP) przygotowana w wodzie,
- woda dejonizowana,
- preparat farmaceutyczny: tabletki ACC.

### **I. 3. Materiały**

- próbki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml (20 szt.) oraz 2ml (8 szt.),
- zestaw końcówek do pipet automatycznych wielomiarowych,
- zlewka o pojemności 100 ml,
- kolba miarowa o pojemności 10 oraz 100 ml,
- naczynko wagowe i łopata,
- lejek,
- fiołki chromatograficzne wykonane ze szkła oraz zakrętki (15 szt.),
- lignina / ręcznik papierowy,
- flamaster,

- moździerz,
- pojemnik na odpady,
- statyw na probówki oraz fiołki.

## II. Wymagane środki ostrożności

- W trakcie wykonywania ćwiczenia Student powinien nosić odzież ochronną (okulary ochronne, rękawiczki, fartuch laboratoryjny) oraz bezwzględnie przestrzegać zasad bezpieczeństwa i higieny pracy oraz regulaminu pracowni.
- Student powinien nie dopuszczać do wdychania oparów cieczy, oraz pipetowania roztworów ustami.
- Na każdym etapie wykonywania ćwiczenia Student powinien postępować zgodnie ze wskazówkami prowadzącego zajęcia.
- Identyfikacja zagrożeń:
  - ✓ **acetonitryl (ACN)** - wysoce łatwopalna ciecz i pary. Działa drażniąco na oczy oraz może powodować ich uszkodzenie. Działa szkodliwie w kontakcie ze skórą. Może powodować podrażnienie dróg oddechowych. Działa toksycznie po połknięciu.



- ✓ **aldehyd o-ftalowy (OPA)** – działa toksycznie po połknięciu. Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu. Może powodować reakcję alergiczną skóry oraz podrażnienie dróg oddechowych. Działa toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.



- ✓ **wodorotlenek sodu (NaOH)** – może powodować korozję metali. Powoduje podrażnienia skóry oraz poważne uszkodzenia oczu. Może powodować podrażnienie dróg oddechowych.



- ✓ **butyloamina (B-NH<sub>2</sub>)** – wysoce łatwopalna ciecz i pary. Może powodować korozję metali. Działa szkodliwie po połknięciu. Działa toksycznie w kontakcie ze skórą lub w następstwie wdychania. Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu.



- ✓ **tris(2-karboksyetylo)fosfina (TCEP)** – powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu.



### III. Wykonanie ćwiczenia

#### III.1. Przygotowanie układu chromatograficznego do pracy oraz warunki prowadzenia pomiarów

##### Warunki chromatograficzne:

- **faza ruchoma: 24% ACN, 76% 0,0025M + 0,0025M OPA,**
- **elucja: izokratyczna,**
- **prędkość przepływu fazy ruchomej: 1 ml/min,**
- **czas analizy: 7 minut,**
- **temperatura kolumny: 25 °C,**
- **długość fali wzbudzenia: 340 nm,**
- **długość fali emisji: 440 nm,**
- **wzmocnienie (gain): 14,**
- **objętość wprowadzanej próbki: 5 µl.**

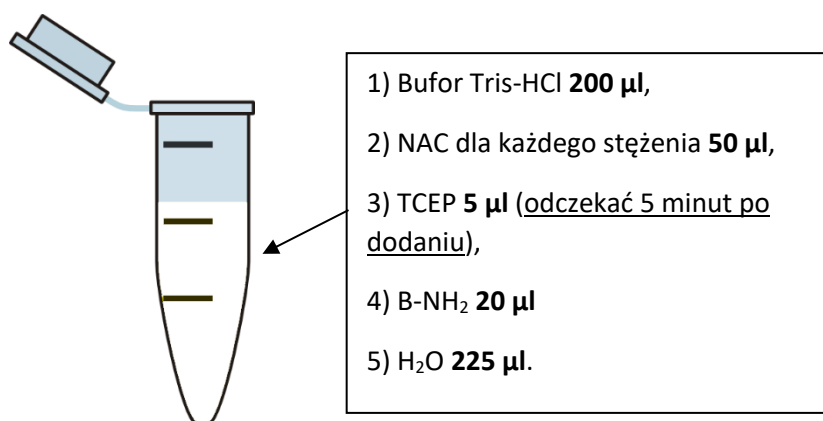
##### Schemat postępowania:

- włączenie chromatografu cieczowego (postępować zgodnie ze wskazówkami prowadzącego ćwiczenia oraz instrukcją od chromatografu),
- podłączenie kolumny do chromatografu (postępować zgodnie ze wskazówkami prowadzącego ćwiczenia i jej uruchomienie,

- kondycjonowanie kolumny chromatograficznej,
- ustawienie parametrów metody i sekwencji analiz,
- wykonanie analiz,
- umycie kolumny chromatograficznej i przygotowanie jej do dłuższego przechowywania.

### III.2. Przygotowanie próbek do krzywej kalibracyjnej

Próbki do krzywej kalibracyjnej przygotować w dwóch powtórzeniach wykorzystując w tym celu odpowiednio rozcieńczony za pomocą wody dejonizowanej roztwór standardowy NAC o stężeniu 0,1M. Roztwory przygotować tak, aby końcowe stężenie NAC wynosiło; 0, 5, 10, 20, 40, 60 ,100 nmol/ml. Schemat postępowania podczas przygotowania próbek przedstawiono na Rysunku 2.



**Rysunek 2.** Schemat postępowania podczas przygotowania próbki do krzywej kalibracyjnej.

### III.3. Przygotowanie roztworu ACC

- 1) na wadze analitycznej zważyć 1 tabletkę preparatu ACC,
- 2) przygotować odważkę o masie 100 x mniejszej niż masa tabletki z pkt.1
- 3) odważkę rozpuścić za pomocą wody dejonizowanej w kolbie o pojemności 10 ml,
- 4) z kolby o pojemności 10 ml pobrać za pomocą pipety automatycznej 1 ml roztworu, przenieść go do kolby o pojemności 100 ml i uzupełnić do kreski wodą dejonizowaną,
- 5) próbkę preparatu ACC przygotować w dwóch powtórzeniach zgodnie ze schematem przedstawionym na Rysunku 2.



#### IV. Opracowanie i dyskusja wyników

1. Przedstawić wszystkie niezbędne do przygotowania roztworów kalibracyjnych obliczenia.
2. Na podstawie porównania czasu retencji oraz widma roztworów wzorcowych NAC oraz tych uzyskanych dla badanej tabletki stwierdzić czy analit jest obecny w badanym preparacie farmaceutycznym.
3. Zintegrować uzyskane chromatogramy, spisać pola powierzchni pików oraz ich wysokości. Na podstawie uzyskanych danych wyliczyć średnie pola powierzchni oraz wysokości pików.
4. Na podstawie wartości pól powierzchni metodą najmniejszych kwadratów wykreślić krzywą kalibracyjną, wyznaczyć jej równanie oraz współczynnik korelacji R.
5. Określić czy wykonane pomiary zostały przeprowadzone precyzyjnie oraz dokładnie? Wskazać, co o tym świadczy? Jako kryterium akceptacji należy przyjąć wartości wyznaczonego parametru, charakteryzującego precyzję pomiarów, nie przekraczające 5%, a dla parametru charakteryzującego dokładność wartości w zakresie 85-115%.
6. Uzyskane wyniki dla pkt. 3 i 5 zestawić w tabeli.
7. Oznaczyć zawartość NAC w próbce preparatu farmaceutycznego i porównać z wartością deklarowaną przez producenta – zamieścić niezbędne obliczenia.

#### Literatura:

[1] R. Kasprzykowska, A.S. Kołodziejczyk, Skrypt z chemii leków, „Chemiczna analiza środków leczniczych (leki proste)” Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk 2010.

[2][http://www.ptfarm.pl/pub/File/FP/4\\_2009/15%20%20jakosc%20lekow%20i%20kontrola.pdf](http://www.ptfarm.pl/pub/File/FP/4_2009/15%20%20jakosc%20lekow%20i%20kontrola.pdf)

[3] <https://bazalekow.>