

# KONTROLA JAKOŚCI LEKÓW

Oznaczanie N-acetylocysteina w preparacie farmaceutycznym)

Instrukcja do ćwiczeń opracowana w Katedrze Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

## Wprowadzenie

Rosnące zainteresowanie analizą leków, wynikające z jej roli w kontroli jakości farmaceutyków oraz w wykrywaniu i identyfikacji szeroko pojętych środków biologicznie czynnych, takich jak środki psychotropowe, anaboliki, czy środki dopingujące, spowodowało coraz częstsze pojawianie się tej tematyki podczas ćwiczeń laboratoryjnych na uczelniach wyższych. 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, 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:

- ustalanie tożsamości i czystości substancji leczniczej na drodze analizy chemicznej, chromatograficznej i spektralnej;
- analizę jakościową i ilościową zawartości substancji leczniczej;
- projektowanie toku oraz przeprowadzanie 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. Stale prowadzone są badania dążące na opracowania warunków umożliwiających łatwiejsze, szybsze i tańsze analizy preparatów farmaceutycznych. Zawartość badanej substancji oraz odchylenia od wartości teoretycznej są ściśle określone normami. Szczególnie ważny jest dobór takich metod analitycznych, które gwarantują oznaczenie substancji aktywnej oraz ewentualnych jej zanieczyszczeń na poziomie mikrogramów i niższych.

Duży wpływ na trwałość preparatu farmaceutycznego oraz na uwalnianie i wchłanianie w organizmie substancji czynnej mają substancje pomocnicze, które są składnikiem każdego leku. Obecnie substancje pomocnicze poddaje się również szczegółowej analizie jakościowej i ilościowej. Do kontroli przebiegu produkcji oraz do kontroli jakości gotowego preparatu farmaceutycznego wykorzystywane są różne techniki analityczne. Wybór techniki analitycznej zależy nie tylko od składu leku, ale również od ilości próbki jaką dysponujemy i jej trwałości. Dla każdej oznaczanej substancji oraz każdego rodzaju próbki należy dobrać właściwą metodę analityczną. Metody charakteryzujące się jak najkrótszym czasem przygotowania próbki oraz krótkim czasem analizy są szczególnie cenione w analizie

leków. Związane jest to przede wszystkim z niską trwałością aktywnych substancji leczniczych i w przypadku monitorowania stężenia leków i ich metabolitów w płynach ustrojowych. Ważnym kryterium wyboru metody analitycznej jest koszt aparatury i odczynników oraz rodzaj informacji oczekiwanej po analizie (dokładność, precyzja, czułość, selektywność).

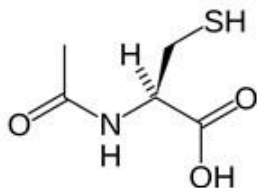
W Polsce za weryfikację bezpieczeństwa i jakości produktów leczniczych, wyrobów medycznych i produktów biobójczych statutowo odpowiedzialny jest Narodowy Instytut Leków, w którym decyzją Ministra Zdrowia wydaną w grudniu 2005 roku powołano Narodowe Laboratorium Kontroli Produktów Leczniczych, Wyrobów 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 produkcyjnej (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. Dodatkowych problemów jakościowych dostarcza import równoległy oraz gwałtownie narastająca sprzedaż leków i suplementów diety przez Internet.

### **N-acetylocysteina**

N-acetylocysteina (NAC), pochodna aminokwasu cysteiny, należy do grupy leków tiolowych. Lek ten 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. Nie zaburza naturalnego odruchu kaszlowego. NAC wykazuje także działanie przeciwutleniające, dzięki któremu neutralizuje wolne rodniki w zmienionych zapalnie lub niedotlenionych komórkach. Stosuje się ją w ostrym i przewlekłym zapaleniu oskrzeli i oskrzelików, rozstrzeni oskrzeli, mukowiscydozie, rozedmie płuc, oraz innych chorobach dróg oddechowych charakteryzujących się dużą ilością gęstej wydzieliny śluzowej. 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, Nacemis, Tussicom.

Po podaniu doustnym NAC dobrze wchłania się z przewodu pokarmowego, osiągając maksymalne stężenie w drogach oddechowych po 0,5–3 h. Wykazuje szczególne powinowactwo do tkanki płucnej i wydzieliny oskrzelowej. Metabolizowana jest głównie w wątrobie i wydalana z moczem.



Rys.1. Wzór strukturalny N-acetylocysteiny.

## Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest przygotowanie próbek preparatów farmaceutycznych oraz analiza ilościowa NAC za pomocą techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofluorymetryczną i porównanie jej zawartości z wartością deklarowaną przez producenta. W pierwszej części ćwiczenia Studenci wykonają krzywą kalibracyjną NAC. W drugiej części eksperymentu Studenci przygotowują roztwory preparatów farmaceutycznych ACC oraz Nacecis, a następnie przeprowadzą analizę chromatograficzną przygotowanych przez siebie próbek na zawartość oznaczanego analitu.

## 2. Odczynniki i aparatura

- chromatograf Hewlett-Packard 1100 z detektorem spektrofluorymetrycznym
- kolumna chromatograficzna Hamilton PRP-1 (150×4.6 mm, 5 μm), Phenomenex
- rozpuszczalniki i roztwory do przygotowania fazy ruchomej (acetonitryl, 0.0025M NaOH oraz 0.0025M OPA)
- 0.1M roztwór standardowy NAC
- 0.5M bufor Tris/HCl pH=9
- 0.25M TCEP w Tris/HCl
- 1M butyloamina
- woda dejonizowana
- preparaty farmaceutyczne: ACC i Nacecis

## Wymagane środki ostrożności

- ✓ W trakcie wykonywania ćwiczenia Student powinien nosić odzież ochronną.
- ✓ Roztworów nie należy wdychać i pipetować ustami.
- ✓ Identyfikacja zagrożeń (Klasyfikacja zgodnie z dyrektywami UE 67/548/EWG lub 1999/45/WE):
  - R36, R67 Wodorotlenek sodu - C Produkt żrący R35
  - Acetonitryl - F Produkt wysoce łatwopalny R11, T Produkt toksyczny R23/24/25, R39/23/24/25
  - Aldehyd *o*-ftalowy - T, N Produkt toksyczny, Produkt niebezpieczny dla środowiska R25, R34, R43, R50
  - Butyloamina – Produkt wysoce łatwopalny. Działa szkodliwie przez drogi oddechowe, w kontakcie ze skórą i po połknięciu. Powoduje poważne oparzenia.
- ✓ Pierwsza pomoc:
  - w razie kontaktu ze skórą: spłukać dużą ilością wody;
  - w razie kontaktu z oczami: przepłukać dużą ilością wody, przy szeroko otwartej powiece;
  - jeżeli osoba poszkodowana oddycha, przenieść na świeże powietrze; jeżeli osoba poszkodowana nie oddycha, zastosować sztuczne oddychanie; zasięgnąć porady medycznej;
  - w przypadku wystąpienia podrażnień skontaktować się z lekarzem;
  - w razie spożycia: przepłukać usta wodą.

### 3. Wykonanie ćwiczenia

#### 3.1. Przygotowanie układu chromatograficznego do pracy.

##### Warunki chromatograficzne:

- kolumna chromatograficzna Hamilton PRP-1 (150×4.6 mm, 5 μm), Phenomenex
- faza ruchoma: 24% acetonitryl, 76% 0.0025M NaOH + 0.0025M OPA
- elucja: izokratyczna
- prędkość przepływu: 1 ml/min
- czas analizy: 4.6 minuty
- temperatura kolumny: 25 °C
- $\lambda_{ex}=340$  nm,  $\lambda_{em}=440$  nm, wzmacnienie (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
- wymycie roztworu NaOH oraz OPA z kolumny, umycie kolumny chromatograficznej i przygotowanie do dłuższego przechowywania.

3.2. Przygotowanie próbek do krzywej kalibracyjnej z roztworu standardowego N-acetylocysteiny stężeniu 0.1 mol/l w dwóch powtórzeniach. Przygotowanie serii roztworów, w których końcowe stężenie N-acetylocysteiny wynosi: 5; 10; 20; 40; 60; 100 nmol/ml. Szereg rozcieńczeń roztworu macierzystego N-acetylocysteiny wykorzystywanych do sporządzenia krzywej kalibracyjnej przygotować na podstawie przeprowadzonych samodzielnie obliczeń.

Przygotowanie próbek do krzywej kalibracyjnej:



Bufor Tris/HCl 200 μl

NAC (nmol/ml) dla każdego stężenia 50 μl

TCEP 5 μl (redukcja 15 min)

B-NH<sub>2</sub> 20 μl

H<sub>2</sub>O 225 μl

Stężenie NAC [nmol/ml]	Średnia wysokość piku [%F]	Średnie uzyskane stężenie NAC [nmol/ml]	SD [nmol/ml]	RSD [%]	Odzysk [%]
0					
5					
10					
20					
40					
60					
100					

### Przygotowanie roztworów ACC i NACECIS:

Masa ACC = 3,7279g (3 tabletki 600mg) → naważka 100 x mniejsza → naważkę rozpuścić w kolbie 10 ml → pobrać 1ml i rozcieńczyć do 100 ml H<sub>2</sub>O

Masa NACECIS = 9,0152g (3 tabletki 1800mg) → naważka 300 x mniejsza → naważkę rozpuścić w kolbie 10 ml → pobrać 1ml i rozcieńczyć do 100 ml H<sub>2</sub>O

Przygotować próbki do analizy w analogiczny sposób jak przygotowano próbki do krzywej kalibracyjnej.

### Sprawozdanie

- 3 Na podstawie wartości czasu retencji i widma określić obecność badanej substancji w próbce.
- 4 Na podstawie wartości pól powierzchni metodą najmniejszych kwadratów wykreślić krzywą kalibracyjną, wyznaczyć jej równanie oraz współczynnik korelacji R<sup>2</sup>.
- 5 Wyliczyć względne odchylenie standardowe oraz odzysk dla poszczególnych stężeń.
- 6 Oznaczyć zawartość NAC w próbkach preparatów farmaceutycznych i porównać z wartością deklarowaną przez producenta przeliczając na zawartość w 1 tablecie.
- 7 Skomentować uzyskane wyniki.

[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>.