

Т. Н. Цокова (к.б.н., доц.)^а, Л. И. Котлова (к.фарм.н., доц.)^б

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА УФ-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ АЦИКЛОВИРА В ДОЗИРОВАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ

Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России,

^а кафедра медицинской информатики и биологической физики,

^б кафедра химии и фармакогнозии

625023, г. Тюмень, ул. Одесская, 52; e-mail: tcokova@tyumsmu.ru

T. N. Tsokova, L. I. Kotlova

USE OF UV SPECTROMETRY METHOD FOR THE DETERMINATION OF ACYCLOVIR CONTENT IN DOSAGE FORMULATIONS

Tyumen State Medical University of the Ministry of Health of Russia

52, Odesskaya Str., 625023, Tyumen, Russia; e-mail: tcokova@tyumsmu.ru

Рассмотрены методы УФ-спектрометрии для определения содержания лекарственного вещества в таблетках: метод «градуировочного графика» для моносистем лекарственного вещества, метод дифференцирования спектров поглощения полиномами Чебышева, а также его модификация. Были показаны достоинства и недостатки каждого метода в определении содержания ацикловира в твердой лекарственной форме. Найденное с применением всех методов количество ацикловира соответствует требованиям нормативной документации по количественному содержанию действующего вещества в таблетках.

Ключевые слова: ацикловир; градуировочный график; метод дифференцирования спектров поглощения полиномами Чебышева; ультрафиолетовый спектр.

Ацикловир (2-амино-9-[(2-гидрокси-этокс)метил]-1,9-дигидро-6Н-пурин-6-он)¹ относится к классу модифицированных нуклеозидов и обладает широкой терапевтической активностью, способен ингибировать *in vitro* и *in vivo* вирусы герпеса человека, включая вирус простого герпеса (ВПГ) 1-го и 2-го типов, вирус ветряной оспы и опоясывающего герпеса (варицелла-зостер вирус, *Varicella zoster virus* (ВЗВ)), вирус Эпштейна-Барр (ЭБВ) и цитомегаловирус (ЦМВ). Лечение ацикловиром острой формы ветряной оспы снижает жар, постоянную боль, а также распространение сыпи, и ускоряет заживление кожи.

The study considers UV-spectrometry methods for determining the drug substance content in tablets, including the method of «graduation chart» for monosolutions of drug substance, the method of differentiation of absorption spectra by Chebyshev polynomials, as well as its modification. A comparative analysis was conducted to assess the merits and limitations of each method in determining the content of acyclovir in solid dosage forms. The results obtained using all methods were found to be in accordance with the requirements stipulated in the regulatory documentation for the quantitative content of the active substance in tablets.

Key words: acyclovir; calibration graph; method of differentiation of absorption spectra by Chebyshev polynomials; ultraviolet spectrum.

При пероральном введении ацикловира происходит его медленное и неравномерное всасывание, что приводит к отсутствию реакции на лечение. Таким образом, существует необходимость создания фармацевтических составов ацикловира, включающих, по меньшей мере, одно соединение агента для доставки: ацикловир или его соль, эфир или пролекарство². Показана перспективность использования коллоидного диоксида кремния для разработки новой лекарственной формы ацикловира для перорального введения с улучшенными функциональными свойствами³.

В настоящее время ацикловир производят в виде капсул, таблеток и суспензий для перорального применения. В соответствии с программой

Дата поступления 15.01.25

импортозамещения многие лекарственные препараты с ацикловиром производятся российской фармацевтической промышленностью. При производстве лекарственных препаратов задача определения терапевтически эффективной дозы ацикловира и его соединений для доставки лекарственного средства стоит на первом месте.

Количественное содержание ацикловира в таблетках проводится методами спектрофотометрии^{3, 4} и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)⁵. Для изучения растворимости ацикловира в воде авторы⁶ применяли УФ-спектроскопию. Длина волны максимального поглощения составляла 256 ± 1 нм, в качестве растворителя использовали 0.1М хлористоводородную кислоту.

Целью настоящей работы является анализ эффективности метода производной УФ-спектроскопии полиномами Чебышева для качественного и количественного определения ацикловира в таблетированной лекарственной форме.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили: фармацевтическая субстанция ацикловира (2-Амино-9-[(2-гидроксиэтокси)метил]-1,9-дигидро-6Н-пурин-6-он) фармакопейного уровня чистоты, раствор хлористоводородной кислоты (0.1М HCl), таблетки Ацикловир (АЦИКЛОВИР ВЕЛ-ФАРМ), GTIN:04603179006062, SN:739МК6Х 5631МН, серия: 240323, годен до 03-2026.

Растворы ацикловира для построения градуировочного графика готовили следующим образом. Точную навеску субстанции ацикловира (около 10 мг) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в хлористоводородной кислоте (0.1М HCl), доводили объем раствора этим же растворителем до метки и перемешивали (раствор А).

Методом разведения раствора А хлористоводородной кислотой (0.1М HCl) получали концентрации ацикловира в монорастворах: 0.00105, 0.0007, 0.00052, 0.00026 %.

Для приготовления растворов Ацикловира 20 таблеток взвешивали для определения средней массы одной таблетки (0.4224 г) и растирали в порошок. Точную навеску массы растертых таблеток (около 0.02 г) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в хлористоводородной кислоте (0.1М HCl), доводили объем раствора этим же растворителем до метки и перемешивали. Раствор фильтровали (обеззоленный фильтр «Синяя лента»), первую порцию фильтрата (примерно 10–15 мл) отбрасывали. Методом разведения в хлористоводородной кислоте (0.1М HCl) с

учетом навески, разведения и содержания в одной таблетке (200.0 мг) готовили раствор ацикловира с концентрацией (0.0007 ± 0.00001) %.

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре (СФ-2000), в диапазоне от 200 до 360 нм, с шагом 2 нм. Спектры поглощения для каждого образца снимали с повтором три раза.

Результаты и их обсуждение

На рис.1 представлены УФ-спектры поглощения монорастворов субстанций ацикловира с различными концентрациями и раствора таблеток Ацикловир. Максимум поглощения при длине волны составил 254 ± 2 нм.

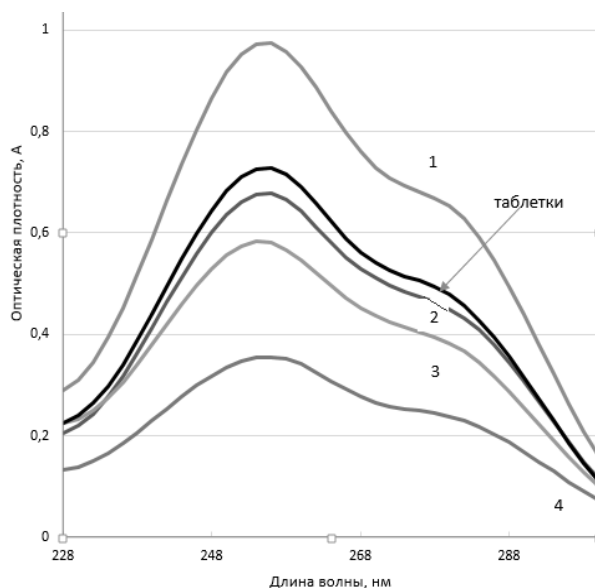


Рис.1 УФ-спектры поглощения субстанций ацикловира с концентрациями: 1 – 0.00105%; 2 – 0.0007%; 3 – 0.00052%; 4 – 0.00026%; растворитель 0.1М HCl; шаг сканирования 2 нм; спектрофотометр СФ-2000

По градуировочному графику зависимости оптической плотности от концентрации субстанции на длине волны максимального поглощения 254 нм можно определить концентрацию ацикловира в таблетках (рис. 2). Статистическую обработку провели с использованием программы Excel. Уравнение линейной регрессии:

$$A_{254\text{нм}} = 0.15947 + 768.7382 \cdot C (\%) \quad (1)$$

Оптическая плотность таблеток Ацикловир при длине волны 254 нм составила 0.7261. По уравнению (1) концентрация ацикловира составляет $(7.37 \pm 0.09) \cdot 10^{-4}$ %. Абсолютная погрешность концентрации в случае линейной зависимости пропорциональна абсолютной погрешности оптической плотности. За абсолютную погрешность оптической плотности взято максимальное отклонение от значения на длине волны 254 нм с шагом

± 2 нм ($\Delta A_{\max} = 0.0066$). По уравнению (1) найдено $\Delta C = 8.5855 \cdot 10^{-6} \approx 0.09 \cdot 10^{-4} \%$.

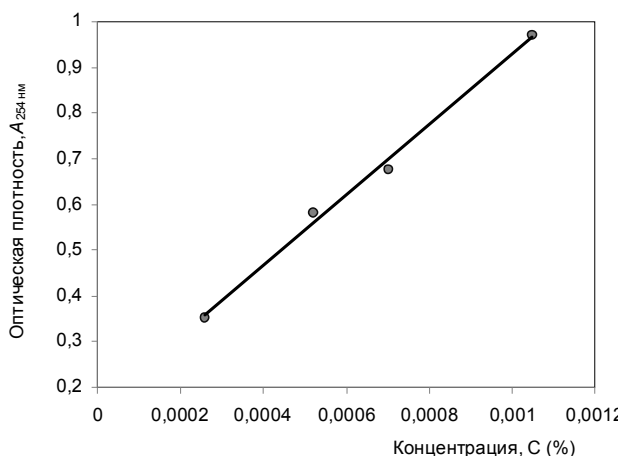


Рис. 2. Градуировочный график. Коэффициент корреляции 0.997229

Данный способ определения концентрации ацикловира в таблетках может привести к большим ошибкам. Растворы ацикловира могут содержать примеси гуанина (2-амино-1Н-пурин-6(9Н)-она) – продукта термического разложения ацикловира. Длина волны максимального поглощения гуанина на длине волны составляет 246 нм. Европейская Фармакопея 5 издания определяет его, как допустимую примесь и регламентирует количественное содержание не более 0.7% относительно ацикловира.

Для определения содержания лекарственного вещества в смеси с другими соединениями можно использовать метод дифференцирования спектров поглощения полиномами Чебышева (ДПЧ) ⁷.

Суть данного метода состоит в следующем. УФ-спектр поглощения аппроксимируется полиномом Чебышева n -го порядка. В точке максимального поглощения i определяется значение комбинированного коэффициента полинома (ККП) – $\sum A_i P_i$, где A_i – оптическая плотность спектра поглощения в точке максимума, P_i – многочлен Чебышева в этой точке. Было установлено, что значение ККП в точке максимального поглощения данного лекарственного вещества не зависит от наличия других примесей.

Построив модель лекарственного препарата Ацикловир с различным содержанием исследуемого вещества, и сняв УФ-спектры поглощения для каждой модели, нашли ККП₂₅₄ в точке максимального поглощения (254 нм). Для вычисления значений ККП всех растворов использована компьютерная программа ⁸. График зависимости ККП₂₅₄ от концентрации ацикловира в модельной смеси показан на рис. 3.

Уравнение линейной регрессии:

$$\text{ККП}_{254\text{нм}} = -49920699 + 2.406 \cdot 10^{11} \cdot C (\%) \quad (2)$$

По графику вычислена концентрация ацикловира, содержащегося в таблетках.

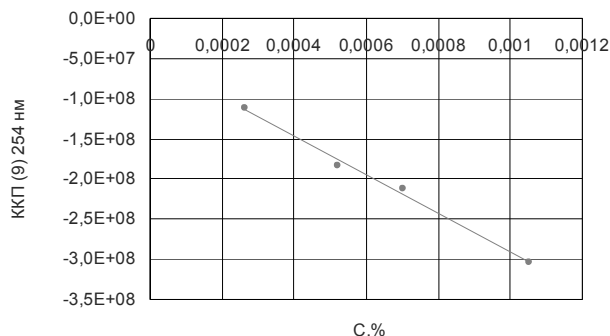


Рис. 3. Зависимость значений ККП (комбинированных коэффициентов полиномов 9-го порядка) от концентрации ацикловира в модельной смеси. Коэффициент корреляции 0.99723.

На рис.4 показан УФ-спектр поглощения таблеток Ацикловир и его аппроксимирующий полином 9-го порядка (длина волны от 228 нм до 300 нм, шаг 2 нм, всего 37 точек).

Уравнение полинома:

$$A^* = -0.01916x^0 + 0.020506x^1 - 0.00506x^2 + 0.000876x^3 - 0.00008313612x^4 + 0.000004388862x^5 - 0.000000129009x^6 + 0.000000001980599x^7 - 0.00000000001239604x^8,$$

где $x = 1, 2, 3, \dots, 37$.

Значение ККП₂₅₄ нм для таблеток составило -227295300.0 (максимум поглощения 254 нм соответствует точке $x = 14$), по уравнению (2) вычислена концентрация ацикловира в таблетках, равная $0.0007371 \pm 0.0000215 \%$.

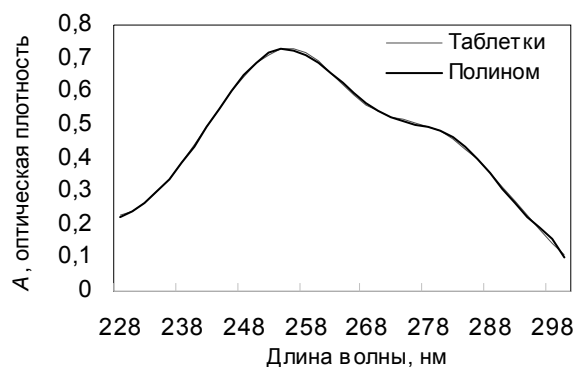


Рис. 4. УФ-спектр поглощения таблеток Ацикловир: растворитель 0.1 М HCl; шаг сканирования 2 нм; СФ-2000; вторая линия – полином 9-го порядка по программе ⁸

Нами предлагается более простой способ вычисления концентрации лекарственного вещества

в смеси модифицированным методом дифференцирования спектров поглощения полиномами Чебышева (ДПЧ). Концентрацию лекарственного вещества в дозированной лекарственной форме этим методом можно вычислить по формуле:

$$C_i = \frac{KKП_{смесь} \cdot C_x \cdot m_x}{KKП_x \cdot m_{смесь}}, \quad (3)$$

где $KKП_{смесь}$ – КПП всей смеси;

C_x – единичная концентрация ацикловира (например 0.0001%) при длине волны его максимального поглощения (254 нм);

m_x – заявленная производителем масса действующего лекарственного вещества (ацикловир), мг;

$KKП_x$ – значение оптимального комбинированного коэффициента полинома, соответствующего единичной концентрации вещества (по уравнению (2));

$m_{смесь}$ – масса всей смеси действующих лекарственных веществ в препарате, мг.

Вместо масс в уравнение (3) можно подставлять пропорциональное соотношение $m_x/m_{смесь}$.

В таблетках Ацикловир действующее лекарственное вещество – только ацикловир, поэтому за C_x принимается значение 0.0007% (концентрация ацикловира в приготовленном для исследования растворе).

По уравнению (3) $KKП_x = -218370581.5$ ацикловира; $KKП_{смесь} = -227295300.0$. Массы действующих лекарственных веществ в данном случае равны: $m_x = m_{смесь}$, и концентрация ацикловира равна 0.000728609%. Погрешность вычисления равна погрешности концентрации при приготовлении раствора таблеток $\Delta C = 0.00001\%$.

Таким образом, количественное содержание ацикловира в таблетках составило:

1. По градуировочному графику (используется для монорастворов лекарственных препаратов):

$C_A = (7.37 \pm 0.09) \cdot 10^{-4} \%$; точность вычисления 1%.

2. Вычислено с помощью модели лекарственного препарата (метод ДПЧ):

$C_A = (7.371 \pm 0.215) \cdot 10^{-4} \%$; точность вычисления 3%.

3. Вычислено по формуле (модифицированный метод ДПЧ):

$C_A = (7.28 \pm 0.1) \cdot 10^{-4} \%$; точность вычисления 1%.

В процентном соотношении к исходной концентрации ацикловира в навеске $0.0007 \pm 0.00001 \%$ это составит:

1. $C_A = 105.28 \pm 0.09 \%$;

2. $C_A = 105.3 \pm 0.2 \%$;

3. $C_A = 104.3 \pm 0.1 \%$.

Согласно требованиям нормативной документации (НД), содержание действующих веществ в таблетках Ацикловир должно находиться в пределах от 90 до 110 %. Содержание ацикловира в таблетках не превышает этих границ, следовательно, таблетки Ацикловир соответствуют требованиям НД по количественному содержанию действующего вещества.

Возможное содержание примеси в виде гуанина, содержащегося в исследуемом растворе таблеток Ацикловир, не должно превышать 0.7% относительно ацикловира, в данном случае это значение с учетом разведения составит концентрация $0.049 \cdot 10^{-4} \%$. Это значение меньше погрешности определения концентрации ацикловира всеми методами, что позволяет считать в таблетках Ацикловир наличие только одного действующего лекарственного вещества.

Первый метод позволяет определять концентрацию ацикловира по градуировочному графику на длине волны его максимального поглощения 254 нм. Второй метод предполагает построение модели лекарственного препарата из субстанций с учетом возможного содержания примеси в виде гуанина, поэтому может давать ошибку, если не учитывать содержание примеси в виде действующих веществ. В третьем методе не требуется создание модели, а только указывается предполагаемое содержание примеси.

Таким образом, результаты исследований показали, что для определения концентрации ацикловира лучше использовать третий метод (вычисления по формуле), поскольку в лекарственном препарате кроме ацикловира могут оказаться и другие действующие лекарственные вещества, дающие вклад в УФ-спектр поглощения. Модифицированный метод ДПЧ, вычисление концентрации лекарственного вещества по формуле, не требует создания полной модели лекарственного препарата и не зависит от поглощения других действующих лекарственных веществ, которые могут присутствовать в лекарственном препарате.

Литература

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. Изд. XV. ФС.2.1.0062. Фармакопейная статья. Ацикловир №377. Электронный ресурс <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/>

References

1. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. Izd. XV. FS.2.1.0062. Farmakopeynaya stat'ya. Atsiklovir №377* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XV. FS.2.1.0062. Pharmacopoeial article. Acyclovir №377]. <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/>

2. Патент РФ №2406504 С2. Способы изготовления лекарственных составов ацикловира / Адамс Эмми, Сингх Брахма, Дхоот Никхил, Маджуру Шингай // 2010.
3. Акимшева Е. Ю., Долинина Е.С., Парфенюк Е.В. Композит ацикловир-диоксид кремния как платформа для разработки новой пероральной лекарственной формы ацикловира пролонгированного действия // Известия высших учебных заведений. Серия. Химия и химическая технология. – 2020. – Т.63, №4. – С.63-67.
4. Филькин М.Р., Рыженков И.И., Торшина Ю.В. Сравнительный анализ таблетированных лекарственных форм ацикловира российского и зарубежного производства // Смоленский медицинский альманах. – 2021. – С.146-148.
5. Жилиякова А.В., Баскакова А.В., Новиков О.О., Комиссаров М.И., Фадеев А.Н. Сравнительная характеристика методов анализа ацикловира // Научные ведомости. Серия Медицина. Фармация. – 2013. – №25-1 (168). – С.100-103.
6. Алешин С.В., Амбросов И.В., Матело С.К., Шохин И.Е. Разработка методики определения фрагмента ацикловира в составе инновационного лекарственного препарата ациклогерманий методом ВЭЖХ. Идентификация основной примеси // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2016. – Т.16, №1. – С.93-99.
7. Цокова Т.Н., Котлова Л.И. Количественное определение концентрации лекарственных веществ в таблетках цитрамона методом дифференцирования спектров поглощения полиномами Чебышева // Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Химия. – 2022. – Т.15, №2. – 206-213.
8. Цокова Т.Н., Котлова Л.И. Автоматизированный способ разделения полос поглощения при спектрофотометрическом анализе лекарственных смесей: Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №RU2020660335. – 2020.
2. Adams Jemmi, Singh Brahma, Dhoot Nikhil, Madzhuru Shingaj. *Sposoby izgotovleniya lekarstvennykh sostavov atsiklovira* [Methods for the preparation of medicinal formulations of acyclovir]. Patent RF no.2406504 C2, 2010.
3. Akimsheva E.Yu., Dolinina E.S., Parfenyuk E.V. *Kompozit atsiklovir-dioksid kremniya kak platforma dlya razrabotki novoy peroral'noy lekarstvennoy formy atsiklovira prolongirovannogo deystviya* [Acyclovir-silicon dioxide composite as a platform for the development of a new oral dosage form of prolonged-acting acyclovir]. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Khimiya i khimicheskaya tekhnologiya* [ChemChemTech], 2020, vol.63, no.4, pp.63-67.
4. Fil'kin M.R., Ryzhenkov I.I., Torshina Yu.V. *Sravnitel'nyi analiz tabletirovannykh lekarstvennykh form atsiklovira rossiyskogo i zarubezhnogo proizvodstva* [Comparative analysis of tablet dosage forms of acyclovir produced in Russia and abroad]. *Smolenskiy meditsinskiy al'manakh* [Smolensk Medical Almanac], 2021, pp.146-148.
5. Zhilyakova A.V., Baskakova A.V., Novikov O.O., Komissarov M.I., Fadeev A.N. *Sravnitel'naya kharakteristika metodov analiza atsiklovira* [Comparative characterisation of methods for the analysis of acyclovir]. *Nauchnye vedomosti. Seriya Meditsina. Farmatsiya* [Scientific Bulletins. Series Medicine. Pharmacy], 2013, no.25-1 (168), pp.100-103.
6. Aleshin S.V., Ambrosov I.V., Matelo S.K., Shohin I.E. *Razrabotka metodiki opredeleniya fragmenta atsiklovira v sostave innovatsionnogo lekarstvennogo preparata atsiklogermaniy metodom VZhKh. Identifikatsiya osnovnoy primesi* [Development of a technique for the determination of acyclovir fragment in the composition of the innovative drug acyclogermanium by HPLC. Identification of the main impurity]. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy* [Sorption and chromatographic processes], 2016, vol. 16, no.1, pp.93-99.
7. Tsokova T.N., Kotlova L.I. *Kolichestvennoe opredelenie kontsentratsii lekarstvennykh veshchestv v tabletkakh tsitramona metodom differentsirovaniya spektrov pogloshheniya polinomami Chebysheva* [Quantification of drug concentrations in citramone tablets by differentiation of absorption spectra by Chebyshev polynomials]. *Zhurnal Sibirskogo federal'nogo universiteta. Seriya: Khimiya* [Journal of the Siberian Federal University. Series: Chemistry], 2022, 15(2), pp.206-213.
8. Tsokova T.N., Kotlova L.I. *Avtomatizirovannyi sposob razdeleniya polos pogloshheniya pri spektrofotometricheskom analize lekarstvennykh smesey* [Automated method for separating absorption bands in spectrophotometric analysis of medicinal mixtures]. Certificate of state registration of a computer program no.2020660335, 2020.