

УДК 543.421/.424:547-326:615.036.8

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
КИСЛОТЫ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ В РАСТВОРАХ
МЕТОДОМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ****Попова А.П., Корнеева И.Н., Савченко И.А., Бондаренко Д.Я.,
Антонов И.А., Комаровский И.В.***ГБОУ ВПО Омский Государственный Медицинский Университет Минздрава России,
Омск, e-mail: Kuzimanza@mail.ru*

На настоящий момент на фармацевтическом рынке присутствует огромное количество препаратов для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы, и наибольшее их число представлено дженериками. Разработка недорогих, чувствительных и точных экспресс-методов определения биоэквивалентности лекарственных веществ в различных лекарственных формах является актуальной задачей современного фармацевтического анализа. В данном исследовании представлена методика определения кислоты ацетилсалициловой в растворах спектрофотометрическим методом в УФ-диапазоне. Подобраны оптимальные условия спектрофотометрирования, обнаружен максимум поглощения на длине волны 275 ± 2 нм. Для растворов в диапазоне концентраций 0,02 – 0,1 мг/мл обнаружена линейная зависимость оптической плотности от содержания кислоты ацетилсалициловой. Показано, что данная методика может быть использована для целей изучения биоэквивалентности и биодоступности препаратов кислоты ацетилсалициловой в фармацевтическом анализе.

Ключевые слова: кислота ацетилсалициловая, аспирин, спектрофотометрия, биоэквивалентность**DEVELOPMENT OF METHODS FOR DETERMINATION OF ACETYLSALICYLIC
ACID IN SOLUTIONS BY SPECTROPHOTOMETRY****Popova A.P., Korneeva I.N., Savchenko I.A., Bondarenko D.Y.,
Antonov I.A., Komarovskii I.V.***Omsk State Medical University Russian Ministry of Health, Omsk, e-mail: Kuzimanza@mail.ru*

At present, the pharmaceutical market has a huge number of drugs for the treatment of cardiovascular diseases, and the largest number of them is represented by generics. The development of inexpensive, sensitive and accurate methods for rapid determination of bioequivalence of drugs in various dosage forms is an actual problem of modern pharmaceutical analysis. In this study, the technique of determination of acetylsalicylic acid in solution by spectrophotometry in the UV range is presented. Optimal conditions of determination by spectrophotometry and an absorption maximum at a wavelength of 275 ± 2 nm was detected. For solutions in the concentration range 0.02 – 0.1 mg / ml, a linear dependence of optical density from the content of acetylsalicylic acid is found. It has been shown that this technique is can be used for the purpose of studying the bioequivalence and bioavailability of acetylsalicylic acid at drugs for the pharmaceutical analysis.

Keywords: acetylsalicylic acid, aspirin, spectrophotometry, bioequivalence

В последнее время наблюдается постоянный рост смертности населения РФ от неинфекционных заболеваний (НИЗ), основную угрозу состоянию здоровья граждан представляют заболевания сердечно-сосудистой системы (ССС) [2]. Известно, что своевременная и качественно организованная профилактика заболеваний сердца и сосудов позволяет сократить смертность на 30-35%, для сравнения – проведение лечебных мероприятий, таких как стентирование, позволяет снизить уровень смертности лишь на 1-5% [3]. На современном фармацевтическом рынке огромную долю занимают препараты, предназначенные для профилактики и лечения заболеваний ССС, в большинстве своём представленные дженериками. Поэтому изучение биоэквивалентности и биодоступности препаратов, предназначенных для лечения и профилак-

тики заболеваний ССС, является актуальной и социально значимой проблемой современного фармацевтического анализа.

Одним из наиболее распространённых лекарственных веществ, используемых в комплексной терапии и профилактике различных заболеваний ССС, является кислота ацетилсалициловая (Аспирин Кардио, Тромбо АСС, Кардиомагнил, и др.). Кислота ацетилсалициловая является производным салициловой кислоты, проявляет следующие фармакологические свойства: анальгезирующее, жаропонижающее, противовоспалительное, антиагрегационное. Ингибирует циклооксигеназу (ЦОГ-1 и ЦОГ-2) и необратимо тормозит циклооксигеназный путь метаболизма арахидоновой кислоты, блокирует синтез простагландинов и тромбоксана. Уменьшение содержания тромбоксана А₂ в тромбоцитах приводит к необратимо-

му подавлению агрегации, несколько расширяет сосуды [4, 6].

Таким образом, препараты кислоты ацетилсалициловой являются практически незаменимыми при лечении различного рода воспалительных процессов, болевого синдрома, а также – профилактики заболеваний ССС вследствие антиагрегационного действия. Назначение препаратов кислоты ацетилсалициловой лицам, подверженным риску заболеваний сердца и сосудов, является обязательным и зачастую пожизненным. Поэтому крайне важно обеспечивать население качественными и доступными препаратами данного лекарственного вещества. Однако, применение дженериков низкой стоимости повышает риск снижения терапевтического эффекта из-за вероятной низкой биоэквивалентности препарата. Как следствие, разработка экспресс-методов точного определения биодоступности и биоэквивалентности препаратов кислоты ацетилсалициловой является актуальной задачей. Одним из таких методов анализа является спектрофотометрия в ультрафиолетовой области спектра (УФ-спектрофотометрия).

Биодоступность – это скорость и степень, с которой активная субстанция всасывается из готовой лекарственной формы и накапливается в месте ее предполагаемого действия. Два лекарственных препарата биоэквивалентны, если они фармацевтически эквивалентны или альтернативны и если их биодоступность после введения в одинаковой молярной дозе сходна в такой степени, что их эффективность и безопасность в основном одинаковы [8]. Наиболее эффективными методами изучения биоэквивалентности являются методы *in vivo*. Однако, данные методы до сих пор остаются самыми дорогостоящими и технически сложными фармацевтическими испытаниями, поэтому предварительные испытания биодоступности возможно проводить методами *in vitro*, например, определение кинетики растворения для таблетированных лекарственных форм [7].

Для определения концентрации кислоты ацетилсалициловой в жидкой среде возможно применить метод спектрофотометрии в УФ и видимой области спектра, метод является точным, чувствительным, доступным и не требует больших затрат времени [1, 5, 9, 10].

Цель нашего исследования – разработка доступного экспресс-метода качественного и количественного определения кислоты ацетилсалициловой для целей изучения биоэквивалентности и биодоступности. Методика спектрофотометрического определения кислоты ацетилсалициловой может

быть использована в обычных лабораториях, исключает применение дорогостоящего оборудования, высокотоксичных и летучих реактивов.

Материалы и методы исследования

Исследуемые образцы с концентрациями 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 и 0,1 мг/мл готовили с использованием субстанции лекарственного вещества «Кислота ацетилсалициловая» («Омский реактив», Россия), спирта этилового 96% («Омская фармацевтическая фабрика», Россия), 0,1М раствора кислоты хлористоводородной («Омский реактив», Россия). Качество использованных субстанций и реактивов соответствует требованиям Государственной Фармакопеи РФ XIII изд.

Оборудование: спектрофотометр СФ-2000, набор кварцевых кювет, набор лабораторной посуды.

Методика:

1. *Приготовление серии разведений исследуемых растворов:* в мерные колбы на 50 мл помещали по 0,05 г (т.н.) субстанции кислоты ацетилсалициловой, прибавляли 20 мл спирта этилового, встряхивали до растворения и доводили до метки спиртом этиловым (раствор А); в мерные колбы на 100 мл помещали соответственно по 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 и 10,0 мл раствора А и доводили 0,1М раствором кислоты хлористоводородной до метки (исследуемые растворы); полученные растворы спектрофотометрировали в интервале длин волн 200-759 нм в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см на спектрофотометре СФ-2000.

2. *Приготовление модельных растворов:* в мерные колбы на 50 мл помещали по 0,0314 г (I, т.н.) или по 0,0335 г (II, т.н.) субстанции кислоты ацетилсалициловой, далее поступали, как при приготовлении серии разведений исследуемых растворов; полученные растворы спектрофотометрировали в тех же условиях.

Статистическую обработку результатов эксперимента проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0 для достоверной вероятности $p = 0,95$.

Результаты исследования и их обсуждение

Выбор растворителей при приготовлении серий разведений обусловлен физико-химическими свойствами исследуемого вещества, а также условиями проведения теста «Растворение» для таблетированных/капсулированных лекарственных форм. Кислота ацетилсалициловая легко растворима в спирте этиловом 96%, растворима в хлороформе и мало растворима в воде, поэтому для приготовления раствора А использовали в качестве растворителя спирт этиловый 96%. Кислота ацетилсалициловая, как вещество кислотного характера, подвергается наибольшему всасыванию в желудке, поэтому изучение растворения таблетированных лекарственных форм необходимо проводить, используя в качестве растворителя 0,1М раствор кислоты хлористоводородной (ОФС.1.4.2.0014.15), поэтому при приготовлении исследуемых растворов в качестве растворителя использовали 0,1М раствор кислоты хлористоводородной.

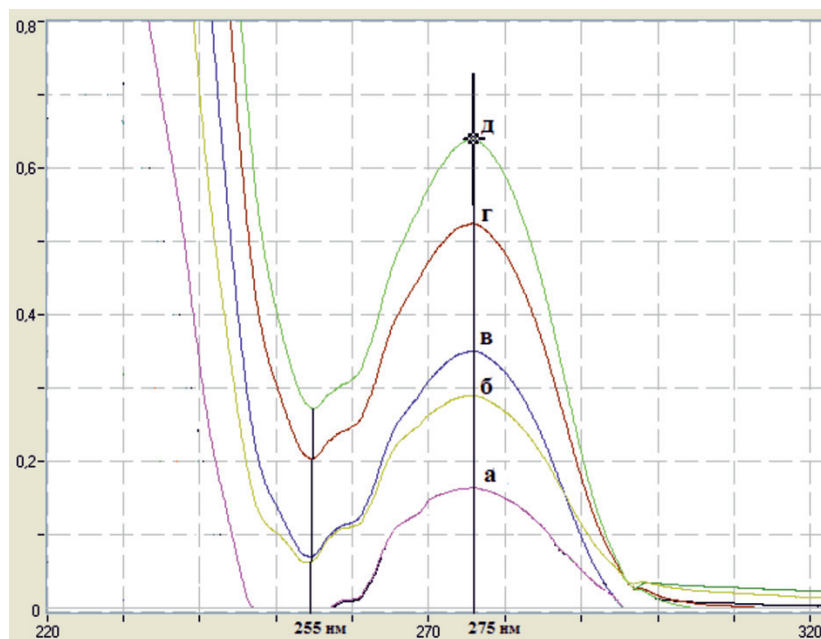


Рис. 1. Спектры поглощения кислоты ацетилсалициловой в исследуемых растворах для концентраций, мг/мл: а – 0,02, б – 0,04, в – 0,06, г – 0,08, д – 0,1

Таблица 1

Статистические параметры результатов спектрофотометрирования исследуемых растворов (n = 5, p = 0,95)

C (мг/мл)	A_{cp}	S_f	A, σ	$A_{cp} \pm \Delta A$
0,02	0,1447	0,1507	0,0005	$\pm 0,0271$
0,04	0,2729	0,0447	0,0002	$\pm 0,0152$
0,06	0,3994	0,0821	0,0011	$\pm 0,0408$
0,08	0,5316	0,0480	0,0006	$\pm 0,0317$
0,1	0,6917	0,0545	0,0014	$\pm 0,0469$

Регистрировали спектры 5 образцов для каждой концентрации исследуемых растворов. На всех полученных спектрах отмечены характерной формы максимумы поглощения при длине волны 275 ± 2 нм и минимумы при 255 ± 2 нм, что свидетельствует об отсутствии влияния растворителей и межмолекулярного взаимодействия на поглощение электромагнитного излучения исследуемым веществом. Спектры поглощения кислоты ацетилсалициловой в исследуемых растворах представлены на рис. 1.

Результаты статистической обработки экспериментальных данных представлены в табл. 1.

Из представленных данных следует, что компоненты системы растворителей (спирт этиловый 96 % и 0,1М раствор кислоты хлористоводородной) в различных соотношениях не оказывают значимого влияния на величину оптической плотности и последу-

ющий расчёт количественного содержания кислоты ацетилсалициловой для всех исследуемых концентраций.

Для подтверждения линейной зависимости оптической плотности от концентрации кислоты ацетилсалициловой строили градуировочный график на 5 уровнях концентраций её растворов, полученных с использованием 0,1М раствора кислоты хлористоводородной (рис. 2).

Зависимость оптической плотности от концентрации кислоты ацетилсалициловой в исследуемых растворах была аппроксимирована линейным уравнением с помощью метода наименьших квадратов. Полученное уравнение для водных растворов имеет вид:

$$A = 0,002 + 0,135 \cdot C,$$

где A – оптическая плотность (величина светопоглощения) раствора,

C – концентрация исследуемого раствора, мг/мл.

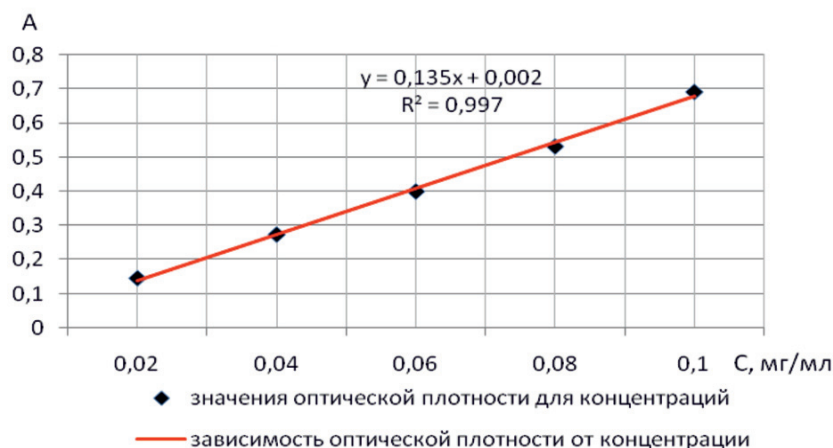


Рис. 2. График зависимости оптической плотности от концентрации кислоты ацетилсалициловой в растворе

Таблица 2

Характеристики спектрофотометрической методики

Определяемое вещество	Молярная масса, г/моль	Область линейности графика, мг/мл	Молярный коэффициент поглощения	Удельный коэффициент поглощения	Определяемый минимум, мг/мл
Кислота ацетилсалициловая	180,15	0,02 – 0,1	1235,18	73,953	0,00135

Во всём интервале концентраций наблюдалась линейная зависимость оптической плотности от концентрации раствора, что свидетельствует о выполнении закона Бугера-Ламберта-Бера. Критерием приемлемости линейности явился и коэффициент корреляции (R^2), его расчетная величина близка к единице (0,997). Таким образом, в данных интервалах концентраций методика обеспечивает определение кислоты ацетилсалициловой с требуемой линейностью.

Используя результаты построения градуировочного графика, рассчитывали молярный показатель поглощения, удельный показатель поглощения и чувствительность определения кислоты ацетилсалициловой, приняв за $A_{\min} = 0,01$. Результаты расчётов представлены в табл. 2.

Установлено, что разработанная методика достаточно чувствительна для определения биодоступности кислоты ацетилсалициловой в диапазоне концентраций при выполнении теста на растворение для исследуемых твёрдых лекарственных форм (0,05 мг/мл при среднем содержании 50 мг/табл и объёме 0,1М раствора кислоты хлористоводородной 1000 мл).

Также показано, что предел обнаружения кислоты ацетилсалициловой составляет 0,00135 мг/мл, поэтому данная методика

может быть применима и для исследований биоэквивалентности *in vivo* для фармакокинетических концентраций в биологических жидкостях человека при употреблении в дозе 300-325 мг/сут (0,004-0,005 мг/мл, при средней массе тела 75 кг и объёме распределения 0,2 л/кг).

Нами проводились предварительные исследования устойчивости исследуемых растворов кислоты ацетилсалициловой, полученных с использованием 0,1М раствора кислоты хлористоводородной, к гидролизу или другим изменениям. Для этого спектрофотометрировали образцы в тех же условиях через 30 мин после приготовления. Установлено, что значимых расхождений в положении максимумов и минимумов, а также в значении оптической плотности не выявлено.

Для оценки точности разработанной методики проводили определение 10 аликвот модельных растворов I и II, вычисляли стандартное отклонение и относительное стандартное отклонение. На всех полученных спектрах отмечены характерной формы максимумы и минимумы поглощения, совпадающие с таковыми у исследуемых растворов. Результаты определения концентрации модельных растворов по калибровочному графику представлены в табл. 3.

Таблица 3

Анализ точности методики определения кислоты ацетилсалициловой (КАС)
в модельных растворах при помощи калибровочного графика

Модельный раствор	Расчётная концентрация КАС, мг/мл	Оптическая плотность, средн.	Найденная концентрация КАС, мг/мл	Открываемость R, %	Метрологические характеристики
I	0,0126	0,0912	0,0128	92,3	Rcp. = 97,4% S = 3,2691 Sr = 0,0336
	0,0251	0,1473	0,0224	97,9	
	0,0377	0,2123	0,0312	99,3	
	0,0502	0,3219	0,0471	97,2	
	0,0628	0,4248	0,0638	101,9	
II	0,0134	0,0963	0,0152	93,8	
	0,0268	0,1734	0,0240	94,7	
	0,0402	0,2241	0,0378	98,6	
	0,0536	0,3508	0,0591	95,9	
	0,0670	0,4284	0,0644	102,1	

Из представленных данных следует, что разработанная нами методика отвечает критериям точности, средняя открываемость составила 97,4%, относительное стандартное отклонение составило 0,0336 (3,36%), что позволяет использовать данную методику при количественном определении кислоты ацетилсалициловой в выбранных условиях.

Выводы

1. Разработана методика спектрофотометрического определения кислоты ацетилсалициловой в растворе, полученном с использованием в качестве растворителя 0,1М раствора кислоты хлористоводородной.

2. Показано, что спектр поглощения кислоты ацетилсалициловой в выбранных условиях имеет максимум поглощения при длине волны 275 ± 2 нм и минимум при 255 ± 2 нм.

3. Предложенная методика линейна в диапазоне концентраций 0,02 – 0,1 мг/мл, предел обнаружения составил 0,00135 мг/мл.

4. Данная методика применима для определения биодоступности кислоты ацетилсалициловой при выполнении теста на растворение для твёрдых лекарственных форм (предполагаемая средняя концентрация 0,05 мг/мл). Также данная методика может быть применима и для исследований биоэквивалентности *in vivo* для фармакокинетических концентраций в биологических жидкостях человека при употреблении в дозе 300-325 мг/сут (0,004-0,005 мг/мл).

Список литературы

1. Глижова Т.Н. Разработка технологии и стандартизация суппозитория с дипиридамолом и кислотой ацетил-

салициловой / Т.Н. Глижова, Э.Ф. Степанова, А.Ю. Саенко, И.Я. Куль // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 2-2. – С. 412–415.

2. Доклад о ситуации в области неинфекционных заболеваний в мире, 2010 г.: аналит. обзор, 2013 / Всемирная организация здравоохранения. – 2013. – 170 с.

3. Официальный сайт Минздрава РФ [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.rosminzdrav.ru/news/2016/05/12/2941-predstaviteli-minzdrava-rossii-prinyali-uchastie-v-kruglom-stole-zakonodatelnye-aspekty-borby-s-neinfektsionnymi-zabolevaniyami-i-obschestvennogo-zdorovya-v-rossiyskoy-federatsii> (дата обращения: 20.05.2016).

4. Регистр лекарственных средств России РЛС Энциклопедия лекарств. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_394.htm (дата обращения 25.05.2016).

5. Степанова Э.Ф. Валидационная оценка методик анализа суппозитория с диклофенаком натрия и кислотой ацетилсалициловой / Э.Ф. Степанова, А.Ю. Саенко, А.Ю. Петров, И.Я. Куль // Фундаментальные исследования. – 2013. – №10-12. – С. 2710–2714.

6. Шилов А.М. Ацетилсалициловая кислота – антиагрегант в практике лечения сердечно-сосудистых заболеваний // Русский медицинский журнал. – 2013. – № 35. – С. 1804–1808.

7. Шохин И.Е. Оценка возможности замены исследований биоэквивалентности *in vivo* на изучение сравнительной кинетики растворения *in vitro* (процедура «Биовериф» при определении взаимозаменяемости лекарственных средств («дженериков»)) / И.Е. Шохин, Г.В. Раменская, Г.Ф. Василенко, Е.А. Малащенко // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Том 45, № 2. – С. 46–48.

8. EMEA. The rules governing medicinal products in the European Union. Investigation of Bioavailability and Bioequivalence, v. 3C. – 1998. – P. 231–244.

9. Madhuri D. Game, Gabhane K.B. and Sakarkar D.M. Quantitative analysis of clopidogrel bisulphate and aspirin by first derivative spectrophotometric method in tablets // Indian J Pharm Sci. – 2010. – Nov-Dec, 72(6). – P. 825–828.

10. Qiao Lan-Xia. Quantitative determination of aspirin in tablets by spectrophotometry / Qiao Lan-Xia, Gao Zhi-guo, Xing Qing, Qiu-rui. // J. Hebei Norm. Univ. – 2001. – Vol. 25, N2. – P. 219–220.