



УДК 543.544

## Новый способ определения N-ацетилцистеина в плазме крови с применением дериватизации и ВЭЖХ с УФ-детектированием

Никитин Д.А.<sup>1</sup>, Рудакова Л.В.<sup>2</sup>, Дутов А.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет», Воронеж

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Забайкальский Государственный Университет», Чита

Поступила в редакцию 2.03.2018 г.

DOI: <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2018.18/498>

Предложен простой, быстрый и доступный способ определения N-ацетилцистеина в плазме сыворотки крови с использованием в качестве дериватизационного реагента 4-хлор-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазола (NBD-Cl) и последующим анализом методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. Нижний предел обнаружения для данного способа составил 0.05 нг на инъекцию. Простота, хорошая воспроизводимость метода и достаточная чувствительность, делают возможным его практическое применение для терапевтического мониторинга уровня N-ацетилцистеина в плазме крови.

**Ключевые слова:** N-ацетилцистеин, плазма крови, обращенно-фазовая ВЭЖХ, УФ-детектирование, дериватизация, 4-хлор-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазол.

## A new way to determine N-acetylcysteine in blood plasma by derivatization and HPLC with UV detection

Nikitin D.A.<sup>1</sup>, Rudakova L.V.<sup>2</sup>, Dutov A.A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Voronezh State University, Voronezh

<sup>2</sup>Voronezh State Medical University, Voronezh

<sup>3</sup>Transbaikal State University, Chita

N-acetylcysteine is a medicinal substance used in various medicinal products (mucolytic drugs, cytoprotective agents, drugs for chemotherapy of oncological diseases). There are many methods of HPLC analysis of N-acetylcysteine. Most of these techniques are based on the reaction of the sulfhydryl group of N-acetylcysteine with reagents, resulting in the formation of fluorescent derivatives. These methods are characterized by non-optimal conditions of derivatization reactions, the complexity of chromatographic separation of derivatives and high cost of reagents. Thereby the aim of this work was to develop a simple, quick and affordable way to determine N-acetylcysteine in serum plasma.

Blood plasma of patients taking N-acetylcysteine is analyzed. Blood sampling was performed 1 hour after oral administration or intravenous administration.

A solution of 4-chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-Cl) in acetonitrile was proposed as a derivatization reagent. This reagent is commercially available. In aqueous solutions and organic solvents it reacts quickly with primary and secondary amino groups, and in alkaline environment reacts with phenolic hydroxyls and sulfhydryl groups. Wherein stable chromophores/fluorophores groups with a maximum absorption in the visible range from 425 to 476 nm are formed. 1,4-dithioerythritol was used as the reducing reagent.

The studies were carried out using a high-performance liquid chromatograph which includes a high-pressure pump («Shimadzu» LC-20AT Prominence), a spectrophotometric detector («Shimadzu» SPD-20A

Prominence), a manual injector ("Rheodyne" 7725i). Data processing was carried out using software (Amersand, Multichrome version 3.0).

Chromatography of the standard and the plasma extract was carried out by two ways: 1) on a Chromolith Performance RP-18e column,  $100 \times 4.6$  mm, detection at 425 nm, eluant is acetonitrile-0.05 M phosphate buffer (pH=8.0; v/v=18:82), flow rate is  $2000 \mu\text{l} / \text{min}$ , pressure is 40 bars; 2) on a Gemini (Phenomenex) column  $50 \times 4.6$  mm, C18,  $5 \mu\text{m}$ , detection at 425 nm, eluent is acetonitrile - 0.01 M phosphate buffer (pH=7.0; v/v=20: 80), a flow rate is  $1000 \mu\text{l} / \text{min}$ , a pressure is 35 bar.

The results of the chromatographic study showed that the polar aminothiols are eluted by one peak, the less polar derivative of the N-acetylcysteine is completely separated from them, as well as from the degradation product (NBD-OH). After intravenous administration of the drug, its concentration in the plasma is higher and the separation is realized on a short column in this case.

Thus, the developed chromatographic method for determining N-acetylcysteine in blood plasma after derivatization with 4-chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole and subsequent HPLC analysis with UV detection is simple, well reproducible and sufficiently sensitive. The quantification limit (LOQ) is 0.05 ng per injection.

**Keywords:** N-acetylcysteine, blood plasma, reverse-phase HPLC, UV detection, derivatization, 4-chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole.

## Введение

N-ацетилцистеин (АЦЦ) известен в основном как муколитическое средство. Кроме того, его используют при интоксикации ацетаминофеном, он оказывает цитопротекторное действие при химиотерапии онкологических заболеваний и предупреждает развитие нефропатии в результате использования рентгеноконтрастных средств [1]. Сульфгидрильная (SH) группа N-ацетилцистеина ответственна за его метаболическую активность, ацетильная группа делает молекулу более устойчивой к окислению и деструкции пищеварительными ферментами [2]. N-ацетилцистеин чаще рассматривают как пролекарство глутатиона [3], который в клетках и в плазме сыворотки деацетируется, превращаясь в L-цистеин (рис.1), который в свою очередь идет на построение глутатиона [2, 4].



Рис. 1. Пути метаболизма N-ацетилцистеина.

Существует достаточное количество методик ВЭЖХ анализа N-ацетилцистеина, которые представлены в руководстве [5]. Большинство этих методик основано на реакции сульфгидрильной группы N-ацетилцистеина с реагентами, в результате чего образуются флюоресцирующие производные. Эти методики отличаются неоптимальными условиями дериватизационных реакций, сложностью хроматографического разделения дериватов и малой коммерческой доступностью реагентов. В связи с этим нами была поставлена задача разработать простой, быстрый и доступный способ определения N-ацетилцистеина в плазме сыворотки, для решения которой предложено использовать недорогой дериватизационный реагент – 4-хлор-

7-нитро-2,1,3-бензоксадиазол (NBD-Cl) и последующий анализ методом ВЭЖХ с УФ-детектированием.

## Эксперимент

**Реагенты и растворители.** В работе применяли следующие реактивы: D,L-гомоцистеин (> 98%, Fluka), L-цистеин (>97.5%, Sigma-Aldrich), глутатион восстановленный (>97.5%, Sigma-Aldrich), N-ацетилцистеин (>98%, Fluka), 1,4-дитиоэритритол (ДТТ) (>99%Fluka). Исходные растворы аналитов (1 мг/мл) получали растворением точных навесок в 0.01 н HCl, полученные растворы хранили при температуре +4°C. Для перорального приема использовали N-ацетилцистеин (Sandoz®), а для в/в введения флуимуцил (Zambon®, Италия). Дериватизационный реагент – 4-хлор-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазол готовили растворением в ацетонитриле (1 мг/см<sup>3</sup>) [5]. Данный реагент является коммерчески доступным. В водных растворах и органических растворителях он быстро реагирует с первичными и вторичными аминогруппами, а в щелочной среде – с фенольными гидроксилами (phenolic OH) и сульфгидрильными (SH) группами. При этом образуются стабильные хромофоры/флюорофоры с максимумом поглощения в видимой области от 425 до 476 нм [6].

В качестве восстанавливающего реагента использовали 1,4-дитиоэритритол. Его раствор готовили путем его растворения в 0.25 М фосфатном буферном растворе с pH 8.0 (4 мг/см<sup>3</sup>). Использовали только свежеприготовленный раствор.

**Оборудование.** Исследования проводили с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа, в комплектацию которого входят: насос высокого давления («Shimadzu» LC-20AT Prominence), спектрофотометрический детектор («Shimadzu» SPD-20A Prominence), ручной инжектор («Rheodyne» 7725i). Обработку данных проводили с применением программного обеспечения («Амперсанд», Мультихром версия 3.0).

**Биологический материал.** Забор крови осуществляли через час после перорального или внутривенного введения. Кровь забирали в 5-мл пробирки Vacutainer с ЭДТА и центрифугировали 5 мин при 3000 обр. (СМ-6М, Elmi, Latvia). Если анализ не проводился в тот же день, плазму помещали в 2-мл полипропиленовые пробирки и хранили до анализа при температуре –20°C.

**Дериватизация.** Растворы стандартов готовили, добавляя к 80 мкл плазмы 10 мкл N-ацетилцистеина (100 нг/мкл) и 10 мкл ДТТ. Полученную смесь выдерживали 10 мин при 50°C.

Подготовка плазмы пациента, принимающего N-ацетилцистеин, заключалась в том, что к 90 мкл плазмы добавляли 10 мкл ДТТ и выдерживали 10 мин при 50°C.

После этого, к стандарту и плазме пациента добавляли по 100 мкл раствора NBD-Cl, интенсивно перемешивали на вортексе в течение 5 мин и центрифугировали 1 мин при 10000 обр/мин. Отбирали часть супернатанта и вводили в петлю инжектора 5 мкл стандарта (25 нг) или 11 мкл плазмы пациента (0.005 см<sup>3</sup>).

## Обсуждение результатов

Результаты хроматографического разделения представлены в таблице 1. В этих условиях полярные аминотиолы элюируются одним пиком, менее полярный дериват АЦЦ полностью от них отделен (рис. 2), также как от продукта деградации (NBD-OH).

Таблица 1. Хроматографические параметры NBD-производных аминотиолов.

Стандарты, по 25 нг каждого	$t_R$	h, mV
<i>I</i>	2	3
Цистеин (Cys)	1.29	26.7
<i>I</i>	2	3
Гомоцистеин (Hcy)	1.28	31.8
Глутатион (GSH)	1.27	51.2
N-ацетилцистеин (АЦЦ)	1.96	65.0
NBD-ОН	3.75	20.0

$t_R$  – время удерживания (мин), h, mV – высота пика. NBD-ОН – продукт деградации дериватизационного реагента.

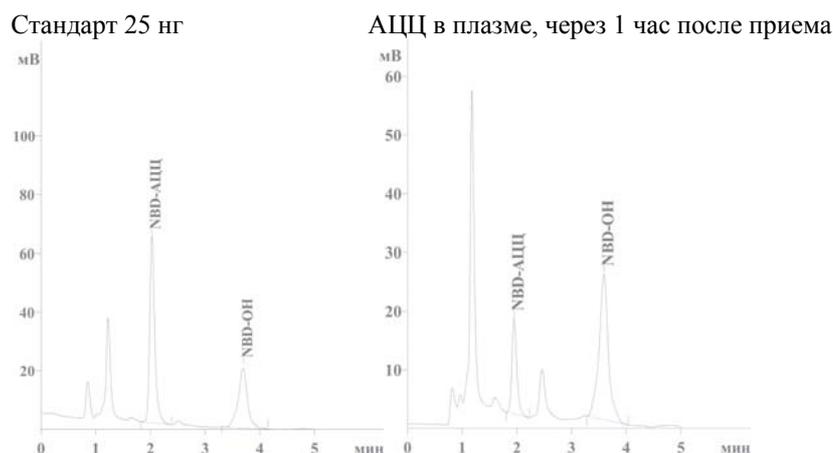


Рис. 2. Хроматограммы стандарта и экстракта плазмы пациента через 1 час после перорального приема 600 мг АЦЦ. Рассчитанная концентрация АЦЦ 3.1 мкг/см<sup>3</sup>. Хроматографическое разделение проводилось на колонке Chromolith Performance RP-18e, 100×4.6 мм, детекция при 425 нм, используемый элюент ацетонитрил – 0.05 М фосфатный буферный раствор с рН 8.0 (18:82, v/v), скорость потока 2000 мкл/мин, давление 40 бар.

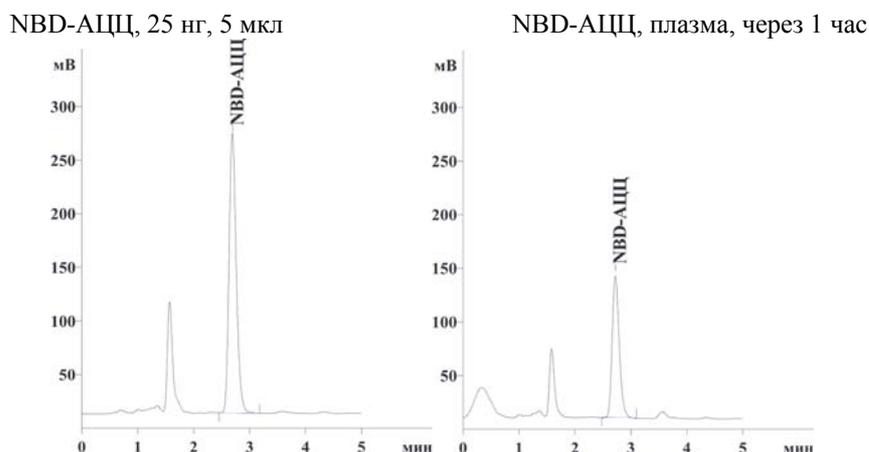


Рис. 3. Хроматограммы стандарта и экстракта плазмы пациента через 1 час после в/в введения 1200 мг АЦЦ. Рассчитанная концентрация АЦЦ 29.5 мкг/мл. Пик NBD-ОН на хроматограмме не показан (элюируется после 5-й мин). Колонка Gemini (Phenomenex) 50 × 4.6 мм, С18, 5 мкм, детекция при 425 нм, элюент ацетонитрил – 0.01 М фосфатный буферный раствор рН 7.0 (20:80, v/v), скорость потока 1000 мкл/мин, давление 35 бар.

Гораздо более высокие концентрации АЦЦ в крови обнаруживаются после внутривенного введения препарата (рис. 3). В этом случае разделение реализуется на короткой колонке.

## Заключение

Таким образом, разработанный хроматографический способ определения N-ацетилцистеина в плазме крови после дериватизации с 4-хлор-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазолом и последующим анализом методом ВЭЖХ с УФ-детектированием отличается простотой, хорошей воспроизводимостью и достаточной чувствительностью. Нижний предел обнаружения для данного способа составил 0.05 нг на инъекцию. Простота, хорошая воспроизводимостью метода и достаточная чувствительность, делают возможным его практическое применение для терапевтического мониторинга уровня N-ацетилцистеина в плазме крови.

## Список литературы

1. Nolin T.D., Ouseph R., Himmelfarb J., McMenamin M.E. et al. // *Clin J Am. Soc Nephrol.* 2010. Vol. 5. pp. 1588-1594.
2. Kelly G.S. // *Alt Med Rev.* 1998. Vol. 3(2). pp. 114-127.
3. Cacciatore I., Cornacchia C., Pinnen F., Mollica A. et al. // *Molecules.* 2010. Vol. 15. pp. 1242-1264.
4. De Caro L., Ghizzi A., Costa R., Longo A. et al. // *Arzneim Forsch Drug Res.* 1989. Vol. 39. pp. 382-386.
5. Рудаков О.Б., Селеменев В.Ф., Рудакова Л.В. ВЭЖХ. Сорбаты, сорбенты и элюенты. Воронеж. ВГАСУ. 2016. 205 с.
6. Lynn G., Hellwig L.C. Handbook of derivatization reactions for HPLC. John Wiley & Sons, Inc. 1998. 1795 p.

## References

1. Nolin T.D., Ouseph R., Himmelfarb J., McMenamin M.E. et al., *Clin J Am. Soc Nephrol*, 2010, Vol. 5, pp. 1588-1594.
2. Kelly G.S., *Alt Med Rev*, 1998, Vol. 3(2), pp. 114-127.
3. Cacciatore I., Cornacchia C., Pinnen F., Mollica A. et al., *Molecules*, 2010, Vol. 15, pp. 1242-1264.
4. De Caro L., Ghizzi A., Costa R., Longo A. et al., *Arzneim Forsch Drug Res*, 1989, Vol. 39, pp. 382-386.
5. Rudakov O.B., Selemenov V.F., Rudakova L.V. HPLC. Sorbaty, sorbenty i ehlyuenty, Voronezh, VGASU, 2016, 205 p.
6. Lynn G., Hellwig L.C., Handbook of derivatization reactions for HPLC. John Wiley & Sons, Inc., 1998, 1795 p.

**Дутов Алексей Александрович** – д.м.н., проф. кафедры химии Забайкальского Государственного Университета, Чита.

**Никитин Денис Александрович** – аспирант кафедры аналитической химии Воронежского государственного университета, Воронеж

**Рудакова Людмила Васильевна** – д.х.н., доцент, заведующий кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии Воронежского государственного медицинского университета, Воронеж

**Dutov Alexey A.** – doctor of science, prof. Department of Chemistry, Transbaikal State University, Chita. e-mail: [dutovaa@yandex.ru](mailto:dutovaa@yandex.ru)

**Nikitin Denis A.** – post graduate student, department of analytical chemistry, chemical faculty, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: [nikitind@gmail.com](mailto:nikitind@gmail.com)

**Rudakova Lyudmila V.** – doctor of science, head of Department of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology, pharmaceutical faculty, Voronezh State Medical University, Voronezh, e-mail: [vodoley65@mail.ru](mailto:vodoley65@mail.ru)