

1 – ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», химический факультет, кафедра аналитической химии, 119991, Россия, г. Москва, Ленинские горы, ГСП-2, 1, стр. 3

2 – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, 127051, Россия, г. Москва, Петровский б-р, 8, стр. 2

1 – M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, 1/3, Leninskie gory, Moscow, 119991, Russia

2 – Federal State Budgetary Institution «Scientific Center for Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8/2, Petrovskiy blv., Moscow, 127051, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: a.a.chaplenko@yandex.ru
Тел.: 8 (495) 939 25 79

СОРБЦИОННО-ЦВЕТOMETРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В ЛЕКАРСТВЕННОЙ СУБСТАНЦИИ ТЕТРАЦИКЛИНА ГИДРОХЛОРИДА И В РАСТВОРЕ ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ ЦИАНОКОБАЛАМИНА

А.А. Чапленко^{1,2*}, О.В. Моногарова¹, К.В. Осолок¹,
С.А. Чапленко¹

Резюме. Предложен простой и доступный способ цветометрического определения тетрациклина в виде окрашенного комплекса с ионами железа(III) и витамина В₁₂ в виде окрашенного комплекса кобальта(II) после химической минерализации цианокобаламина. Для отделения от сопутствующих компонентов фармацевтических препаратов аналиты извлекали из растворов с помощью сорбента, изготовленного из пенополиуретана на основе простых эфиров. Оптимизированы условия сорбционного извлечения и измерения аналитического сигнала указанных веществ. Полученные результаты хорошо согласуются с данными, заявленными производителями. Адекватность предложенного подхода подтверждена результатами косвенного рентгенофлуоресцентного анализа субстанции тетрациклина и раствора для инъекций витамина В₁₂ (цианокобаламина).

Ключевые слова: тетрациклин, цианокобаламин, пенополиуретановый сорбент, цветометрия.

SORPTION-CHROMATICITY DETERMINATION OF ACTIVE INGREDIENTS IN DRUG SUBSTANCE TETRACYCLINE HYDROCHLORIDE AND IN CYANOCOBALAMIN SOLUTION FOR INJECTION

A.A. Chaplenko^{1,2*}, O.V. Monogarova¹, K.V. Oskolok¹, S.A. Chaplenko¹

Abstract. The simple and available technique of determination of tetracycline in the form of colored complex with iron(III) ions and B₁₂ vitamin in the form of the colored thiocyanate complex of cobalt(II) after a chemical mineralization of cyanocobalamin is offered. The analytes were separated from the accompanying components by sorption to polyurethane foam based on ethers. The conditions of sorption separation and measurement of analytical signal of these substances are optimized. The obtained results are in satisfactory agreement with data declared by the manufacturer. The adequacy of proposed approach is confirmed by results of indirect X-ray fluorescence analysis of tetracycline drug substance and injection solution B₁₂ vitamin (cyanocobalamin).

Keywords: tetracycline, cyanocobalamin, polyurethane foam sorbent, chemical chromaticity method.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важных задач фармацевтической химии является разработка эффективных способов определения действующих веществ в лекарственных препаратах [1]. Согласно российской и зарубежным фармакопеям для определения действующих веществ в фармацевтических препаратах традиционно используют как химические, так и инструментальные методы, например высокоэффективную жидкостную хроматографию или инфракрасную спектроскопию [2–4]. Низкая селективность первых существенно ограничивает круг определяемых действующих веществ, а высокая стоимость последних и требования к квалификации оператора – доступность для полевых лабораторий и производственных аптек. В связи с этим разработка технически простых и достаточно селективных способов определения действующих веществ в лекарственных

препаратах является актуальной задачей современной фармацевтической химии.

К числу таких простых и доступных методов анализа относится цветометрия. Цветометрические методики широко используются в аналитической химии, а их комбинация с цифровой обработкой получаемых изображений открывает широкие перспективы для расширения областей применения и улучшения метрологических характеристик [5].

Цель настоящей работы – иллюстрация возможностей комбинированного химико-инструментального подхода, основанного на сорбционном извлечении действующих веществ из фармацевтических препаратов с последующим цветометрическим определением. Функция сорбента не ограничена исключительно стадией разделения и концентрирования. Поскольку фаза сорбента играет роль некой универсальной среды с постоянными свойствами, при-

нимающей участие в формировании аналитического сигнала и обеспечивающей единство условий его измерения, определение больших содержаний лекарственных веществ также должно осуществляться посредством перевода аналита в фазу сорбента. Для сорбционного извлечения действующих веществ из растворов использовали сорбенты, изготовленные из пенополиуретана (ППУ) на основе простых эфиров. Они очень дешёвы и доступны, обладают высокой химической, механической и термической устойчивостью. Для многих классов органических и неорганических соединений ППУ-сорбенты обеспечивают высокие коэффициенты распределения в системе «водный раствор – сорбент», составляющие от 3 до 5 порядков [6]. Для измерения аналитического сигнала – интенсивности окраски образца – вместо дорогостоящего оборудования предложено использовать простое, недорогое и доступное измерительное устройство – офисный планшетный сканер. Для обработки растровых изображений, полученных на сканере, можно использовать графический редактор.

Продукты физико-химического взаимодействия ППУ с лекарственными веществами, как правило, содержат функционально-аналитические хелатообразующие группы, способные связывать ионы переходных металлов в устойчивые комплексные соединения. Данное обстоятельство может быть использовано в работе для проверки адекватности цветометрических методик с помощью косвенного рентгенофлуоресцентного (РФ) определения указанных выше органических веществ определением аналитов по «тяжёлым меткам» – ионам металлов, образующих устойчивые комплексные соединения с соответствующими действующими веществами [7].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты и материалы

Для сорбционного извлечения действующих веществ применяли ППУ на основе простых эфиров марки 5-30 (ГПО «Радикал», Украина). Для очистки от органических примесей и технологических примесей металлов таблетку ППУ массой ~0,2 г (размер 10×10 мм, толщина 1 мм) последовательно промывали в 1 М растворе HCl, ацетоне и деионизированной воде (приблизительно в течение часа в каждом растворе), после чего высушивали до воздушно-сухого состояния и сразу же использовали для сорбции. Степень очистки от металлов выборочно контролировали РФ-методом. В работе использовали государственный стандартный образец (ГСО) ионов кобальта(II), раствор в ампулах 5 мл, содержание ионов кобальта 0,999 мг/мл (ЭАА «Экоаналитика», Россия, серия 7784-2000, годен до 08.2017 г.); субстанции (х.ч.); NaF (кат. № 01148), KSCN (кат. № 207799), NaOH (кат. № S8045), FeCl₃ (кат. № 157740); концентрированные растворы кислот (х.ч.) – серной (кат. № 258105), соляной (кат. № 258148), ацетон (х.ч.) (кат. № 179124) (все – Sigma-Aldrich, США); цианокобаламина раствор для инъекций 0,5 мг/мл в ампулах по 1 мл (Борисовский завод ме-

дицинских препаратов, Беларусь, серия 00G272, срок годности до 06.2019 г.); фармацевтическая субстанция-порошок тетрациклина гидрохлорида (North China Pharmaceutical Goodstar Co., Китай, серия 98874НК, срок годности до 07.2017 г.). В качестве стандартного образца тетрациклина гидрохлорида использовали раствор субстанции тетрациклина (1 мг/мл), описанной выше, качество которой подтверждено согласно методам, описанным в фармакопейной статье Европейской Фармакопеи 8 изд. «Tetracyclini hydrochloridum» [2], содержание тетрациклина составило 99,4±0,2%.

В работе использовали перемешивающее устройство модели 6500 производства группы компаний «Экрос», Россия.

Пробоподготовка лекарственных средств и приготовление градуировочных растворов

Тетрациклина гидрохлорид. Для приготовления анализируемого раствора тетрациклина 0,250 г фармацевтической субстанции тщательно измельчили в фарфоровой ступке, количественно перенесли в мерную колбу объемом 100,0 мл, растворили в 30 мл 0,01 М NaOH, встряхивая на перемешивающем устройстве в течение 60 мин, после чего раствор довели до метки 0,01 М NaOH. Аликвоту (1,00 мл) полученного раствора перенесли в мерную колбу объемом 25,0 мл, добавили 1,00 мл раствора FeCl₃ (1 мг/мл) и довели раствор до метки деионизированной водой, подкисленной до pH 2-3 добавлением HCl 1М. Полученный раствор использовали для анализа. Для приготовления градуировочных растворов использовали стандартный образец субстанции тетрациклина, растворы готовили аналогично анализируемому, концентрации тетрациклина в градуировочных растворах: 0,0005; 0,001; 0,002; 0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 мг/мл.

Тетрациклин сорбировали на ППУ в виде комплексов с ионами железа(III). Для повышения равномерности распределения аналита по объёму сорбента из ППУ-таблеток, помещённых в водный раствор, с помощью стеклянной палочки были тщательно удалены пузырьки воздуха. Концентрирование проводили в статическом режиме, встряхивая приготовленные растворы с ППУ-сорбентом на перемешивающем устройстве в течение 60 мин. После промывания дистиллированной водой ППУ-таблетки были высушены между листами фильтровальной бумаги.

Цианокобаламин. Пробоподготовка лекарственного препарата цианокобаламина включала этап минерализации. Содержимое 5 ампул выпарили досуха в фарфоровом тигле, к остатку прибавили 5 мл концентрированной H₂SO₄ и продолжили нагревание в течение 5 мин. Полученный после прокаливания остаток количественно перенесли в мерный фторопластовый стакан и растворили в 5 мл деионизированной воды, подщелоченной 1М NaOH до pH 10-11. Во фторопластовый стакан также вносили точные навески 50,0 мг NaF и 50,0 мг KSCN и встряхивали полученную смесь на перемешивающем устройстве до полного растворения. Раствор количественно перенесли в мер-

ную колбу вместимостью 25,0 мл и довели до метки деионизированной водой, подкисленной HCl 1M до pH 2-3.

Для приготовления градуировочных растворов использовали ГСО ионов кобальта(II). С помощью мерной пипетки отбирали аликвоту ГСО-раствора ионов кобальта(II) (0,999 мг/мл) объемом 1,00 мл и количественно переносили в колбу вместимостью 10,0 мл, в которую предварительно внесли точные навески 50,0 мг NaF и 50,0 мг KSCN, объем смеси довели до метки деионизированной водой, подкисленной HCl 1M до pH 2-3 и встряхивали до полного растворения. Полученный раствор последовательно разбавляли в 2 и в 5 раз. Содержание ионов кобальта(II) в градуировочных растворах: 0,0005; 0,001; 0,002; 0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 (что соответствует интервалу содержаний цианокобаламина от 0,01 до 2,30 мг/мл).

Сорбцию тиоцианатных комплексов кобальта проводили аналогично сорбции комплексов тетрациклина. Полноту извлечения цианокобаламина проверяли косвенным РФ-методом при повторном добавлении таблетки ППУ к исследуемым растворам после проведения сорбции.

Измерение аналитического сигнала

Измерение аналитического сигнала (светлоты выбранного цветового канала) цветометрическим методом выполнено с помощью офисного сканера LaserJet M1120 MFP (Hewlett-Packard, США) и программы для просмотра и обработки растровых изображений Gimp 2.8.16 (The GIMP Team, США). Параметры сканирования: цветовой режим – цветное изображение; тип – фото; разрешение – 300 dpi. Обработка изображений таблеток ППУ и определение светлоты цветового R-канала (L_R) выполнены в графическом редакторе. Аналитический сигнал измеряли по шкале RGB-модели как светлоту B-канала в условных единицах от 0 до 255.

Для проверки адекватности предложенного подхода косвенное РФ-определение лекарственных веществ на ППУ-сорбенте проводили с использованием светосильного бесколлиматорного последовательного РФ-спектрометра «Спектроскан Макс-Г» (НПО «Спектрон», Россия). Прибор укомплектован мало-мощной (4 Вт) острофокусной (3 мм) рентгеновской трубкой трансмиссионного типа с тонкоплёночным (2 мкм) Mo-анодом. Рабочее напряжение 40 кВ. Сила тока 100 мкА. Разложение вторичного рентгеновского излучения в спектр реализовано по схеме Иоганссона с помощью кристалла-анализатора LiF (200) ($2d=0,4028$ нм). Спектрометр укомплектован отпаянным газоразрядным пропорциональным счётчиком. Для измерения РФ-спектров ППУ-таблетки помещали в специально изготовленные кюветы, характеризующиеся низким уровнем рассеянного первичного излучения [8]. Для каждого образца сорбента измеряли амплитудное распределение интенсивности линий CoK_{α} , FeK_{α} в интервалах длин волн $0,1790 \pm 0,0050$ нм, $0,1937 \pm 0,0050$ нм соответственно. Время экспозиции

60 с. В качестве аналитического сигнала использовали интегральные интенсивности соответствующей линии за вычетом фонового сигнала. Для учета влияния положения образца под зондом на неопределённость результатов измерения аналитический сигнал измеряли 4 раза при повороте ППУ-таблетки на 90°.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация условий сорбции комплексов на ППУ-сорбенте

Для оптимизации условий сорбции роданидных комплексов Co(II) и хелатов тетрациклин-Fe(III) экспериментально определен оптимальный pH сорбции комплексов (для комплекса тетрациклина-Fe(III) pH составляет 5–6, для роданидных комплексов кобальта – 2–3) и времени контакта фаз на степень извлечения аналитов (рисунок 1). Показано, что время контакта фаз, необходимое для достижения максимальной сорбции, для изученных соединений наблюдается через 50–70 мин (рисунок 1).

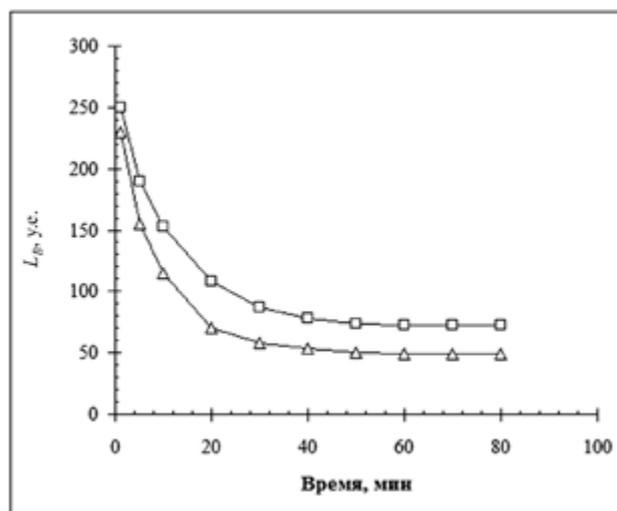


Рисунок 1. Зависимость светлоты цветового канала (L_B) от времени сорбции: Δ – для роданидного комплекса кобальта(II), \square – для тетрациклина-Fe(III)

Сорбционно-цветометрическое и косвенное РФ-определение действующих веществ

Метрологические характеристики цветометрического и косвенного РФ-определения действующих веществ в лекарственных препаратах после сорбционного извлечения на ППУ представлены в таблицах 1, 2. Для иллюстрации возможностей развитого комплексного подхода при анализе лекарственных препаратов, содержащих металлоорганические действующие вещества, в работе предложен способ определения витамина B_{12} . Процедура включает химическую минерализацию цианокобаламина, извлечение ионов кобальта(II) в виде роданидных

комплексов из водных растворов на ППУ-сорбенте с последующим цветометрическим и косвенным РФ-измерением аналитического сигнала. Роданидный комплекс кобальта окрашивает ППУ-сорбент в голубой цвет, комплекс тетрациклин-Fe(III) – в сиренево-серый. Проверку правильности определения витамина В₁₂ проводили способом «введено – найдено» (таблица 3). Результаты определения действующих веществ в фармацевтических препаратах цветометрическим и косвенным РФ-методами представлены в таблице 4.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, развитый химико-инструментальный подход применим для определения органических и металлоорганических действующих веществ, одним из продуктов трансформации которых является окрашенное комплексное соединение. К таким фармацевтическим препаратам, например, относятся таблетки тетрациклина и раствор цианокобаламина для инъекций, для них представлена методика определения содержания действующего вещества. Предложенный подход доступен, технически прост, для измерения аналитического сигнала не требуются специализированные и дорогостоящие приборы. Методика, представленная в статье, может быть использована в малобюджетных лабораториях, а также для предварительного скрининга препаратов, не соответствующих требуемым нормам, при проведении контроля качества фармацевтических препаратов.

Таблица 1.

Метрологические характеристики цветометрического определения лекарственных веществ после сорбционного извлечения с использованием ППУ-сорбентов (n=5, P=0,95)

| Лекарственное вещество | R ² | Диапазон определяемых содержаний, мг/мл | C _{min} , мг/мл | S _r |
|------------------------|----------------|---|--------------------------|----------------|
| Цианокобаламин | 0,9933 | 0,3–1,5 | 0,090 | 0,030 |
| Тетрациклин | 0,9881 | 0,02–0,2 | 0,018 | 0,007 |

Таблица 2.

Метрологические характеристики косвенного РФ-определения лекарственных веществ после сорбционного извлечения на ППУ-сорбентах (n=5, P=0,95)

| Лекарственное вещество | R ² | Диапазон определяемых содержаний, мг/мл | C _{min} , мг/мл | S _r |
|------------------------|----------------|---|--------------------------|----------------|
| Цианокобаламин | 0,9940 | 0,2–1,4 | 0,12 | 0,04 |
| Тетрациклин | 0,9916 | 0,05–0,2 | 0,024 | 0,009 |

Таблица 3.

Проверка правильности сорбционно-цветометрического и косвенного сорбционно-рентгенофлуоресцентного определения действующего вещества в растворе цианокобаламина для инъекций способом «введено – найдено» (n=5, P=0,95)

| Введено | m цианокобаламина, мг | |
|---------|-----------------------|------------|
| | Найдено | |
| | Цветометрия | РФА |
| 0,5 | 0,50±0,05 | 0,045±0,06 |
| 1,0 | 1,05±0,07 | 0,94±0,09 |

Таблица 4.

Цветометрическое и косвенное РФ-определение лекарственных веществ с использованием ППУ-сорбентов (n=5; P=0,95)

| Лекарственное вещество | m, мг/проба | | |
|------------------------|--------------------------------|-------------|----------|
| | согласно фармакопейным методам | цветометрия | РФА |
| Цианокобаламин | 2,50±0,02 | 2,4±0,1 | 2,6±0,20 |
| Тетрациклин | 248,5±0,5 | 244±14 | 251±27 |

ЛИТЕРАТУРА

1. А. П. Арзамасцев. Фармацевтическая химия. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2004. 640 с.
2. European Pharmacopoeia (2014) (Ph. Eur.) 8th edition.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. 2015.
4. The United States Pharmacopoeia 33 – National Formulary 28, Reissue 2010.
5. V.M. Ivanov, O.V. Monogorova, K.V. Oskolok. Capabilities and prospects of the development of a chromatography method // Journal of Analytical Chemistry. 2015. V. 70. № 10. P. 1165–1178.
6. С.Г. Дмитриенко, В.В. Апяри. Пенополиуретаны: Сорбционные свойства и применение в химическом анализе. – М.: Крассанд, 2010. 264 с.
7. А.А. Чапленко, О.В. Моногарова, К.В. Осолок, С.А. Чапленко. Определение микроэлементов в витаминно-минеральных комплексах и лекарственном растительном сырье рентгенофлуоресцентным методом с использованием диазотированных пенополиуретановых сорбентов // Микроэлементы в медицине. 2016. № 1(17). С. 30–37.
8. К.В. Осолок, О.В. Моногарова, Е.Д. Девяткина. Прямое рентгенофлуоресцентное определение ртути на пенополиуретановом сорбенте // Вестник Московского университета. Серия 2, Химия. 2012. № 2(53). С. 115–118.