

УДК 615.014.47:543.422.3-76:51-37

<https://www.doi.org/10.34907/JPQAI.2021.40.20.002>

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА КОМПОНЕНТОВ СМЕСИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ МЕТОДОМ ПРОИЗВОДНЫХ УФ-СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПОЛИНОМОВ ЧЕБЫШЕВА

Т.Н. Цокова, канд. биол. наук, доцент кафедры медицинской и биологической физики с курсом информатики, ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Тюмень, tcokova@mail.ru

Л.И. Котлова, канд. фарм. наук, доцент кафедры фармацевтической химии, ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Тюмень, cot4801@mail.ru

Представлены результаты разработки и валидации метода количественного определения веществ в лекарственных препаратах с использованием дифференцирования УФ-спектров поглощения полиномами Чебышева. Контроль правильности методики проводился на растворах таблеток «Цитрамона» разных производителей.

Ключевые слова: спектрофотометрия, валидация, численное дифференцирование, полиномиальная аппроксимация

Спектрофотометрия в УФ-области спектра широко применяется в фармацевтическом анализе. Разработано много методик для решения задач фармацевтического анализа: подлинность смеси, количественный состав смеси [1]. Идентификация и количественное определение лекарственных веществ в смеси по спектрам их поглощения затруднена тем, что полосы поглощения перекрываются. В этих случаях используют метод производной спектроскопии. На оси ординат записывают не оптическую плотность, а производную оптической плотности по длине волны [2,3]. Метод позволяет четко определять положение длины волны максимального поглощения,

суживает полосы поглощения и позволяет определять вещества при близких длинах волн, исключая их влияние друг на друга. Этот метод успешно используют в количественном анализе двух- и – реже – трехкомпонентных смесей. Применение метода основано на существовании прямо пропорциональной зависимости величины поглощения от концентрации вещества в анализируемом растворе:

$$D = \varepsilon \cdot c \cdot l.$$

При этом необходимо соблюдение принципа аддитивности оптических плотностей смеси [4].

Разновидностью метода производной спектрофотометрии является метод дифференцирования со сглаживанием. УФ-спектры поглощения описываются полиномами n -й степени [2]. Авторы разработали метод нахождения производных с помощью табличных значений полиномов Чебышева, которые связаны с производными простыми соотношениями. Метод не получил широкого распространения, т. к. для его реализации необходимо проводить математические вычисления, что требует автоматизации процесса расчетов.

В нашей работе [5] была описана методика определения концентрации лекарственного препарата в двухкомпонентной смеси методом производной УФ-спектрофотометрии с применением полиномов Чебышева. УФ-спектр поглощения аппроксимировался оптимальным полиномом n -го порядка. Коэффициенты полинома соответствовали значениям производной n -го порядка. Все расчеты осуществлялись в компьютерной программе [6].

Цель исследования – разработка и валидация метода количественного определения состава трехкомпонентных смесей лекарственных препаратов, используя производные УФ-спектров поглощения с применением полиномов Чебышева.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили лекарственные препараты – таблетки «Цитрамон-П» разных производителей и их модели. Концентрации компонентов смесей для создания моделей таблеток соответствовали ФС и подбирались в концентрациях, подобных их содержанию в таблетках. Спектры поглощения снимали на спектрофотометре СФ-2000-02. Производные от спектров поглощения вычисляли в компьютерной программе [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Весь процесс спектрального анализа с целью определения концентрации компонентов в смеси можно разделить на несколько этапов.

1. Приготовление растворов для исследования

Важным пунктом на этом этапе является выбор растворителя. Известно, что профиль УФ-спектров лекарственных веществ, особенно связанных с p -л, p -л* электронными

переходами, зависит от рН среды. Для изучения характера спектров в УФ-области молекулярной и ионной форм объектов исследования нами применялись 0,01 моль/л раствор хлороводородной кислоты и 0,01 моль/л раствор гидроксида натрия с добавлением этанола в соотношении 1:10. Было показано, что полоса поглощения с максимумом ионной формы по отношению к молекулярной форме кислоты ацетилсалициловой сдвинута гипсохромно на 18 нм (222 ± 2 нм и 194 ± 2 нм), ионной формы парацетамола 242 ± 2 нм в щелочном растворе сдвинута батохромно на 10 нм (254 ± 2 нм). Кофеин как соединение, не обладающее выраженными кислотно-основными свойствами, находясь в молекулярной форме, и в кислотной, и в щелочной средах имеет постоянный максимум в полосе поглощения при 272 ± 2 нм. Учитывая, что растворители и кислотный, и щелочной в диапазоне 180–200 нм сами сильно поглощают свет (рис. 1), нецелесообразно проводить анализ веществ в этом диапазоне, например, определять кислоту ацетилсалициловую по максимуму поглощения 194 ± 2 нм в щелочной среде. Лучше использовать кислотную среду, в которой максимум поглощения 222 ± 2 нм.

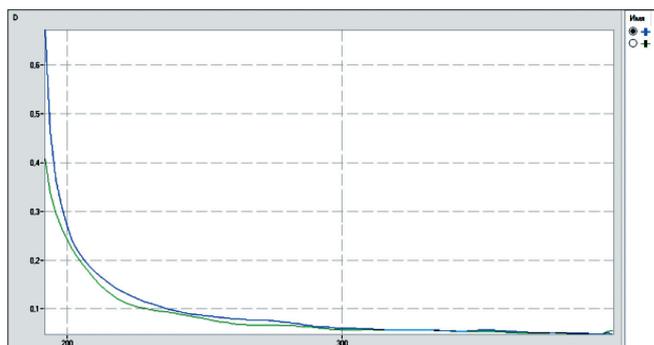


РИС. 1. УФ-спектры поглощения растворов сравнения относительно воздуха:
1 – раствор 0,001 М гидроксида натрия с добавлением этанола в соотношении 1:10 (синий), 2 – 0,001 М раствор кислоты хлороводородной с добавлением этанола в соотношении 1:10 (зеленый)

2. Работа с прибором СФ-2000

Из характеристик прибора следует, что при измерении оптической плотности до 1 погрешность составит 0,01. Это добавляет еще одно условие для снятия спектров – разводить пробы до концентраций, при которых оптическая плотность не превышает 1. Фотометрическая воспроизводимость при оптической плотности 1 не превышает значения 0,005.

На рис. 2 показаны УФ-спектры поглощения растворов таблеток «Цитрамон-П» разных производителей.

Спектры идентичны, различие только по высоте, которое возникает из-за разной навески порошка таблеток при приготовлении смеси. Спектр поглощения раствора Т№ 4 выше остальных и имеет значения оптической плотности больше 1. Расчет концентрации лекарственных веществ этого раствора показал недостоверный результат. Поэтому при приготовлении растворов для определения концентраций лекарственных веществ в одинаковых по составу смесях необходимо делать навески, примерно одинаковые по массе.

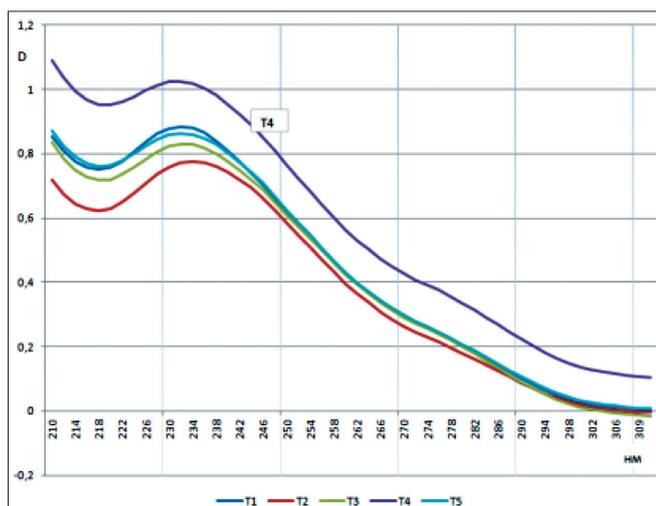


РИС. 2. *УФ-спектры поглощения раствора таблеток «Цитрамон-П» от пяти производителей (растворитель – спирт этиловый 98% – хлористоводородная кислота 0,01 моль/л в соотношении 1:10). СФ-2000, шаг 2 нм*

При спектральном анализе смеси некоторые компоненты входят в очень малых количествах, например, кофеин в таблетках «Цитрамона». При очень сильном разведении оптическая плотность становится меньше 0,01 на участках поглощения кофеина. Поэтому для анализа такие смеси исключаются.

3. Выбор шага сканирования

Выбор шага сканирования определяет разрешение и продолжительность снятия спектра. Наименьший разрешаемый спектральный интервал спектрофотометра СФ-2000 $1 \pm 0,4$ нм в диапазоне 190–390 нм (<http://www.labteh.com/productID411/>). Нами был проведен ряд опытов для определения оптимального шага сканирования, для чего были сняты УФ-спектры поглощения 0,002995% раствора модельной смеси таблеток «Цитрамона» с шагом 0,2 нм, 0,5 нм, 1 нм, 2 нм и 4 нм. Результаты представлены на рис. 3. Анализ графиков показывает, что шаг сканирования 4 нм не позволяет получить хорошего разрешения и спектр поглощения не имеет максимумов. При шаге 2 нм вид спектра не искажен, он такой же, как и при минимальном шаге 1 нм, следовательно, шаг сканирования 2 нм можно считать оптимальным.

4. Производная УФ-спектрофотометрия и производная УФ-спектрофотометрия с применением полиномов Чебышева

Программное обеспечение СФ-2000 позволяет производить вычисление первой или второй производной от выбранного спектра. Если взять производную второго порядка от производной второго порядка, получаем четвертую производную. На рис. 4а показан УФ-спектр поглощения таблеток «Цитрамона», на рис. 4б – вторая и четвертая производные от спектра поглощения по длине волны.

«Цитрамон» имеет в своем составе кислоту ацетилсалициловую с максимумом поглощения 222 ± 2 нм, парацетамол – 240 ± 2 нм, кофеин – 272 ± 2 нм. Цель применения метода

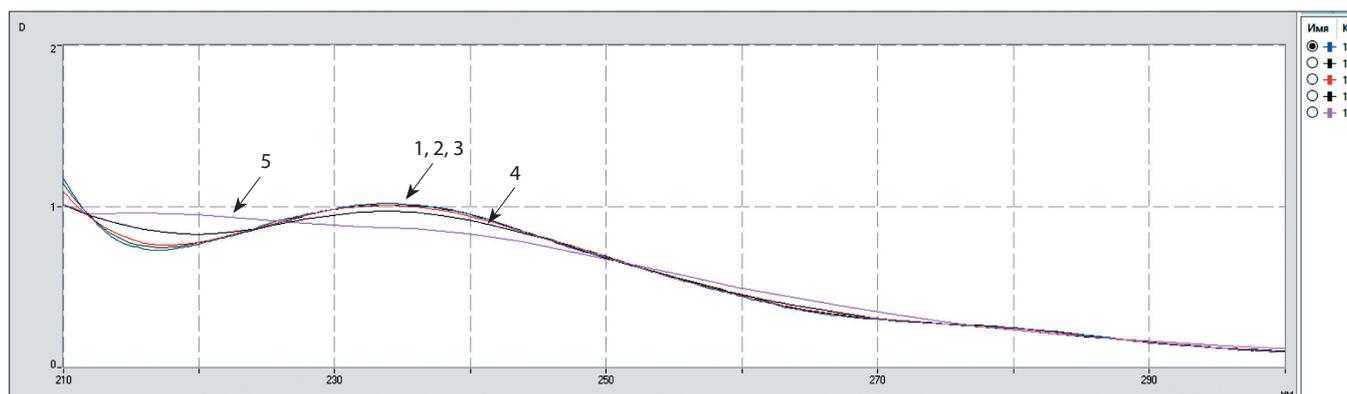


РИС. 3. УФ-спектр поглощения раствора модельной смеси таблеток «Цитрамона» с шагом 0,2 нм (1), 0,5 нм (2), 1 нм (3), 2 нм (4), 4 нм (5) (растворитель – спирт этиловый 98% – хлористоводородная кислота 0,01 моль/л в соотношении 1:10)

производной спектроскопии – в выделении индивидуальных полос из УФ-спектра. Спектр представляет собой сумму налагающихся полос поглощения или полос, не имеющих четко выраженного максимума (рис. 4а). На каждом шаге дифференцирования спектра появляются полосы с отчетливо выраженными максимумами и минимумами. Это позволяет идентифицировать состав смеси. На рис. 4б на графике 2-й производной отмечаем три основных максимума и побочные, которые называются сателлитами. Первый в районе 218 нм, второй – 258 нм и третий – в области 290 нм. Однако для данной смеси продолжать дифференцирование неуместно, т. к. число максимумов

увеличивается (рис. 4б – четвертая производная от спектра поглощения). Положение максимумов не соответствует длинам волн максимального поглощения трех компонентов смеси – 222 нм, 242 нм и 272 нм (аспирина, парацетамола, кофеина соответственно). Использование метода производных от спектров для исследования таблеток «Цитрамона» приведет к большим ошибкам.

5. Дифференцирование спектров поглощения полиномиальным методом

Основная цель дифференцирования спектров поглощения полиномиальным методом – аппроксимировать спектр поглощения

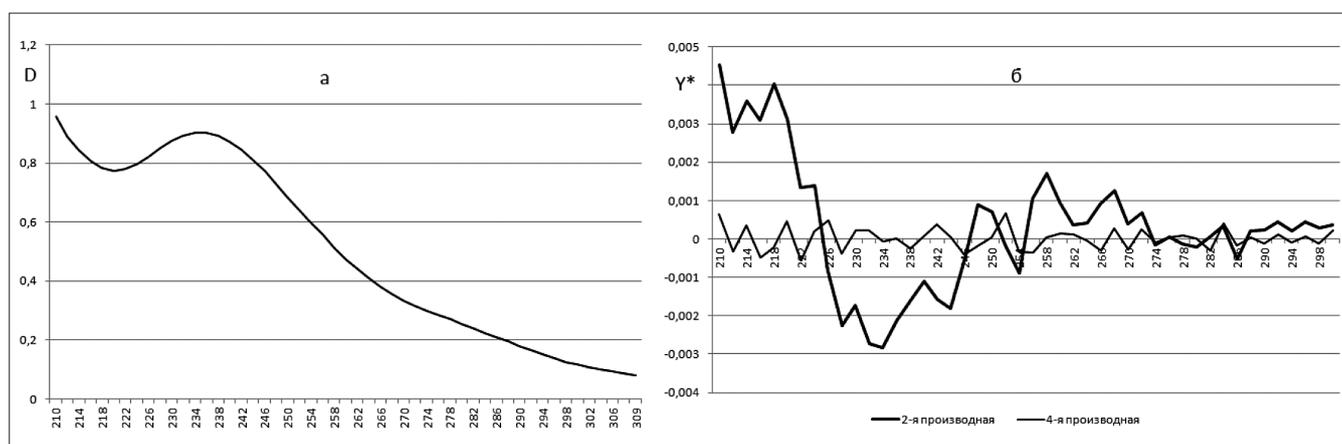


РИС. 4: а) УФ-спектр поглощения раствора таблеток «Цитрамона». Шаг 2 нм (растворитель – спирт этиловый 98% – хлористоводородная кислота 0,01 моль/л в соотношении 1:10; б) производные от УФ-спектра: 2-го порядка и 4-го порядка. СФ-2000

исследуемой смеси полиномом Чебышева. Коэффициенты полинома связаны со значением производных простым соотношением. Производные в точках максимумов спектра обусловлены только одним компонентом смеси, что позволяет оценить вклад каждого, без разделения полос поглощения, используя лишь значения коэффициентов оптимального полинома.

Для вычисления коэффициентов была составлена компьютерная программа, которая позволяет аппроксимировать спектр поглощения с любой точностью [7]. Оптические плотности вводятся в программу в виде файла с расширением ANSI, в который легко преобразуется файл спектра (столбец чисел в *спектр.txt*), выдаваемый прибором СФ-2000. Точность определяли по минимальной ошибке, которая рассчитывалась по формуле:

$$\sigma = \sqrt{\frac{(D_i - y(\lambda_i))^2}{n-1}},$$

где D_i и $y(\lambda_i)$ – значения оптической плотности спектра поглощения и аппроксимирующего полинома соответственно.

Расчеты оптимальной производной с помощью полиномов Чебышева показали, что наи-

меньшая ошибка соответствует полиному 9-го порядка (рис. 5). В первом столбце – вычисленные ошибки полиномов от 1 до 11 порядков. Второй столбец на рис. 5 показывает разрядность числа коэффициентов полиномов.

Ошибки значений коэффициентов полиномов 8 и 9 порядков примерно одинаковы $5,4 \cdot 10^{-03}$ (полином 8-го порядка) и $3,6 \cdot 10^{-03}$ (для 9-го порядка). Оба полинома хорошо аппроксимируют спектр поглощения и могут быть выбраны в качестве оптимального полинома. На рис. 6 показаны спектр поглощения и аппроксимирующий спектр поглощения – полином 9-го порядка.

6. Градуировочные графики

Нахождение оптимальной производной спектров поглощения необходимо для нахождения ее значений в точках максимального поглощения компонентов модельных смесей, используемых для построения градуировочных графиков. Большой разброс концентраций стандартных растворов неактуален ввиду ограниченной области возможных изменений концентрации исследуемого вещества в таблетках. Вторая причина того, что градуировочные графики строятся с небольшим различием в концентрациях, – оптимальные производные должны быть одного порядка.

CONCLUSION OF RESULTS		
1. VALUES OF DERIVATIVES		
Choose the optimal derivative value, corresponding to the minimum error (N = derivative order)		
error	max derivative value	
L 0 - .3019672		25.83374
L 1 - 8.376991E-02		217.7893
L 2 - 8.188932E-02		174.3461
L 3 - 5.217582E-02		8047.501
L 4 - 5.204165E-02		6107.554
L 5 - 3.509493E-02		800491.9
L 6 - 1.166569E-02		8764276
L 7 - 1.139097E-02		9162908
L 8 - 5.459004E-03		4.883734E+08
L 9 - 3.638987E-03		5.193789E+07
L 10 - 1.259523E-02		1.525704E+11
L 11 - 1.304155E-02		6.18418E+11

OPPOLINOM=
?

РИС. 5. Оптимальный полином 9-го порядка (минимальная ошибка $3,6 \cdot 10^{-03}$). (Компьютерная программа [6].)

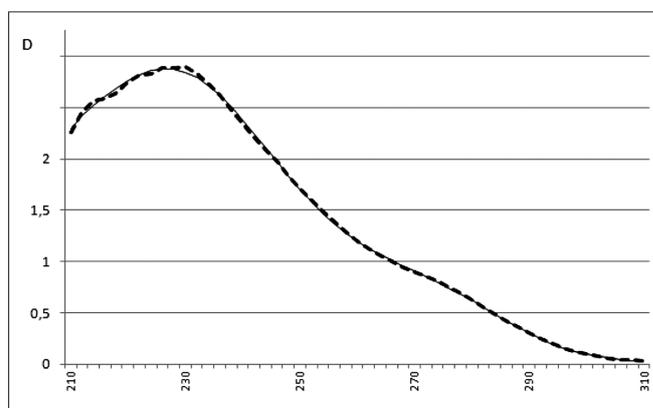


РИС. 6. УФ-спектр поглощения 0,00253% раствора модели таблеток «Цитрамона» – сплошная линия и аппроксимация полиномом 9-го порядка – пунктирная линия

Таблица 1

СРАВНЕНИЕ НАЙДЕННЫХ И ОЖИДАЕМЫХ ЗНАЧЕНИЙ МАСС ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ В ТАБЛЕТКАХ РАЗНЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В НАВЕСКАХ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Таблетки Цитрамон	Ожидаемое значение, мг	Найдено Аспирин, мг	Ожидаемое значение, мг	Найдено Парацетамол, мг	Ожидаемое значение, мг	Найдено Кофеин, мг
Таб. 1	242±12	246±4	181±12	191±0,3	33±2	30±0,5
Таб. 2	221±11	206±4	166±8	177± 0,3	28±1	27±0,5
Таб. 3	229±11	233±4	172±9	184±0,3	29±1	30±0,5
Таб. 4	248±12	304±4	186±9	227±0,3	31±2	45±0,5
Таб. 5	238±12	246±4	178±9	191±0,3	27±1	31±0,5

В нашем случае диапазон значений концентраций градуировочных смесей составлял: для кислоты ацетилсалициловой – 0,0011–0,0020%; для парацетамола – 0,0009–0,0015%, для кофеина – 0,00015–0,00030%.

Были получены уравнения: для кислоты ацетилсалициловой (222 нм) – $Y^* = 1716,25 + 5,9E^{+12} \cdot C, 5 \cdot 10^{-5}\%$; для парацетамола (242 нм) – $Y^* = 896,8186 + 1,98E^{+12} \cdot C, 2 \cdot 10^{-6}\%$; для кофеина (272 нм) – $Y_9 = 693,0353 + 1,09E^{+13} \cdot C, 4 \cdot 10^{-6}\%$. Y^* – значение оптимального коэффициента полинома 9-го порядка. Коэффициент корреляции равен 0,99 для всех уравнений.

Для контроля правильности используемой методики использовали растворы таблеток «Цитрамон-П» разных производителей:

- Т№ 1 – АО «Татхимфармпрепараты», г. Казань (серия 550920, годен до 10.24);
- Т№ 2 – АО «Медисорб», г. Пермь (серия 39042020, годен до 05.2024);
- Т№ 3 – ОАО «Дальхимфарм», г. Хабаровск (серия 440920, годен до 09.24);
- Т№ 4 – ОАО «Фармстандарт – Лексредства», г. Курск (серия 7941120, годен до 12.24);
- Т№ 5 – АО «Производственная фармацевтическая компания «Обновление», г. Новосибирск (серия 11120, годен до 12.24).

В табл. 1 приведены ожидаемые значения массы лекарственных веществ, содержащихся

в навесках таблеток, и найденные по градуировочным графикам значения. Сравнивая полученные массы с ожидаемыми (масса в навеске ±5%), можно сделать вывод, что найденные массы кислоты ацетилсалициловой, парацетамола, кофеина в таблетках № 1, № 2, № 3, № 5 входят в интервалы (5% погрешности) массы лекарственных веществ в навесках, взятых для исследования. Содержание веществ в смеси № 4, как и ожидалось, не соответствует требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания, поскольку навеска этого препарата отличалась от других на 0,03 г и при соответствующем разведении оптическая плотность этого препарата превышала 1.

ВЫВОДЫ

1. Проведен анализ выполнения алгоритма метода производных спектров поглощения в УФ-области полиномами Чебышева смесей лекарственных препаратов для определения концентраций их компонентов.

2. На каждом этапе выявлены возможные нарушения, приводящие к ошибкам в использовании предлагаемого метода. Представлены способы их устранения.

3. Следование требованиям метода (выбор растворителя, диапазон спектрального анализа УФ-спектров поглощения, шаг сканирования, расчет оптимальной производной и построение градуировочных графиков) позволяет утверждать, что метод применим для анализа многокомпонентной системы веществ, не реагирующих химически друг с другом. Метод позволяет находить концентрации лекарственных препаратов в смеси быстро и с хорошей точностью.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Власова И.В., Шилова А.В., Фокина Ю.С. Спектрофотометрические методы в анализе лекарственных препаратов (обзор) // Заводская лаборатория. Диагностика материалов, 2011, 77(1): 21–28.
2. Беликов В.Г., Вергейчик Е.Н., Саушкина А.С., Клочков С.В. Количественное определение лекарственных веществ в смесях методом производной спектрофотометрии // Современные методы анализа фармацевтических препаратов. 1988; XXVI: 7–9.
3. Федерякина А.С., Родионова Р.А. Применение производной спектрофотометрии для количественного определения действующих веществ лекарственного средства «Параскофен» // Вестник фармации. 2009; 2(44): 31–42.
4. Власова И.В., Вершинин В.И., Цюпко Т.Г. Методология спектрофотометрического анализа смесей органических соединений. Проблема неаддитивности светопоглощения // Журнал аналитической химии. 2011; 66(1): 25–33.
5. Цокова Т.Н., Котлова Л.И., Осипова А.В. Метод производной УФ-спектрофотометрии определения концентрации лекарственного препарата в смесях // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2013; 11(5): 694–698.
6. Автоматизированный способ разделения полос поглощения при спектрофотометрическом анализе лекарственных смесей (свидетельство №2020660335). Правообладатель: ФГБОУ ВО ТюмГМУ Минздрава РФ / Т.Н. Цокова, Л.И. Котлова, заявка №2020614843, дата поступления 27.05.2020, дата регистрации 02.09.2020.

VALIDATION OF THE METHOD OF QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE COMPONENTS OF A MIXTURE OF MEDICINAL PRODUCTS BY THE METHOD OF DERIVATIVES OF UV ABSORPTION SPECTRA USING CHEBYSHEV POLYNOMIALS

T.N. Tsokova, L.I. Kotlova

Tyumen State Medical University, Tyumen, Russia

The results of the development and validation of a method for the quantitative determination of substances in drugs using the differentiation of UV absorption spectra by Chebyshev polynomials are presented. The control of the correctness of the method was carried out on solutions of Citramon tablets from different manufacturers.

Keywords: spectrophotometry, validation, numerical differentiation, polynomial approximation