

ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОМ РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

А.Ю. Хрущев, Э.Р. Акмаев, С.В. Колячкина, Т.Н. Лихих

*Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств
для животных и кормов, Москва, Россия*

ВВЕДЕНИЕ

В связи с появлением на рынке большого количества фальсифицированных лекарственных средств все большую популярность набирают экспресс-методы контроля подлинности (аутентификации). Широко используются в практике методы, основанные на ИК-спектроскопии в ближнем и среднем диапазоне. Преимуществами такого подхода являются: высокая скорость анализа, минимальная пробоподготовка; а также отсутствие потребности в реактивах, расходных материалах и стандартных образцах, что делает эту группу методов одной из наиболее перспективных в области мониторинга качества лекарственных средств [1, 2].

КР-спектроскопия (спектроскопия комбинационного рассеяния света, Раман-спектроскопия), наряду с ИК-спектроскопией, относится к методам колебательной спектроскопии. Данный метод обладает рядом преимуществ: возможность проведения анализа водных растворов, низкая температурная зависимость аналитического сигнала, низкая интенсивность полос обертонов и комбинационных частот [3]. Однако в случае количественного определения действующих веществ лекарственных препаратов методом КР-спектроскопии возникает ряд сложностей, связанных со значительными вариациями содержания вспомогательных компонентов, что, в ряде случаев, может привести к искажению результатов анализа. Для решения данной проблемы широко используются методы многофакторного анализа [4, 5], а также метод внутреннего стандарта [6].

Метод полуколичественного анализа, построенный с использованием хемометрической обработки данных, обладает большей устойчивостью к вариабельности компонентного состава по сравнению с методом количественного определения. Данный подход позволяет определить не только подлинность препарата, но также качественно определить диапазон концентрации действующего вещества. Таким образом, целью данной работы является оценка возможности создания полуколичественного метода анализа жидких лекарственных форм, на примере препарата, содержащего тилозин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования был выбран лекарственный препарат, содержащий в своем составе тилозин в концентрации 45–55 мг/мл, а также вспомогательные вещества: 1,2 – пропандиол, бензиловый спирт, вода для инъекций. Тилозин – антибиотик группы макролидов, действующий на грамположительные и некоторые грамотрицательные бактерии, в том числе: стрептококки, стафилококки, лептоспиры, коринебактерии, клостридии, эризепилотрикссы, пастереллы, хламидии, спирохеты и микоплазмы. В сельском хозяйстве тилозин находит применение в качестве стимулятора роста как кормовой антибиотик, а также часто назначается при лечении мелких домашних животных при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, дыхательной и мочеполовой систем. По степени воздействия на организм относится к малоопасным веществам.

Измерения проводили на Раман микроскопе inVia Renishaw (Великобритания) с лазером 785 нм на 50 % мощности, через 5х объектив с числовой апертурой 0,2 и ПЗС-детектор охлажденным до -70 °С. Образцы препарата помещали в прозрачную стеклянную вials объемом 2 мл и толщиной стенок 1 мм. Для анализа была выбрана наиболее информативная область спектра 750–1800 см⁻¹. Измерение образца проводили в каждой вiale по 10 раз, поворачивая ее вокруг своей оси перед снятием каждого спектра. Для увеличения соотношения сигнал/шум для каждого измерения проводили по 10 сканирований с последующим усреднением спектральных данных. Первичная обработка данных заключалась в сглаживании спектра с помощью фильтра Норриса, вычислении первой производной из спектра, коррекции базовой линии и длины оптического пути по методу MSC.

Для построения калибровочной модели были зарегистрированы спектры 7 серий лекарственного препарата, качество которых было предварительно проверено по нормативной документации с использованием метода ВЭЖХ. Были приготовлены и проанализированы образцы препарата в которых содержание тилозина было занижено относительно предельно допустимых значений на 5, 15, 25 мг/мл путем разбавления препарата деионизированной водой, а также завышено на 5, 15, 25 мг/мл путем добавления к препарату навесок стандартного образца тилозина. Таким образом, были получены 3 класса образцов, содержащих репрезентативные наборы данных: препараты с нормативным содержанием тилозина (70 спектров), с завышенным содержанием тилозина (30 спектров) и с заниженным содержанием тилозина (30 спектров) – Рисунок 1. На основе этих данных в программе TQAnalyst 9 была построена калибровочная модель с использованием дискриминантного анализа. На следующем этапе была проведена валидация модели. Для каждого класса был собран проверочный набор образцов, не участвовавших в построении модели. На проверочном наборе была проверена чувствительность модели, то есть ее способность правильно распознавать новые аутентичные образцы. Кроме того, была оценена специфичность модели, как возможность распознавать поддельные / некачественные образцы, не принадлежащие к целевому классу [7].

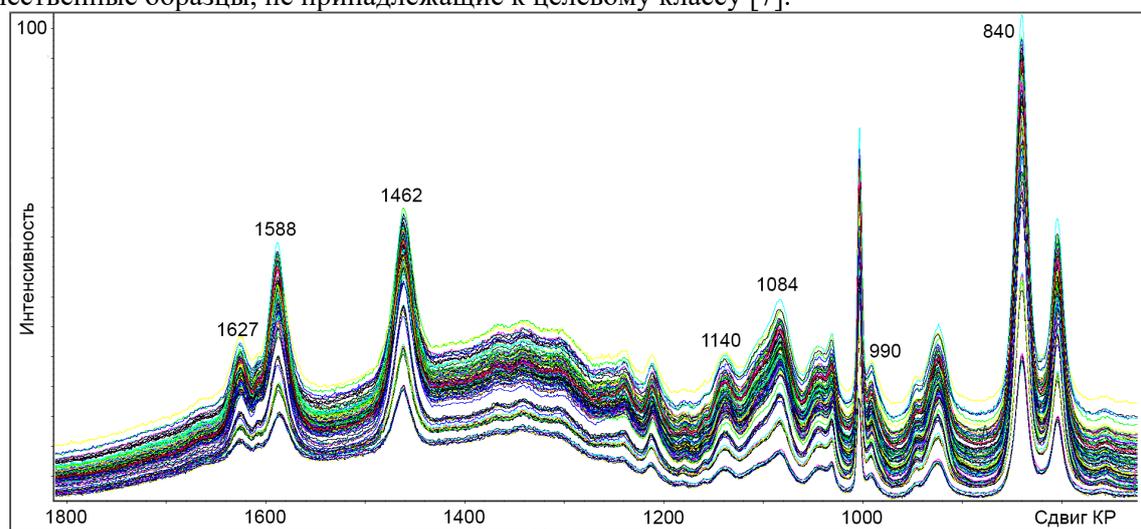


Рисунок 1. КР-спектры образцов с нормативным, завышенным и заниженным содержанием тилозина

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведено отнесение основных полос, относящихся к действующему веществу (тилозин), содержащихся в спектре препарата (таблица 1) [8, 9]. Группа пиков, находящаяся в диапазоне частот 750–900 см⁻¹, принадлежит вспомогательным компонентам препарата.

Отнесение	Частота, см ⁻¹
C=O валентные колебания	1627
C-N валентные колебания	1596
C-O валентные симметричные и ассиметричные колебания в RCOO- (тарtrat ион)	1588
Деформационные колебания CH ₂ -, CH ₃ -групп	1462
Симметричные и ассиметричные C-O-C валентные колебания в алифатических простых эфирах	1140, 1084, 840
Деформационные колебания в trans RHC=CHR'	990

Для построения калибровочной модели было использовано 7 главных компонент, что описывает 88 % спектральной дисперсии данных. Оценку однородности образцов обучающего набора проводили методом главных компонент (МГК) [5,10].

Отображение образцов в пространстве главных компонент позволяет обнаружить группы и подклассы внутри обучающего набора. На рисунке 2 видно, что все серии образцов с номинальной концентрацией достаточно хорошо перемешаны (эллипс А), что свидетельствует об однородности этого класса. Препараты с повышенной (Б) и пониженной (В) концентрацией тилозина менее однородны, что связано со значительным различием в содержании действующего вещества для образцов этих классов.

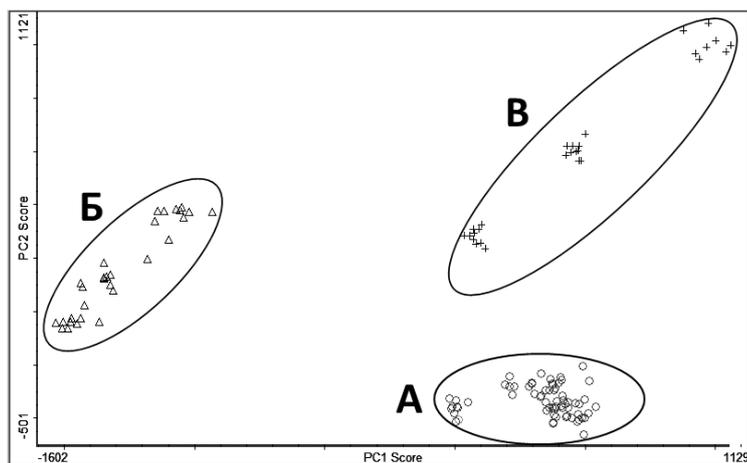


Рисунок 2. Распределение образцов обучающего набора в пространстве главных компонент

Качество разработанного метода оценивали путем кросс-валидации, в процессе которой спектральные данные каждой серии препарата последовательно удаляли из калибровочной модели, а затем использовали их в качестве проверочных образцов. По результатам данной диагностической процедуры все 13 серий образцов выдержали испытание на подлинность, а также они были корректно классифицированы согласно содержанию действующего вещества.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере лекарственного препарата, содержащего в своем составе тилозин, было установлено, что полуколичественный анализ позволяет одновременно проводить определение подлинности, а также определять диапазон концентраций действующего вещества: его номинальное значение, повышенное или заниженное. Разработанная калибровочная модель в результате валидационных тестов показала устойчивость для разных серий лекарственного препарата. Таким образом, использование данной методики экспресс-анализа лекарственных препаратов позволяет точнее установить причину несоответствия качества образца, что предоставляет дополнительную информацию для дальнейшего испытания препарата арбитражными методами.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.П. Арзамасцев, Н.П. Садчикова, А.В. Титова, Современное состояние проблемы применения ИК-спектроскопии в фармацевтическом анализе лекарственных средств, *Химико-фармацевтический журнал*, 42, № 8 (2008) 26–30
2. Д.А. Верескун, О.Е. Родионова, А.В. Титова А.В., Н.П. Садчикова, Изучение возможности использования БИК-спектроскопии в анализе таблеток комбинированного противомикробного препарата, *Вестник Росздравнадзора*, № 2 (2016) 62–66
3. D. Pivonka, J. Chalmers, P. Griffiths. *Applications of Vibrational Spectroscopy in Pharmaceutical Research and Development*, John Wiley & Sons, New York, 2007, pp. 293–308.
4. O. Ye. Rodionova A.L. Pomerantsev, *Trends in Analytical Chemistry NIR-based approach to counterfeit-drug detection*, *Trends in Analytical Chemistry* 29, № 8 (2010) 795 – 803
5. О.Е. Родионова, А.Л. Померанцев, Хемометрика: достижения и перспективы, *Успехи Химии*, 75, № 4 (2006) 302–321
6. А.Ю. Хрущев, Э.Р. Акмаев, В.О. Бондаренко, А.Е. Метлин, Использование гексацианоферрата (III) калия в качестве внутреннего стандарта при количественном определении кетопрофена методом КР-спектроскопии, *Аграрная наука*, 1 (2020), 13–16
7. O. Ye. Rodionova, P. Oliveri, A.L. Pomerantsev, *Rigorous and compliant approaches to one-class classification*, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 159 (2016), 89 – 96
8. Б.Н. Тарасевич. ИК спектры основных классов органических соединений. Справочные материалы, Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова (2012) 4–31
9. А.Х. Купцов, Г.Н. Жижин. Фурье-спектры комбинационного рассеяния и инфракрасного поглощения полимеров. Справочник, Москва, Физматлит (2001) 26–29
10. К. Эсбенсен. Анализ многомерных данных, сокр. пер. с англ. под ред. О. Родионовой, Черноголовка, Издательство ИПХФ РАН (2005) 54–69