

УДК 543.4

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕВОМИЦЕТИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ МЕТОДОМ МУЛЬТИСЕНСОРНОЙ ЦИФРОВОЙ ЦВЕТОМЕТРИИ

О.В. Моногарова^{1*}, А.А. Чапленко^{1,2}, К.В. Осолок¹

(¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра аналитической химии; ² Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России; *e-mail: o_monogarova@mail.ru)

Разработан эффективный, доступный и экспрессный способ анализа лекарственных препаратов на основе левомицетина методом мультисенсорной цифровой цветометрии. Предложено использование двумерного кода для идентификации и определения левомицетина при минимальном уровне информационного шума. Для повышения достоверности результатов определения лекарственного вещества применен метод главных компонент. Адекватность разработанного подхода подтверждена при анализе препаратов левомицетина в виде двух лекарственных форм – таблеток и глазных капель. Правильность полученных результатов подтверждена способом «введено-найдено». Показано, что полученные результаты не имеют статистически значимых отличий от величин, заявленных производителем.

Ключевые слова: левомицетин, молекулярный сенсор, цифровая цветометрия, лекарственный препарат.

Левомицетин (хлорамфеникол) – бактериостатический антибиотик широкого спектра действия, который проникает сквозь клеточную стенку бактерий и обратимо связывается с субъединицей рибосомы 50S, тем самым нарушая процесс синтеза белка в микробной клетке. Данный препарат известен с 1947 г., выпускается в различных лекарственных формах – капли глазные, таблетки, раствор для наружного применения, а также линимент.

Для предварительного экспрессного выявления фальсификатов (еще до использования дорогостоящего аналитического оборудования) целесообразно применять простые и доступные методы. К таким методам можно отнести мультисенсорную цифровую цветометрию [1–4], основанную на получении окрашенных продуктов взаимодействия аналита с молекулярными сенсорами, получении информации об их цветовых характеристиках и последующем преобразовании в уникальный дискретный код вещества, который можно использовать для химического анализа.

Цель настоящей работы – идентификация и определение левомицетина в лекарственных препаратах методом цифровой цветометрии с использованием молекулярных сенсоров.

Экспериментальная часть

Реактивы. Для реализации предложенного подхода использовали субстанции хлорамфе-

никала («Органика», Россия); 0,25% глазные капли (ПФК «Обновление»), таблетки 500 мг («БиоФармКомбинат») и стандартные образцы хлорамфеникола Европейской Фармакопеи (EP CRS C1200000).

В качестве молекулярных сенсоров использовали C_1 (10%-й раствор NaOH), C_2 (0,1 М раствор нитрата серебра) и C_3 (пищевой краситель E129 – 1 мМ спиртовой раствор кислотно-основного индикатора «красный очаровательный» AC (CAS# 25956-17-6)). Как правило, указанные реагенты используют в нормативной документации разных производителей для обнаружения левомицетина при проведении качественных реакций с образованием окрашенных продуктов. При выборе условий цветометрического определения принимали во внимание данные, приведенные в нормативной документации на субстанцию и препараты левомицетина (все реакции проводили в одинаковых условиях при температуре 85 °С в течение 20 мин).

Оборудование. Анализ проводили в прозрачных планшетах из полипропилена с плоским дном, объем лунки составлял 350 мкл («Thermo Fischer Scientific», США, кат. № 430341). В лунки планшета последовательно вносили по 100 мкл соответствующего сенсора (C_1 – C_3) и по 100 мкл спиртовых растворов субстанции левомицетина. В отдельный ряд лунок для сравнения вносили растворы сенсоров без добавления растворов

субстанции (интактные лунки). После добавления растворов субстанции планшет заклеивали пленкой, встряхивали на планшетном термощейкере «PST-100HL» («BioSan», Латвия) в течение 20 мин.

Для получения растровых изображений применяли офисный планшетный сканер «Epson Perfection 1670» (CCD-матрица) со съемной крышкой. Сканирование планшета с образцами проводили с помощью программы Epson Scan в режиме Professional mode (разрешение 600 dpi, глубина цвета 24 bit). Параметры «Color restoration», «Unsharp mask filter» и «Descreeing filter» были отключены. Для выполнения цифрового цветометрического анализа с использованием 96-луночного планшета («Thermo Fischer Scientific», США, кат. № 1256604) была изготовлена тефлоновая рамка-вкладыш размером 210×297×17 мм с центральным прямоугольным вырезом (128×86 мм), которую помещали под крышкой офисного планшетного сканера формата А4. Это позволило:

ускорить и формализовать процедуру установки планшета на рабочем стеклянном столе сканера;

зафиксировать координаты и условия освещения планшета электролюминесцентной лампой, встроенной в каретку;

минимизировать боковые паразитные засветки планшета с субстратами внешними источниками излучения;

повысить точность результатов измерения светлоты цветных каналов растровых изображений планшета.

В качестве аналитического сигнала использовали разность светлот цветных каналов между лункой с аналитом и интактной лункой. Полученные цифровые изображения ячеек обрабатывали в программе ImageJ с использованием цветовой модели RGB 24 bit (8 бит на канал), в каждой лунке выделяли центральную область и получали 3 усредненных значения светлоты – по одному для каждого цветового канала. Выбор цветных каналов осуществляли эмпирически.

Результаты и их обсуждение

Идентификация субстанции левомицетина. На первом этапе проводили пробоподготовку и реакцию взаимодействия спиртового раствора левомицетина с растворами вышеуказанных трех веществ-сенсоров. Цифровое изображение ячеек планшета получали с помощью планшетного сканера. На втором этапе проводили маскирова-

ние изображения и цифровую обработку в целях определения светлоты цветных каналов (R , G , B). Для субстанции левомицетина получали набор из 9 значений светлоты каналов (R , G и B) – по три на каждый из 3 сенсоров. Аналитическим признаком служило изменение цвета ячейки, обусловленное прохождением химической реакции между аналитом и сенсором. Изменение цвета ячейки численно характеризуется разностью светлоты отдельных цветных каналов изображения ячеек в присутствии и в отсутствие левомицетина. При значимом отличии светлоты каналов для аналита от светлоты в интактных ячейках (не важно, в большую или меньшую сторону) соответствующему цветовому каналу ячейки присваивали значение «1», в случае совпадения – «0». На основании этого можно сформировать уникальный штрих-код, позволяющий идентифицировать препараты на основе левомицетина. Важно определить, начиная с какого значения разности светлоты изменение цвета можно считать признаком протекания реакции, а не артефактом, связанным с вариативностью цифрового изображения. Пороговое значение разности светлоты канала влияет, с одной стороны, на уникальность кода, с другой – на его воспроизводимость. При экспериментально выбранном пороговом значении код каждой из субстанций был уникальным и воспроизводимым для 10 параллельных измерений.

Для имитации препаратов с давно истекшим сроком годности или нарушением условий хранения раствор левомицетина подвергали «стресс-тесту» – нагреванию до 100 °С в течение 5 мин. Как видно из рис. 1, штрих-код для препарата после стресс-теста отличается от штрих-кода для стандартного образца. Таким образом, существует принципиальная возможность предварительного суждения о качестве препаратов левомицетина.

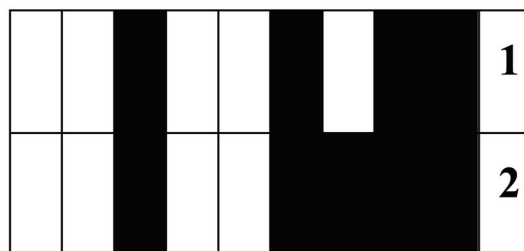


Рис. 1. Одномерный код стандартного раствора субстанции левомицетина до стресс-теста (1) и после (2). Ячейка с белой заливкой соответствует отсутствию аналитического сигнала, с черной – указывает на его наличие

Полуколичественный анализ препаратов левомецетина с использованием цветомерических кодов. С помощью предложенного подхода можно не только идентифицировать, но и определять левомецетин. Для определенной концентрации лекарственного вещества можно сформировать двумерный 9-битный штрих-код (3 сенсора × 3 цветовых канала). Сравнение кода анализируемого образца при неизвестной концентрации левомецетина со стандартной библиотекой кодов позволит определять содержание аналита. При выборе оптимального порога, выше которого значение разности светлот обозначается «1», а значение, равное ему или более низкое, обозначается «0», руководствовались следующими требованиями:

1) получаемый код должен быть селективным, каждой концентрации должна соответствовать только одна кодировка;

2) различие в кодировках между соседними значениями концентрации должно быть минимальным (1–2 значения), таким, чтобы получаемые при анализе коды интерпретировались однозначно.

Для выполнения указанных требований целесообразно установить индивидуальные пороговые значения для каждого из каналов (при едином значении задача невыполнима). С помощью надстройки MS Excel «Поиск решения» найдены оптимальные пороговые значения для каналов и получены цветомерические коды для определенного диапазона концентраций левомецетина (табл. 1). Предложенная система штрих-кодов использована для анализа таблеток и глазных капель левомецетина. Анализируемый раствор левомецетина готовили растворением точно известной навески таблеток (предварительно растертых в порошок) на ультразвуковой бане с последующим отделением нерастворимого осадка фильтрацией. Указанная методика предлагается производителем в нормативной документации на препарат. Дополнительную пробоподготовку глазных капель левомецетина не проводили.

Правильность полученных результатов подтверждена способом «введено-найдено» (табл. 2). Таким образом, разработанный способ полуколичественного анализа левомецетина отличается достаточно высокой правильностью и может применяться для экспрессного скринингового анализа препаратов левомецетина.

Количественный анализ лекарственных препаратов левомецетина. Для построения граду-

ировочных зависимостей приготовлены растворы фармакопейного стандарта левомецетина в интервале от 0,5 до 5 мг/мл. Диапазон концентраций подбирали таким образом, чтобы наиболее распространенное значение концентрации растворов парентеральных лекарственных форм левомецетина (2,5 мг/мл) находилось в середине градуировочного графика. После проведения аналитических реакций левомецетина с выбранными молекулярными сенсорами сканировали планшет с образцами и обрабатывали цифровые изображения. Результаты эксперимента представлены в табл. 3. Можно отметить наличие корреляции между разностью светлот отдельных каналов и концентрацией аналита, однако рассчитанные коэффициенты детерминации и относительное стандартное отклонение величин сигналов (табл. 4) не соответствуют требованиям линейности и воспроизводимости, предъявляемым к методикам контроля качества лекарственных средств [5, 6], а именно:

$$R^2 \geq 0,99; s_r \leq 5\%.$$

Как альтернативный вариант в качестве аналитического сигнала можно использовать разность «эффективных» светлот (Y), учитывающих неодинаковую чувствительность человеческого глаза к разным цветам в системе RGB :

$$Y = 0,299R + 0,587G + 0,114B.$$

Результаты анализа левомецетина представлены в табл. 5. Как следует из приведенных данных, только разность «эффективных» светлот, рассчитанная для второго сенсора (C_2), может быть использована для анализа лекарственных препаратов на основе левомецетина. Таким образом, именно эта величина рассмотрена в качестве аналитического сигнала при разработке способа определения левомецетина в разных лекарственных формах.

Оценку правильности разрабатываемого способа определения проводили с использованием реальных объектов – лекарственных препаратов левомецетина. Для анализа нами были выбраны наиболее широко применяемые лекарственные формы – капли глазные 0,25% (ПФК «Обновление»), а также таблетки 500 мг («БиоФармКомбинат»). Пробоподготовку осуществляли так же, как при выполнении полуколичественного анализа (см. выше). Правильность полученных результатов подтверждена способом «введено-найдено». Результаты представлены в табл. 6.

Т а б л и ц а 1

Двумерный цветометрический код для полуколичественного анализа лекарственных препаратов левомецетина (C_i – молекулярные сенсоры; круг со светлой заливкой соответствует отсутствию аналитического сигнала, с темной – указывает на его наличие)

Диапазон концентраций левомецетина, мг/мл	C_1			C_2			C_3		
	Пороговые значения разности светлот для разных цветовых каналов								
	ΔR_1	ΔG_1	ΔB_1	ΔR_2	ΔG_2	ΔB_2	ΔR_3	ΔG_3	ΔB_3
	157	94	18	39	33	12	47	6	4
<1,0									
1,0–1,5									
1,5–2,0									
2,0–2,5									
2,5–3,0									
3,0–3,5									
3,5–4,0									
4,0–4,5									
4,5–5,0									
> 5,0									

Т а б л и ц а 2

Проверка правильности результатов полуколичественного определения левомецетина в таблетках (1,0 мг/мл) и каплях (2,5 мг/мл) ($P = 0,95$; $n = 10$)

Таблетки		Капли глазные	
введено, мг/мл	найдено, мг/мл	введено, мг/мл	найдено, мг/мл
0,7	1,5–2,0	1,2	3,5–4,0
1,2	2,0–2,5	1,7	4,0–4,5
1,7	2,5–3,0	2,2	4,5–5,0
2,2	3,0–3,5	2,7	> 5,0

Таблица 3

Значения цветометрического сигнала для разных концентраций стандартных растворов левомецитина

Концентрация левомецитина, мг/мл	C ₁			C ₂			C ₃		
	ΔR_1	ΔG_1	ΔB_1	ΔR_2	ΔG_2	ΔB_2	ΔR_3	ΔG_3	ΔB_3
0,5	30	30	9	14	7	0	26	5	3
1,0	46	31	14	15	13	4	30	6	5
1,5	50	36	15	18	18	7	34	7	6
2,0	61	40	18	20	25	17	37	9	7
2,5	89	64	19	29	31	22	39	12	11
3,0	104	88	19	37	34	29	41	18	14
3,5	148	86	20	41	36	34	45	21	19
4,0	151	89	20	48	39	38	49	26	25
4,5	155	99	21	55	38	47	60	30	29
5,0	158	106	21	63	40	61	64	38	31

Обозначения: C_i – молекулярные сенсоры; ΔR_i , ΔG_i , ΔB_i – значения разности светлот для красного, зеленого и синего цветового каналов соответственно.

Таблица 4

Метрологические характеристики способа оценки содержания левомецитина в водных растворах с концентрацией 0,5–5,0 мг/мл

Разность светлот цветовых каналов	C ₁			C ₂			C ₃		
	ΔR_1	ΔG_1	ΔB_1	ΔR_2	ΔG_2	ΔB_2	ΔR_3	ΔG_3	ΔB_3
R ²	0,95	0,93	0,80	0,96	0,91	0,97	0,94	0,94	0,95
s _r , % (c = 2,5 мг/мл)	5,1	5,8	8,1	6,2	6,8	6,4	6,1	8,9	8,0

Обозначения: C_i – молекулярные сенсоры; ΔR_i , ΔG_i , ΔB_i – значения разности светлот для красного, зеленого и синего цветового каналов соответственно; R² – коэффициент корреляции; s_r – относительное стандартное отклонение.

Таблица 5

Метрологические характеристики способа оценки содержания левомецитина в водных растворах при использовании в качестве аналитического сигнала разности «эффективных» светлот для i-го сенсора (ΔY_i)

Y	ΔY_1	ΔY_2	ΔY_3
R ²	0,9570	0,9901	0,9587
Уравнение градуировочной зависимости	$\Delta Y_1 = 21,3c + 12,3$	$\Delta Y_2 = 9,2c + 4,2$	$\Delta Y_3 = 7,4c + 4,1$
s _r , % (c = 2,5 мг/мл)	5,1	4,1	5,9

Использование способа главных компонент для количественного анализа препаратов левомецитина. Перспективным представляется подход, в котором набор значений светлот цветовых каналов рассматривают как некий «цветометрический спектр», когда данные могут быть обработаны с помощью хемометрических алгоритмов, из

которых наиболее часто используется метод главных компонент (PCA, principal component analysis) [7, 8]. В этом случае имеется возможность, с одной стороны, выделить наиболее информативный сенсор и канал, с другой – снизить уровень шума и повысить точность результатов анализа. Кроме того, применение хемометрических алгоритмов

Т а б л и ц а 6

Оценка правильности разработанного способа определения левомецетина в различных лекарственных формах ($P = 0,95; n = 10$)

Таблетки (1,0 мг/мл)		Капли глазные (2,5 мг/мл)	
введено, мг/мл	найдено, мг/мл	введено, мг/мл	найдено, мг/мл
0,5	1,5 ± 0,1	1,0	3,4 ± 0,1
1,0	2,1 ± 0,1	1,5	4,1 ± 0,1
1,5	2,6 ± 0,2	2,0	4,5 ± 0,2
2,0	2,9 ± 0,2	2,5	4,9 ± 0,2

Т а б л и ц а 7

Метрологические характеристики способа определения левомецетина в глазных каплях, основанного на хемометрической обработке результатов, полученных методом мультисенсорной цифровой цветометрии ($P = 0,95; n = 10$)

Диапазон определяемых концентраций, мг/мл	R^2	s_p , % (2,50 мг/мл)	Заявлено производителем, мг/мл	Цветометрия, мг/мл
0,5–5,0	0,999	2,2	2,50	2,48 ± 0,04

позволяет выявить образцы, качественный состав которых отличается от остальных, например препараты с истекшим сроком годности.

Для апробации хемометрических подходов использовали серию градуировочных растворов с концентрацией 0,5–5,0 мг/мл. Анализируемый раствор готовили из 0,25% глазных капель левомецетина с содержанием действующего вещества 0,25 мг/мл. В качестве образцов, моделирующих неправильное хранение/нарушение сроков годности, предложены капли левомецетина после

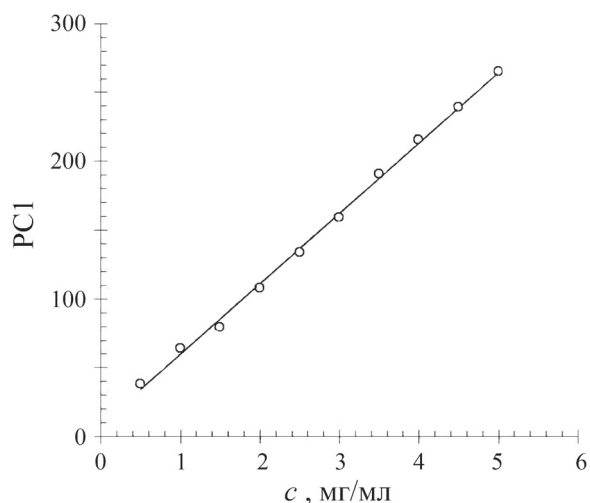


Рис. 2. Зависимость первой главной компоненты от концентрации левомецетина в градуировочных растворах

стресс-теста – нагревания до 100 °С в течение 5 мин. Полученные цветометрические данные были обработаны методом NIPALS PCA. Результаты обработки – значения главных компонент PC1 и PC2 для всех образцов – представлены в виде точечной диаграммы на рис. 2. Значения PC1 и PC2 были рассчитаны по следующим формулам:

$$PC1 = 0,67 \cdot \Delta R_1 + 0,54 \cdot \Delta G_1 + 0,15 \cdot \Delta B_1 + 0,25 \cdot \Delta R_2 + 0,24 \cdot \Delta G_2 + 0,24 \cdot \Delta B_2 + 0,12 \cdot \Delta R_3 + 0,15 \cdot \Delta G_3 + 0,14 \cdot \Delta B_3;$$

$$PC2 = 0,09 \cdot \Delta R_1 - 0,24 \cdot \Delta G_1 + 0,13 \cdot \Delta B_1 - 0,13 \cdot \Delta R_2 + 0,04 \cdot \Delta G_2 - 0,06 \cdot \Delta B_2 + 0,94 \cdot \Delta R_3 - 0,06 \cdot \Delta G_3 - 0,11 \cdot \Delta B_3.$$

Можно отметить наличие линейной корреляции ($R^2 = 0,998$) между значением первой главной компоненты (PC1) и содержанием левомецетина в градуировочных растворах (рис. 3). Точки, соответствующие анализируемым образцам препарата, формируют единую группу в области диаграммы, соответствующей градуировочному раствору с содержанием 2,5 мг/мл (номинальное содержание действующего вещества в препарате). Точки для образцов, подвергшихся стресс-тесту (моделирование нарушений условий хранения и транспортировки) также формируют единую выборку, среднее значение PC2 которой статистически достоверно ($p < 0,01$) отличается от такового для «нормальных» образцов. Таким образом, значение первой глав-

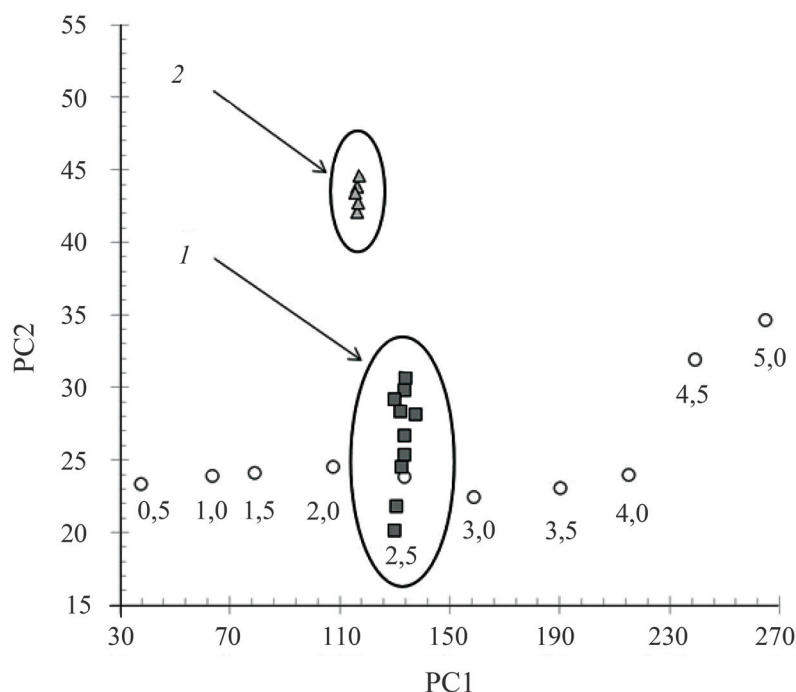


Рис. 3. Результаты обработки цветиметрических данных, полученных для градуировочных (с концентрациями 0,5–5,0 мг/мл) и анализируемых растворов левомицетина до (1) и после (2) стресс-теста

ной компоненты может быть использовано для определения содержания левомицетина в глазных каплях. Метрологические характеристики способа представлены в табл. 7. Полученные результаты согласуются с данными, заявленными производителем. Из табл. 7 видно, что использование метода главных компонент позволяет улучшить воспроизводимость результатов анализа по сравнению с применением градуировочной зависимости по выбранному сенсору и выбранному цветовому каналу.

Вторая главная компонента (PC2) может быть использована для определения недоброкачествен-

ных образцов, содержащих, наряду с действующим веществом, продукты его деградации и/или технологические примеси. Данная возможность предлагаемого подхода – ключевое преимущество для использования настоящего способа в скрининговом анализе качества лекарств.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-23-00012).

Конфликта интересов нет.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чапленко А.А., Моногарова О.В., Осколок К.В. // Химико-фармацевтический журнал. 2019. Т. 53. С. 44.
2. Kangas M.J., Wilson K.L., Burks L.M., Atwater J., Lukowicz R.M., Garver B., Mayer M., Havenridge S., Holmes A.E. // International Journal of Chemistry. 2018. Vol. 10. P. 36.
3. Kangas M.J., Ernest A., Lukowicz R.M., Mora A.V., Quossi A., Perez M., Kyes N., Holmes A.E. // Sensors. 2018. Vol. 18. P. 4291.
4. Goodey A. // Journal of the American Chemical Society. 2001. Vol. 123. N. 11. P. 2559.
5. Smith A. // Journal of Forensic Research. 2012. Vol. 3. N. 8. P. 161.
6. Общая фармакопейная статья 1.1.0012.15. Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. I. 2018.
7. Kangas M.J., Burks R.M., Atwater J., Lukowicz R.M., Garver B., Holmes A.E. // Journal of Chemometrics. 2018. Vol. 32. P. 1.
8. Suslick B.A., Feng L., Suslick K.S. // Analytical Chemistry. 2010. Vol. 82. N 5. P. 2067.

Поступила в редакцию 10.06.2019

Получена после доработки 12.07.2019

Принята к публикации 14.09.2019

IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF CHLORAMPHENICOL IN DRUGS BY MULTISENSORY DIGITAL COLORIMETRY

O.V. Monogarova^{1*}, A.A. Chaplenko^{1,2}, K.V. Oskolok¹

(¹*Chemistry Department of Lomonosov Moscow State University, Division of Analytical Chemistry;* ²*Scientific center for expert evaluation of Medicinal products of the Ministry of Health of the Russian Federation;* *e-mail: o_monogarova@mail.ru)

An effective, available and express method for the analysis of drugs based on chloramphenicol by the multisensory digital colorimetry method was developed. The use of a two-dimensional code for identification and determination of chloramphenicol with a minimum level of information noise was proposed. To improve the reliability of the results of the determination of the medicinal substance principal component analysis was applied. The adequacy of the developed approach was confirmed by the analysis of chloramphenicol drugs in the form of two dosage forms – tablets and eye drops. The accuracy of the results obtained is confirmed by the “spike recovery test”. It is shown that the results obtained do not have statistically significant differences from the values stated by the manufacturer.

Key words: chloramphenicol, molecular sensor, digital colorimetry, drug.

Сведения об авторах: *Моногарова Оксана Викторовна* – доцент кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (o_monogarova@mail.ru); *Чапленко Александр Андреевич* – аспирант кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, эксперт ФГБУ Научного центра экспертизы средств медицинского применения Минздрава России (a.a.chaplenko@yandex.ru); *Осколок Кирилл Владимирович* – доцент кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (k_oskolok@mail.ru).