

УДК 619:615.4

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2020-334-1-13-16>

Хрущев А.Ю.,
Ахмаев Э.Р.,
Бондаренко В.О.,
Метлин А.Е.

ФГБУ «Всероссийский государственный
Центр качества и стандартизации лекар-
ственных средств для животных и кормов»,
123022, Москва.

Ключевые слова: комбинационное
рассеяние света, внутренний стандарт,
количественное определение,
лекарственные препараты.

Для цитирования: Хрущев А.Ю., Ахмаев
Э.Р., Бондаренко В.О., Метлин А.Е.
Использование гексацианоферрата
(III) калия в качестве внутреннего
стандарта при количественном
определении кетопрофена методом КР-
спектроскопии // Аграрная наука. 2020;
(1): 13–16.

DOI: 10.32634/0869-8155-2020-334-1-13-16

Khrushchev A.Y.,
Akmaev E.R.,
Bondarenko V.O.,
Metlin A.E.

The Russian State Center for Animal Feed
and Drug Standardization and Quality (FGBU
«VGNI»), 123022, Moscow, Russia.

Ключевые слова: Raman scattering,
internal standard, quantitative determination,
pharmaceuticals.

Для цитирования: Khrushchev A.Y.,
Akmaev E.R., Bondarenko V.O., Metlin A.E.
Quantitative analysis by Raman spectroscopy
using potassium hexacyanoferrate (III) as an
internal standard // Agrarian science. 2020;
(1): 13–16.

DOI: 10.32634/0869-8155-2020-334-1-13-16

Использование гексацианоферрата (III) калия в качестве внутреннего стандарта при количественном определении кетопрофена методом КР-спектроскопии

РЕЗЮМЕ

В данной статье нами предложен метод количественного определения кетопрофена в лекарственном препарате с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния света с использованием гексацианоферрата (III) калия в качестве внутреннего стандарта. Точность данного метода была продемонстрирована на примере количественного определения кетопрофена в лекарственном препарате для ветеринарного применения. Вычисление метрологических параметров методики доказывает применимость предложенного метода градуировки. Также было изучено влияние расфокусировки лазерного пучка на воспроизводимость результатов измерения. Предложенный метод является более быстрым способом количественного определения, по сравнению с анализом методом ВЭЖХ.

Quantitative analysis by Raman spectroscopy using potassium hexacyanoferrate (III) as an internal standard

ABSTRACT

In this article we proposed a method for quantitative determination of active substance in pharmaceuticals via Raman scattering using potassium ferricyanide as internal standard. We approved this method in ketoprophenum quantitative determination in drug for veterinary use "Ketojekt". The calculation of metrological requirements of procedures are established proposed method of calibration. Either we demonstrated the focalisation factor of laser beam affects on the method reproducibility. The method provides a precise, rapid, convenient to quantitative analysis that is more effective than the standard HPLC assay.

Введение

Методы спектроскопии в ИК-диапазоне все чаще используются для контроля качества лекарственных средств. Отличительной особенностью этих методов является возможность осуществления бесконтактного и неразрушающего анализа, отсутствие пробоподготовки, быстрота выполнения анализа и высокий уровень информативности получаемой информации. В настоящее время наибольшее распространение получили методы спектроскопии в ближнем и среднем инфракрасном диапазоне, а также спектроскопия комбинационного рассеяния света (КР-спектроскопия, раман-спектроскопия) [1–6].

По сравнению с методом ИК-Фурье спектроскопии КР-спектроскопия имеет существенные ключевые преимущества: так, метод КР-спектроскопии может быть использован для анализа водных растворов, поскольку высокий коэффициент поглощения воды не оказывает на него существенного влияния; также спектр комбинационного рассеяния не зависит от изменений температуры раствора. Эти преимущества, связанные со специфической природой метода, делают рамановскую спектроскопию мощным средством анализа и мониторинга химического состава [7, 8].

Известно, что интенсивность полос комбинационного рассеяния света не имеет абсолютного характера и измеряется относительно внешнего или внутреннего эталона. Сложность количественных измерений с помощью данного метода обусловлена низкой воспроизводимостью получаемых данных, что связано как с флуктуацией мощности излучения лазера, так и с расфокусировкой пучка, разъюстировкой оптических элементов, наклоном плоскости анализируемого образца и т.д. Данные затруднения успешно устраняются при использовании внутреннего стандарта.

Внутренний стандарт должен соответствовать ряду требований: он должен быть инертен к компонентам анализируемой среды, стабилен в условиях проведения анализа, вещество должно нелетучим и, желательно, малотоксичным. Кроме того, рекомендуется использовать в качестве внутреннего стандарта близкородственные аналитам вещества, что обеспечивает линейность отклика системы в зависимости от концентрации аналита в широком диапазоне. Наилучшим стандартом в этом случае является изотопно-замещенное производное аналита. Как показано в работе [9] возможно успешное использование изотопомера родамина для экспрессии генов. При использовании ГКР-метода перспективным является использование пика колебания AgCl на 230 см^{-1} [10].

С практической точки зрения важным условием для проведения анализа является отсутствие интерференции и/или частичного перекрытия пиков анализируемого вещества с пиками внутреннего стандарта, что ввиду высокой пиковой плотности спектров сложных органических молекул не всегда можно осуществить на практике.

В данной работе предложен в качестве внутреннего стандарта раствор гексацианоферрата (III) калия. Это вещество имеет только один узкий сдвоенный пик колебания CN-группы расположенный в области, где отсутствуют пики колебания наиболее распространенных функциональных групп среди веществ, используемых в фармацевтической промышленности [11]. Ранее сообщалось об успешном применении родственного соединения — гексацианоферрита (II) калия, имеюще-

го степень окисления железа +2 для количественного определения изоцианурата в полиуретане методом ИК-спектроскопии в среднем диапазоне [12].

Целью данной работы была оценка возможности применения гексацианоферрата (III) калия для количественного определения действующих веществ в лекарственных препаратах методом КР-спектроскопии.

Экспериментальная часть

Для проведения исследований в качестве модельного объекта был использован лекарственный препарат для ветеринарного применения, содержащий в качестве действующего вещества кетопрофен (100 мг/мл) и вспомогательные вещества: L-аргинин, бензиловый спирт, натрия гидроксид, воду для инъекций.

Для работы использовался ИК-Фурье спектрометр с Фурье-Раман модулем и блоком для ближней ИК-спектроскопии Thermo Scientific Nicolet iS50, США. Для уменьшения аппаратного шума проводили усреднение по 200 спектрам. Спектральный диапазон исследования $2300\text{--}1500\text{ см}^{-1}$ (сдвиг КР). Разрешение 16 см^{-1} , время анализа $2,4\text{ мин.}$, мощность лазера $0,5\text{ Вт}$ ($\lambda = 1064\text{ нм}$).

Хроматографию проводили на жидкостном хроматографе Waters 1525 с УФ-детектором Waters 2489. Хроматографическая колонка Zorbax SB-C18, $4,6 \times 150\text{ мм}$, $3,5\text{ мкм}$. Концентрация действующего вещества (Кетопрофен) была предварительно измерена методом, описанным в нормативном документе на препарат (СТО 75330130-0073-2013) — ВЭЖХ с внешней калибровкой по одной точке.

Измерение концентрации кетопрофена методом КР-спектроскопии

Готовили серию градуировочных растворов стандарта кетопрофена (USP) с концентрацией $100, 86, 67, 52$ и 36 мг/мл в воде. В качестве внутреннего стандарта использовали 20% водный раствор $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Перед проведением анализа добавляли к 200 мкл каждого стандартного раствора стандарта по 50 мкл раствора внутреннего стандарта (гексацианоферрат III калия). Для измерения концентрации кетопрофена в препарате для ветеринарного применения использовали ту же методику: к 200 мкл исследуемого препарата добавляли 50 мкл раствора внутреннего стандарта. Для снижения ошибки измерения объема, все операции смешивания проводили на аналитических весах с измерением добавленного компонента до $0,1\text{ мг}$. После построения калибровочного графика в этот же день готовили 4 смеси препарата Кетоджект с внутренним стандартом и проводили по 2 измерения содержания кетопрофена в каждой смеси. На следующий день также 4 образца препарата измеряли в 2-х повторностях.

Результаты и обсуждение

На рисунке 1А приведен спектр комбинационного рассеяния исследованного лекарственного препарата в диапазоне $2300\text{--}1500\text{ см}^{-1}$ (сдвиг КР). Пики 1647 и 1597 см^{-1} соответствуют C=O валентным колебаниям кетонов в соединениях типа арил- C(O) -арил [11]. На рисунке 1Б представлен спектр комбинационного рассеяния водного раствора $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, пик 2130 см^{-1} соответствует колебаниям CN-группы [11]. Из рисунка 1В видно, что пики не перекрываются при смешивании раствора $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ с препаратом Кетоджект, а также не происходит смещения или искажения их характеристических полос, что свидетельствует об отсутствии взаимодействия компонентов смеси.

Значение концентрации кетопрофена в препарате определенное методом ВЭЖХ (согласно СТО 75330130-0073-2013) составило 97,44 мг/мл с неопределенностью 0,29 мг/мл. Эта величина была принята в качестве аттестационного значения для определения валидационных параметров предложенной методики. Результаты измерений, полученные методом КР-спектроскопии в 1 и 2 день анализа, а также ошибка измерения по среднему значению в каждой параллели относительно метода ВЭЖХ представлены в Таблице 1.

Для оценки методики на грубые ошибки (промахи) сомнительных значений выборки из случайной величины, имеющей нормальное распределение был применен критерий Граббса. При этом расчётное значение критерия $U_{расч}$ определяли по формуле

$$U_{расч} = \frac{|x_c - x_{cp}|}{s}$$

Здесь x_{cp} — среднее значение выборки, x_c — сомнительное значение (максимальное или минимальное в выборке), s — выборочное среднеквадратическое отклонение (СКО).

Расхождение между дисперсиями оценивали по критерию Кохрена. Как видно из данных приведенных в таблице 2 полученные расчетные значения G не превышает табличные ($U_{расч} < U_{табл}$). Это означает, что полученные значения не содержат грубых ошибок [13].

Как видно из приведенных данных полученные расчетные значения G не превышает табличных значений.

Стандартная неопределенность в условиях повторяемости и относительная стандартная неопределенность в условиях промежуточной прецизионности представлены в таблице 3

Смещение представляет собой систематическую ошибку в противоположность случайной ошибке. Большее систематическое отклонение от истинного значения соответствует большому значению смещения [14]. В таблице 4 представлены значения оцененного смещения результатов измерения предложенной методики относительно арбитражного значения. Так значения относительной суммарной стандартной неопределенности и суммарной стандартной неопределенности находятся на уровне 2%.

Предел повторяемости — значение, которое с доверительной вероятностью 95 % не превышает абсолютной величиной разность между результатами двух измерений (или испытаний), получены в условиях повторяемости (сходимости). Прецизионностью является мера схожести независимых результатов измерений, полученных методом КР-спектроскопии [15]. Предел промежуточной прецизионности предложенной методики менее 3%. Данные представлены в таблице 5.

Результаты представленной метрологической оценкой методики определения количественного содержания кетопрофена в

Рис. 1. КР-спектры препарата (А), раствора $K_3[Fe(CN)_6]$ (Б) и их смеси (В)

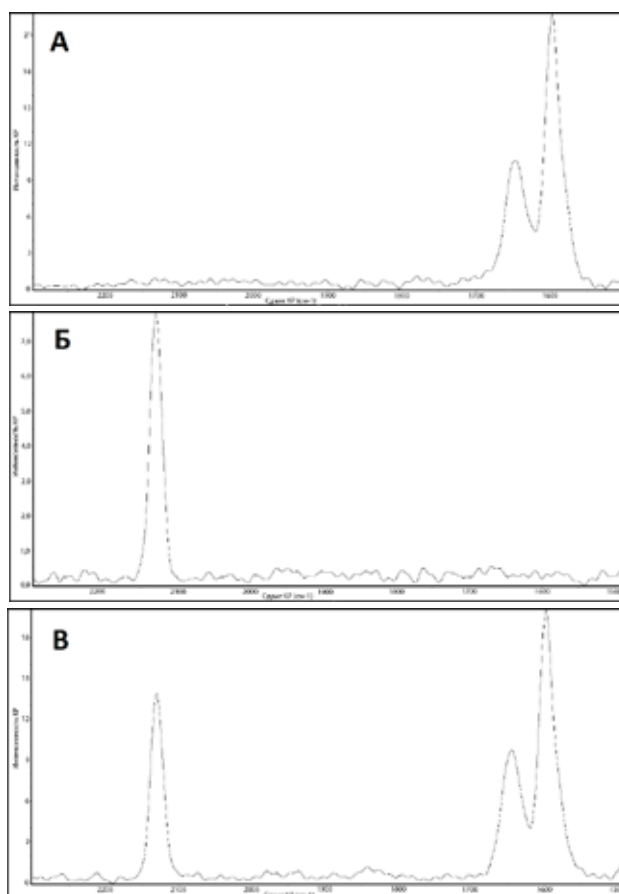


Таблица 1.

Результаты измерения содержания кетопрофена в 1 и 2 день анализа

Время анализа	№ анализа	Содержание кетопрофена при первом измерении, мг/мл	Содержание кетопрофена при втором измерении, мг/мл	Относительная ошибка измерения, %
1 день	1	97,58	95,27	1,04
	2	95,23	98,65	0,51
	3	98,96	96,4	0,25
	4	97,94	99,52	1,32
2 день	1	97,35	100,88	1,72
	2	95,08	98,47	0,68
	3	98,52	96,42	0,03
	4	98,68	95,88	0,1

Таблица 2.

Результаты измерения содержания кетопрофена в 1 и 2 день анализа

Критерий Кохрена	Критерий Граббса
G_{max} рассчитано/табличное значение	G_{max} рассчитано/табличное значение
0,20/0,68	1,66/2,126

Таблица 3.

Стандартная неопределенность в условиях повторяемости

Стандартная неопределенность в условиях повторяемости	Стандартная неопределенность в условиях промежуточной прецизионности	Относительная стандартная неопределенность в условиях повторяемости, %	Относительная стандартная неопределенность в условиях промежуточной прецизионности, %
1,97	0,94	2,02	0,96

лекарственном препарате методом КР-спектроскопии с внутренним стандартом доказывают применимость данного метода согласно нормам по ГОСТ 8.563-2009, ГОСТ Р 5725-2002. Проведение расчетов концентрации кетопрофена без учета внутреннего стандарта приводит к относительной ошибке измерения более 5%, и относительной расширенной неопределенности 10,5%, что выходит за пределы допустимых значений.

Для рамановской спектроскопии характерна зависимость интенсивности сигнала от точности фокусировки лазерного пучка на образце. В результате изучения влияния степени расфокусировки лазерного пучка на интенсивность сигнала было установлено, что смещение фокальной плоскости на 2% в зафокальное, либо предфокальное положение приводит к уменьшению интенсивности пиков кетопрофена и гексацианоферрата (III) калия на 8–9%. Поскольку фокусировка в ряде случаев осуществляется вручную и может зависеть от оператора, для результатов количественного анализа методом КР-спектроскопии без внутреннего стандарта характерна меньшая воспроизводимость по сравнению с ВЭЖХ [16]. Было установлено, что при смещении фокальной плоскости от -10% до +10% от положения фокуса наблюдалось пропорциональное и снижение интенсивностей пиков карбонильной группы кетопрофена и CN-группы гексацианоферрата (III) калия, что является необходимым условием применимости метода внутреннего стандарта и позволяет значительно сократить ошибки данного рода.

Заключение

В данной работе предложен метод количественного определения кетопрофена в лекарственном препарате с помощью спектроскопии комбинационного рассе-

Таблица 4.

Оцененное смещение и относительная суммарная стандартная неопределенность

Оцененное смещение	Стандартная неопределенность оценки смещения	Расширенная неопределенность оценки смещения	Суммарная стандартная неопределенность	Относительная суммарная стандартная неопределенность
0,11	1,72	3,44	1,96	2,01%

Таблица 5.

Оцененное смещение и относительная суммарная стандартная неопределенность

Предел повторяемости, %	Предел промежуточной прецизионности, %	Показатель правильности (относительная стандартная неопределенность оценки смещения), %	Относительная расширенная неопределенность, %
5.60	2.67	1.76	4.01

яния света с использованием в качестве внутреннего стандарта широко распространенного вещества — гексацианоферрата (III) калия. Показано, что ввиду обособленности пика колебания CN-группы на КР-спектрах не наблюдается перекрывания или смещения пиков колебания компонентов анализируемого образца, что свидетельствует об отсутствии взаимодействия компонентов смеси. Определенные метрологические параметры методики доказывают применимость предложенного метода градуировки. Показано, что использование гексацианоферрата (III) калия в качестве внутреннего стандарта позволяет значительно снизить негативное влияние основного источника ошибок присущего данному методу — неточности фокусировки лазерного луча. В данной работе продемонстрировано, что точность анализа, проводимого методом КР-спектроскопии может быть существенно увеличена при использовании внутреннего стандарта (гексацианоферрата (III) калия). По сравнению с методом ВЭЖХ данная методика позволяет получать результат количественного определения значительно быстрее — в течение нескольких минут, при этом практически полностью отсутствует расход реактивов и расходных материалов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. M. R. Witkowski, American pharmaceutical review, Volume 8, Issue 1, 56-62 (2005).
2. M. Otsuka, Y. Fukui, K. Otsuka, et al., J.Near Infrared Spectroscopy, 14(1), 9-16 (2006).
3. O. Kolomiets, U. Hoffmann, P. Geladi, et al., Applied spectroscopy, 62 (11), 1200-1208 (2008).
4. D.A. Burns and E.W. Ciurczak (Eds.), Handbook of Near-Infrared analysis, Second edition, Marcel Dekker Inc, New York Basel, (2001), pp. 53-70.
5. E.W. Ciurczak and B. Igne (Eds.), Pharmaceutical and Medical Applications of Near-Infrared Spectroscopy, Second edition, CRC, Boca Raton, (2014), pp. 73-96.
6. E. C. Сапон, В. Г. Лугин, Вестник фармации №1 (75), 82-92. (2017).
7. D. Pivonka, J. Chalmers, P. Griffiths (Eds.), Applications of Vibrational Spectroscopy in Pharmaceutical Research and Development, John Wiley & Sons, New York, 2007, pp. 239–262.

8. D. Pivonka, J. Chalmers, P. Griffiths (Eds.), Applications of Vibrational Spectroscopy in Pharmaceutical Research and Development, John Wiley & Sons, New York, 2007, pp. 293–308.
9. D.M. Zhang, Y. Xie, S.K. Deb, et al., Anal. Chem., 77, 3563-3569 (2005).
10. C. Caro, C. Lopez-Cartes, P. Zaderenko et al., J. of Raman Spectroscopy., 39, 1162-1169 (2008).
11. А.Х. Купцов, Г.Н. Жижин, Фурье-спектры комбинационного рассеяния и инфракрасного поглощения полимеров, ФИЗМАТЛИТ, Москва (2011), с. 27
12. W. C. Solomon, E.S. Pratz, A. Doris, NASA Tech Brief (1993), P. 86, 1.
13. ГОСТ Р 8-736 (2011)
14. Р 50.1.060 (2006)
15. ГОСТ Р ИСО 21748 (2012)
16. Sergio Armenta, Salvador Garrigues, Miguel de la Guardia. Analytica Chimica Acta. Sweeteners determination in table top formulations using FT-Raman spectrometry and chemometric analysis, 521, 149–155(2004).