

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОКСИТЕТРАЦИКЛИНА В ЖИДКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ НА ВОДНОЙ ОСНОВЕ МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

А. Ю. Хрущев\*, Э. Р. Акмаев, В. О. Бондаренко, И. В. Кис

УДК 535.375.5;543.42.062

Всероссийский государственный центр качества и стандартизации  
лекарственных средств для животных и кормов,  
123022, Москва, Россия; e-mail: a.hrushev@vgnki.ru, khrushh@rambler.ru

(Поступила 10 августа 2020)

Разработан универсальный метод количественного определения окситетрациклина в трех лекарственных препаратах на водной основе с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния. Проведено сравнение пяти калибровочных моделей, построенных с помощью различных подходов к математической обработке данных: одномерной калибровки (закон Бугера—Ламберта—Бера, наименьших квадратов, обратных наименьших квадратов) и методов многомерного анализа данных (проекция на латентные структуры и регрессии на главные компоненты). Установлено, что наиболее точные результаты количественного определения достигаются при использовании калибровочной модели, построенной методом проекции на латентные структуры с помощью двух главных компонент.

**Ключевые слова:** спектроскопия комбинационного рассеяния, количественный анализ, лекарственные препараты, окситетрациклин, многомерный анализ, хемометрика.

*A universal method for the quantitative determination of oxytetracycline in three water-based medicinal drugs using Raman spectroscopy has been developed. A comparison is made of five calibration models based on different mathematical data processing: one-dimensional calibration (Beer-Lambert Law, classical least squares, stepwise multiple linear regression) and multi-dimensional calibration (partial least squares and principal component regression). It is found that the most accurate quantitative determination results are achieved when using a calibration model based on partial least squares using two principal components.*

**Keywords:** Raman spectroscopy, quantitative analysis, medicinal drugs, oxytetracycline, multi-dimensional analysis, chemometrics.

**Введение.** По данным Всемирной организации здравоохранения количество фальсифицированных препаратов на рынке возрастает с каждым годом [1, 2]. В связи с этим обеспечение качества лекарственных средств, находящихся в обращении, является одной из приоритетных задач. Для этого требуются исследования в области совершенствования методов контроля качества, а также внедрение экспресс-методик анализа фармацевтической продукции. Методы колебательной спектроскопии — одни из наиболее перспективных в этом направлении [3].

Спектроскопия комбинационного рассеяния света (КР) наряду с ИК-спектроскопией относится к методам колебательной спектроскопии. Данный метод обладает рядом преимуществ: возможностью проведения анализа водных растворов, низкой температурной зависимостью аналитического сигнала, низкой интенсивностью полос обертонов и комбинационных частот [4].

---

## QUANTITATIVE DETERMINATION OF OXYTETRACYCLINE IN WATER-BASED LIQUID DOSAGE FORMS BY RAMAN SPECTROSCOPY

A. Yu. Khrushchev\*, E. R. Akmaev, V. O. Bondarenko, I. V. Kis (Federal State Budgetary Institution "The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality", Moscow, 123022, Russia; e-mail: a.hrushev@vgnki.ru, khrushh@rambler.ru)

**Теория.** Лекарственные препараты представляют собой композицию действующих веществ и вспомогательных компонентов, при этом каждое вещество вносит свой вклад в суммарный спектр препарата, что приводит к искажению спектральных данных индивидуальных компонентов за счет перекрывания областей спектра, интерференции и резонанса Ферми [5, 6]. Совокупность спектральных данных от действующих веществ, вспомогательных компонентов, их обертонов, а также эффектов взаимодействия, возникающих в многокомпонентных смесях, обуславливает уникальный спектральный образ каждого лекарственного препарата, что позволяет, основываясь на хемометрической обработке данных, проводить классификацию и аутентификацию лекарственных препаратов [7—11]. Однако в случае количественного анализа эффекты спектральных взаимодействий вспомогательных компонентов и действующих веществ вызывают существенные затруднения. Данная проблема особенно актуальна для методов одномерной калибровки, основанных на линейном законе Бугера—Ламберта—Бера вследствие недостаточной аппаратной селективности. Эффективным решением этой проблемы является использование методов многомерного анализа, что позволяет выделить из всего объема данных только ту часть, которая нужна для решения поставленной задачи [12]. Приведено сравнение следующих методов: одномерной калибровки, основанной на линейном законе Бугера—Ламберта—Бера; многомерного анализа PCR (Principal Component Regression — метод регрессии на главные компоненты) и PLS (Partial Least Square — метод проекции на латентные структуры); методов CLS (Classical Least Squares — метод наименьших квадратов) и SMLR (Stepwise Multiple Linear Regression — метод обратных наименьших квадратов).

В качестве объекта исследования выбраны доступные на рынке препараты на основе окситетрациклина — антибиотика тетрациклинового ряда, который обладает широким спектром антимикробного действия. Препараты на его основе применяют для лечения животных при инфекционных болезнях, вызванных как грамположительными, так и грамотрицательными бактериями, а также риккетсиями, хламидиями, микоплазмами и спирохетами [13]. В настоящее время разработано большое количество методов определения содержания окситетрациклина: жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектором (LC-MS) [14], иммунохимический [15], люминесцентный [16] и др., однако практически отсутствуют работы по его количественному определению в многокомпонентных смесях и лекарственных препаратах с использованием КР-спектроскопии.

Метод КР-спектроскопии имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами аналитического контроля [17—19]. Однако в большинстве работ описаны методы, позволяющие провести количественный анализ действующих веществ, содержащихся в лекарственном препарате определенного компонентного состава. Это свидетельствует о недостаточной изученности универсальных методов количественного анализа, основанных на КР-спектроскопии.

Цель данной работы — оценка возможности создания универсального метода количественного определения окситетрациклина в жидких лекарственных формах препаратов с использованием КР-спектроскопии.

**Эксперимент.** Для исследования взяты лекарственные препараты разного компонентного состава. Препарат А: окситетрациклина гидрохлорид 100 мг, поливинилпирролидон 30 мг, магния хлорид 25 мг, пиросульфит натрия 10 мг, натрия гидроокись 15 мг, вода для инъекций до 1.0 мл; препарат Б: окситетрациклина гидрохлорид 200 мг, магния оксид 18.4 мг, диметилацетамид 500 мг, ронгалит 4.4 мг, моноэтаноламин до pH 8.5, вода для инъекций до 1.0 мл; препарат В: окситетрациклина гидрохлорид 200 мг, магния хлорида гексагидрат 110 мг, натрия формальдегидсульфоксилат 2.5 мг, ди-натрия эдетат 2 мг, н-метил-1-2-пирролидон 0.225 мл, 2-пирролидон 0.375 мл, 2-аминоэтанол (для коррекции pH 7.5—9.0), вода для инъекций до 1.0 мл.

Измерения проведены на ИК-Фурье-спектрометре с КР-Фурье-модулем и блоком для ближней ИК-спектроскопии Thermo Scientific Nicolet iS50 (США). Для уменьшения аппаратного шума итоговый спектр получен путем усреднения 32 сканирований. Регистрацию спектров проводили в диапазоне 400—4000 см<sup>-1</sup> (сдвиг КР), разрешение 8 см<sup>-1</sup>, время анализа 2 мин, мощность лазера 0.5 Вт ( $\lambda = 1064$  нм) с помощью программного обеспечения Omnic 9.8.44 (Thermo Fisher Scientific). Обработка КР-спектров и построение калибровочных моделей проведены в программе TQ Analyst 9.7.179 (Thermo Fisher Scientific).

Хроматографию проводили на жидкостном хроматографе Waters 1525 с УФ-детектором Waters 2489. Хроматографическая колонка Zorbax SB-C18, 4.6×150 мм, 3.5 мкм. Концентрацию действующего вещества (окситетрациклина) определяли методом ВЭЖХ с калибровкой по внешнему стандарту. Описание методик изложено в нормативных документах на лекарственные препараты. Элюиро-

вание осуществляли в изократическом режиме, подвижная фаза 9 % ацетонитрил в 0.02 %-ном водном растворе тетрабутиламмония бисульфата (рН 3.0, доведено ортофосфорной кислотой). Поглощение регистрировали на  $\lambda = 263$  нм.

Для построения калибровки приготовлены образцы лекарственных препаратов с разной концентрацией окситетрациклина: для препарата А — 91.36, 93.96, 101.13, 111.62 мг/мл; препарата Б — 141.92, 169.96, 186.14, 190.42, 212.08 мг/мл, препарата В — 170.80, 178.47, 190.00, 216.05, 239.32 мг/мл. Растворы с концентрацией меньше номинальной готовили путем добавления воды к навеске препарата в мерной колбе, с концентрацией больше номинальной — путем добавления навески стандартного образца окситетрациклина гидрохлорида (USP) к каждому препарату. Концентрация окситетрациклина в исходных препаратах предварительно проанализирована методом ВЭЖХ согласно требованиям нормативного документа на препарат, полученные значения использованы для приготовления растворов для калибровки. Регистрацию КР-спектров проводили при указанных выше настройках спектрометра, для этого образцы помещали в прозрачные стеклянные флаконы объемом 2 мл с толщиной стенок 1 мм. Флаконы размещали в стандартном держателе с углом наклона  $10^\circ$  к горизонтальной плоскости. Предварительная обработка спектральных данных заключалась в коррекции базовой линии по алгоритму Spline correction, снижению аппаратных шумов методом Савицкого—Голея. Растворы для валидации готовили аналогично: препарат А — 93.96 мг/мл, препарат Б — 186.14 мг/мл, препарат В — 178.47 мг/мл. Концентрация окситетрациклина в данных растворах проверена методом ВЭЖХ. Для построения всех калибровочных моделей спектры валидационных растворов не использовали, их применяли только для оценки качества калибровки (согласно процедуре валидации).

**Результаты и их обсуждение.** Для решения поставленной задачи проанализированы КР-спектры лекарственных препаратов и выбраны максимально информативные участки спектра, в которых полосы окситетрациклина представлены в наибольшей степени относительно вспомогательных компонентов. На рис. 1 представлены КР-спектры препаратов без разбавления, а также кристаллического гидрохлорида окситетрациклина. Проведено соотнесение КР-спектров с данными [20, 21] и выявлены основные полосы, принадлежащие окситетрациклину (табл. 1).

**Т а б л и ц а 1. Интерпретация КР-спектров исследуемых препаратов**

Образец	Валентные асимметричные колебания $\text{CH}_3$ -групп, $\text{см}^{-1}$	Плоские деформационные колебания $-\text{NH}_2$ , $\text{см}^{-1}$	Валентные колебания ароматического кольца, $\text{см}^{-1}$	Валентные колебания $\text{C-N}$ , $\text{см}^{-1}$	Валентные колебания $\text{Ar-OH}$ , $\text{см}^{-1}$
Препарат А	2980.8	1608.7	1445.4	1329.8	1260.9
Препарат Б	2940.2	1608.4	1441.4	1329.9	1260.4
Препарат В	2969.9	1608.7	1443.5	1328.1	1252.9
Окситетрациклина гидрохлорид кристаллический	2945.4	1617.7	1459.3	1315.4	1275.1

Калибровочные модели построены на основе закона Бугера—Ламберта—Бера, а также методов CLS, SMLR, PCR, PLS. Для каждой модели набор данных получен из КР-спектров 14 калибровочных и трех валидационных растворов. Спектральный диапазон калибровки для каждого метода определен согласно наибольшему коэффициенту корреляции, а также минимальным RMSEC (root mean square error of calibration — среднеквадратичный остаток калибровки) и RMSEP (root mean square error of prediction — среднеквадратичный остаток прогноза).

Из табл. 2 видно, что модели, полученные по закону Бугера—Ламберта—Бера и методу CLS имели высокие RMSEP и RMSEC, при этом коэффициент корреляции  $< 0.99$ . Калибровка по методу SMLR показывает низкое RMSEC, однако RMSEP более чем в 2.5 раза выше, что свидетельствует о переоцененности калибровочной модели и ставит под сомнение точность получаемых результатов [22, 23]. Выбор количества главных компонент (ГК) для построения многомерной калибровочной модели является важным этапом в процессе обработки данных с помощью хемометрики [24, 25]. Построены по 10 калибровочных моделей для методов PLS и PCR с последовательно возрастающим количеством ГК от 1 до 10. При увеличении количества ГК наблюдается снижение RMSEC как для метода PCR, так и для PLS, при этом зависимость ошибки проверки от количества ГК имеет более сложный профиль (рис. 2).

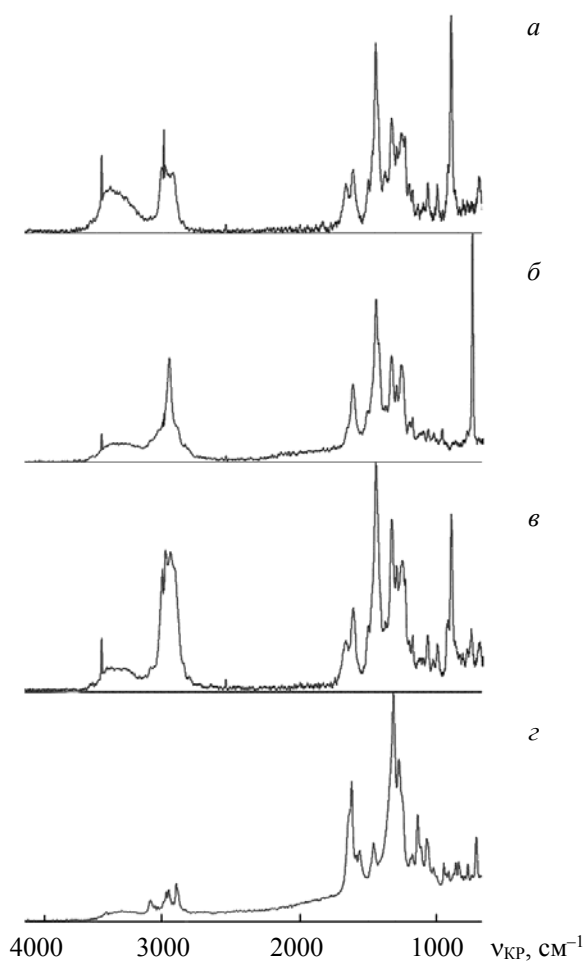


Рис. 1. КР-спектры препаратов А (а), Б (б), В (в) и кристаллического гидрохлорида окситетрациклина (з)

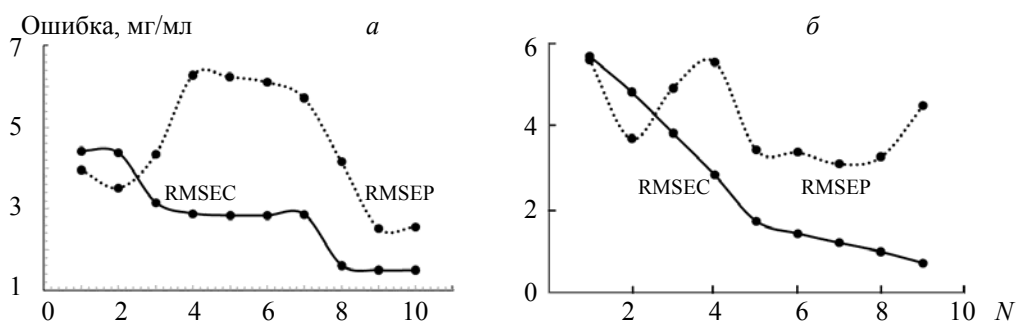


Рис. 2. Зависимость ошибки калибровки и проверки от количества главных компонент в модели ( $N$ ), построенной по алгоритмам PCR (а) и PLS (б)

При построении калибровочной модели с использованием многомерных методов анализа необходимо учитывать не только минимальные ошибки калибровки и проверки, но и зависимость уровня учтенной дисперсии спектральных данных при добавлении в модель дополнительных ГК [12]. На рис. 3 показана зависимость степени учтенной дисперсии от количества ГК. Видно, что уже при  $ГК = 2$  степень учета дисперсии 96.2 % и последующее увеличение количества ГК приводит к незначительному росту уровня учитываемой дисперсии данных. Как видно из рис. 2, калибровочные модели на основе методов PCR и PLS с использованием двух ГК имеют близкие RMSEP и RMSEC, что

характерно для сбалансированных калибровочных моделей с высоким уровнем правильности (trueness) [12]. Поскольку поставлена задача определения содержания основного действующего вещества, концентрация которого выше, чем других компонентов препарата, можно сделать вывод, что только первые две ГК описывают спектральные характеристики данного вещества, тогда как остальные ГК относятся к вспомогательным компонентам и аппаратному шуму.

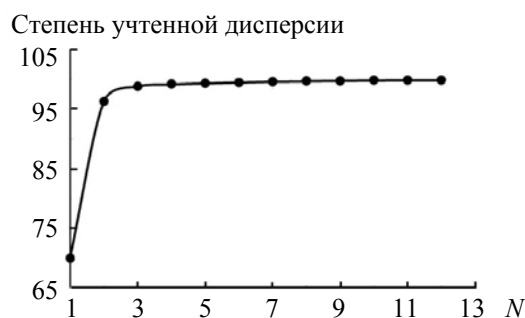


Рис. 3. Зависимость степени учтенной дисперсии данных от количества главных компонент  $N$  в калибровочной модели

В табл. 3 представлено сравнение правильности результатов, полученных при калибровке по методам PLS и PCR относительно арбитражного валидированного метода ВЭЖХ. Результаты, полученные по методу PLS, наиболее точно соответствуют арбитражному методу: истинное значение, полученное с помощью ВЭЖХ, находится внутри доверительного интервала разработанной методики. Экспериментальные данные согласуются с [26—30], где показано, что PLS-регрессия лучше описывает сложные связи в многокомпонентных смесях, чем PCR, используя при этом меньше ГК.

Т а б л и ц а 2. Сравнение методов построения калибровочной модели

Метод калибровки	Спектральный диапазон калибровки, $\text{см}^{-1}$	RMSEC, мг/мл	RMSEP, мг/мл	Коэффициент корреляции
По закону Бугера—Ламберта—Бера	1429—1446	12.8	16.7	0.9692
CLS	399—3570	8.99	10.4	0.9808
SMLR	1455—3274	3.04	8.39	0.9978
PCR (2 ГК)	1250—1447	4.40	4.58	0.9960
PLS (2 ГК)	1250—1447	4.75	4.30	0.9952

Т а б л и ц а 3. Сравнение результатов количественного определения, полученных методами ВЭЖХ и КР-спектроскопии

Образец для валидации	ВЭЖХ, мг/мл	PLS, мг/мл	Относительная ошибка, %	PCR, мг/мл	Относительная ошибка, %
Препарат А	93.96	95.42	+1.55	91.1	-3.04
Препарат Б	186.14	186.11	-0.02	178.25	-4.24
Препарат В	178.47	179.74	+0.71	183.54	+2.84

**Заключение.** Метод количественного определения с использованием КР-спектроскопии позволяет значительно сократить время и материальные затраты на проведение анализа лекарственных препаратов. Однако для образцов с разным компонентным составом стандартные методы калибровки, основанные на линейной регрессии, не позволяют получить удовлетворительные результаты по причине наложения спектральных данных действующего вещества и вспомогательных компонентов. Для решения этой проблемы проведено сравнение разных математических подходов к построению калибровочных моделей. На примере трех препаратов на основе окситетрациклина показано, что использование многомерного анализа позволяет построить универсальную калибровочную модель для

нескольких препаратов и получить с ее помощью достоверные результаты количественного определения в широком диапазоне концентраций. Установлено, что наибольшей правильностью обладает метод PLS.

- [1] **Weng Li Yoon.** *Am. Pharm. Rev.*, **8**, N 5 (2005) 115—118
- [2] **L. Rago.** World Health Organization's Viewpoint, SMI Conference Documentation, London (2004)
- [3] **T. E. Elizarova, M. A. Morozova, T. V. Pleteneva.** *Pharm. Chem. J.*, **45**, N 5 (2011) 302—305
- [4] **D. Pivonka, J. Chalmers, P. Griffiths.** *Applications of Vibrational Spectroscopy in Pharmaceutical Research and Development*, John Wiley & Sons, New York (2007) 293—308
- [5] **С. А. Буриков, Т. А. Доленко, Д. М. Карпов.** *Опт. и спектр.*, **109**, № 2 (2010) 306—312
- [6] **О. В. Бояркин.** Роль резонансов ферми в формировании ИК спектров колебательно-высоковозбужденных многоатомных молекул, автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук, Москва, Науч.-исслед. физ.-хим. ин-т им. Л. Я. Карпова (1991) 7—8
- [7] Guideline on the Use of Near Infrared Spectroscopy by the Pharmaceutical Industry and the Data Requirements for New Submissions and Variations, London, European Medicines Agency (2012) 12—22
- [8] **А. П. Арзамасцев, Н. П. Садчикова, А. В. Титова.** *Хим.-фарм. журн.*, **42**, № 8 (2008) 47—51
- [9] **А. П. Арзамасцев, Н. П. Садчикова, А. В. Титова.** *Вопросы биолог., мед. и фарм. химии*, № 1 (2010) 16—20
- [10] **О. Ye. Rodionova, A. L. Pomerantsev.** *Trends Anal. Chem.*, **29**, N 8 (2010) 795—803
- [11] **Д. А. Верескун, О. Е. Родионова, А. В. Титова, Н. П. Садчикова.** *Вестн. Росздравнадзора*, № 2 (2016) 62—66
- [12] **О. Е. Родионова, А. Л. Померанцев.** *Успехи химии*, **75**, № 4 (2006) 302—321
- [13] **K. Sangrungruang, A. Chotchuang, R. Ueno.** *Fisher Science*, **70**, N 3 (2004) 467—472
- [14] ГОСТ 31694-2012. Метод определения остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором
- [15] **А. А. Комаров, Е. С. Вылегжанина, А. Н. Панин.** Конъюгат окситетрациклина с бычьим сывороточным альбумином для иммунохимического способа определения окситетрациклина, RU 2243235 C1, Москва, ФИПС (2004) 3—7
- [16] **Е. О. Витюкова, А. В. Егорова, С. В. Бельтюкова, Е. В. Малинка.** *Вісн. Одеського нац. ун-ту. Хімія*, **9**, № 6-7 (2004) 97—106
- [17] **A. Jawad Bajwa, Haq Nawaz, Muhammad Irfan Majeed, Abdullah Ijaz Hussain, Muhammad Kashif.** *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, **238** (2020) 118446
- [18] **Laureen Coic, Pierre-Yves Sacré, Amandine Dispas, Elodie Dumont, Eric Ziemons.** *Talanta*, **2141** (2020) 120888
- [19] **Sylwester Mazurek, Roman Szostak.** *Vibr. Spectrosc.*, **93** (2017) 57—64
- [20] **Б. Н. Тарасевич.** ИК спектры основных классов органических соединений. Справочные материалы, Москва, МГУ имени М. В. Ломоносова (2012) 4—31
- [21] **А. Х. Купцов, Г. Н. Жижин.** Фурье-спектры комбинационного рассеяния и инфракрасного поглощения полимеров. Справочник, Москва, Физматлит (2001) 26—29
- [22] **A. Höskuldsson.** *Prediction Methods in Science and Technology*, Copenhagen, Thor Publishing (1996) 112—154
- [23] **A. Höskuldsson.** *J. Chemometrics*, **2** (1988) 211—228
- [24] **Р. Кельнер, Ж. М. Мерме, М. Отто, Г. М. Видмер.** *Аналитическая химия. Проблемы и подходы*, **2**, Москва, Мир (2004) 416—567
- [25] **К. Эсбенсен.** Анализ многомерных данных, пер. с англ. под ред. О. Родионовой, Черногоровка, ИПХФ РАН (2005) 54—69
- [26] **S. de Jong.** *Chemomet. Intel. Lab. Systems*, **18** (1993) 251—263
- [27] **B. Li, A. J. Morris, E. B. Martin.** *Chemomet. Intel. Lab. Systems*, **72** (2004) 21—26
- [28] **M. Hubert, K. Vanden Branden.** *J. Chemometrics*, **17**, N 10 (2003) 537—549
- [29] **E. Vigneau, M. Devaux, M. Qannari, P. Robert.** *J. Chemometrics*, **11**, N 3 (1997) 239—249
- [30] **P. Geladi.** *Chemomet. Intel. Lab. Systems*, **60**, N 1-2 (2002) 211—224