

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 543.426:543.062:577.182.99:543.068.8

**НЕДЕСТРУКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ
ТЕТРАЦИКЛИНОВОГО РЯДА МЕТОДОМ ЦИФРОВОЙ ЦВЕТОМЕТРИИ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СМАРТФОНА И ПРОГРАММНОГО
ОБЕСПЕЧЕНИЯ PHOTOMETRIX PRO®**

**Василий Григорьевич Амелин^{1,2}, Галина Михайловна Бесчастнова²,
Зин Алабдин Чалави Шаока², Алексей Викторович Третьяков¹, Леонид
Карольевич Киш¹**

¹ Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов

² Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых

Автор, ответственный за переписку: Василий Григорьевич Амелин,
amelinv@mail.ru

Аннотация. Предложен неdestructивный анализ тетрациклинов в лекарственных средствах по их собственной флуоресценции с использованием смартфона и напечатанного на 3D-принтере устройства. Показана возможность использования хеометрических методов, позволяющих сократить время анализа и визуализировать полученные данные. Обработку массива данных проводили методами главных компонент, иерархического кластерного анализа, частичной регрессии метода наименьших квадратов и методом наименьших квадратов с применением программного обеспечения PhotoMetrix PRO®. Рассмотрено использование хеометрических методов анализа для определения концентрации действующего вещества и идентификации производителя лекарственной продукции.

Ключевые слова: тетрациклины, неdestructивный анализ, смартфон, PhotoMetrix PRO®

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2024-65-5-397-407

Финансирование. Исследование выполнено в рамках бюджетного финансирования ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ВГНКИ)».

Для цитирования: Амелин В.Г., Бесчастнова Г.М., Шаока З.А.Ч., Третьяков А.В., Киш Л.К. Неdestructивный анализ лекарственных препаратов тетрациклинового ряда методом цифровой цветометрии с использованием смартфона и программного обеспечения PhotoMetrix PRO® // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2024. Т. 65. № 5. С. 397–407.

SCIENTIFIC REVIEW

NON-DESTRUCTIVE ANALYSIS OF TETRACYCLINE DRUGS BY DIGITAL COLORMETRIC METHOD USING A SMARTPHONE AND SOFTWARE PHOTOMETRIXPRO®**Vasily G. Amelin^{1,2}, Galina M. Beschastnova², Z.A.Ch. Shogah², Alexey V. Tretyakov¹, Leonid K. Kish¹**¹ The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality² Vladimir State University named after Alexander and Nikolay Stoletovs**Corresponding author:** Vasily Grigorievich Amelin, amelinvg@mail.ru

Abstract. A non-destructive analysis of tetracyclines in drugs by their own fluorescence using a smartphone and a device printed on a 3D printer is proposed. The possibility of using chemometric methods, which reduce the analysis time and visualize the obtained data, is shown. The dataset was processed by principal component analysis (PCA), hierarchical cluster analysis (HCA), partial least squares regression (PLS), and least squares using PhotoMetrix PRO® software. The use of chemometric methods of analysis to determine the concentration of the active substance and identify the manufacturer of medicinal products is considered.

Keywords: tetracyclines, non-destructive analysis, smartphone, PhotoMetrixPRO®

Financial Support. The study was carried out within the framework of budget financing of the Federal State Budgetary Institution «All-Russian State Center for Quality and Standardization of Medicines for Animals and Feed (VGNI)».

For citation: Amelin V.G., Beschastnova G.M., Shogah Z.A.Ch., Tretyakov A.V., Kish L.K. Non-Destructive Analysis of Tetracycline Drugs by Digital Colormetric Method Using a Smartphone and Software Photometrixpro® // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. 2024. T. 65. № 5. S. 397–407.

Среди всего многообразия лекарственных средств антибиотики тетрациклиновой группы уже более полувека используются как препараты широкого спектра действия, в основе антибактериального действия которых лежит подавление синтеза белка. Для этой группы соединений характерно наличие четырехчленного нафтаценового ядра (рис. 1).

Для подтверждения качества готовых лекарственных препаратов и определения тетрациклинов в биологических объектах получили развитие флуориметрические методы анализа. Антибиотики тетрациклинового ряда имеют плоское строение молекул (рис. 1) и способны флуоресцировать при облучении УФ-светом. Кроме того, тетрациклины образуют комплексы с ионами металлов, в частности с европием(III) и тербием(III). В последнем случае это приводит к сенсibilизированной тетрациклинами флуоресценции ионов европия и тербия [1–4].

Сенсibilизированная тетрациклинами флуоресценция европия в растворах [1, 2] и на цел-

люлозной бумаге [3] используется для определения антибактериальных препаратов тетрациклинового ряда в биологических жидкостях. В последнем случае авторами установлено рассеяние флуоресцирующего излучения водой в целлюлозной бумаге, для удаления которой использовали дополнительную пропитку бумаги сахарозой.

Органические хелаты ионов лантаноидов используют для чувствительного обнаружения и определения лигандов [2]. В комплексе с европием(III) тетрациклин при облучении УФ переходит в триплетное состояние, а затем передает свою энергию на 4F-уровень иона европия(III). Сенсibilизированную тетрациклинами флуоресценцию европия использовали для определения тетрациклина и двух его аналогов (хлортетрациклина и доксициклина). Пределы обнаружения составили 1–3 нг/мл.

В работе [1] показано определение тетрациклинов (тетрациклин, доксициклин, окситетрациклин, демеклоциклин, метациклин и

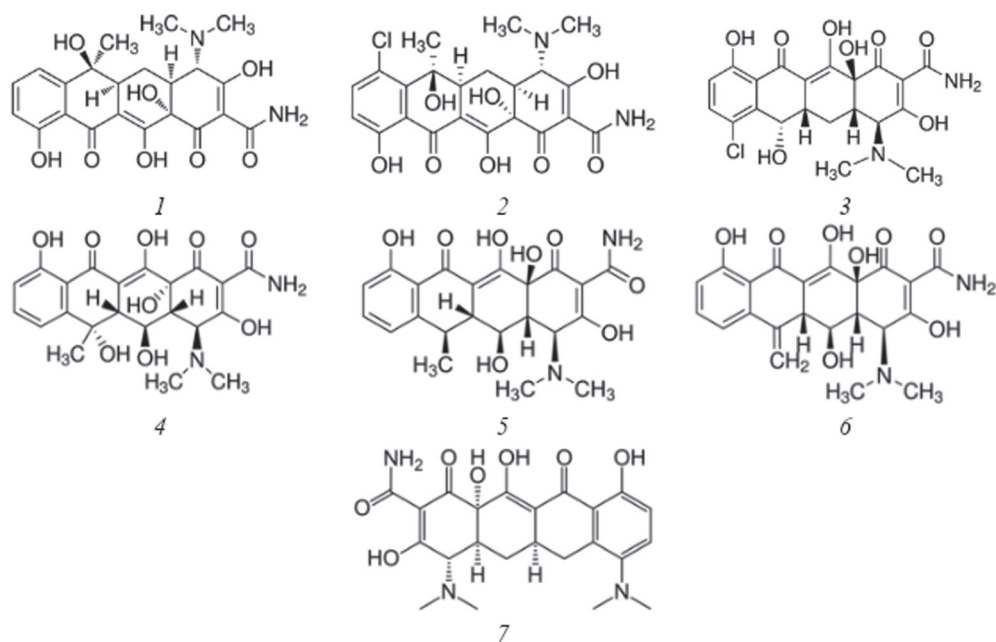


Рис. 1. Структурные формулы тетрациклина (1), хлортетрациклина (2), демеклоциклина (3), окситетрациклина (4), доксициклина (5), метациклина (6), миноциклина (7)

хлортетрациклин) с использованием цифровой цветометрии твердофазной флуоресценции. Изучена собственная флуоресценция тетрациклинов и сенсibilизированная тетрациклинами флуоресценция европия на целлюлозной бумаге и тонком слое силикагеля. Апробация проведена на готовых лекарственных препаратах. Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышало 0,09.

Предложена методика для одновременного определения ципрофлоксацина и тетрациклина в образцах биологических жидкостей (сыворотке крови и мочи) [3]. Ионы лантаноидов были иммобилизованы путем адсорбции на бумажных полосках, которые предварительно были обработаны сахарозой. Градуировочные зависимости линейны в диапазоне 0,03–1,50 мкг/мл для ципрофлоксацина и 0,03–2,50 мкг/мл для тетрациклина. Пределы обнаружения составили 9 и 11 нг/мл для ципрофлоксацина и тетрациклина соответственно, степень извлечения аналитов в образцах биологических жидкостей варьировала от 88,7 до 109,3%.

Сенсibilизированная доксициклином флуоресценция европия на силикагеле в присутствии ПАВ использована для определения этого антибиотика в лекарственных препаратах [4]. Разработана методика сорбционно-люминесцентного определения доксициклина с применением мицелл неионного ПАВ Тритона X-100; предел

обнаружения составил $1 \cdot 10^{-7}$ М. Градуировочная зависимость линейна в диапазоне концентраций доксициклина $3 \cdot 10^{-7}$ – $3 \cdot 10^{-5}$ М. Методика апробирована на лекарственном препарате «Доксициклин», относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышало 0,04.

В приведенных выше работах для регистрации аналитического сигнала использовали флуориметры. Подобный подход не позволяет в значительной степени обеспечить экспресс-определение действующих веществ антибактериальных препаратов. Альтернативой служит использование простых и доступных экспресс-методов анализа. Одно из направлений в этой области – цифровая цветометрия, которую все чаще используют для решения различных проблем аналитического контроля [5–7]. Эту группу методов отличает простота аппаратного оформления, возможность использования в качестве цветорегистрирующих устройств цифровой фото-, видео- и оптической офисной техники. Значительный потенциал развития цветометрии обусловлен разработкой современных смартфонов и специализированного программного обеспечения [8, 9]. Достижения последних лет позволяют сделать лабораторные исследования более мобильными и экспрессными.

Цель настоящей работы состояла в изучении способа оценки качества антибиотиков

тетрациклинового ряда по их собственной флуоресценции без извлечения таблеток из блистерной упаковки с использованием смартфона и приложения PhotoMetrix PRO®.

Экспериментальная часть

Образцы. В качестве объектов исследования были выбраны 6 лекарственных препаратов, приобретенных в аптеках г. Владимир (табл. 1).

Получение и обработка изображений с помощью приложения PhotoMetrix PRO®. Для изучения способности неdestructивно анализировать лекарственные препараты тетрациклинового ряда использовали приложение PhotoMetrix PRO®, установленное на смартфоне RedmiNote 9 Pro («Xiaomi», Китай, Android 9 с основной камерой 64 МП). В работе использовали устройство-бокс (9×12×9 см), напечатанное на 3D-принтере с установленной УФ-светодиодной матрицей SHL0020UV (390 нм) и блоком питания на 4,5 В (три элемента питания AAA) (рис. 2).

Лекарственные препараты в виде таблеток и капсул (в блистерной упаковке, без нее и на рас-

коле таблеток) помещали в бокс. Устанавливали камеру смартфона на смотровое окно, фотографировали и обрабатывали результаты с помощью приложения PhotoMetrix PRO®.

PhotoMetrix PRO® – бесплатное программное обеспечение для смартфонов на платформе андроид. С его помощью проводили обработку и представление результатов методами одномерного или многомерного анализа [10–12]. На рис. 3 показан интерфейс начального экрана и настроек (settings), в которых устанавливали область захвата цветовых характеристик (region of interest) 16×16 пикселей. Установлено, что в данном анализе эта область наиболее оптимальна при расстоянии 10 см от камеры до образца. Чтобы камера была сфокусирована только в области захвата, устанавливали режим фокусирования (focus mode) «бесконечный» (infinity). Проводили фотографирование без вспышки (flash mode – off) с разрешением экрана (resolution) 640×480.

Одномерный анализ (univariate analysis). При определении концентрации действующего вещества в препаратах по градуировочной

Т а б л и ц а 1

Состав лекарственных препаратов и их производители

Лекарственный препарат (действующее вещество, мг в таблетке)	Вспомогательные вещества	Производитель
Доксициклин, диспергируемые экспресс-таблетки (доксициклин, 100 мг)	целлюлоза микрокристаллическая, сахарин, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, кремния диоксид, магния стеарат, лактозы моногидрат	ОАО «Фармстандарт-Лексредства», Россия
Доксициклин Солюшн, таблетки диспергируемые (доксициклин, 100 мг)	лактозы моногидрат, целлюлоза микрокристаллическая, гипролоза низкозамещенная, натрия сахаринат, гипромеллоза, стеарат магния, кремния диоксид	ООО «Озон», Россия
Тетрациклин, таблетки покрыты пленочной оболочкой (тетрациклин, 100 мг)	сахароза, крахмал кукурузный, тальк, магния карбонат основной, декстрин, стеарат натрия, желатин, кислотный красный 2С, тропеолин 0	ООО «Озон», Россия
Тетрациклин, таблетки покрыты пленочной оболочкой (тетрациклин, 100 мг)	сахароза, кальций стеарат, желатин пищевой, крахмал картофельный, тальк; оболочка: метилцеллюлоза, макрогол-6000, титана диоксид, краситель азорубин, тропеолин 0	ОАО «Биосинтез», Россия
Минолексин, капсулы (Миноциклин, 50, 100 мг)	целлюлоза микрокристаллическая, повидон низкомолекулярный, крахмал картофельный, магния стеарат, лактозы моногидрат; капсулы твердые желатиновые: краситель хинолиновый желтый, краситель солнечный закат желтый (Е110), титана диоксид, желатин	АО «АВВА РУС», Россия

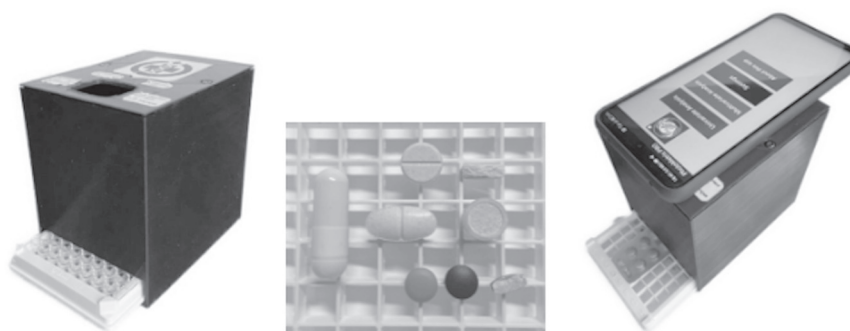


Рис. 2. Устройство для цветометрического анализа

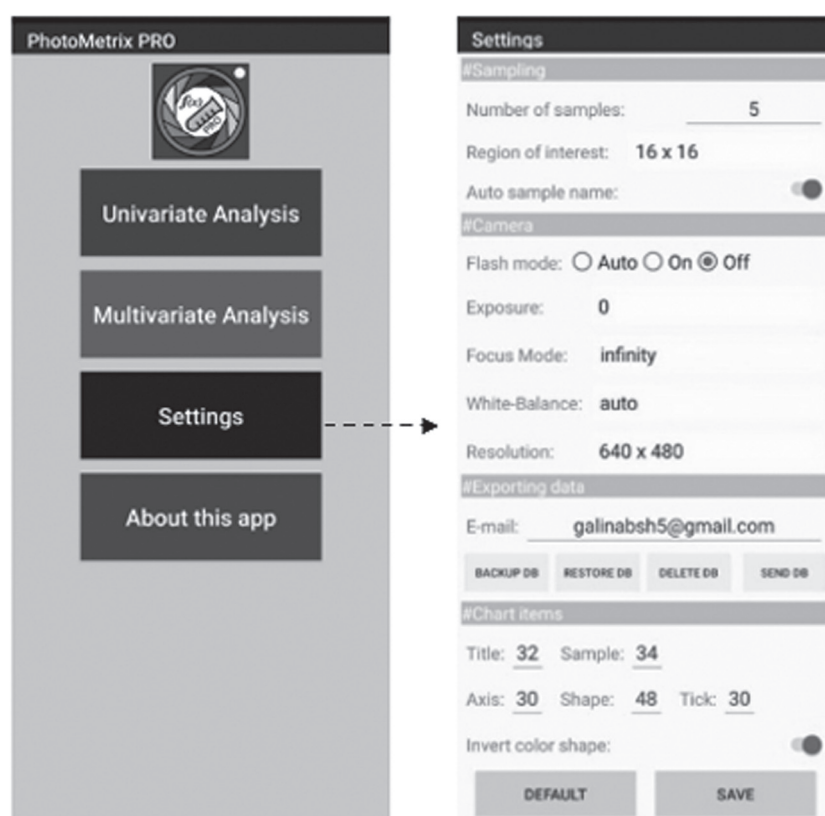


Рис. 3. Установление начальных настроек в PhotoMetrix PRO®

зависимости использовали одномерный анализ. Для этого в разделе метода выбирали опцию «multiple channels», использующую расчеты с помощью метода наименьших квадратов по отдельно выбранным цветометрическим каналам R, G, B, H, S, V, L и I. После построения градуировочной зависимости в разделе (calibration) добавляли образцы (sampling) и получали результаты (рис. 4).

Многомерный анализ (multivariate analysis). Многомерный анализ с использованием цветометрических каналов R, G, B, H, S, V, L и I позволяет использовать алгоритмы методов главных компонент (PCA), иерархического кластерного анализа (HCA) и частичной регрессии метода наименьших квадратов (PLS).

В настоящей работе при использовании алгоритмов PCA анализируемые образцы помещали

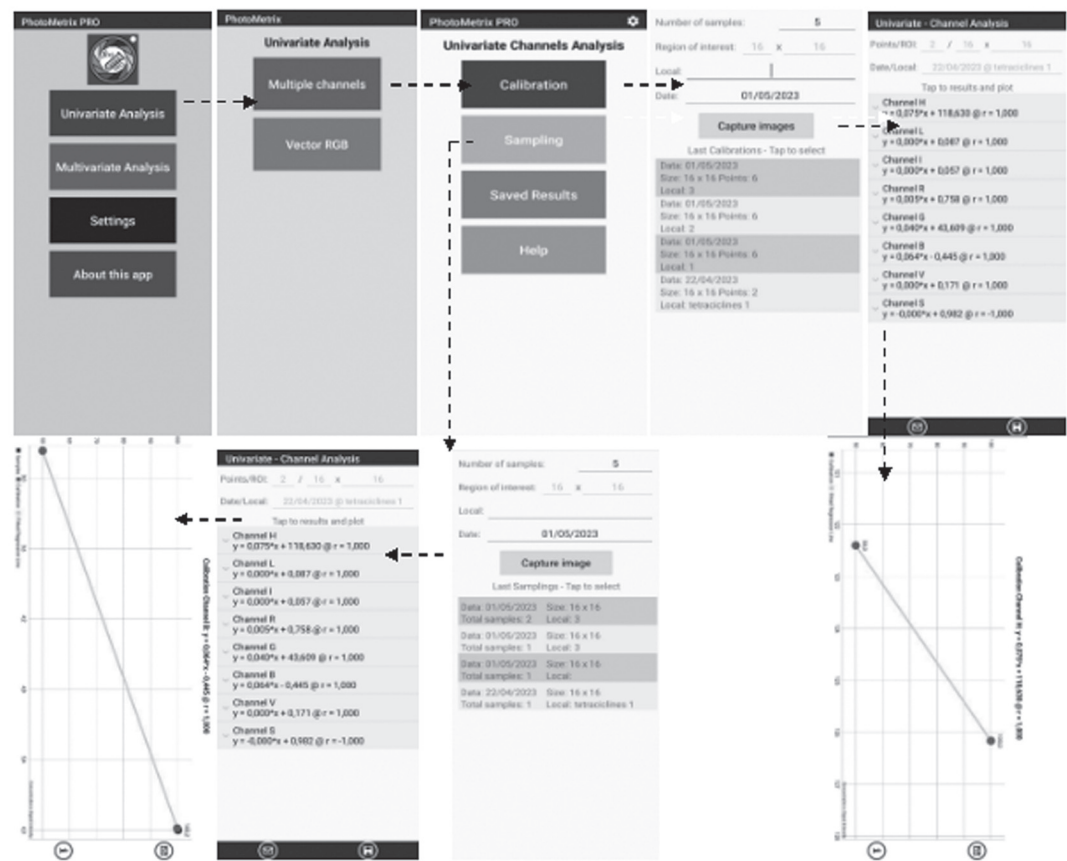


Рис. 4. Работа с одномерным анализом в PhotoMetrix PRO®

Таблица 2

Результаты анализа лекарственных препаратов (n = 3, P = 0,95)

Наименование лекарственного препарата	Содержание основного вещества, мг	Уравнения градуировочных зависимостей	R ²	Найдено, мг в таблетке	s _r
PLS					
Миноксидин	50 100	y = 0,998x + 0,154	0,998	55±4 86±3	0,03 0,02
Одномерный анализ					
Миноксидин	50 100	y = 0,423x – 4,555 —	0,994	52±4 96±1	0,04 0,01

в бокс и проводили фотографирование в разделе Sampling. Полученные результаты находятся в разделе Re-Processing, для алгоритма НСА дендрограмма устанавливается автоматически после использования метода PCA (рис. 5).
Применяли алгоритм PLS, использующий градуировочные зависимости концентраций

стандартных образцов от предсказанных (расчитанных методом PLS). После построения градуировочных зависимостей в разделе «Calibration», с полученными данными ознакомились в пункте «Cal Repressing». Добавление образца проводили в разделе «Sampling», а просмотр результатов – в разделе «Saved



Рис. 5. Применение метода главных компонент (PCA) и иерархического кластерного анализа (HCA) в PhotoMetrix PRO®

Results». Работа с этим алгоритмом представлена на рис. 6.

Результаты и их обсуждение

Антибиотики тетрациклинового ряда способны флуоресцировать при облучении УФ желтым цветом. На гистограмме (рис. 7) представлены суммы значений RGB в зависимости от объектов фотографирования (в блистерной упаковке, без упаковки и на расколе таблеток). Как видно из рис. 7, блистерная упаковка, изготавливаемая в основном из полиэтилентерефталата или поливинилхлорида, незначительно уменьшает прохождение света с длиной волны 390 нм и позволяет зафиксировать цветовые характеристики собственной флуоресценции тетрациклинов. Аналогичный результат получали для таблеток, покрытых пленкой (тетрациклин) и в капсулах из желатины (минолексин).

С помощью метода PCA проанализировали пять лекарственных препаратов разных производителей, один из которых (минолексин) был представлен в концентрации 50 и 100 мг в таблетке.

Графики PCA, полученные при фотографировании в блистерной упаковке, без нее и на расколе таблетки, представлены на рис. 8. На всех графиках для препаратов доксициклина (1, 2) и тетрациклина (3, 4), взятых в одинаковой концентрации, можно наблюдать четкое различие по производителю. При фотографировании на расколе таблетки проявляется общность по действующему веществу. Так, в 4-м квадранте находятся доксициклины (1, 2), в 3-м – тетрациклины (4, 5), а в 1-м – миноциклины (5, 6) (рис. 8, в). Наглядная идентификация по производителю вне зависимости от объекта фотографирования представлена на дендограммах PCA с образованием отдельных кластеров (рис. 9). При использовании таблеток минолексина с действующим веществом миноциклин были построены градуировочные зависимости с применением алгоритма PLS и одномерного анализа (число параллельных определений равно 3). Получены градуировочные зависимости с коэффициентом детерминации 0,998 ($y = 0,998x + 0,154$) для



Рис. 6. Применение частичной регрессии метода наименьших квадратов (PLS) в PhotoMetrix PRO®

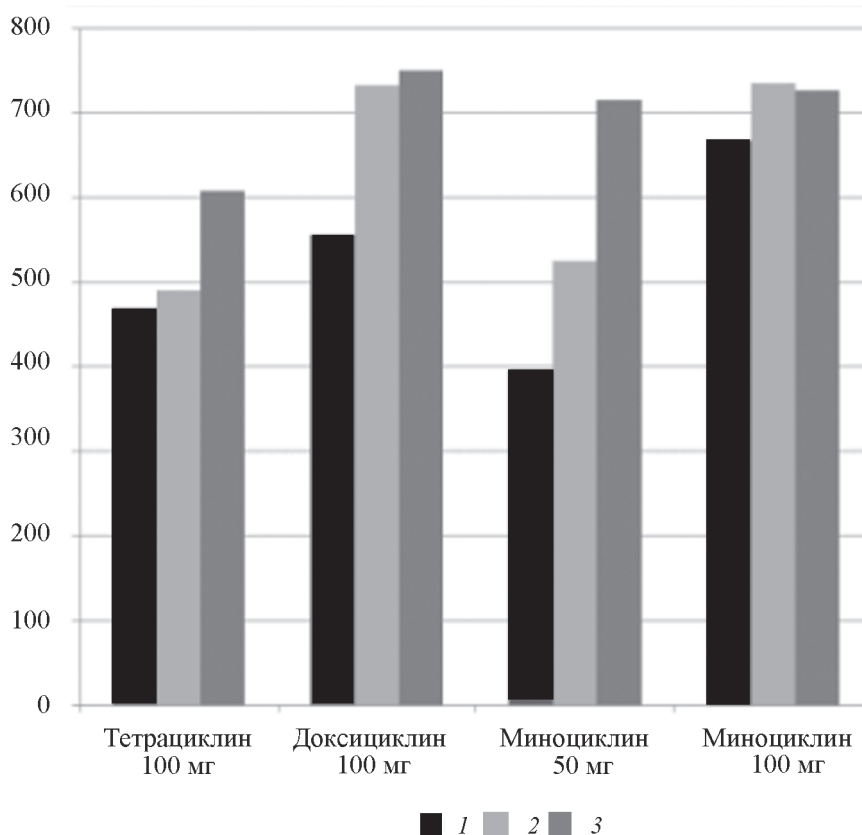


Рис. 7. Суммы значений RGB флуоресценции тетрациклинов в разных условиях:
1 – в упаковке, 2 – без упаковки, 3 – на расколе таблетки

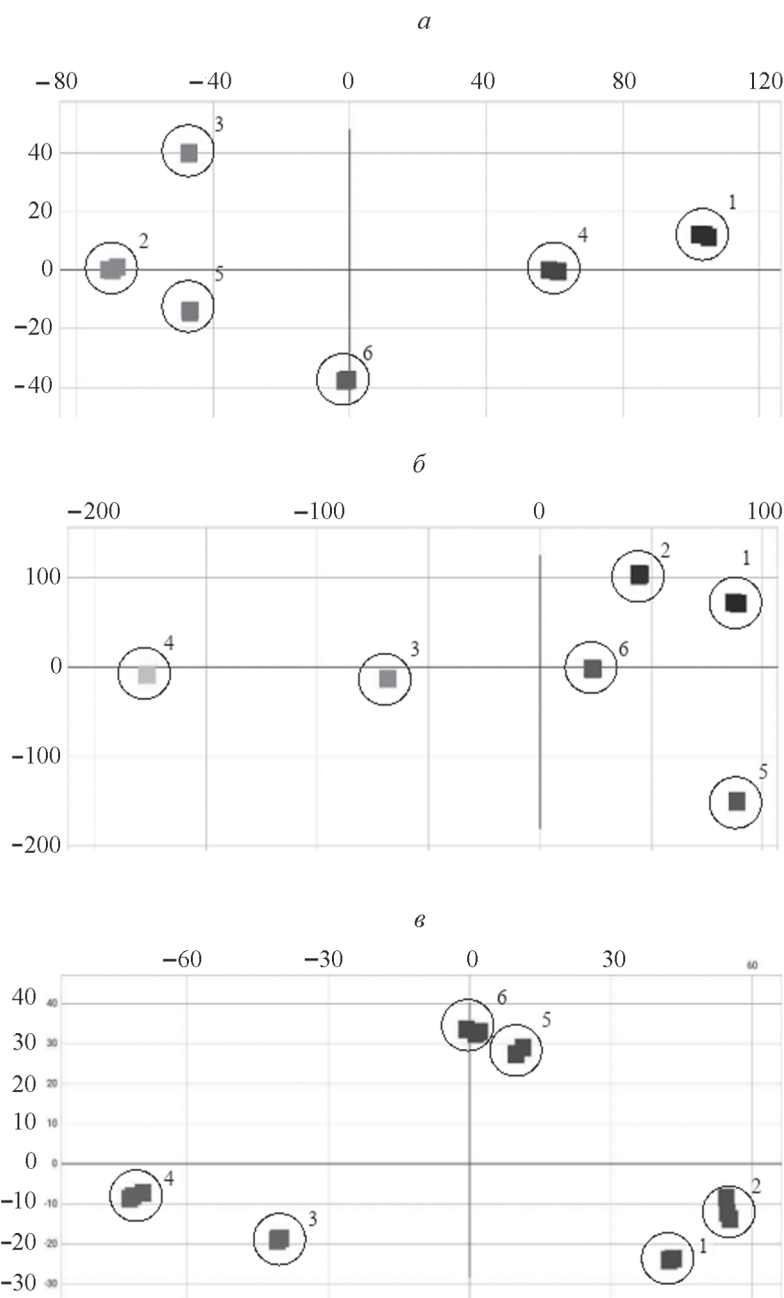


Рис. 8. Графики PCA для лекарственных препаратов с действующими веществами 1, 2 – доксициклин, 3, 4 – тетрациклин, 5, 6 – миноциклин, сфотографированные: *a* – в упаковке, *б* – без упаковки, *в* – на расколе таблетки

алгоритма PLS и 0,994 ($y = 0,002x - 0,018$) для одномерного анализа.

В табл. 2 представлены результаты определения действующего вещества миноциклин в лекарственных препаратах.

Заключение

Предложен анализ лекарственных препаратов тетрациклинового ряда с помощью смартфона с приложением PhotoMetrix PRO® и

специального устройства с УФ светодиодной матрицей. С помощью метода главных компонент и иерархического кластерного анализа рассмотрена способность идентификации производителя и действующего вещества. Для определения концентрации действующего вещества использовали частичную регрессию метода наименьших квадратов и одномерный анализ. Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышало 0,04.

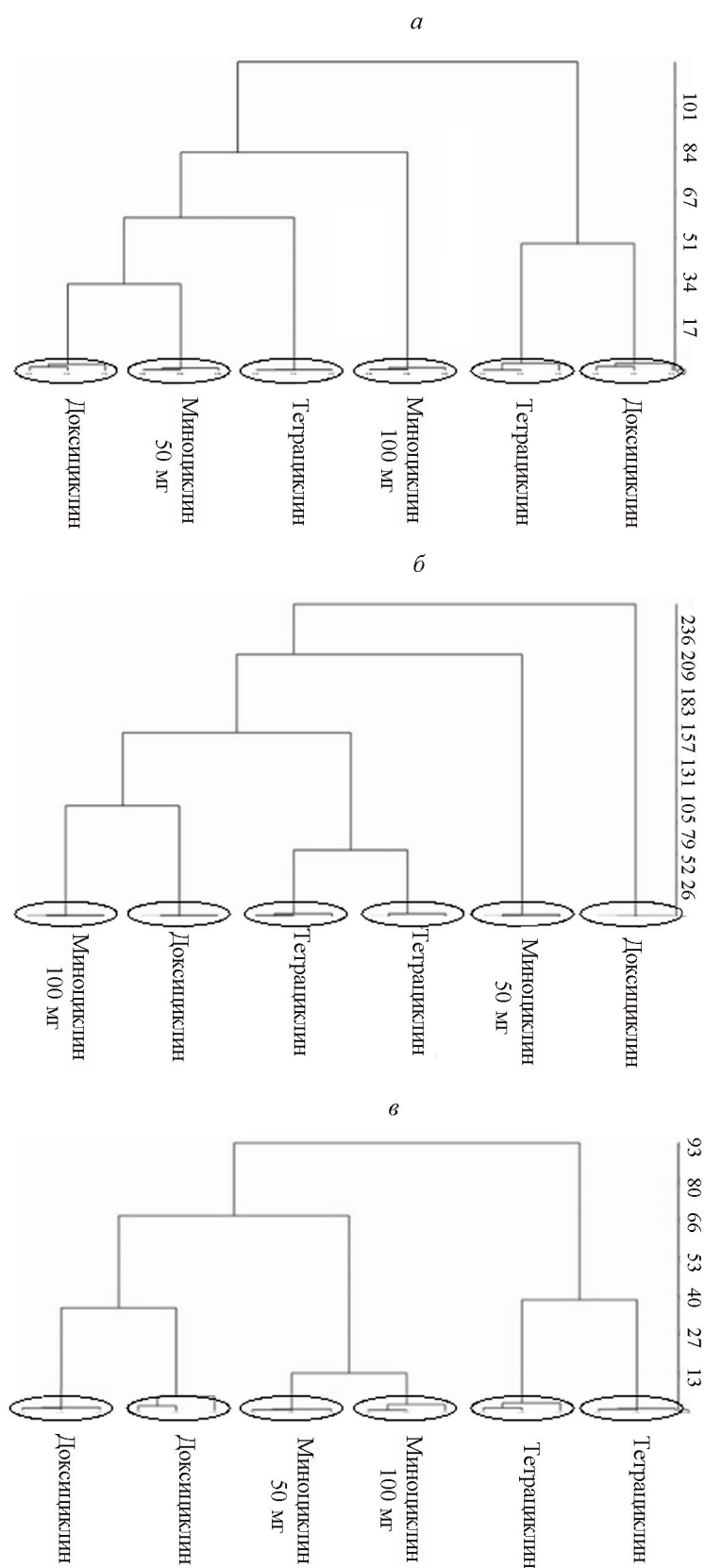


Рис. 9. Дендограммы, полученные с помощью метода НСА: *a* – в упаковке, *б* – без упаковки, *в* – на расколе таблетки

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амелин В.Г., Шаока З.А.Ч., Большаков Д.С., Третьяков А.В. // Изв. ВУЗов. Сер. Химия и хим. технол. 2022. Т. 65. № 7. С. 17.
2. Hirschy L.M., Dose E.V., Winefordner J.D. // Anal. Chem. Acta. 1983. Vol. 147. P. 311.
3. Rodriguez-Diaz R.C., Aguilar-Caballos M.P., Gomez-Hens A. // Anal. Chim. Acta. 2003. Vol. 494. P. 55.
4. Паращенко И.И., Смирнова Т.Д., Штыков С.Н., Кочубей В.И., Жукова Н.Н. // Журн. аналит. химии. 2013. Т. 68. № 2. С. 125.
5. Моногарова О.В., Осолок К.В., Апяри В.В. // Журн. аналит. химии. 2018. Т. 73. № 11. С. 857.
6. Апяри В.В., Горбунова М.В., Исаченко А.И., Дмитриенко С.Г., Золотов Ю.А. // Журн. аналит. химии. 2017. Т. 72. № 11. С. 963.
7. Иванов В.М., Кузнецова О.В. // Успехи химии. 2001. Т. 70. № 5. С. 411.
8. Huang X., Xu D., Chen J., Liu J., Li Y., Song J., Ma X., Guo J. // Analyst. 2018. Vol. 143. P. 5339.
9. Rezazadeh M., Seidi Sh., Lid M., Pedersen-Bjergaard S., Yamini Y. // Trends Analyt. Chem. 2019. Vol. 118. P. 548.
10. Von Mühlen L., Prestes O. D., Ferrão M.F., Sirtori C. // Molecules. 2022. Vol. 27. P. 4721.
11. Dhruvin P., Rajashree M. // J. Drug Deliv. Therapeut. 2022. Vol. 12. P. 108.
12. Kamini B., Rajashree M. // J. Drug Deliv. Therapeut. 2022. Vol. 12. P. 49.

Информация об авторах

Василий Григорьевич Амелин – гл. науч. сотр. ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, ВГНКИ», профессор кафедры химии Института биологии и экологии ФГБОУ ВО «Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых, ВлГУ», докт. хим. наук, профессор (amelinv@gmail.ru);

Галина Михайловна Бесчастнова – магистрант кафедры химии Института биологии и экологии ФГБОУ ВО «Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых, ВлГУ» (galinabsh5@gmail.com);

Зин Алабдин Чалави Шаока – аспирант кафедры химии Института биологии и экологии ФГБОУ ВО «Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых, ВлГУ» (zeanalaabideen4@gmail.com);

Алексей Викторович Третьяков – зам. директора ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, ВГНКИ», канд. хим. наук. (a.tretyakov@vgnki.ru);

Леонид Карольевич Киш – директор ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, ВГНКИ», канд. вет. наук (kanc@vgnki.ru).

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических стандартов

В данной работе отсутствуют исследования человека и животных.

Статья поступила в редакцию 15.05.2023;
одобрена после рецензирования 16.06.2023;
принята к публикации 16.02.2024.