

**ЦИФРОВАЯ ЦВЕТОМЕТРИЯ ИНДИКАТОРНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
СМАРТФОНА И ХЕМОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА
ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ТЕТРАЦИКЛИНОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ**

В.Г. Амелин, З.А.Ч. Шаока, Д.С. Большаков, А.В. Третьяков

Василий Григорьевич Амелин (ORCID 0000-0001-7477-7398)*

Кафедра химии, Институт биологии и экологии, Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых, ул. Горького, 87, Владимир, Российская Федерация, 600000

Отделение фармакологических лекарственных средств, безопасности пищевой продукции и кормов, Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, Звенигородское шоссе, 5, Москва, Российская Федерация, 123022

E-mail: amelinvg@mail.ru*

Зин Алабдин Чалави Шаока

Кафедра химии, Институт биологии и экологии, Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых, ул. Горького, 87, Владимир, Российская Федерация, 600000

E-mail: zeanalaabideen4@gmail.com

Дмитрий Сергеевич Большаков (ORCID 0000-0001-9233-1349)

Лаборатория санитарно-гигиенических исследований, Центр гигиены и эпидемиологии в Владимирской области, ул. Токарева, 5, Владимир, Российская Федерация, 600005

E-mail: bolshakovina@mail.ru

Алексей Викторович Третьяков (ORCID 0000-0002-4984-9502)

Отделение фармакологических лекарственных средств, безопасности пищевой продукции и кормов, Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, Звенигородское шоссе, 5, Москва, Российская Федерация, 123022

E-mail: tretyakov81@gmail.com

Рассмотрена возможность определения действующих веществ антибактериальных препаратов тетрациклинового ряда (тетрациклин, доксициклин, окситетрациклин, демеклоциклин, метациклин и хлортетрациклин) с использованием цифровой цветометрии твердофазной флуоресценции. Изучена собственная флуоресценция тетрациклинов и sensibilizированная тетрациклинами флуоресценция европия на целлюлозной бумаге и тонком слое силикагеля. Предложено тест-устройство, состоящее из четырех индикаторных зон. При облучении монохроматическим ультрафиолетовым светом пятен растворов тетрациклинов нанесенных на матрицы разработанной тест-системы, наблюдается желто-зеленая (тетрациклины) и розовая (европий) флуоресценция. Измерение интенсивности флуоресценции на поверхности матриц осуществляли с помощью смартфона в качестве цветорегистрирующего устройства. Для расчета аналитического сигнала (A_i) по базисным компонентам цвета выбрана аддитивная цветовая модель RGB. Показана возможность использования хемометрического анализа, позволяющего сократить время анализа и визуализировать данные исследования. Обработку массива данных проводили методами главных компонент (principal component analysis, PCA), иерархического кластерного анализа (hierarchical clustering analysis, HCA) и метода k-means с использованием программного обеспечения XLSTAT. Установлено,

что привлечение хемометрических методов для обработки аналитического сигнала способствует увеличению достоверности идентификации аналитов. Предложен способ идентификации и оценки содержания антибактериальных веществ тетрациклинового ряда в готовых лекарственных препаратах комбинацией методов цифровой цветометрии индикаторных тест-систем и хемометрического анализа. Данный подход отличает экспрессность, простота аппаратного оформления, доступность используемых материалов и средств обработки данных. Диапазон определяемых содержаний составил 8–500 мкг/мл. Апробация рассмотренного в работе подхода проведена на готовых лекарственных препаратах коммерческого производства. Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 0,09.

Ключевые слова: тетрациклины, цифровая цветометрия, твердофазная флуориметрия, смартфон, хемометрический анализ, лекарственные препараты

DIGITAL COLORIMETRY OF INDICATOR TEST SYSTEMS USING SMARTPHONE AND CHEMOMETRIC ANALYSIS IN DETERMINING TETRACYCLINES IN MEDICINAL PREPARATIONS

V.G. Amelin, Z.A.C. Shogah, D.S. Bolshakov, A.V. Tretyakov

Vasily G. Amelin (ORCID 0000-0001-7477-7398)*

Department of Chemistry, Institute of Biology and Ecology, Vladimir State University named after Alexander and Nikolay Stoletovs, Gor'kogo st., 87, Vladimir, 600000, Russia
Department of Pharmacological Medicines, Food and Feed Safety, Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality, Zvenigorodskoye shosse, 5, Moscow, 123022, Russia
E-mail: amelinvg@mail.ru*

Zen Alabden Chalawi Shogah

Department of Chemistry, Institute of Biology and Ecology, Vladimir State University named after Alexander and Nikolay Stoletovs, Gor'kogo st., 87, Vladimir, 600000, Russia
E-mail: zeanalabideen4@gmail.com

Dmitry S. Bolshakov (ORCID 0000-0001-9233-1349)

Laboratory of Sanitary and Hygienic Research, Center for Hygiene and Epidemiology in the Vladimir Region, Tokareva st., 5, Vladimir, 600005, Russia
E-mail: bolshakovina@mail.ru

Alexey V. Tretyakov (ORCID 0000-0002-4984-9502)

Department of Pharmacological Medicines, Food and Feed Safety, The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality, Zvenigorodskoye shosse, 5, Moscow, 123022, Russia
E-mail: tretyakov81@gmail.com

The possibility of determining the active substances of antibacterial drugs of the tetracycline series (tetracycline, doxycycline, oxytetracycline, demeclocycline, metacycline and chlortetracycline) using solid-phase fluorescence digital colorimetry is considered. The intrinsic fluorescence of tetracyclines and tetracyclines sensitized fluorescence of europium on cellulose paper and a thin layer of silica gel were studied. The proposed test device consists of four indicator zones. When irradiating with monochromatic ultraviolet light spots of tetracyclines solutions deposited on the matrices of the developed test system, yellow-green (tetracyclines) and pink (europium) fluorescence is observed. The measurement of the fluorescence intensity on the surface of the matrices was carried out using a smartphone as a color-registering device. To calculate the analytical signal (A_r) from the basic color components, an additive RGB color model was selected. The possibility of using chemometric analysis, which makes it possible to reduce the analysis time and visualize research data, is shown. The data set was processed by principal component analysis (PCA), hierarchical clustering analysis (HCA), and k-means using the XLSTAT software. It was found that the use of chemometric methods for processing the analytical signal contributes to an increase in the

reliability of the identification of analytes. A method for identifying and evaluating the content of antibacterial substances of the tetracycline series in finished medicinal preparations by a combination of digital colorimetry methods of indicator test systems and chemometric analysis is proposed. This approach is distinguished by expressness, simplicity of hardware design, availability of the materials used and data processing tools. The range of determined contents was 8–500 µg/mL. Approbation of the approach considered in the work was carried out on finished medicinal products of commercial production. The relative standard deviation of the analysis results does not exceed 0.09.

Key words: tetracyclines, digital colorimetry, solid-phase fluorimetry, smartphone, chemometric analysis, drugs

Для цитирования:

Амелин В.Г., Шаока З.А.Ч., Большаков Д.С., Третьяков А.В. Цифровая цветометрия индикаторных тест-систем с использованием смартфона и хемометрического анализа при определении тетрациклинов в лекарственных препаратах. *Изв. вузов. Химия и хим. технология*. 2022. Т. 65. Вып. 7. С. 17–27. DOI: 10.6060/ivkkt.20226507.6568.

For citation:

Amelin V.G., Shogah Z.A.C., Bolshakov D.S., Tretyakov A.V. Digital colorimetry of indicator test systems using smartphone and chemometric analysis in determining tetracyclines in medicinal preparations. *ChemChemTech [Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.]*. 2022. V. 65. N 7. P. 17–27. DOI: 10.6060/ivkkt.20226507.6568.

ВВЕДЕНИЕ

Фармацевтическая отрасль предъявляет жесткие требования к качеству производимой продукции [1]. Дополнительная трудность контроля готовых лекарственных препаратов (ЛП) обусловлена многообразием лекарственных форм, которые содержат вспомогательные вещества различной химической природы. Официально признанные методики [1] позволяют проводить идентификацию действующего вещества ЛП, оценку его количественного содержания и содержания родственных примесей. Однако, для выполнения подобных исследований необходимо внушительное приборное обеспечение, позволяющее реализовывать значительный спектр методик.

Актуальным и перспективным направлением последних лет является развитие экспресс-методологии, которая позволяет существенно повысить экспрессность анализа (как единичного, так и серийного), его мобильность (анализ на месте отбора проб), уменьшить себестоимость и автоматизировать процесс обработки первичных данных. Подобные разработки стали возможными благодаря совершенствованию портативной цифровой техники (главным образом смартфонов), специализированных приложений и программных продуктов.

Особое место среди всех лекарственных средств (ЛС) занимают антибактериальные вещества. Данная группа соединений включает природные, полусинтетические и синтетические вещества, обладающие антимикробной активностью. Они способны убивать или подавлять рост других микроорганизмов. К природным антибиотикам относят вещества тетрациклинового ряда (ТЦ) (рис. 1).

Высокая противомикробная активность и низкая стоимость ТЦ привели к их широкому использованию в медицине и животноводстве для профилактики и лечения инфекционных заболеваний, в качестве стимуляторов роста животных, а также в пищевой промышленности для увеличения сроков хранения пищевых продуктов [2].

Учитывая физико-химические свойства рассматриваемого класса антимикробных соединений, последние научные разработки используют методы спектрофотометрии [3–14], высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [9, 15–19], атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС) [9], капиллярного электрофореза (КЭ) [20] и вольтамперометрии [21] для оценки качества готовых ЛП, содержащих ТЦ.

Наиболее простым в реализации, относительно дешевым, а значит и доступным для испытательных и контрольных лабораторий является спектрофотометрический метод в видимой области спектра [3–14]. Для повышения чувствительности определения ТЦ переводят в аналитическую форму, обладающую большим молярным коэффициентом поглощения. Используют реакции образования хелатных комплексных соединений с ионами металлов (Rh (II) [5], Zr (IV) [7], Au (II) и Hg (II) [9]), а также реакции получения окрашенных продуктов при взаимодействии ТЦ с нитропруссидом натрия в присутствии гидросиламина гидрохлорида ($\lambda_{\max} = 529$ нм) [3], *p*-*N,N*-диметилфенилендиамин в присутствии метапериодата натрия ($\lambda_{\max} = 625$ нм) [4], диазотированным 4-аминоантипирином в присутствии хлорида цетилпиридиния ($\lambda_{\max} = 537$ нм) [6], хлорамином-Т ($\lambda_{\max} = 535$ и 525 нм) [8], хлораниловой ($\lambda_{\max} = 540$ нм) [10] и сульфани-

ловой ($\lambda_{\text{max}} = 403 \text{ нм}$) [11] кислотами, 2,4-динитро-фенилгидразином в присутствии периодата калия ($\lambda_{\text{max}} = 488 \text{ нм}$) [12].

Данные методики подходят только для одноконпонентного анализа, не дают возможность провести идентификацию и оценку содержания близкородственных соединений тетрациклиновой группы. Более универсальными являются хроматографические [15-19] и электрофоретические [20] методы.

Методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим (МС) (в том числе tandemным) [15, 16] и диодно-матричным [17] вариантами детектирования проводят определение терапевтических количеств ТЦ в лечебных кормах. Для извлечения антибактериальных веществ используют жидкостную экстракцию буферными смесями кислотного характера в присутствии органических растворителей (метанол, ацетонитрил). В работе [15] предложена методика определения окситетрациклина, тетрациклина, хлортетрациклина и доксициклина в лечебных кормах для животных методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с квадрупольным МС детектором при электрораспылительной ионизации. Экстракцию ТЦ проводили смесью $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ – буферный раствор МакИлвейна ($\text{pH} = 4$): метанол (40:60, об.) с последующей гомогенизацией и центрифугированием. В качестве подвижной фазы применяли

растворы 0,1%-ной муравьиной кислоты в воде (элюент А) и 0,1%-ной муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент Б) при градиентном режиме элюирования. Пределы обнаружения и определения варьировались в диапазонах 2,8-4,2 мг/кг и 4,3-5,7 мг/кг соответственно. Диапазон определяемых содержаний (ДОС) составил 50-1500 мкг/кг при степенях извлечения 78,2–113,5 %.

Высокоэффективные методы разделения применяют и для устранения мешающего влияния компонентов матрицы при анализе лекарственных форм сложного состава [18, 19]. Разработан способ определения тетрациклина в мазях и таблетированных формах в диапазоне концентраций 0,1-5 мкг/мл методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием при проведении постколоночной реакции комплексообразования с $\text{Mg}(\text{II})$ [19]. Градиентное элюирование проводили при использовании системы подвижных фаз, состоящей из раствора 0,01 М щавелевой кислоты ($\text{pH} = 3$) (элюент А) и ацетонитрила (элюент Б). Показана возможность применения микроэмульсии на стадии пробоподготовки для количественного извлечения тетрациклина из заявленных лекарственных форм. Пределы обнаружения и определения соответственно составили 25 и 75 нг/мл. Степени извлечения варьировались от 95 до 100%.

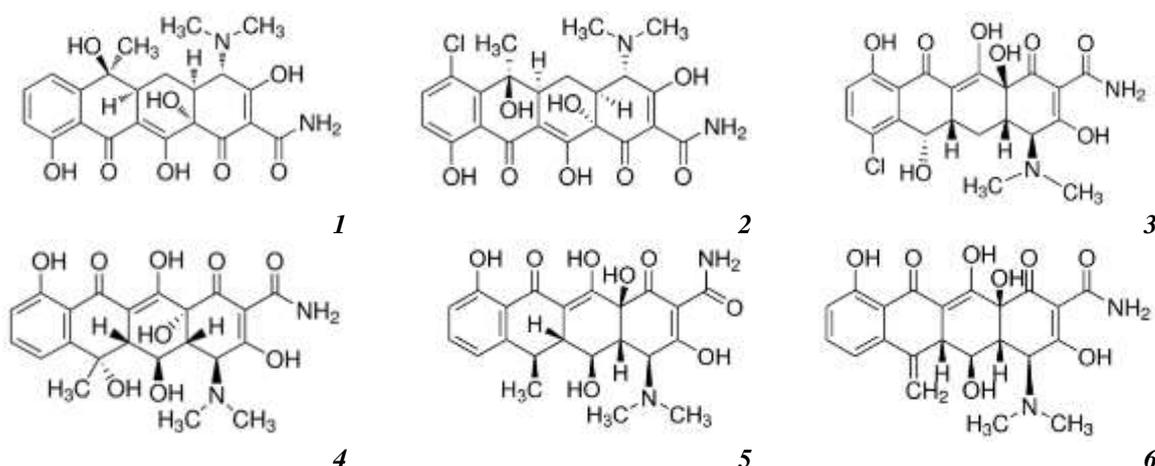


Рис. 1. Структурные формулы тетрациклина (1), хлортетрациклина (2), демеклоциклина (3), окситетрациклина (4), доксициклина (5), метациклина (6)

Fig. 1. Structural formulas of tetracycline (1), chlortetracycline (2), demeclocycline (3), oxytetracycline (4), doxycycline (5), metacyclin (6)

Несмотря на существенные преимущества, описанные методы не позволяют выполнять экспресс-анализ ЛП при сохранении высокой точности и достоверности результатов. Совершенствование экспресс-методологии возможно, например, при совместном использовании таких подходов,

как цифровая цветометрия [22-25] и хемометрический анализ [26]. Разработка различных цветометрических систем и многообразие способов обработки сырых данных предоставляют исследователю возможность решать большое количество за-

дач, оперируя ограниченным, но достаточным набором аналитических инструментов [27].

В серии работ [22-25] приведены достижения цветометрического метода при решении различных прикладных задач, в том числе для проверки качества ЛП, оценки безопасности пищевой продукции и водных источников. С целью увеличения достоверности получаемых результатов в рамках данного исследования для идентификации и определения тетрациклинов в ЛП предложено использовать тест-систему из четырех индикаторных зон. Состав матриц и пропиточных растворов для сенсibilизированной флуоресценции обеспечивает необходимую дифференциацию выбранного в работе спектра антибактериальных средств за счет особенностей флуориметрического поведения аналитов. В данном случае только применение хемометрических алгоритмов гарантирует надлежащую качественную и количественную оценку полученных результатов. Сочетание взаимодополняющих подходов для решения задачи контроля качества ЛП на основе тетрациклинов обуславливает научную новизну представленного исследования.

Цель данной работы состояла в изучении возможности определения действующих веществ антибактериальных препаратов тетрациклинового ряда по собственной флуоресценции тетрациклинов и сенсibilизированной тетрациклинами флуоресценции европия на целлюлозной бумаге и тонком слое силикагеля с использованием смартфона в качестве цветорегистрирующего устройства и обработки данных посредством хемометрического анализа.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Аппаратура. Для изучения оптических и цветометрических характеристик в качестве цветорегистрирующего устройства использовали смартфон «iPhone X» (Apple, США), оснащенный специализированным программным обеспечением «RGBer». Возбуждение флуоресценции проводили с помощью источника монохроматического излучения «Jialite F114 5W 365NM UV» (Shenzhen Jialite Technology Co., Китай) с длиной волны 365 нм, детектора банкнот «Dors 60 SYS-033278/277» (DORS, Китай) и осветителя люминесцентного диагностического «Лампа Вуда ОЛДД-01» (Россия).

В работе применяли аналитические весы «Pioneer PA 214C» специального класса точности с пределом взвешивания 0,1 мг (Ohaus Corporation, USA), дозаторы «Proline Biohit» 1-канальные механические переменного объема 2-20 мкл, 100-1000 мкл, 1000-5000 мкл (Biohit, Финляндия), политетрафторэтиленовые мембранные фильтры 25 мм

диаметром пор 0,20 мкм (Pall Corporation, США), пробирки полипропиленовые емк. 15 мл (SPL Life Sciences Co., Корея), пробирки типа «Эппендорф» емк. 2,0 мл (GenFollower Biotech Co., Китай), полистирольные планшеты для иммуноферментного анализа.

Материалы. Использовали бумагу для хроматографии «Whatman 17 Chr» (Cytiva, США), пластины для высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) «HPTLC Silica gel 60» (Merck, Германия).

Реактивы. В работе использовали стандартные образцы тетрациклина, доксициклина, окситетрациклина, демеклоциклина, метациклина и хлортетрациклина (98-100%, Sigma-Aldrich, США). Исходные стандартные растворы (1 мг/мл) готовили растворением точной навески препаратов в метаноле. Рабочие растворы готовили разбавлением исходных деионизированной водой (15-18 МОм·см, ОСТ 11 029.003-80).

Применяли метанол (Fisher Scientific UK, Великобритания), соляную кислоту («х.ч.», АО «БСК»), тетраборат натрия (Sigma-Aldrich, США), 6-водный хлорид европия (III) $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, США).

Подготовка матриц для сенсibilизированной флуоресценции европия (ЦБ–Eu, ВЭТСХ–Eu). Бумагу для хроматографии «Whatman 17 Chr» или пластину ВЭТСХ погружали в 0,001 М раствор хлорида европия на 1-2 мин, вынимали и сушили в потоке теплого воздуха с помощью тепловентилятора. После высыхания матрицу помещали в 0,2 %-ный раствор тетрабората натрия на 1-2 мин и сушили. Из полученных индикаторных бумаг изготавливали тест-устройство (рис. 2), после нанесения 10 мкл пробы на индикаторные зоны и облучении их УФ-светом проводили измерения цветометрических параметров.

Построение градуировочных зависимостей. Использовали стандартные растворы тетрациклинов концентрацией 1 мг/мл, приготовленные растворением точных навесок в метаноле. Рабочие растворы с концентрацией 500, 250, 125, ... 1, 0 мкг/мл готовили последовательным разбавлением исходного раствора деионизированной водой в полистирольном планшете для иммуноферментного анализа. Полученные таким образом растворы объемом 10 мкл наносили на матрицу с помощью механического дозатора. После высыхания, пятна облучали монохроматическим УФ излучением (365 нм) и измеряли смартфоном цветометрические характеристики. Аналитический сигнал (A_T) в системе RGB рассчитывали по формуле:

$$A_r = \sqrt{(R_0 - R_x)^2 + (G_0 - G_x)^2 + (B_0 - B_x)^2}$$
 где R_0 , G_0 , B_0 , R_x , G_x , B_x – цифровые значения интенсивностей красного, зеленого, синего цветов холостой и анализируемой пробы соответственно.

Определение тетрациклинов в лекарственных препаратах. Одну таблетку лекарственного препарата помещали в колбу вместимостью 100 мл, приливали 1 мл 1 М раствора HCl и объем в колбе до метки доводили деионизированной водой, перемешивали до полного растворения таблетки. Отбирали 1 мл полученного раствора и разбавляли деионизированной водой в колбе вместимостью 25-50 мл, перемешивали и фильтровали через мембранный фильтр 0,20 мкм. Отбирали 10 мкл полученного раствора и наносили на ЦБ или пластину ВЭТСХ. После высыхания пятна облучали УФ (365 нм) и измеряли смартфоном цветиметрические

характеристики, по уравнению градуировочной зависимости рассчитывали содержание тетрациклинов в таблетке с учетом разбавления пробы.

Регистрацию цветиметрических параметров собственной флуоресценции аналитов и сенсibilизированной тетрациклинами флуоресценции европия проводили в темноте (темном помещении), при контролируемом и воспроизводимом положении камеры смартфона и источника монохроматического УФ-излучения.

Хемометрический анализ. Для идентификации и определения антибиотиков тетрациклинового ряда в лекарственных препаратах применяли метод главных компонент (principal component analysis, **PCA**), иерархический кластерный анализ (hierarchical clustering analysis, **HCA**) и метод k-средних (k-means) с использованием программного обеспечения XLSTAT (v. 2021.3.1).

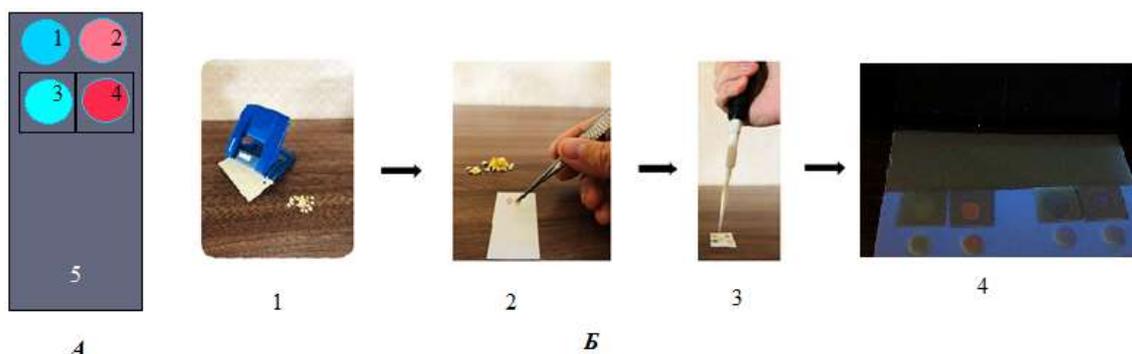


Рис. 2. Тест-устройство и расположение индикаторных зон для идентификации и определения тетрациклинов (А): 1 – ЦБ, 2 – ЦБ–Еу, 3 – ВЭТСХ, 4 – ВЭТСХ–Еу, 5 – держатель. Схема изготовления тест-устройства и измерения цветиметрических характеристик индикаторных зон смартфоном (Б): 1 – изготовление индикаторных зон с помощью дырокола, 2 – приклеивание индикаторов на двухсторонний скотч, 3 – нанесение пробы на индикаторные зоны, 4 – измерение цветиметрических характеристик с помощью смартфона при облучении УФ-светом

Fig. 2. Test device and location of indicator zones for identification and determination of tetracyclines (A): 1 – CP, 2 – CP-Eu, 3 – HPTLC, 4 – HPTLC-Eu, 5 – holder. Scheme of making a test device and measuring the colorimetric characteristics of indicator zones with a smartphone (B): 1 – making indicator zones using a punch, 2 – gluing indicators on double-sided tape, 3 – applying a sample to indicator zones, 4 – measuring colorimetric characteristics using a smartphone when irradiation with UV light

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Тетрациклины на поверхности целлюлозной бумаги (ЦБ, ЦБ–Еу) и силикагеля (ВЭТСХ, ВЭТСХ–Еу) проявляют флуоресцирующие свойства. При облучении УФ светом (365 нм) наблюдается зеленая (ЦБ, ВЭТСХ) флуоресценция и розовая (ЦБ–Еу, ВЭТСХ–Еу) при использовании матриц, пропитанных солью европия(III) и тетрабората натрия. Для получения матриц ЦБ–Еу, ВЭТСХ–Еу изучали влияние на аналитический сигнал концентрации пропиточных растворов европия (0,0001-0,01 М) и тетрабората натрия (0-1%). Установлено, что максимальное значение A_r наблюдается при использовании 0,001 М раствора

хлорида европия(III) для пропитки матриц. В отсутствие тетрабората натрия при нанесении растворов тетрациклинов на ЦБ и ВЭТСХ наблюдали розовое флуоресцирующее кольцо по краям пятна. Использование повторной пропитки матриц раствором тетрабората натрия (оптимально 0,2 %-ный раствор) привело к равномерному окрашиванию флуоресцирующего пятна, что, вероятно, связано с образованием и закреплением в порах ЦБ и ВЭТСХ гидроксида европия(III).

Методом цифровой цветиметрии проанализировано 6 тетрациклинов при различных концентрациях. Цветиметрические данные (аналитический сигнал A_r) для четырех индикаторных зон и десяти концентраций были обработаны методом

РСА, получены матрицы счетов и нагрузок. Установлено, что четкое различие тетрациклинов при концентрации 125 мкг/мл (98,62%) получено для первых двух главных компонент (F1, F2) (рис. 3).

На рис. 4 показаны графики РСА для первых двух главных компонент при различных концентрациях тетрациклинов. Как видно из рисунка, наблюдается дискриминация тетрациклинов (91,10%) в зависимости от концентрации. При малых концентрациях идентифицируемые тетрациклины находятся в квадрантах 1 и 3, при больших – в квадрантах 2 и 4.

Наблюдается логарифмическая зависимость между компонентой F1 и концентрацией тетрациклинов в диапазоне 8-500 мкг/мл с коэффициентом корреляции $R^2 \geq 0,98$ (рис. 5А, табл. 1). Данную зависимость использовали в качестве градуировочной при определении концентрации тетрациклинов.

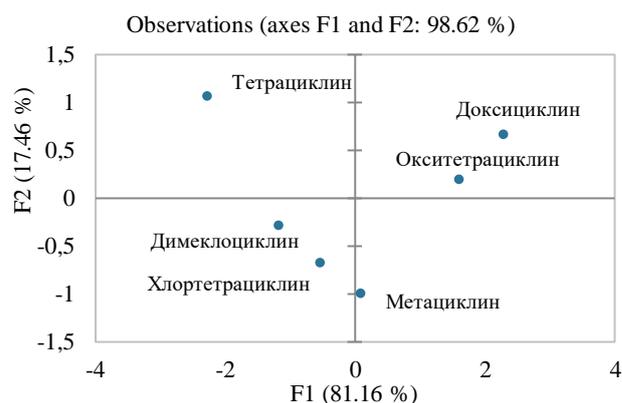


Рис. 3. График РСА для идентификации тетрациклинов при концентрации 125 мкг/мл
Fig. 3. PCA graph for identification of tetracyclines at a concentration of 125 µg/ml

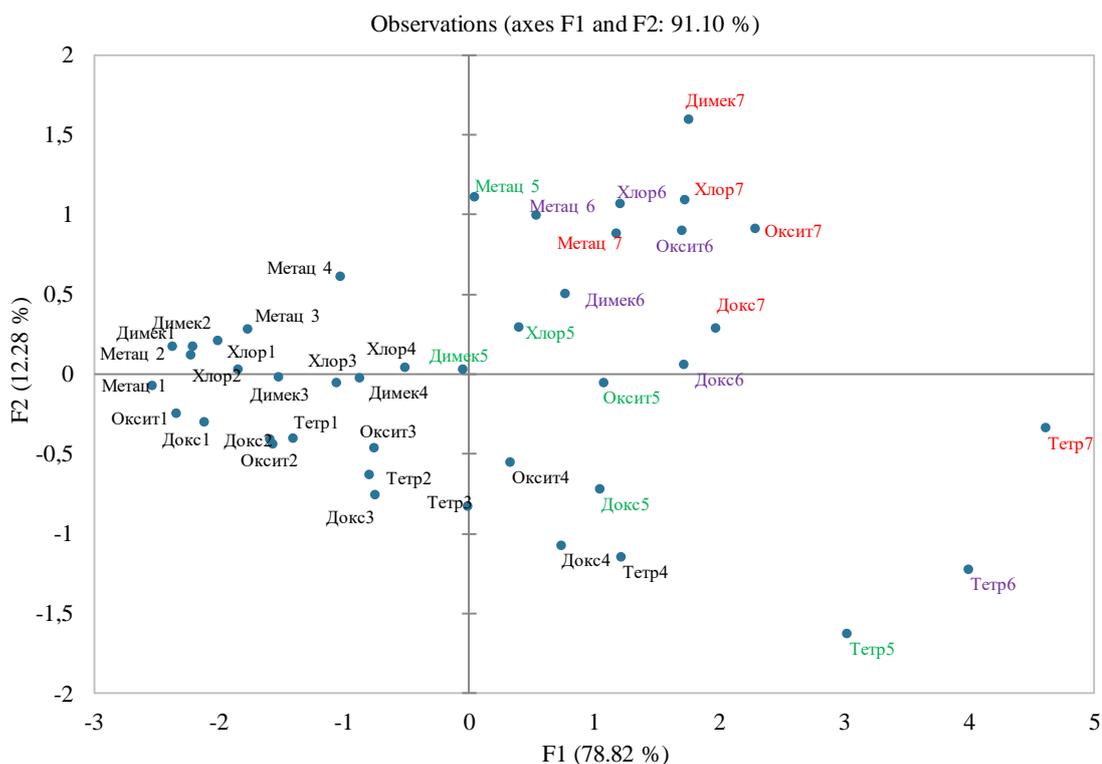


Рис. 4. График РСА для идентификации тетрациклинов в 7-ми последовательных концентрациях: 8 мкг/мл, 16 мкг/мл, 32 мкг/мл, 64 мкг/мл, 125 мкг/мл, 250 мкг/мл и 500 мкг/мл
Fig. 4. PCA graph for identification of tetracyclines in 7 consecutive concentrations: 8 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml, 64 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml and 500 µg/ml

Использование метода иерархического кластерного анализа позволило идентифицировать и определить концентрацию тетрациклинов (рис. 6). На дендрограмме отдельные кластеры образуют тетрациклины с различными концентрациями. Идентифицируемые тетрациклины (X) выделены в

кластеры с нулевым или небольшим расстоянием (Linkage distance) от аналогичных, использованных для обучающей выборки. Концентрацию хинолонов определяли по градуировочной зависимости F1–с (табл. 2).

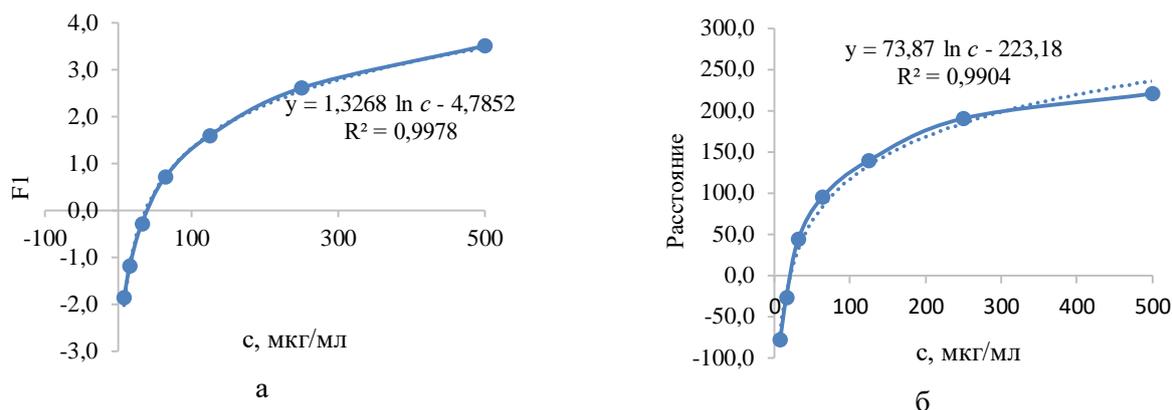


Рис. 5. Градуировочные зависимости для тетрациклина в методах PCA (а) и k-средних (б)
 Fig. 5. Calibration curves for tetracycline in PCA (a) and k-means (б) methods

Таблица 1

Уравнения градуировочных зависимостей для определения тетрациклинов, полученные методом PCA и k-средних в диапазоне определяемых 8–500 мкг/мл

Table 1. Equations of calibration dependences for the determination of tetracyclines, obtained by PCA and k-means methods in the range of 8–500 µg/ml

Тетрациклин	Уравнение градуировочной зависимости k-средних	R ²	Уравнение градуировочной зависимости F1–c	R ²
Тетрациклин	$y = 73,87 \ln c - 223,18$	0,9904	$y = 1,3268 \ln c - 4,7852$	0,9978
Хлортетрациклин	$y = 50,385 \ln c - 215,14$	0,9917	$y = 1,2348 \ln c - 5,1984$	0,9907
Окситетрациклин	$y = 60,201 \ln c - 239,01$	0,9834	$y = 1,3197 \ln c - 5,2668$	0,9959
Димеклоциклин	$y = 54,445 \ln c - 233,31$	0,9910	$y = 1.2503 \ln c - 5,3025$	0,9921
Доксициклин	$y = 50,18 \ln c - 210,52$	0,9806	$y = 1,2399 \ln c - 5,2402$	0,9946

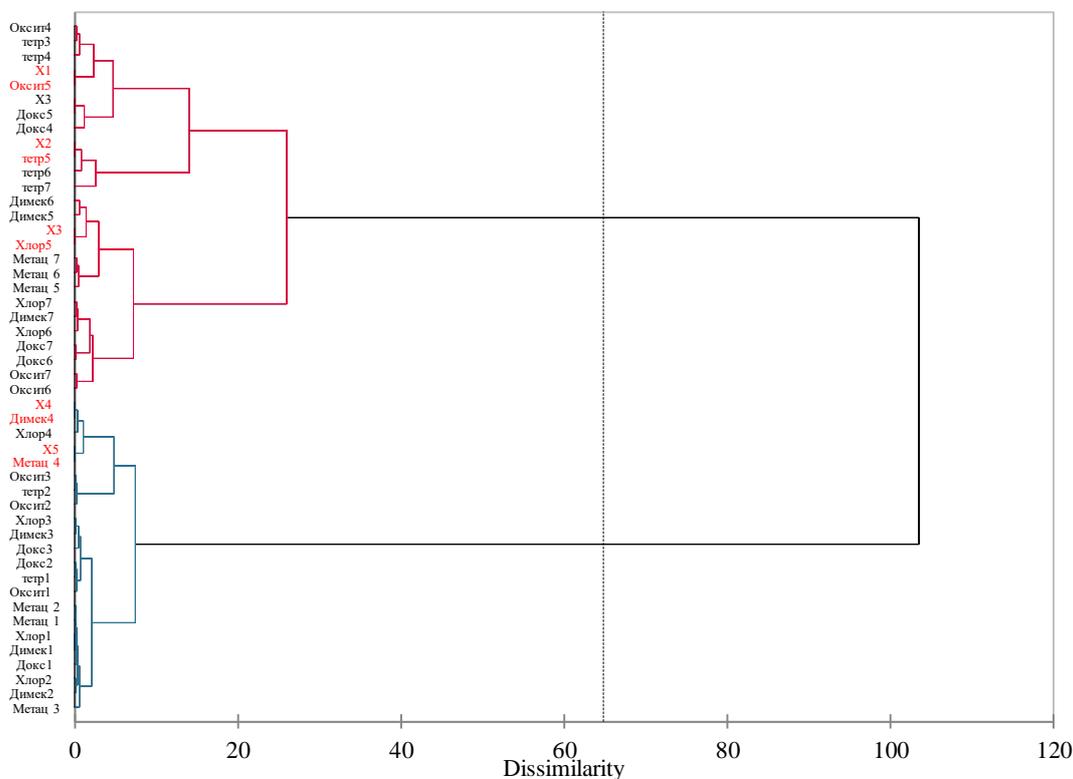


Рис. 6. Дендрограмма для 6-ти тетрациклинов в 7 последовательных концентрациях: 1 – 8 мкг/мл, 2 – 16 мкг/мл, 3 – 32 мкг/мл, 4 – 64 мкг/мл, 5 – 125 мкг/мл, 6 – 250 мкг/мл, 7 – 500 мкг/мл (X – идентифицируемые тетрациклины)

Fig. 6. Dendrogram for 6 tetracyclines in 7 consecutive concentrations: 1 – 8 µg/ml, 2 – 16 µg/ml, 3 – 32 µg/ml, 4 – 64 µg/ml, 5 – 125 µg/ml, 6 – 250 µg/ml, 7 – 500 µg/ml (X – identifiable tetracyclines)

Таблица 2

Идентификация и определение тетрациклинов методом PCA (числитель) и k-средних (знаменатель)
Table 2. Identification and determination of tetracyclines by PCA (numerator) and k-means methods (denominator)

Тетрациклин	F1	Идентифицировано (расстояние от центра, усл. ед)	Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	Относительная погрешность, %
	Расстояние от центра, усл. ед.				
X1	1,034	Окситетрациклин 5 (63,002)	125	138	10,4
	62,957			130	4,0
X2	2,811	Тетрациклин 5 (157,201)	125	125	0
	156,665			129	3,2
X3	0,372	Хлортетрациклин 5 (24, 645)	125	134	7,2
	24,155			140	12,0
X4	-0,870	Димеклоциклин 4 (-41,003)	64	67	4,7
	-40,655			63	-1,5
X5	-0,996	Метациклин 4 (-54,203)	64	62	-3,1
	-54,199			69	7,8

Идентификацию и определение концентрации проводили также методом k-средних (k-means) по расстоянию от центра до тетрациклина. В этом случае градуировочные графики представляли собой зависимость расстояния от центра (димеклоциклин 5) до центральной точки кластера тетрациклинов с определенной концентрацией. Для тетрациклинов с концентрациями в 1 и 3 квадрантах расстояние от центра брали со знаком минус. Градуировочные зависимости имеют логарифмический вид с коэффициентом корреляции $R^2 \geq 0,99$ (рис. 5Б, табл. 1). Как видно из табл. 2, расхождения в расстояниях от центра тетрациклинов X и тетрациклинов, использованных для обучающей выборки, незначительны, что приводит к 100%-ной идентификации.

Таблица 3

Результаты определения тетрациклинов в лекарственных препаратах при обработке данных методом PCA (числитель) и k-средних (знаменатель) n = 5, P = 0,95)

Table 3. The results of the determination of tetracyclines in medicinal products during data processing by PCA (numerator) and k-means (denominator) methods (n = 5, P = 0.95)

Наименование препарата (действующее вещество, содержание в таблетке)	Найдено, мг	Относительное стандартное отклонение, s_r
Тетрациклин (тетрациклин, 100 мг)	107 ± 6	0,05
	110 ± 9	0,09
Юнидокс (доксидоциклин, 100 мг)	98 ± 7	0,06
	107 ± 9	0,06
Доксициклин (доксидоциклин, 100 мг)	104 ± 6	0,03
	108 ± 10	0,09

При выбранных параметрах твердофазно-флуориметрического определения тетрациклинов провели оценку качества готовых лекарственных препаратов коммерческого производства «Тетрациклин», «Юнидокс» и «Доксициклин» (табл. 3). При заявленном содержании действующих веществ (тетрациклина и доксициклина) 100 мг (в таблетке) в результате анализа установлено содержание тетрациклина (107 ± 6) мг, доксициклина (98 ± 7) мг и (104 ± 6) мг (в таблетке) в препаратах «Тетрациклин», «Юнидокс» и «Доксициклин» соответственно.

ВЫВОДЫ

В работе для идентификации и определения антибактериальных веществ тетрациклинового ряда в ЛП предложено сочетание цифровой цветиметрии твердофазной флуоресценции с использованием хемометрического анализа. Разработана тест-система, состоящая из четырех индикаторных зон. Измерение интенсивности собственной флуоресценции антибиотиков и сенсibilизированной тетрациклинами флуоресценции европия(III) на индикаторных зонах проводили с помощью цветорегистрирующего устройства (смартфона). После расчета аналитического сигнала (A_r) дальнейшую хемометрическую обработку данных осуществляли несколькими методами с использованием специализированного программного продукта. Апробацию предложенного подхода провели на коммерческих лекарственных препаратах.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

The authors declare the absence a conflict of interest warranting disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. III. Москва. 2018.
2. Удалова А.Ю., Дмитриенко С.Г., Апыри В.В. Методы выделения, концентрирования и определения антибиотиков тетрациклиновой группы. *Журн. аналит. химии*. 2015. Т. 70. № 6. С. 577-593. DOI: 10.7868/S0044450215060195.
3. Hadi H., Fadhil G. Sensitive spectrophotometric determination of tetracycline hydrochloride indosage forms using sodium nitroprusside and hydroxylamine hydrochloride. *ANJS*. 2014. V. 17. N 3. P. 53-58. DOI: 10.22401/JNUS.17.3.07.
4. Tella E.D., Taherunnisa M., Deepthi G.K., Choragudi B.M., Choragudi B.R. Spectrophotometric determination of tetracyclines using p-N,N-dimethylphenylenediamine and sodium metaperiodate. *RJC*. 2011. V. 4. N 3. P. 539-543.
5. Ali F., Kamoona R.A. Spectrophotometric determination of tetracycline hydrochloride in pharmaceutical preparations using rhodium (II) as a mediator metal. *IJRPC*. 2016. V. 6. N 2. P. 249-261.
6. Othman N.S., Al-Ashow R.J. Spectrophotometric determination of tetracycline by coupling with diazotised 4-aminoantipyrine in presence of cetylpyridinium chloride. *Raf. J. Sci.* 2012. V. 23. N 2. P. 72-84. DOI: 10.33899/rjs.2012.44397.
7. Prasad A.R.G., Rao V.S. Spectrophotometric methods for the microdetermination of oxytetracycline and hostacycline. *Sci. World J.* 2010. V. 5. N 1. P. 1-4. DOI: 10.4314/swj.v5i1.61477.
8. Rufino J.L., Fernandes F.C.B., Ruy M.S., Pezza H.R., Pezza L. A simple spectrophotometric method for the determination of tetracycline and doxycycline in pharmaceutical formulations using chloramine-T. *Eclat. Quim.* 2010. V. 35. N 4. P. 139-145. DOI: 10.1590/S0100-46702010000400018.
9. Abdulghani A.J., Jasim H.H., Hassan A.S. Determination of tetracycline in pharmaceutical preparation by molecular and atomic absorption spectrophotometry and high performance liquid chromatography via complex formation with Au(III) and Hg(II) ions in solutions. *Int. J. Anal. Chem.* 2013. V. 2013. ID 305124. P. 1-11. DOI: 10.1155/2013/305124.
10. Fabelelbom K.M.S. Analysis of certain tetracyclines and oxytetracyclines through charge transfer complexation. *Am. J. Pharmacol. Toxicol.* 2008. V. 3. N 3. P. 212-218. DOI: 10.3844/ajptsp.2008.212.218.
11. Ali R.J., Hawezy H.J.S., Abdullah M.S. Spectrophotometric determination of tetracycline hydrochloride through coupling with sulphanic acid. *Rasul. J. Ali.* 2018. V. 15. P. 15-22. DOI: 10.26505/djm.15024140416.
12. Hameedi I.T. Determination of tetracycline hydrochloride in pure and pharmaceutical samples via oxidative coupling reaction. *Mater. Today: Proceed.* 2021. V. 42. P. 2953-2958. DOI: 10.1016/j.matpr.2020.12.802.
13. Priya S.S., Radha K.V. Brief review of spectrophotometric methods for the detection of tetracycline antibiotics. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2014. V. 6. P. 48-51.
14. Sversut R.A., Da Silva A.A., Cardoso T.F.M., Kassab N.M., Do Amaral M.S., Salgado H.R.N. A critical review of properties and analytical methods for the determination of oxytetracycline in biological and pharmaceutical matrices. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2017. V. 47. N 2. P. 154-171. DOI: 10.1080/10408347.2016.1236673.
15. Patyra E., Kwiatek K. Analytical procedure for the determination of tetracyclines in medicated feedingstuffs by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Vet. Res.* 2016. V. 60. P. 35-41. DOI: 10.1515/jvetres-2016-0006.

REFERENCES

1. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV ed. T. III. Moscow. 2018 (in Russian).
2. Udalova A.Yu., Dmitrienko S.G., Apyari V.V. Methods for the separation, preconcentration, and determination of tetracycline antibiotics. *J. Anal. Chem.* 2015. V. 70. N 6. P. 661-676. DOI: 10.1134/S1061934815060180.
3. Hadi H., Fadhil G. Sensitive spectrophotometric determination of tetracycline hydrochloride indosage forms using sodium nitroprusside and hydroxylamine hydrochloride. *ANJS*. 2014. V. 17. N 3. P. 53-58. DOI: 10.22401/JNUS.17.3.07.
4. Tella E.D., Taherunnisa M., Deepthi G.K., Choragudi B.M., Choragudi B.R. Spectrophotometric determination of tetracyclines using p-N,N-dimethylphenylenediamine and sodium metaperiodate. *RJC*. 2011. V. 4. N 3. P. 539-543.
5. Ali F., Kamoona R.A. Spectrophotometric determination of tetracycline hydrochloride in pharmaceutical preparations using rhodium (II) as a mediator metal. *IJRPC*. 2016. V. 6. N 2. P. 249-261.
6. Othman N.S., Al-Ashow R.J. Spectrophotometric determination of tetracycline by coupling with diazotised 4-aminoantipyrine in presence of cetylpyridinium chloride. *Raf. J. Sci.* 2012. V. 23. N 2. P. 72-84. DOI: 10.33899/rjs.2012.44397.
7. Prasad A.R.G., Rao V.S. Spectrophotometric methods for the microdetermination of oxytetracycline and hostacycline. *Sci. World J.* 2010. V. 5. N 1. P. 1-4. DOI: 10.4314/swj.v5i1.61477.
8. Rufino J.L., Fernandes F.C.B., Ruy M.S., Pezza H.R., Pezza L. A simple spectrophotometric method for the determination of tetracycline and doxycycline in pharmaceutical formulations using chloramine-T. *Eclat. Quim.* 2010. V. 35. N 4. P. 139-145. DOI: 10.1590/S0100-46702010000400018.
9. Abdulghani A.J., Jasim H.H., Hassan A.S. Determination of tetracycline in pharmaceutical preparation by molecular and atomic absorption spectrophotometry and high performance liquid chromatography via complex formation with Au(III) and Hg(II) ions in solutions. *Int. J. Anal. Chem.* 2013. V. 2013. ID 305124. P. 1-11. DOI: 10.1155/2013/305124.
10. Fabelelbom K.M.S. Analysis of certain tetracyclines and oxytetracyclines through charge transfer complexation. *Am. J. Pharmacol. Toxicol.* 2008. V. 3. N 3. P. 212-218. DOI: 10.3844/ajptsp.2008.212.218.
11. Ali R.J., Hawezy H.J.S., Abdullah M.S. Spectrophotometric determination of tetracycline hydrochloride through coupling with sulphanic acid. *Rasul. J. Ali.* 2018. V. 15. P. 15-22. DOI: 10.26505/djm.15024140416.
12. Hameedi I.T. Determination of tetracycline hydrochloride in pure and pharmaceutical samples via oxidative coupling reaction. *Mater. Today: Proceed.* 2021. V. 42. P. 2953-2958. DOI: 10.1016/j.matpr.2020.12.802.
13. Priya S.S., Radha K.V. Brief review of spectrophotometric methods for the detection of tetracycline antibiotics. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2014. V. 6. P. 48-51.
14. Sversut R.A., Da Silva A.A., Cardoso T.F.M., Kassab N.M., Do Amaral M.S., Salgado H.R.N. A critical review of properties and analytical methods for the determination of oxytetracycline in biological and pharmaceutical matrices. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2017. V. 47. N 2. P. 154-171. DOI: 10.1080/10408347.2016.1236673.
15. Patyra E., Kwiatek K. Analytical procedure for the determination of tetracyclines in medicated feedingstuffs by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Vet. Res.* 2016. V. 60. P. 35-41. DOI: 10.1515/jvetres-2016-0006.

16. **Gavilan R.E., Nebot C., Miranda J.M., Martin-Gomez Y., Vazquez-Belda B., Franco C.M., Cepeda A.** Analysis of tetracyclines in medicated feed for food animal production by HPLC-MS/MS. *Antibiotics*. 2016. V. 5. P. 1-10. DOI: 10.3390/antibiotics5010001.
17. **Patyra E., Kowalczyk E., Kwiatek K.** Development and validation method for the determination of selected tetracyclines in animal medicated feedingstuffs with the use of micellar liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. V. 405. P. 6799-6806. DOI: 10.1007/s00216-013-7117-5.
18. **Ramesh P.J., Basavaiah K., Tharpa K., Vinay K.B., Revanasiddappa H.D.** Development and validation of RP-HPLC method for the determination of doxycycline hyclate in spiked human urine and pharmaceuticals. *J. Clin. Diagn. Res.* 2010. V. 4. N 2. P. 101-107.
19. **Каргин И.Д., Соколова Л.С., Пирогов А.В., Шпигун О.А.** Определение тетрациклина в лекарственных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Разраб. и регистр. лекарств. ср-в.* 2014. № 4 (9). С. 116-122.
20. **Mamani M.C.V., Farfan J.A., Reyes F.G.R., Rath S.** Simultaneous determination of tetracyclines in pharmaceuticals by CZE using experimental design. *Talanta*. 2006. V. 70. P. 236-243. DOI: 10.1016/j.talanta.2006.02.048.
21. МУ 08-47/111. Определение содержания левомицетина и тетрациклина гидрохлорида в таблетках, капсулах и глазных каплях методом вольтамперометрии. Издание второе (с Изменением №1). Номер в реестре ФР.1.39.2001.00249. № свидетельства об аттестации МВИ № 08-47/111 от 15 июля 2004 г.00250.
22. **Амелин В.Г., Шаока З.А.Ч., Большаков Д.С.** Твердофазно-флуориметрическое определение хинолонов на целлюлозной бумаге и тонком слое силикагеля в лекарственных препаратах с использованием смартфона. *Журн. аналит. химии*. 2021. Т. 76. № 7. С. 593-602. DOI: 10.31857/S0044450221070033.
23. **Амелин В.Г., Шаока З.А.Ч., Большаков Д.С.** Использование смартфона для определения тетрациклинов в воде и молоке по сенсibilизированной твердофазной флуоресценции европия на его гидроксиде. *Журн. аналит. химии*. 2021. Т. 76. № 10. С. 952-958. DOI: 10.31857/S0044450221080028.
24. **Амелин В.Г., Шаока З.А.Ч., Большаков Д.С.** Сорбционно-флуориметрическое определение хинолонов в сточных и природных водах с использованием смартфона. *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия*. 2021. Т. 62. № 4. С. 29-37.
25. **Амелин В.Г., Майя М., Большаков Д.С.** Микроэкстракционно-цветометрическое определение четвертичных аммониевых соединений в лекарственных и дезинфицирующих средствах. *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия*. 2021. Т. 62. № 2. С. 121-129.
26. **Силаев Д.В., Шестопалова Н.Б., Фомина Ю.А., Русанова Т.Ю.** Применение хемометрических алгоритмов для спектрофотометрического определения синтетических пищевых красителей E110 и E124. *Изв. вузов. Химия и хим. технология*. 2022. Т. 65. Вып. 2. С. 50-59. DOI: 10.6060/ivkkt.20226502.6497.
27. **Апярй В.В., Горбунова М.В., Исаченко А.И., Дмитриенко С.Г., Золотов Ю.А.** Использование бытовых цветорегистрирующих устройств в количественном химическом анализе. *Журн. аналит. химии*. 2017. Т. 72. № 11. С. 963-977.
16. **Gavilan R.E., Nebot C., Miranda J.M., Martin-Gomez Y., Vazquez-Belda B., Franco C.M., Cepeda A.** Analysis of tetracyclines in medicated feed for food animal production by HPLC-MS/MS. *Antibiotics*. 2016. V. 5. P. 1-10. DOI: 10.3390/antibiotics5010001.
17. **Patyra E., Kowalczyk E., Kwiatek K.** Development and validation method for the determination of selected tetracyclines in animal medicated feedingstuffs with the use of micellar liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. V. 405. P. 6799-6806. DOI: 10.1007/s00216-013-7117-5.
18. **Ramesh P.J., Basavaiah K., Tharpa K., Vinay K.B., Revanasiddappa H.D.** Development and validation of RP-HPLC method for the determination of doxycycline hyclate in spiked human urine and pharmaceuticals. *J. Clin. Diagn. Res.* 2010. V. 4. N 2. P. 101-107.
19. **Kargin I.D., Sokolova L.S., Pirogov A.V., Shpigun O.A.** Determination of tetracycline in drugs by high performance liquid chromatography. *Razrab. Registr. Lekarstv. Sredstv.* 2014. N 4 (9). P. 116-122 (in Russian).
20. **Mamani M.C.V., Farfan J.A., Reyes F.G.R., Rath S.** Simultaneous determination of tetracyclines in pharmaceuticals by CZE using experimental design. *Talanta*. 2006. V. 70. P. 236-243. DOI: 10.1016/j.talanta.2006.02.048.
21. МУ 08-47/111. Determination of the content of chloramphenicol and tetracycline hydrochloride in tablets, capsules and eye drops by voltammetry. Second edition (with Amendment N 1). Register number FR.1.39.2001.00249. No. of attestation certificate MVI N 08-47/111 dated July 15. 2004 00250 (in Russian).
22. **Amelin V.G., Shaoka Z.A.Ch., Bol'shakov D.S.** Solid-phase-fluorimetric determination of quinolones in medicinal preparations on cellulose paper and in a thin silica layer using a smartphone. *J. Anal. Chem.* 2021. V. 76. N 7. P. 797-805. DOI: 10.1134/S1061934821070030.
23. **Amelin V.G., Shogah Z.A.C., Bol'shakov D.S.** Using a smartphone for determining tetracyclines in water and milk by the sensitized solid state fluorescence of europium on its hydroxide. *J. Anal. Chem.* 2021. V. 76. N 10. P. 1211-1216. DOI: 10.1134/S1061934821080025.
24. **Amelin V.G., Shogah Z.A.Ch., Bol'shakov D.S.** Sorption-fluorimetric determination of quinolones in waste and natural waters with a smartphone. *Mosc. Univ. Chem. Bull.* 2021. V. 76. N 4. P. 262-268. DOI: 10.3103/S0027131421040027.
25. **Amelin V.G., Mayya M., Bolshakov D.S.** Microextraction-colorimetric determination of quaternary ammonium compounds in medicines and disinfectants. *Mosc. Univ. Chem. Bull.* 2021. V. 76. N 1. P. 42-48. DOI: 10.3103/S0027131421010028.
26. **Silaeв D.V., Shestopalova N.B., Fomina Yu.A., Rusanova T.Yu.** Application of chemometric algorithms for spectrophotometric determination of synthetic food colors E110 and E124. *ChemChemTech [Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.]*. 2022. V. 65. N 2. P. 50-59 (in Russian). DOI: 10.6060/ivkkt.20226502.6497.
27. **Apyari V.V., Gorbunova M.V., Isachenko A.I., Dmitrienko S.G., Zolotov Yu.A.** Use of household color-recording devices in quantitative chemical analysis. *J. Anal. Chem.* 2017. V. 72. N 11. P. 1127-1137. DOI: 10.1134/S106193481711003X.

Поступила в редакцию 12.01.2021
Принята к опубликованию 27.04.2022

Received 12.01.2021
Accepted 27.04.2022