



УДК 615.074:543.544

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИАНОКОБАЛАМИНА В ГЛАЗНЫХ КАПЛЯХ МЕТОДОМ ТСХ**QUANTITATIVE DETERMINATION OF CYANOCOBALAMIN IN EYE DROPS TLC**

**А.А. Зинченко², Е.Т. Жилиякова¹, Т.Л. Андрищенко², М.Ю. Новикова¹,
О.О. Новиков¹, Н.Н. Попов¹, Е.Ю. Тимошенко¹**
**A.A. Zinchenko², E.T. Zhilyakova¹, T.L. Andryushchenko², M.Yu. Novikova¹,
O.O. Novikov¹, N.N. Popov¹, E.Yu. Timoshenko¹**

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет
Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, д.85

²Украинский научный Фармакопейный центр качества лекарственных средств
Украина, 61085, г. Харьков, ул. Астрономическая, д.33

¹Belgorod National Research University
Russia 308015, Belgorod, Pobedy St., 85

²Ukrainian Scientific Center Pharmacopoeia Drug Quality
Ukraine, 61085, Kharkov, Astronomicheskaya St., 33

E-mail: ezhilyakova@bsu.edu.ru

Ключевые слова: тонкослойная хроматография, цианокобаламин, таурин, 2-аминоэтанол.
Key words: TLC, cyanocobalamin, taurine, 2-aminoethanol.

Аннотация. Разработана хроматографическая методика сочетающая количественное определение цианокобаламина - одного из действующих веществ препарата «Цитарин, глазные капли» и примеси другого действующего вещества – таурина. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии, с использованием тонкослойных пластинок «Сорбфил ПТСХ-П-А», автоматического аппликатора и сканера. Сканирование хроматограмм проводят при длине волны 550 нм, используя собственное поглощение цианокобаламина.

Resume. Developed chromatographic method combines quantitative determination of cyanocobalamin - one of the active ingredients of the drug "Tsitarin, eye drops" and other impurities of the active substance - Taurine. Determination is carried out by thin layer chromatography, using a thin-layer plates "Sorbfil PTLC-P-A" automatic applicator and scanner. Scanning chromatograms was carried out at a wavelength of 550 nm, using the intrinsic absorption of cyanocobalamin.

Введение

Для количественного определения цианокобаламина в медицинских препаратах, включая и глазные капли, используют такие аналитические методы как высокоэффективную жидкостную хроматографию [Pei Chen et al., 2010; 2. Trang et al., 2013], спектрофотометрию или биологические методы анализа [Государственная Фармакопея СССР IX изд. вып. 2, 1989]. Наиболее часто применяют метод высокоэффективной жидкостной хроматографии который отличается высокой селективностью, а в тех случаях когда в составе препарата отсутствуют другие компоненты, поглощающие в видимом диапазоне – применяют спектрофотометрию, используя собственное поглощение цианокобаламина. При наличии в составе препарата других веществ, поглощающих в видимом диапазоне, альтернативным методом количественного определения цианокобаламина может быть метод ТСХ. Этот метод может быть применен и при одновременном определении цианокобаламина и других веществ, которые могут присутствовать в препарате, например сопутствующих примесей других действующих веществ препарата [Ponder et al., 2004]. В качестве примера можно привести препарат «Цитарин, глазные капли» в состав которого входит цианокобаламин (0.25 мг/мл) и таурин (40 мг/мл), технологической примесью и продуктом распада которого является 2-аминоэтанол.

Цель

Цель работы – разработка методики количественного определения цианокобаламина одновременно с определением сопутствующей примеси таурина - 2-аминоэтанола в препарате цитарин. Помимо количественного определения цианокобаламина и 2-аминоэтанола методика позволяет проводить идентификацию еще одного действующего вещества – таурина.



Материалы и оборудование

Для разработки методики количественного определения цианокобаламина использовали готовые пластинки производства TLC Silica gel 60, производства фирмы “Merck”, Германия и «Сорбфил ПТСХ-П-А», производства ЗАО “Сорбполимер”, Российская Федерация и оборудование производства фирмы “Samag”, Швейцария, в комплекте состоящий из аппликатора модели “Linomat 5”, укомплектованный шприцом вместимостью 100 мкл, хроматографической камерой модели ADC 2, сканером модели “TLC Scanner3”, и визуализатором. Управление комплектом и расчет осуществляется программным обеспечением “WinCats”. Навески исследуемых стандартных образцов (СО) 2-аминоэтанола и цианокобаламина взвешивали на весах модели AUW220D Shimadzu, Япония с неопределенности взвешивания 33 мкг.

При проведении предварительных экспериментов был выбран состав подвижной фазы, при котором наблюдается полное разделение хроматографических зон 2-аминоэтанола и таурина и цианокобаламина. Поскольку цианокобаламин имеет максимум поглощения в видимом диапазоне, а 2-аминоэтанол и таурин практически прозрачны в УФ – ВИД диапазоне в методике предусмотрено последовательное проведение регистрации сначала цианокобаламина, а затем проявление 2-аминоэтанола и таурина раствором нингидрина с последующей регистрацией их хроматографических зон в видимом диапазоне.

Методика

Приготовление испытуемого раствора 1. В качестве испытуемого раствора используют сам препарат.

Приготовление испытуемого раствора 2. 1.0 мл испытуемого раствора 1 помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Приготовление раствора сравнения цианокобаламина. 25 мг (точная навеска) ГСО (СО) цианокобаламина, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 80 мл воды и перемешивают до полного растворения, объем раствора доводят до метки водой и перемешивают (исходный раствор). 0.25 мг/мл

Приготовление раствора сравнения 2-аминоэтанола. 20 мг 2-аминоэтанола (ТУ 6-09-244-86 или аналогичного качества) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 40 мл 0.1 М растворе кислоты хлористоводородной, доводят объем раствора этим же растворителем до метки и перемешивают (исходный раствор).

5.0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной и перемешивают.

Приготовление раствора сравнения таурина. 20 мг стандартного образца таурина помещают в мерную колбу вместимостью 5 мл, растворяют в 3 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Приготовление раствора для проверки пригодности хроматографической системы. 400 мг таурина и 2.5 мг СО цианокобаламина помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляют 1.0 мл исходного раствора 2-аминоэтанола, 5 мл воды, перемешивают до полного растворения веществ, доводят объем раствора до метки водой и перемешивают.

Проведение измерений: на хроматографическую пластинку размером 10×20 см на линию старта расположенной на расстоянии 15 мм от края пластинки аппликатором наносят полосками длиной 4 мм испытуемый раствор 1, испытуемый раствор 2, раствор сравнения цианокобаламина, раствор сравнения таурина и раствор сравнения 2-аминоэтанола. Растворы сравнения цианокобаламина, 2-аминоэтанола и испытуемый раствор 1 наносят по 5 полосок каждого, раствор сравнения таурина и испытуемый раствор 2 наносят по 1 полоске. Количество параллельных хроматограмм испытуемого раствора и раствора сравнения цианокобаламина может быть и менее 5, при этом можно нанести и раствор для проверки пригодности хроматографической системы. В данном конкретном примере раствор для проверки пригодности хроматографической системы наносили на отдельную пластинку той же серии и хроматографировали одновременно, в той же камере.

Затем пластину помещают в камеру со смесью спирт этиловый 96 % - хлороформ – аммиака раствор концентрированный (6:2: 1.5) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 8 см от линии старта, пластинку вынимают и высушивают в токе воздуха в течение 5 мин, до полного отсутствия запаха растворителей. Хроматограммы всех растворов представлены на рисунке 1.

Затем хроматограммы испытуемого раствора и раствора сравнения цианокобаламина сканируют в следующих условиях:

- размер зоны сканирования 6 х 0,1 мм;
- скорость сканирования – 20 мм/сек;
- длина волны регистрации – 550 нм.

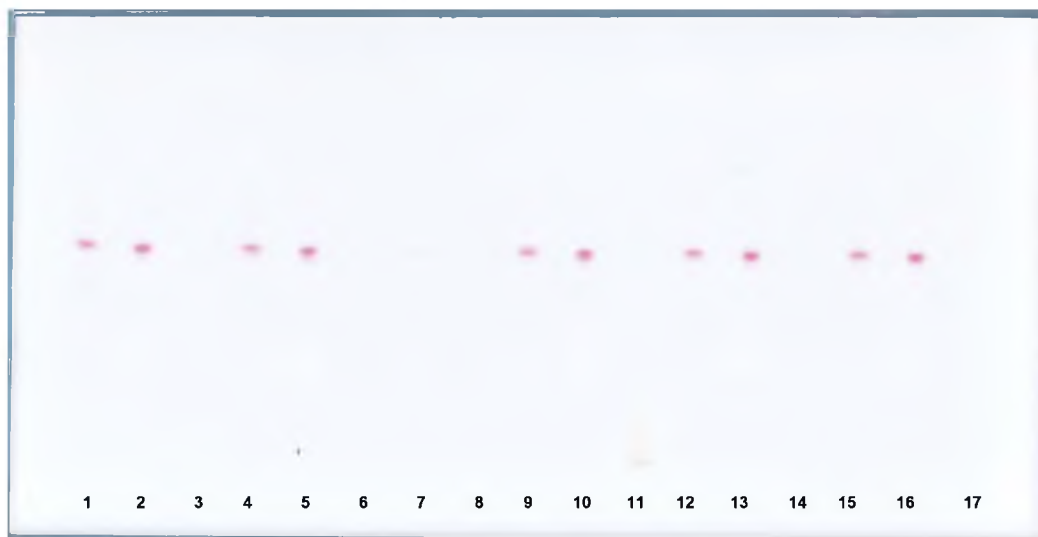


Рис. 1. Хроматограммы испытуемого раствора 1 (2, 5, 10, 13 и 16), раствора сравнения цианокобаламина (1, 4, 9, 12 и 15), раствора сравнения 2-аминоэтанола (3, 6, 11, 14 и 17), испытуемого раствора 2 (7) и раствора сравнения таурина (8) до проявления раствором нингидрином

Fig. 1. Chromatogram of the examinee of solution 1 (2, 5, 10, 13 and 16), solution of comparison of cyanocobalamin (1, 4, 9, 12 and 15), solution of comparison of a 2-aminoetanol (3, 6, 11, 14 and 17), the examinee of solution 2 (7) and solution of comparison of taurine (8) before manifestation by solution the ningidrinny

По данным сканирования хроматограмм раствора сравнения цианокобаламина и испытуемого раствора определяют интегральные значения площадей пиков цианокобаламина. Хроматограммы испытуемого раствора и раствора сравнения цианокобаламина, полученные при сканировании пластинки представлены на рисунке 2.

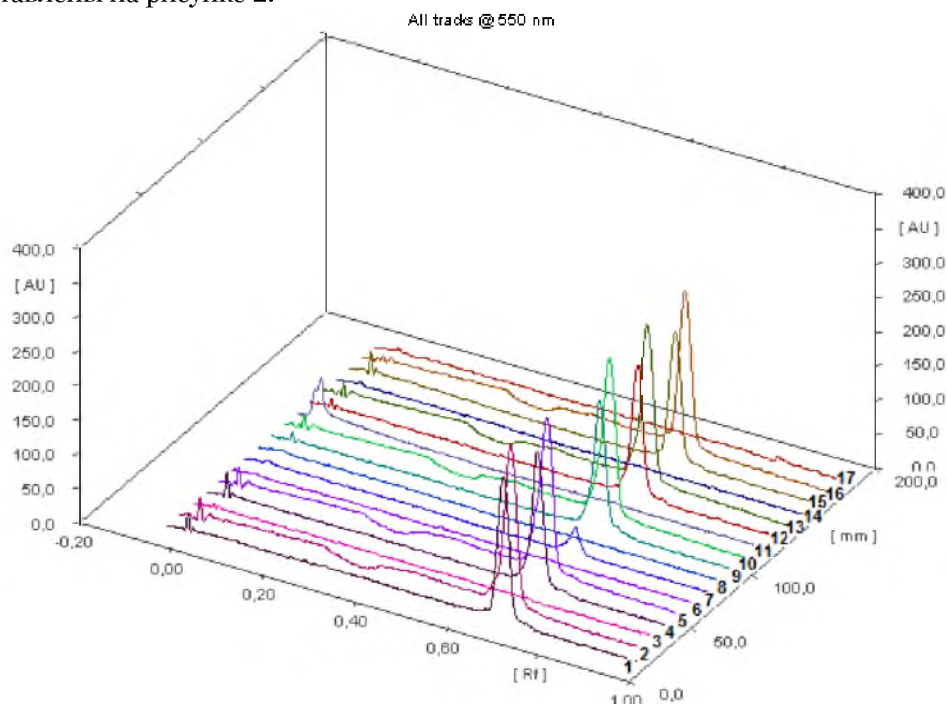


Рис. 2. Сканированные хроматограммы испытуемого раствора 1 (2, 5, 10, 13 и 16), раствора сравнения цианокобаламина (1, 4, 9, 12 и 15), раствора сравнения 2-аминоэтанола (3, 6, 11, 14 и 17), испытуемого раствора 2 (6) и раствора сравнения таурина (7) до проявления раствором нингидрином

Fig. 2. The scanned chromatogram of the examinee of solution 1 (2, 5, 10, 13 and 16), solution of comparison of cyanocobalamin (1, 4, 9, 12 and 15), solution of comparison of a 2-aminoetanol (3, 6, 11, 14 and 17), the examinee of solution 2 (6) and solution of comparison of taurine (7) before manifestation by solution the ningidrinny

Результаты определения интегральных площадей пиков цианокобаламина на хроматограммах испытуемого раствора 1 и раствора сравнения приведены в таблице 1.

Затем, рассчитывают количественное содержание цианокобаламина ($X_{B_{12}}$) по формуле:

$$X_{E12} = \frac{S_i \times m_o \times P}{S_o \times 100 \times 100}$$

где S_i – среднее значение интегральных площадей пиков цианокобаламина, рассчитанное из хроматограмм испытуемого раствора;

S_o - среднее значение интегральных площадей пиков цианокобаламина, рассчитанное из хроматограмм раствора сравнения цианокобаламина;

m_o – масса навески СО цианокобаламина, в миллиграммах;

P – содержание основного вещества в СО цианокобаламина, в процентах.

Содержание $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$ (цианокобаламина) в 1 мл препарата должно быть от 0.225 мг до 0,275 мг.

Далее пластинку погружают в раствор нингидрина и выдерживают в течение 3 сек. Пластинку помещают в сушильный шкаф и выдерживают при температуре 110 °С в течение 10 мин, охлаждают до комнатной температуры и сканируют в следующих условиях:

- размер зоны сканирования 6.0 мм х 0.2 мм
- скорость сканирования – 20 мм/сек;
- длина волны регистрации – 425 нм.

Хроматограммы полученные после обработки пластинки раствором нингидрида и после сканирования пластинки представлены на рисунках 3 и 4.

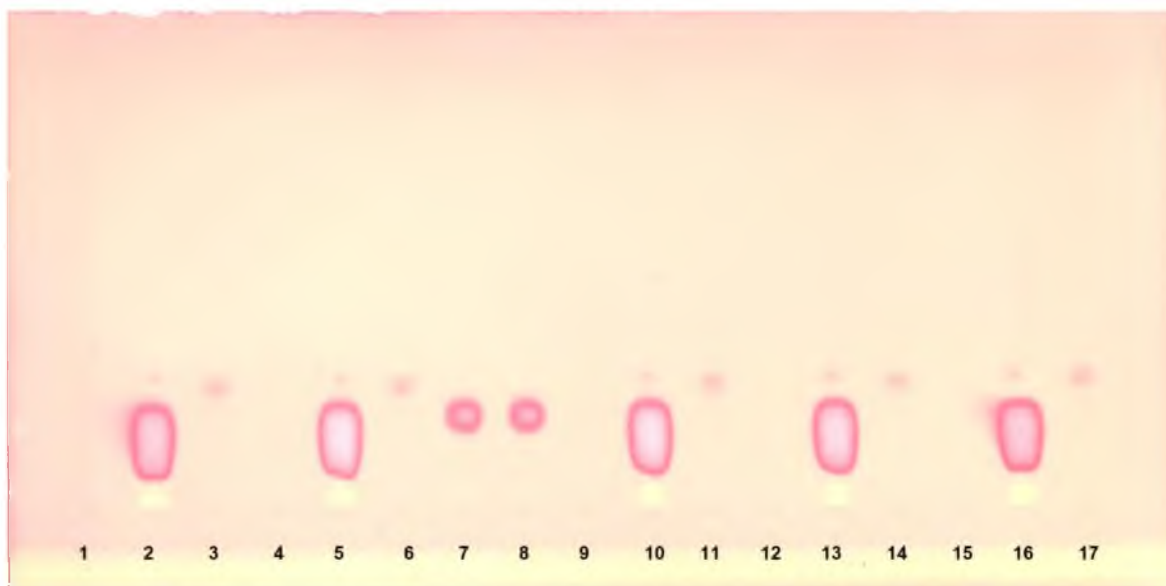


Рис. 3. Хроматограммы испытуемого раствора 1 (2, 5, 10, 13 и 16), раствора сравнения цианокобаламина (1, 4, 9, 12 и 15), раствора сравнения 2-аминоэтанола (3, 6, 11, 14 и 17), испытуемого раствора 2 (7) и раствора сравнения таурина (8) после проявления раствором нингидрином

Fig. 3. Chromatogram of the examinee of solution 1 (2, 5, 10, 13 and 16), solution of comparison of cyanocobalamin (1, 4, 9, 12 and 15), solution of comparison of a 2-aminoethanol (3, 6, 11, 14 and 17), the examinee of solution 2 (7) and solution of comparison of taurine (8) after manifestation by solution the ningidrin

По результатам сканирования определяют значения интегральных площадей пиков 2-аминоэтанола на хроматограммах испытуемого раствора и раствора сравнения 2-аминоэтанола. Среднее значение интегральных площадей пиков 2-аминоэтанола не должно превышать среднего значения интегральных площадей пиков 2-аминоэтанола на хроматограммах раствора сравнения 2-аминоэтанола (не более 0.1%).

Приведенные в таблице 1 результаты определения интегральных площадей пиков цианокобаламина и 2-аминоэтанола позволяют рассчитать количественное содержание цианокобаламина в препарате, а также определить, что содержание продукта распада таурина – 2-аминоэтанола не превышает предельно допустимый уровень 0.1 %. В данном случае, при содержании основного вещества в СО цианокобаламина 90.6 % и навеске 24.4 мг содержание цианокобаламина в препарате составляет 0.27 мг/мл.

Подлинность таурина подтверждается совпадением положения и окраски основного пятна на хроматограммах испытуемого раствора 2 (трек 7) с положением и окраски пятна на хроматограмме раствора сравнения таурина 2 (трек 8).

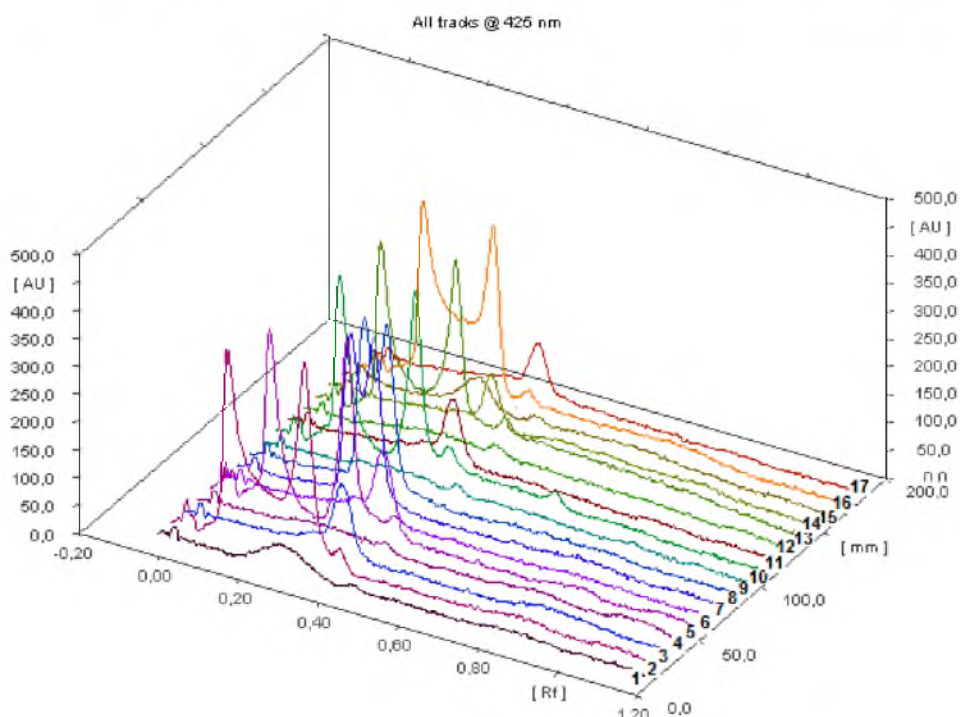


Рис. 4. Сканированные хроматограммы испытуемого раствора 1 (2, 5, 10, 13 и 16), раствора сравнения цианокобаламина (1, 4, 9, 12 и 15), раствора сравнения 2-аминоэтанола (3, 6, 11, 14 и 17), испытуемого раствора 2 (7) и раствора сравнения таурина (8) после проявления раствором нингидрином

Fig. 4. The scanned chromatogram of the examinee of solution 1 (2, 5, 10, 13 and 16), solution of comparison of cyanocobalamine (1, 4, 9, 12 and 15), solution of comparison of a 2-aminoethanol (3, 6, 11, 14 and 17), the examinee of solution 2 (7) and solution of comparison of taurine (8) after manifestation by solution the ningidrinny

Таблица 1
Table. 1

Результаты определения интегральных площадей пиков цианокобаламина и 2-аминоэтанола
Results of determination of the integrated areas of peaks of cyanocobalamine and 2-aminoethanol

	Площади пиков цианокобаламина на хроматограммах сравнения	Площади пиков цианокобаламина на хроматограммах испытуемого раствора 1	Площади пиков 2-аминоэтанола на хроматограммах испытуемого раствора 1	Площадь пика 2-аминоэтанола на хроматограммах сравнения
1	4706.5	5806.9	588.3	3032.5
2	4773.1	5654.0	537.3	3009.3
3	4596.4	5657.6	514.2	2923.7
4	4638,6	5747.4	543.5	2942.7
5	4762.1	5768.7	550.3	2856.7
Среднее значение	4695.3	5729.9	546.7	2953
ОСО (%)	1.64	1.20	4.93	2.38

Валидация методики и обсуждение результатов

Исследования валидационных характеристик методики количественного определения цианокоболомина проводили по характеристикам специфичность, правильность и линейность [Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств, 2007]. Специфичность методики подтверждается приведенными на рис. 5 хроматограммами испытуемого раствора 1, испытуемого раствора 2, раствора сравнения таурина, раствора сравнения цианокобаламина, раствора сравнения 2-аминоэтанола и раствора, раствора для проверки пригодности хроматографической системы, на которых наблюдается полное разделение хроматографических зон цианокобаламина, таурина и 2-аминоэтанола при этом положение и интенсивность окраски основных пятен на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы совпадает с интенсивностью окраски и положением соответствующих пятен на хроматограммах растворов сравнения.

Характеристики Линейность и правильность (прецизионность) исследовали на 9 модельных растворов с концентрацией цианокобалами соответствующими от 80% до 120% по отношению к номинальной. Модельные растворы готовили в мерных колбах вместимостью 100 мл непосредственно



из навесок вспомогательных компонентов препарата, таурина и цианокобаламина. Расчет пригодности метрологических характеристик методики проводили для допуска содержания (В) цианокобаламина на ±10 %. Результаты определения концентрации цианокобаламина в модельных растворах и их метрологическая обработка приведены в таблице 2.

Таблица 2
Table. 2

Результаты определения цианокобаламина и их статистическая обработка
Results of definition of cyanocobalamine and their statistical processing

№ модельной смеси	Навески цианокобаламина, мг	Введенное количество цианокобаламина в % по отношению к номинальному	Найденное количество цианокобаламина в % по отношению к номинальному	Найдено цианокобаламина, в %, по отношению к введенному количеству
1	20.03	80.12	80.94	98.99
2	21.16	84.64	83.96	100.81
3	22.51	90.04	90.02	100.02
4	23.69	94.76	95.54	99.18
5	25.11	100.44	100.41	100.03
6	26.10	104.40	105.76	98.71
7	27.02	108.08	109.15	99.02
8	28.77	115.08	115.01	100.06
9	30.35	121.40	120.55	100.71
Среднее значение Z_{cp} %				99.65
Относительное стандартное отклонение, s_z %				0.70
Относительный доверительный интервал $\Delta\% = t(95\%, 9-2) \times S_z = 1.895 \times S_z =$				1.33
Систематическая погрешность $\delta = Z_{cp} - 100 $				0.35
Критерий незначимости систематической ошибки:				
1) статистическая незначимость: $\delta < \Delta_z : \sqrt{9} = 1.33 : 3 = 0.44\% < 0.35\%$				Выполняется
2) Если не выполняется 1), то $\delta \leq \max \delta$:				Выполняется
2) практическая незначимость: $\delta\% \leq 0.32 \times 3.2 = 1.02\% > 0.35\%$				Выполняется
Общий вывод о методике				КОРРЕКТНА

По приведенным в таблице 2 данным рассчитаны коэффициенты линейной зависимости найденной концентрации цианокобаламина от введенной. График и рассчитанные коэффициенты приведены на рисунке 6 и в таблице 3.

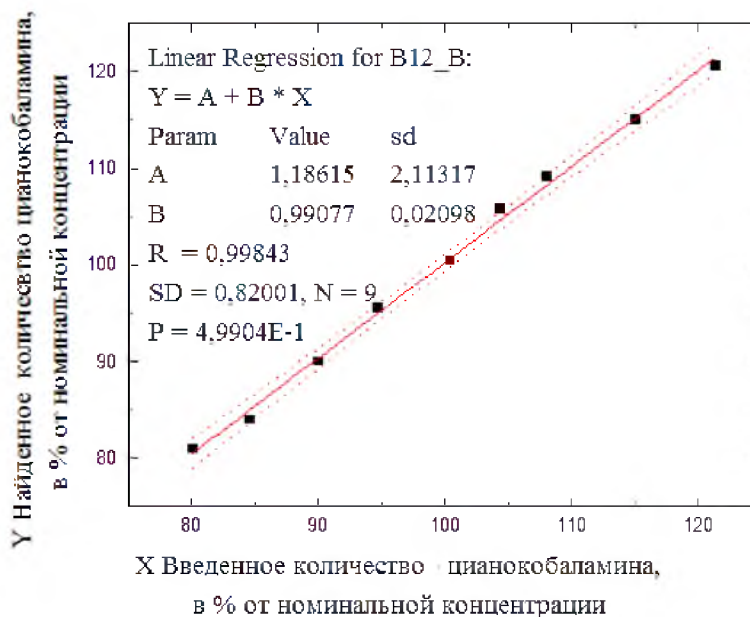


Рис. 6. График и коэффициенты линейной зависимости найденной концентрации цианокобаламина от введенной

Fig. 6. The schedule and coefficients of linear dependence of the found concentration of cyanocobalamine on the entered

Таблица 3
Table. 3

Метрологические характеристики линейной зависимости найденной концентрации цианокобаламина от введенной

Параметры	Значения	Требования 1	Требования 2	Заключение
b	0.99077			
S _b	0.02098			
A	1.18615	$\leq t(95\%, n-2) \times S_a = 1.895 \times S_a = 3.99$	$\square 3.2 $	Выдерживается по 1 критерию
S _a	2.11317			
SD _o	0.820			
SD _o /b	0.83	$\square 1.69 $		Выполняются
r	0.99843	$\geq 0.99236 $		Выполняются

Как следует из представленных данных, требования к параметрам линейной зависимости выполняются, то есть линейность методики количественного определения цианокобаламина подтверждается в диапазоне концентраций от 80% до 120% от предельно допустимого значения.

Неопределенность методики (Δ_{As}) складывается из неопределенности внесенной пробоподготовкой (Δ_{SP}) и неопределенности конечной аналитической операции – хроматографирования и расчет площадей пиков определяемого вещества (Δ_{FAO}):

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2}$$

Поскольку в качестве испытуемого раствора используют непосредственно сам препарат, неопределенность пробоподготовки определяется только неопределенностью приготовления раствора сравнения цианокобаламина. Рассчитанное значение неопределенности пробоподготовки составляет 0.81 %

Неопределенность конечной аналитической операции рассчитывали по результатам хроматографирования испытуемого раствора и раствора сравнения цианокобаламина (табл. 1) при 5 параллельных хроматограммам составляет 0.91. Отсюда следует, что суммарная неопределенность методики (Δ_{As}) составляет 1.22 %, что не превышает предельно допустимую величину – 3.2%.

Заключение

Как свидетельствуют экспериментально полученные данные о валидационных характеристиках, разработанная методика соответствуют всем критериям для методик количественного определения действующих веществ в лекарственных препаратах.

Список литературы References

- Государственная Фармакопея СССР IX изд, вып.2. 1989. М.: Медицина, 400 с.
Gosudarstvennaya Farmakopeya SSSR IX izd, vyp.2. [State Pharmacopoeia of USSR XI Ed, issue 2]. 1989. M.: Medicine, 400 p (in Russian).
- Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / Под ред. Н.В. Юргеля, А.Л. Младенцева, А.В. Бурдейна и др. 2007. М., Фармацевтическая промышленность, 58 с.
Rukovodstvo po validatsii metodik analiza lekarstvennykh sredstv / Pod red. N.V. Yurgelya, A.L. Mladentseva, A.V. Burdeyna i dr. 2007. M., Farmatsevticheskaya promyshlennost [Manual the validation of methods analysis of drugs. Pharmaceutical industry], 58 p (in Russian).
- Pei Chen, Wayne R. Wolf, Isabel Castanheira and Ana Sanches-Silva 2010. A LC/UV/Vis method for determination of cyanocobalamin (VB₁₂) in multivitamin dietary supplements with on-line sample clean-up. Anal. Methods, 2:1171-1175.
- Trang, Hung Khiem. 2013. Development of HPLC methods for the determination of water-soluble vitamins in pharmaceuticals and fortified food products. All Theses, 1745.
- E.L. Ponder, B. Fried, and J. Sherma 2004. Thin-layer chromatographic analysis of hydrophilic vitamins in standards and from *Helisoma trivolvis* snails. Acta chromatographica, 14:70-81.