

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2016
УДК 615.35:577.17.049].074
DOI:10.23888/НМЖ2016494-99

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ АНАЛИЗА АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В ПРЕПАРАТЕ «КАПЛИ БЕРЕШ ПЛЮС»**

Д.А. СМЕЛЬКИНА¹, З.Ф. ГРОМОВА², М.А. ФРОЛОВА²

Компании ЗАО «Глаксо Смит Кляйн Трейдинг» (1)
Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова,
ул. Высоковольтная, 9, 390026, г. Рязань, Российская Федерация (2)

В статье представлены материалы по разработке экспрессной методики анализа микроэлементов в препарате «Капли Береш Плюс». Для идентификации d-катионов использованы реакции дробного анализа, для количественного определения катионов меди – спектрофотометрический метод.

Ключевые слова: мультикомплексный препарат, методы анализа, спектрофотометрия в видимой области спектра, экспресс-анализ, токсичность, экстракция.

**METHODICS OF ANALYSIS OF MICROELEMENTS ACTIVE COMPOUNDS
IN MEDICINE «BERES DROPS PLUS»**

D.A. SMELKINA¹, Z.F. GROMOVA², M.A. FROLOVA²

Representative of CJSC «Glaxo Smith Kline Trading» (1)
Ryazan State Medical University, Visocovoltnaya str., 9, 390026, Ryazan, Russian Federation (2)

The article describes the methodics of an express analysis of microelements in medicine «Beres Drops Plus». The fractional analysis was used for d-cations identification, spectrophotometric method was used for copper cations quantification.

Keywords: multicomplex drug, analysis methods, spectrophotometry in the visible spectrum, express-analysis, toxicity, extraction.

Препараты группы мультиминералов, содержащих в своем составе витамины и определенный набор микроэлементов, довольно широко используются населением для поддержания здоровья, так как считают их универсальными и наиболее безобидными.

К самым востребованным из них относятся препараты «Витрум», «Венофер»,

«Кальцемин», «Капли Береш Плюс», «Феррум Лек», «Супрадин», «Центрум», «Комплевит» и другие [1].

Однако, многие не знают о том, что микроэлементы, которые в основном являются d-элементами, играют большую роль в некоторых биохимических процессах, происходящих в организме. От их количества зависят функции важных биохимических

мических веществ (ферментов, гормонов и др.). Как недостаток, так и избыток элементов может привести к различного рода патологиям, поэтому очень важным аспектом является правильное соотношение компонентов, входящих в состав препаратов мультиминералов.

Данный аспект обуславливает всасывание всех элементов без антагонизма. Однако малейшее отклонение от необходимых количественных параметров вызывает нарушение поступления в организм одного, а иногда и нескольких элементов. Например, избыточное количество железа замедляет всасывание марганца при совместном приеме. Дефицит железа потенцирует обратный эффект, а при дефиците меди и никеля снижается усвоение железа [2].

Одной из характеристик по отношению к препаратам группы «мультиминералы» является соотношение «риск/польза», которое показывает, насколько безопасно и эффективно применение лекарственного препарата у конкретного больного. К примеру, исследования норвежских ученых показали, что применение препаратов железа в период беременности приводит к высокому риску развития глютеновой энтеропатии у плода [3].

Таким образом, помимо биологического воздействия на организм при нарушении физиологического количественного соотношения микрокомпонентов, последние могут вызывать побочные и токсические эффекты. Данный аспект указывает на необходимость контроля за качественным и количественным составом препаратов группы «мультиминералы».

Объектом настоящего исследования является препарат данной группы «Капли Береш Плюс». Он имеет сложный состав, включающий активные соединения макро- и микроэлементов (в основном d-подгруппы), витамины, аминокислоты и ряд вспомогательных веществ.

Информация по анализу данного препарата в доступных источниках отсутствует. Но, учитывая физиологическую активность микроэлементов, доступность (безрецептурный отпуск), применение в

детской практике, разработка методики анализа соединений микроэлементов в данном лекарственном препарате является актуальной. Она позволит провести анализ соединений d-элементов (железа, цинка, марганца, меди, никеля, кобальта) не только в препарате «Капли Береш Плюс», но и в других представителях группы мультиминералов и поливитаминов, включающих элементы указанного перечня и препараты растительного происхождения [4, 5].

Цель исследования

Целью работы является разработка унифицированной, экспрессной методики анализа соединений d-элементов в лекарственном препарате «Капли Береш Плюс».

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Разработать методики качественного обнаружения катионов d-элементов, входящих в состав лекарственного препарата, с учетом их взаимного влияния и влияния других ингредиентов на результат химических реакций.

2. Разработать спектрофотометрический метод количественного определения соединений меди (II) с использованием реакции образования окрашенного комплекса диэтилдитиокарбамината меди. Для решения этой задачи требовалось провести следующие исследования:

- выбрать рабочую длину волны;
- определить линейную зависимость между концентрацией меди (II) и окраской комплекса;
- установить время устойчивости окрашенного продукта реакции;
- определить диапазон подчинения продукта реакции основному закону светопоглощения.

Материалы и методы

Для исследования качественного состава использовали стандартные растворы следующих солей d-элементов, входящих в состав препарата «Капли Береш Плюс» в указанных концентрациях: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 мг/мл); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5 мг/мл); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,94 мг/мл); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1 мг/мл); $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,4865 мг/мл);

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,1 мг/мл). Для приготовления стандартных растворов солей были взяты химически чистые вещества (х.ч.).

Спектрофотометрическое определение катионов меди в видимой области спектра по реакции образования окрашенного комплекса с диэтилдитиокарбамината свинца проводили на фотометре КФК-3 в кювете с толщиной слоя 10 мм при комнатной температуре.

Статистическую обработку экспериментальных данных исследований ($P = 95\%$) проводили с помощью программ StatSoft Statistica 6,0 и Microsoft Excel с вычислением граничных значений доверительного интервала среднего значения и определением ошибки единичного определения [6].

Результаты и их обсуждение

Для качественного обнаружения катионов d-элементов, входящих в состав препарата были использованы химические реакции дробного метода анализа. Этот выбор был продиктован тем, что дробный метод позволяет обнаружить в растворе отдельные ионы без их предварительного разделения, требует небольших количеств исследуемых растворов, и продолжительность анализа составляет от 1 до 10 мин. Используемые реакции высокочувствительны, открываемый минимум искомых ионов составляет 0,05-0,001 мкг. Возможность сочетания качественного и количественного определения катионов металлов в одном объеме раствора делает метод перспективным при ограниченном количестве исследуемых объектов.

При изучении реакций дробного метода анализа применительно к лекарственному препарату придерживались следующих правил: вначале характерные реакции на соответствующий катион выполняли на стандартном растворе, затем изучали взаимное влияние других катионов и вспомогательных веществ, используя смесь их водных стандартных растворов. Затем разработанная методика применялась для качественного обнаружения соответствующего катиона d-элементов в лекарственном препарате «Капли Береш Плюс».

Для обнаружения катиона Zn^{2+} использовали высокочувствительную реакцию образования дитизоната цинка, который окрашивает слой хлороформа от слабо-фиолетового до пурпурно-красного цвета (предел обнаружения 0,025 мкг). Селективность реакции повышали путем регулирования значения pH раствора и добавлением в качестве комплексообразователя тиосульфата натрия. В этом случае устраняется мешающее влияние на результат реакции катионов никеля, кобальта, меди, железа и марганца. Оптимальные условия: pH = 5-5,5; насыщенный раствор тиосульфата натрия, 0,01 % раствор дитизона в хлороформе.

Обнаружение Mn^{2+} проводили путем его окисления периодатом калия до MnO_4^- -красно-фиолетового цвета. Идентификации мешают ионы: Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} . Маскировку ионов Fe^{3+} проводили путем введения комплексообразователя дигидрофосфата натрия. Поскольку количественное содержание катионов Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} меньше, чем определяемого иона, их окраска не мешала обнаружению (предел обнаружения 0,1 мкг). Оптимальные условия: 1 мл насыщенного раствора дигидрофосфата натрия, 0,2 г периодата калия, время нагревания на водяной бане – 20 минут.

Катион Fe^{2+} с гексационоферратом (III) калия в сильноокислой среде образует нерастворимое в воде соединение синего цвета гексационоферрат (III) железа (II). Реакции не мешают катионы других d-элементов в препарате (предел обнаружения 0,05 мкг). Оптимальные условия: 10% раствор H_2SO_4 до сильноокислой реакции среды (pH = 1).

Обнаружение катиона Co^{2+} проводили по реакции образования окрашенных в синий цвет комплексных соединений с тиоцианат-ионами. Влияние Fe^{3+} , образующего с реактивом соединения кроваво-красного цвета устраняли добавлением фторида натрия. Для повышения устойчивости комплекса исследуемого катиона использовали растворитель – изопентиловый спирт. В присутствии комплексного соединения кобальта с тиоцианатом ам-

мония органический слой окрашивается в синий цвет. Реакции не мешают ионы Ni^{2+} (предел обнаружения 0,5 мкг). Оптимальные условия: 0,5 г натрия фторида, нагревание на водяной бане 2-3 минуты, 1 мл изопентилового спирта.

Диметилглиоксим (реактив Чугаева) образует с катионом Ni^{2+} внутрикмплексную соль розово-красного цвета – диметилглиоксимат никеля. Реакции мешают катионы Fe^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} . При малом содержании катиона кобальта, последний не влияет на обнаружение никеля. Ион Fe^{2+} с диметилглиоксимом образует соединение красного цвета растворимое в воде. Добавление раствора пероксида водорода обуславливает переход $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$, что сопровождается появлением бурого окрашивания раствора, в то время как глиоксимат никеля остается на стенках пробирки в виде розового осадка. Катион Cu^{2+} при взаимодействии с реактивом Чугаева образует соединение грязно-зеленого цвета, поэтому проводилось предварительное экстрагирование хлороформом катиона меди в виде диэтилдитиокарбамината. Предел обнаружения катионов никеля – 0,16 мкг.

При обнаружении катионов Cu^{2+} использовали ряд диэтилдитиокарбаминатов металлов (ДДТК-металлов): $Hg > Ag > Cu > Ni > Co > Pb > Bi > Cd > Tl > Sb > Zn > Mn > Fe$. Согласно ряда ДДТК-металлов, составленного для рН среды 5,0, каждый предыдущий металл в водном растворе вытесняет последующий из его ДДТК, растворенного в хлороформе. Для экстракции соединения Cu^{2+} оптимальным является реактив $(ДДТК)_2Pb$ [3]. В исследуемом растворе имеются катионы трех металлов, которые могут образовать комплексные соединения с данным реактивом: Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} . Однако катионы Ni^{2+} и Co^{2+} практически не вытесняют свинец из его ДДТК при рН=3 в отличие от катионов Cu^{2+} . При этом соединение Cu^{2+} образует окрашенный в желто-бурый цвет комплекс. Поэтому важным условием протекания данной реакции является соблюдение реакции среды, обуславливающей селективность экс-

трагирования катионов Cu^{2+} . Подтверждающие реакции на катион Cu^{2+} проводили с реэкстрактом, полученным при обработке хлороформного раствора $(ДДТК)_2Cu$ водным раствором соли Hg^{2+} . При этом с растворами сульфата цинка и тетрароданмеркурата аммония появляется осадок розового цвета. При добавлении к реэкстракту растворов хлорида кадмия и гексацианоферрата (II) калия образуется лилового цвета осадок.

Реакцию образования $(ДДТК)_2Cu$ использовали для количественного определения катионов меди (II) в препарате «Капли Береш Плюс» спектрофотометрическим методом.

Для выбора рабочей длины волны готовили стандартный раствор сульфата меди с концентрацией 0,1 мг/мл. Измеряли оптическую плотность (А) окрашенного продукта реакции $(ДДТК)_2Cu$ – при различных длинах волн, относящихся к видимой области спектра (380-780 нм). Спектр поглощения имеет максимум при длине волны 415 нм. При этой же длине волны проводили измерение оптической плотности испытуемых растворов и растворов сравнения. Проведенные исследования устойчивости окраски комплекса $(ДДТК)_2Cu$ во времени показали, что последний устойчив в течение 30 минут.

Для выявления линейной зависимости между оптической плотностью от концентрации катиона меди (II) готовили ряд разведений в диапазоне концентраций от 0,02 до 0,1 мг/мл. Проведенные исследования позволяют сделать заключение, что в выбранном интервале концентраций соединений меди (II) наблюдается подчинение закону Бугера-Ламбера-Бера.

На основании полученных данных была разработана следующая методика анализа для количественного определения катиона Cu^{2+} в лекарственном препарате «Капли Береш Плюс»: 1 мл раствора препарата помещают в мерную колбу на 10,0 мл, доводят водой до метки. 1 мл полученного раствора переносят в делительную воронку, добавляют 10 % раствора уксусной кислоты (до рН=3), 4 мл хлоро-

формного раствора диэтилдитиокарбамината свинца и экстрагируют в течение 30 секунд. Хлороформный слой отделяют и экстракцию повторяют (до получения бесцветного слоя хлороформа). Полученные экстракты объединяют, измеряют полученный объем и оптическую плотность

при длине волны 415 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствор сравнения – хлороформ. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Как следует из приведенных в таблице данных, полученные результаты укладываются в норму допустимых отклонений.

Таблица 1

Результаты количественного определения катиона Cu^{2+} в препарате «Капли Береш Плюс»

№ анализа	Объект исследования	Найдено		Метрологическая характеристика
		мг	%	
1	«Капли Береш Плюс»	0,857	85,7	$X_{cp}=85,6$ $S = 0,563$ $S_{X_{cp}} = 0,251$ $E = 0,81$ $E_a = 85,6 \pm 0,81$
2		0,861	86,1	
3		0,849	84,9	
4		0,852	85,2	
5		0,862	86,2	

Выводы

Разработана универсальная экспресс-методика обнаружения катионов d-элементов в лекарственном препарате «Капли Береш Плюс» с использованием специфических и доказательных реакций дробного метода анализа.

Разработана методика количественного определения катиона Cu^{2+} с использованием

пользованием спектрофотометрии в видимой области спектра по реакции образования окрашенного комплекса диэтилдитиокарбамината меди. Полученные результаты статистически обработаны и указывают на то, что методика не отягощена грубой систематической ошибкой и позволяет получать воспроизводимые результаты.

Конфликт интересов отсутствует.

Литература

1. Крылова А.Н. Исследование биологического материала на «металлические яды» дробным методом. М.: Медицина, 1975. 100 с.
2. Громова О.А., Торшин И.Ю., Хаджидис А.К. Анализ молекулярных механизмов воздействия железа (II), меди, марганца в патогенезе железодефицитной анемии // Клиническая фармакология и фармакоэкономика. 2010. № 1. С. 1-8.
3. Stordal K., Haugen M., Brantsater A.L., Lundin K.E., Stene L.C. Association between Maternal Iron Supplementation during Pregnancy and Risk of Celiac Disease in Children // Clinical Gastroenterology and Hepatology. 2014. Vol. 12. № 4. P. 624-631.

4. Кириченко Е.Е., Сычев И.А., Чекулаева Г.Ю. Выделение, физико-химическое исследование и определение солибилизирующей активности полисахаридов цветков пижмы обыкновенной // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2012. № 4. С. 146-150.
5. Селезнев Н.Г., Добина С.В. Хроматоспектрофотометрический метод определения арбутина в листьях брусники // Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2013. №1. С. 33-37.
6. Государственная фармакопея. 11-е изд. М.: Медицина, 1987. Вып 1. 334 с.

References

1. Krylova AN. Issledovanie biologicheskogo materiala na «metallicheskie jady» drobnym metodom [Research of biological

material on «metal poisons» by fractional method]. M.: Medicina; 1975. 100 p. (in Russian)

2. Gromova OA, Torshin IJu, Hadzhidis AK. Analiz molekulyarnyh mehanizmov vozdeystvija zheleza (P), medi, marganca v patogeneze zhelezodeficitnoj anemii [Analysis of molecular mechanisms of influence of iron (N), copper, manganese in the pathogenesis of iron deficiency anemia]. *Klinicheskaja farmakologija i farmakojekonomika [Clinical pharmacology and pharmacoeconomics]*. 2010; 1: 1-8. (in Russian)

3. Stordal K, Haugen M, Brantsater AL, Lundin KE, Stene LC. Association between Maternal Iron Supplementation during Pregnancy and Risk of Celiac Disease in Children. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2014; 12(4): 624-631.

4. Kirichenko EE, Sychev IA, Chekulaeva GJu. Vydelenie, fiziko-himicheskoe

issledovanie i opredelenie soljubilizirujushhej aktivnosti polisaharidov cvetkov pizhmy obyknovennoj [Isolation, physicochemical research and determination of solubilizing activity tanacetum vulgare flowers polysaccharides]. *Rossijskij mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I.P. Pavlova [I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald]*. 2012; 4: 146-150. (in Russian)

5. Selezenev NG, Dobina SV. Hromatospektrofotometricheskij metod opredelenija arbutina v list'jah brusniki [Chromatography spectrometric method of arbutin detection in cowberry leaves]. *Nauka molodyh (Eruditio Juvenium) [Science of the young (Eruditio Juvenium)]*. 2013; 1: 33-37. (in Russian)

6. *Gosudarstvennaja farmakopeja. 11 izd. [State Pharmacopoeia. 11 edit.]*. M.: Medicina; 1987. 334 p. (in Russian)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Смелькина Д.А. – Компании ЗАО «Глаксо Смит Кляйн Трейдинг.

Громова З.Ф. – ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Фролова М.А. – ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.