

УДК 615. 453.21

АНАЛИЗ КОМПОНЕНТОВ ПРОТИВООЖОГОВОГО ПОРОШКА НАРУЖНОГО ПРИМЕНЕНИЯ С 5-НИТРОФУРАЛОМ И ЦИТОХРОМОМ С**Коробко В.М., Воробьева О.А., Мельникова Н.Б.***Нижегородская Медицинская Академия, Нижний Новгород, e-mail: melnikovanb@gmail.com*

Разработаны методы контроля качества порошка для лечения ожоговых ран, содержащего смесь цитохрома *c*, нитрофураля, натрия аскорбата и оксида цинка. УФ – и ВЭЖХ – анализы 5-нитрофураля и натрия аскорбата выполняли, растворяя порошок в смеси ацетонитрил:буферный раствор с pH 6 (v/v 27:73), и с последующим удалением осадка. Идентификацию 5-нитрофураля проводили методом УФ – спектроскопии по полосе $\lambda = 375$ нм, сопоставляя этот спектр со спектром аци-соли ($\lambda = 450$ нм). УФ ВЭЖХ анализ (идентификацию и количественное определение) 5-нитрофураля и натрия аскорбата выполняли при $\lambda = 310$ и 254 нм на колонке Discovery C18 (250×4,6 мм, 5 μ m) в изократическом режиме при $t = 35$ °C. Идентификацию цитохрома *c* проводили после его растворения порошка в воде, анализируя видимую область спектра ($\lambda = 410$ –415, 520, 550 нм). Количественное определение железа в цитохроме *c* выполняли методом ААС после растворения порошка в азотной кислоте, используя лампу полого катода с $\lambda = 248,33$ нм, в газовой среде – аргон. Качественный и количественный анализ цинка оксида проводили методом ААС после растворения порошка в азотной кислоте (лампа полого катода $\lambda = 213,9$ нм в газовой среде воздух – ацетилен, 2,2 л мин⁻¹). Проведена валидационная оценка методов количественного определения по показателям правильности, воспроизводимости, линейности и сходимости всех действующих веществ.

Ключевые слова: контроль качества порошка, цитохром *c*, нитрофураля**ANALYSIS OF COMPONENTS OF THE TOPICAL POWDER CONTAINING 5-NITROFURAL AND CYTOCHROME C FOR BURN WOUND TREATMENT****Korobko V.M., Vorobyeva O.A., Melnikova N.B.***Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, e-mail: melnikovanb@gmail.com*

The control quality methods of the powder for treatment of burn wounds, which contain cytochrome *c*, nitrofurural, sodium ascorbate and zinc oxide have been developed. UV – and HPLC – analyses of 5 nitrofurural and sodium ascorbate were carried out by dissolving the powder in acetonitrile:buffer solution of pH 6 (v/v 27:73), and then removing the precipitate. The identification of 5-nitrofurural was performed by UV – spectroscopy using the band $\lambda = 375$ nm, comparing this spectrum with that aci-salt ($\lambda = 450$ nm). RP-HPLC analysis (identification and assay) of 5-nitrofurural and sodium ascorbate was carried out at $\lambda = 310$ nm and 254 nm, Column Discovery C18 (250×4,6 mm, 5 μ m) in isocratic mode at $t = 35$ °C. The identification of cytochrome *c* was performed after dissolving powder in water, analyzing the visible range ($\lambda = 410$ –415, 520, 550 nm). Iron assay in cytochrome *c* was performed by AAS 7000 after dissolving the powder in the nitric acid using a hollow cathode lamp with $\lambda = 248,33$ nm, in a gaseous argon medium. Qualitative and quantitative analysis of zinc oxide was performed by AAS after dissolving of the powder in nitric acid (hollow cathode lamp $\lambda = 213,9$ nm in a gaseous medium air-acetylene, 2,2 l min⁻¹). The methods validation of the assay using such characteristic as the reproducibility, linearity and convergence of all the active ingredients was spend.

Keywords: analyses of powder, cytochrome *c*, nitrofurural

Новым направлением в хирургии и ожоговой практике является вальнеросорбция, позволяющая удалять экссудат, микроорганизмы и их токсины из раны при помощи сорбционных материалов. Для заживления ожоговых и гнойных ран перспективна разработка адсорбентов, способных не только удалять экссудат и жидкость, но и дополнительно воздействовать на процессы воспаления и регенерации в ране. В этом плане большой интерес представляют собой наружные лекарственные средства (ЛС) в виде порошков, способные воздействовать на рану за счет улучшения микроциркуляции крови в зоне поражения.

Одним из перспективных вазодилатирующих ЛС является монооксид азота (в виде газа) или ЛС, способные образовывать нитрозильные комплексы, генерирующих монооксид азота. В настоящее время

доказано, что монооксид азота не только улучшает микроциркуляцию крови, влияет на агрегацию тромбоцитов, но и играет важную роль в течение раневого процесса [1, 2].

Известно, что нитрозильные комплексы железа с серосодержащими лигандами являются депо монооксида азота [3–5]. Наиболее изучены в этом плане нитрозильные комплексы цитохрома *c*, имеющего железосодержащий порфириновый гем. Дизайн новых нитрозильных комплексов цитохрома *c* открывает возможности в создании ЛС с заданными биологическими свойствами для разработки современных стратегий в лечении раневых процессов.

Ранее нами было показано, что взаимодействие цитохрома *c* и нитросодержащих препаратов, таких как нитрит натрия, метронидазол, 5-нитрофураля, 5-нитроксолин,

приводит к образованию нитрозильных комплексов цитохрома *c*, аналогичных нитрозильным комплексам, образованным цитохромом *c* и газообразным монооксидом азота [6]. На основании этих исследований была предложена комбинированная лекарственная форма «водный гель полисахарида + порошок (нитропрепарат, цитохром *c*)», демонстрирующая в эксперименте на крысах высокие регенеративные и репаративные свойства и вазодилатирующий эффект [7].

В настоящей работе нами исследовано новое ЛС в виде порошка с цитохромом *c*, в котором в качестве донатора нитроксидной группы был выбран 5-нитрофураил из группы нитрофуранов, эффективных в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Роль стабилизатора и активатора восстановленной формы цитохрома *c* выполнял натрия аскорбат, дополнительным кератолитиком и антисептиком выступал цинк оксид, а в качестве основного сорбента был использован крахмал картофельный.

Целью работы является разработка методов качественного и количественного определения действующих веществ противожогового порошка, содержащего цитохром *c* и 5-нитрофураил, как депо монооксида азота на ране, и валидационная оценка методов количественного определения по показателям правильность, воспроизводимость, линейность и сходимости действующих веществ.

Материалы и методы исследования

Реактивы: *цитохром c* (из сердца лошади) ($\geq 95\%$, lot STBV7839V, «Fluka» (USA) «Sigma-Aldrich»), *нитрофураил* ($\geq 97\%$, Product Number: 59870, «Aldrich» (USA) «Sigma-Aldrich»), *натрия аскорбат* ($\geq 99\%$, lot BCBJ1585V, «Fluka» (USA) «Sigma-Aldrich»), *оксид цинка* (ГОСТ 10262-73), *крахмал* ($\geq 95\%$, Product Number: 9005-25-8, «Fluka» (USA) «Sigma-Aldrich»), *гидроксид натрия* (ГОСТ 4328-77), *кислота азотная* («ХЧ», ГОСТ 4461-77), *ацетонитрил* для хроматографии сорт 0 (ТУ 2636-040-44493179-00), *вода очищенная*, полученная на установке «Elix-3» фирмы «MILLIPORE», удельное сопротивление менее 0,2 мСм.

Анализ электронных спектров был выполнен на UV-vis спектрофотометре Specord S100 Bionline (Analytic Jena, Германия), толщина кварцевой кюветы 10 мм.

ВЭЖХ-анализ 5-нитрофураила и натрия аскорбата проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе марки Shimadzu LC-10 Avp в обращенно-фазовом режиме, колонка Discovery C18 (250×4,6 mm, 5 μm) с диодно-матричным УФ-детектором. *Условия хроматографирования:* подвижная фаза ацетонитрил—фосфатный буфер 27:73 (v/v) в изократическом режиме при скорости потока 1 мл/мин при температуре 35 °С, объем инъекции 20 μL,

детектирование при длинах волн 310 и 254 нм, время анализа 10 мин.

Элементный анализ выполняли на атомно-абсорбционном спектрофотометре (ААС) Shimadzu AA 7000. А). *Количественное определение железа* в цитохроме *c* проводили с использованием стандартных растворов Fe(NO₃)₃, лампы полого катода с λ = 248,33 нм, в газовой среде – аргон. Объем пробы – 20 μL. Б). *Количественное определение цинка* в оксиде цинка проводили непрерывно-пламенным методом, используя стандартные растворы Zn, лампы с полым катодом при λ = 213,9 нм в газовой среде воздух – ацетилен, 2,2 л·мин⁻¹. Объем пробы – 20 μL.

Стандартные растворы железа с концентрацией 2; 6; 10 мкг/л готовили из ГСО 7872-2000 Fe (10 мг/см³, фон – 1 М HNO₃).

Стандартные растворы цинка с концентрацией 0,1; 0,2; 0,4 мг/л готовили из ГСО 7837-2000 Zn (10 мг/см³, фон – 1 М HNO₃).

Приготовление модельных смесей 1,2,3: 0,25 г; 0,5 г; 0,75 г (точная навеска) 5-нитрофураила помещают в ступку, перетирают, добавляют 0,05 г цитохрома *c*, 0,1 г натрия аскорбата, 0,1 г цинка оксида до 100 г крахмала. Смесь перетирают пестиком до однородной желтоватой массы. 0,5 г (точная навеска) полученного порошка переносят в стакан на 50 мл, добавляют 15 мл подвижной фазы ацетонитрил-фосфатный буфер pH 6 в соотношении 27:73 (v/v), растворяют, фильтруют через фильтр «синяя лента» в мерную колбу вместимостью 25 мл. Раствор в мерной колбе доводят до метки раствором подвижной фазы (соответствует 50%, 100%, 150% ожидаемой концентрации испытуемого раствора).

Приготовление модельных смесей 4,5,6 выполняют аналогично процедуре приготовления модельных смесей 1,2,3, используя 0,05 г; 0,1 г; 0,15 г (точной навески) натрия аскорбата. Состав смеси: 0,05 г цитохрома *c*, 0,5 г нитрофураила, 0,1 г цинка оксида и натрия аскорбата, крахмала до 100 г. После растворения порошка в 25 мл раствора подвижной фазы, концентрация натрия аскорбата в испытуемом растворе соответствовала 50%, 100%, 150% от ожидаемой.

Стандартные растворы натрия аскорбата (0,02 мг/мл), 5-нитрофураила (0,1 мг/мл) готовили из стандартных образцов субстанций.

Статистическую обработку проводили по программе Statistica 7.0 (p < 0,05).

Результаты исследования и их обсуждение

Общая схема пробоподготовки для анализа всех действующих веществ представлена ниже:

Методика качественного и количественного определения 5-нитрофураила и натрия аскорбата в порошке.

Идентификацию 5-нитрофураила проводили, используя визуальный тест (переход из желтой в оранжевый цвет аци-соли после добавления 30% гидроксида натрия) и УФ – спектроскопически, анализируя полученный водно-ацетонитрильный раствор (λ = 375 нм) и, сопоставляя этот спектр со спектром аци-соли (появление плеча λ = 450 нм) (рис. 2).

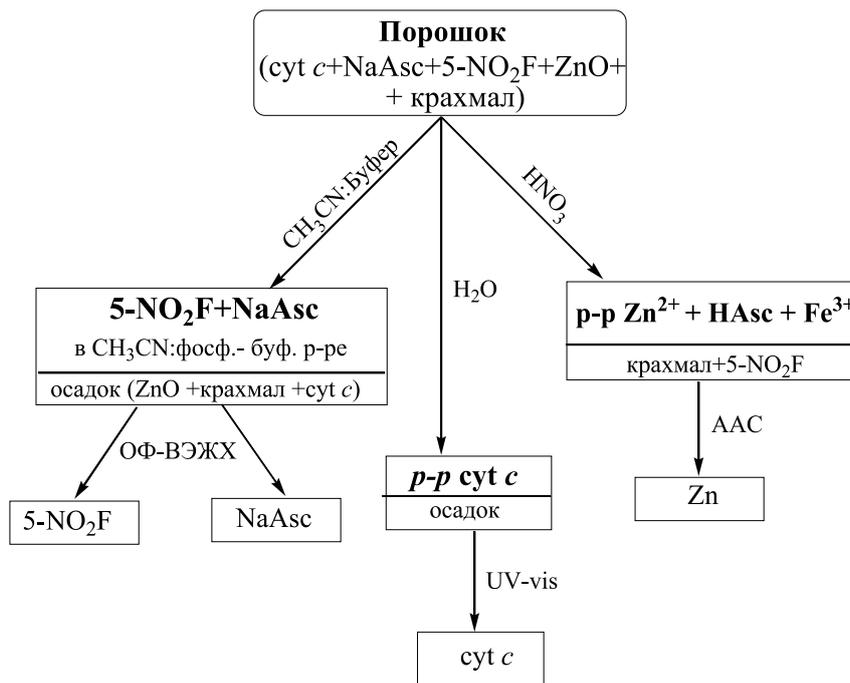


Рис. 1. Общая схема пробоподготовки для анализа действующих веществ порошка

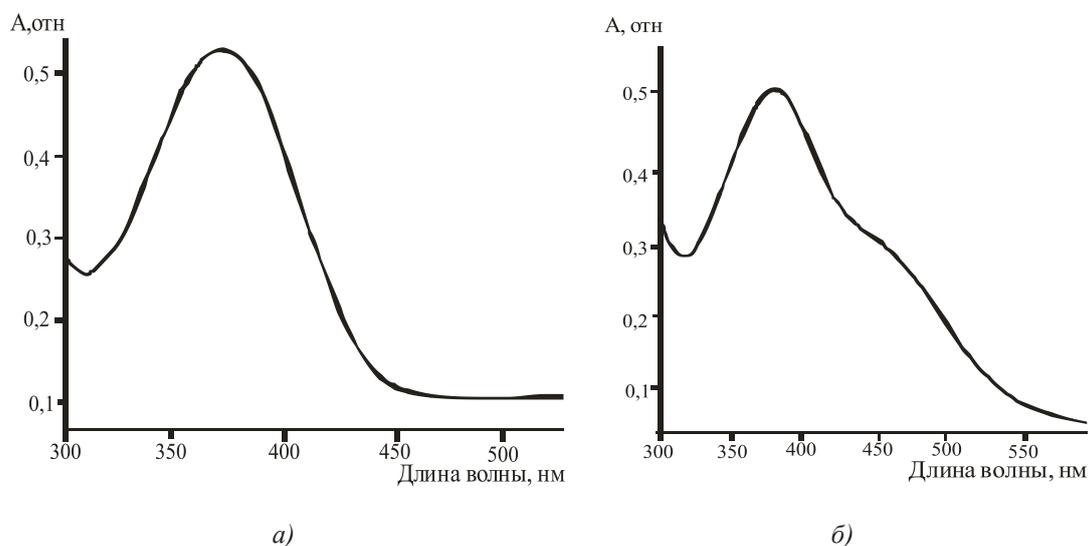


Рис. 2. УФ-спектры ацетонитрильно-буферного раствора смеси 5-нитрофурала и натрия аскорбата после растворения порошка и удаления осадка: 2 а) исходный раствор; 2 б) после добавления 30% гидроксида натрия

Натрия аскорбат доказывали тестом с аммиачным раствором серебра по образованию черного осадка серебра.

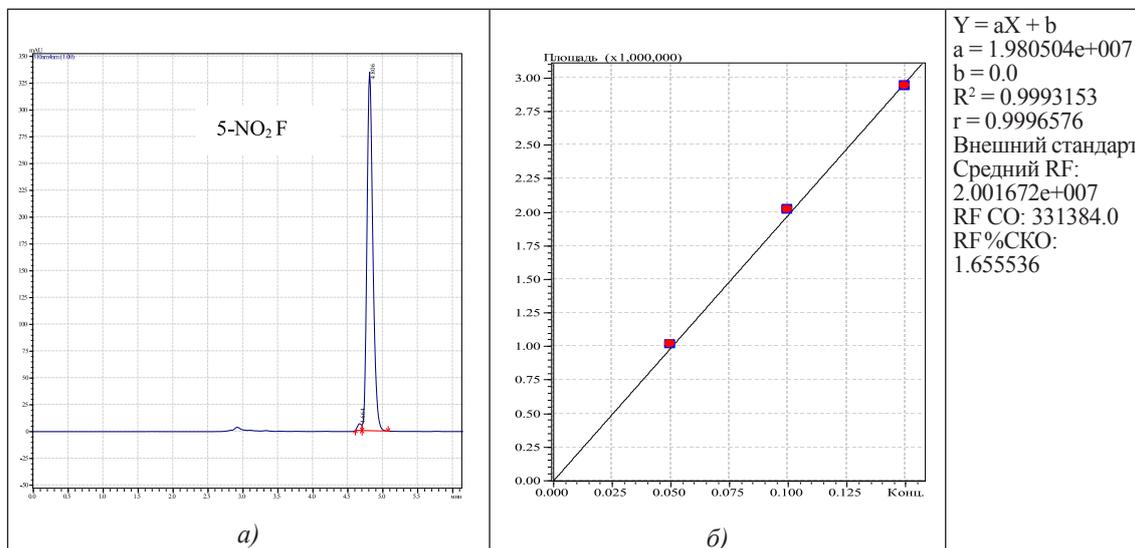
Два компонента 5-нитрофура и натрия аскорбат анализировали ОФ ВЭЖХ методом после растворения порошка в смеси ацетонитрил:фосфатный буферный раствор рН 6 при объемном соотношении 27:73 и уда-

ления нерастворимого осадка, содержащего цитохром *c*, оксид цинка и крахмал (рис. 1).

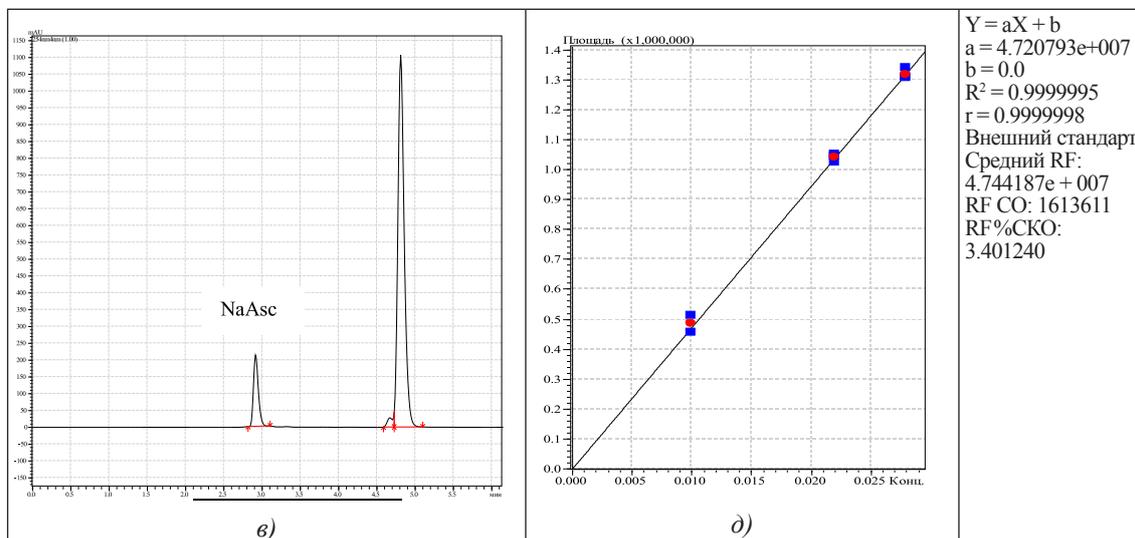
Время выхода пика 5-нитрофураля – 4,8 мин, натрия аскорбата – 2,9 мин на хроматограммах растворов модельных смесей совпадало со временем выхода этих соединений в стандартных растворах в изократическом режиме при $t = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ (рис. 3).

Определение *линейности* проводили на 3 уровнях концентраций для 5-NO₂F и для NaAsc от ожидаемых содержаний в порошке. Уравнения линейной регрессии имеют вид: $y = 1.980504e + 007$ (5-NO₂F)

и $y = 4.720793e + 007$ (NaAsc). Значения коэффициента корреляции для обоих веществ было равным 0,99, что соответствует критерию приемлемости по показателю линейности [8].



Уровень	Концентрация, мг/мл	Средняя площадь	Площадь 1	Площадь 2	Площадь 3
1	0,05	1013907	1013676	1011798	1016247
2	0,1	2019115	2014528	2020407	2022411
3	0,15	2937130	2945730	2933428	2932232



Уровень	Концентрация, мг/мл	Средняя площадь	Площадь 1	Площадь 2	Площадь 3
1	0,01	483528	335186	510289	456766
2	0,022	1038955	1049700	1043742	1023422
3	0,028	1317435	1304687	1338484	1309134

Рис. 3 а, б, в, д. Хроматограммы модельных смесей, содержащих 5-NO₂F и NaAsc, и калибровочные графики действующих веществ: 3 а) – модельной смеси 2, содержащей 0,1 мг/мл 5-NO₂F при постоянстве концентраций остальных действующих веществ; 3 б) – калибровочный график по 5-NO₂F; 3 в) – модельной смеси 5, содержащей 0,02 мг/мл NaAsc при постоянстве концентраций остальных действующих веществ; 3 д) – калибровочный график по NaAsc. Условия: $\lambda = 310$ и 254 нм, объем пробы $20 \mu\text{L}$, v потока 1 мл/мин , $t = 35^\circ\text{C}$

Таблица 1

Результаты количественного определения 5-нитрофурала по методу «введено-найдено»

Введено, г	Найдено, г	Выход, %	Метрологические характеристики
0,25	0,24	96	$X_{cp} = 100,7$ $SD = 5,15$ $RSD = 0,51\%$ $E = 4,21\%$
0,25	0,27	108	
0,25	0,26	106	
0,5	0,49	98	
0,5	0,48	96	
0,5	0,52	104	
0,75	0,77	102	
0,75	0,72	96	
0,75	0,76	101	

Таблица 2

Результаты количественного определения натрия аскорбата по методу «введено-найдено»

Введено, г	Найдено, г	Выход, %	Метрологические характеристики
0,05	0,049	98	$X_{cp} = 100,1$ $SD = 9,48$ $RSD = 0,94\%$ $E = 7,44\%$
0,05	0,051	102	
0,05	0,048	96	
0,1	0,09	90	
0,1	0,11	110	
0,1	0,12	120	
0,15	0,14	93	
0,15	0,16	106	
0,15	0,13	86	

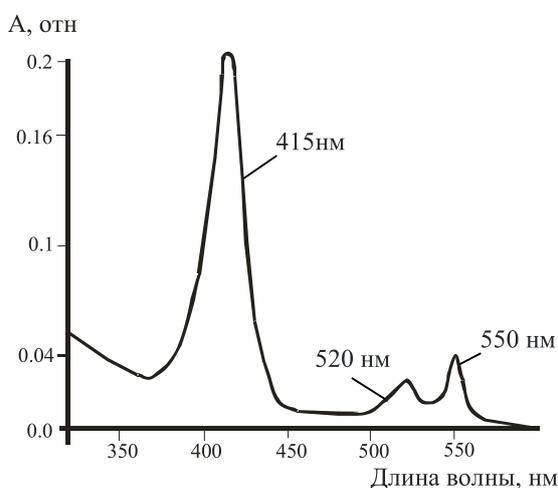


Рис. 4. Электронный спектр сул с раствора в присутствии натрия аскорбата

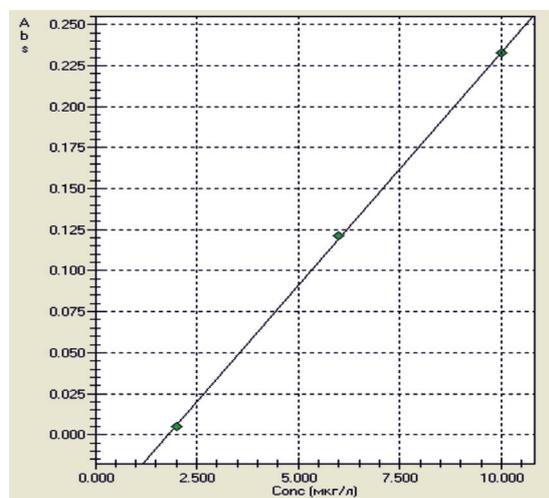


Рис. 5. Зависимость поглощения от концентрации железа

Правильность методики определяли методом «введено-найдено». Отношение количества введенного 5-нитрофурала к найденному (X_{cp}) в % соответствовало 100,7%, что характеризует разработанную методику как правильную (табл. 1). Величина X_{cp} для NaAsc, рассчитанная по этому методу соответствовала 100,1%, что определяет пра-

вильность методики определения двух компонентов в одной пробе (табл. 2).

Методика удовлетворяет требованиям по сходимости для обоих анализируемых компонентов – 5-NO₂F и NaAsc, о чем свидетельствуют критерии приемлемости $RSD\% = 0,51\%$ и $RSD\% = 0,94\%$, соответственно.

Анализ цитохрома с. Идентификацию сыв *c* в порошке проводили после его растворения в воде и удаления нерастворимого осадка, анализируя видимую область спектра ($\lambda = 410-415, 520, 550$ нм).

Количественное определение проводили методом ААС после растворения его в концентрированной азотной кислоте, используя лампу полого катода с $\lambda = 248,33$ нм, в газовой среде – аргон. Результаты с использованием калибровочного графика (уравнение $Abs = y = 0.0284 C_{Fe} - 0.0507$, где $[C_{Fe}] = \text{мкг/л}$) представлены на рис. 5 и в табл. 3.

Как следует из данных табл. 3, значения относительного стандартного отклонения RSD и стандартного отклонения SD малы и составляют 5,5% и 0,025%. В соответствии с требованиями руководства [8] эту методику можно считать *правильной и воспроизводимой*.

Анализ оксида цинка в порошке. Качественный и количественный анализ цинка оксида в порошке проводили методом ААС после растворения его в азотной кислоте, используя лампу полого катода $\lambda = 213,9$ нм в газовой среде воздух–ацетилен, 2,2 л·мин⁻¹. Процедура выполнения пробоподготовки

и анализа в целом аналогична анализу железа в цитохроме *c*. Калибровочный график (уравнение $Abs = y = 0.4829C_{Zn} - 0.0018$, где $[C_{Zn}] = \text{мг/л}$) приведен на рис. 6.

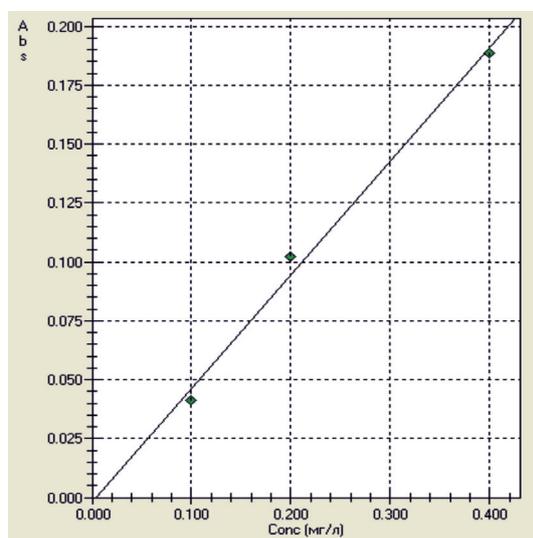


Рис. 6. Зависимость поглощения от концентрации цинка (ААС)

Таблица 3

Результаты анализа железа методом ААС

Действие	Истинное значение концентрации (мкг/л)	Концентрация (мкг/л)	Абсорбция	RSD, %	SD
STD-1	2,000	1,7401	0,0013	6,12	0,023
STD-2	2,000	2,2892	0,0143		
STD-3	2,000	1,8774	0,0026		
STD-AV	2,000	1,9689	0,0052	4,14	0,025
STD-1	6,000	5,4533	0,1042		
STD-2	6,000	3,6161	0,0520		
STD-3	6,000	6,6711	0,1388		
STD-AV	6,000	6,0622	0,1215	5,58	0,027
STD-1	10,000	9,2720	0,2127		
STD-2	10,000	9,5888	0,2217		
STD-3	10,000	11,0494	0,2632		
STD-AV	10,000	9,9689	0,2325	6,06	0,024
Cyt c		4,4803	0,1271		
Cyt c		4,4921	0,1123		
Cyt c		4,4823	0,1040		

Пр и м е ч а н и е . * аббревиатура STD относится к стандартам, прилагаемым к прибору.

Таблица 4

Результаты анализа цинка методом ААС

Действие	Истинное значение концентрации (мг/л)	Концентрация (мг/л)	Абсорбция	RSD, %	SD
1	2	3	4	5	6
STD-1	0,100	0,0886	0,0410	1,20	0,005
STD-2	0,100	0,0901	0,0417		
STD-3	0,100	0,0885	0,0409		
STD-AV	0,100	0,0895	0,0414		

Окончание табл. 4					
1	2	3	4	5	6
STD-1	0,200	0,2092	0,0992	4,35	0,0045
STD-2	0,200	0,2222	0,1055		
STD-3	0,200	0,2221	0,1054		
STD-AV	0,200	0,2158	0,1024		
STD-1	0,400	0,3829	0,1831	4,23	0,0080
STD-2	0,400	0,4063	0,1944		
STD-3	0,400	0,3820	0,1829		
STD-AV	0,400	0,3947	0,1888		
Zn		0,3875	0,1853	3,17	0,0060
Zn		0,4051	0,1938		
Zn		0,3964	0,1896		

Пр и м е ч а н и е . * аббревиатура STD относится к стандартам, прилагаемым к прибору.

Как следует из данных табл. 4 значения относительного стандартного отклонения RSD и стандартного отклонения SD, составляющих 3,2% и 0,006%, методику определения цинка в порошке можно считать *правильной и воспроизводимой*.

Выводы

1. Разработана методика УФ – спектрального и ВЭЖ- хроматографического анализов 5-нитрофураля и натрия аскорбата. Рекомендовано:

1) пробоподготовку для анализа проводить растворением порошка в смеси ацетонитрил:фосфатный буферный раствор рН 6 в объемном соотношении 27:73 и удалением нерастворимого осадка цитохрома с, оксида цинка и крахмала фильтрацией.

2) идентификацию 5-нитрофураля выполнять УФ – спектроскопически, анализируя полученный водно-ацетонитрильный раствор ($\lambda = 310$ нм) и, сопоставляя этот спектр со спектром аци-соли, полученной добавлением 30% гидроксида натрия ($\lambda = 420$ нм).

3) ОФ ВЭЖХ анализ (идентификацию и количественное определение) 5-нитрофураля и натрия аскорбата проводить при $\lambda = 310$ нм на колонке Discovery C18 (250×4,6 мм, 5 μ m) в изократическом режиме при $t = 35^\circ\text{C}$ с использованием стандартных растворов. Время выхода пика 5-нитрофураля – 4,8 мин, натрия аскорбата – 2,9 мин.

2. Разработана методика анализа цитохрома с в порошке. Рекомендовано:

а) идентификацию проводить после его растворения порошка в воде, анализируя видимый область спектра ($\lambda = 410\text{--}415, 520, 550$ нм);

б) количественное определение выполнять методом ААС после растворе-

ния его в концентрированной азотной кислоте, используя лампу полного катода с $\lambda = 248,33$ нм, в газовой среде – аргон.

3. Разработана методика качественного и количественного анализа цинка оксида в порошке методом ААС в соответствии с которой после растворения его в азотной кислоте, выполнять анализ используя лампу полного катода $\lambda = 213,9$ нм в газовой среде воздух – ацетилен, 2,2 л мин⁻¹.

4. Проведена валидационная оценка методов количественного определения по показателям правильность, воспроизводимость, линейность и сходимость 5-нитрофураля, натрия аскорбата, цитохрома с, цинка оксида в порошке.

Список литературы

- Осипов А.Н., Борисенко Г.Г., Владимиров Ю.А. Биологическая роль нитрозильных комплексов гемопротеинов // Успехи биологической химии. – 2007. – № 47. – С. 259–292.
- Берченко Г.Н. Экспериментально-морфологическое обоснование использования экзогенного монооксида азота при лечении огнестрельных ран // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. – 2009. – № 4. – С. 49–55.
- Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes with thiolate ligands: physico-chemistry, biochemistry and physiology // Nitric Oxide Biol. Chem. – 2009. – № 21. – P. 1–13.
- Rakova O.A. Novel «Roussin esters» [Fe₂(m₂-SR)₂(NO)₄] as NO donors: synthesis, structural and spectroscopic characterization // J. Inorg. Biochem. – 2001. – Vol. 85. – P. 390.
- Aldoshin S.M. New class of neutral paramagnetic binuclear sulfur-containing iron nitrosyl complexes // Russ. Chem. Bull., Int. Ed. – 2003. Vol. 52, №8. – P. 1702–1708.
- Osipov A.N. Regulation of cytochrome c peroxidase activity by nitric oxide and laser irradiation // Biochemistry. – 2006. Vol. 71, № 10. – P. 222.
- Korobko V.M. The Study of the Complexes of Nitromedicine with Cytochrome c and NO-containing Aqueous Dosage Form in the Wound Treatment of Rats // Nitric Oxide. – 2014. – № 42. – P. 62–69.
- Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации: научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли; [под ред. С.Н. Быковского]. – М. Изд-во Перо, 2015. – 79 с.