

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕРМАНИЯ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ
ПРЕПАРАТАХ МЕТОДОМ АТОМНО-АБСОРБЦИОННОЙ
СПЕКТРОМЕТРИИ**

С. В. Алешин¹, В. И. Гегечкори¹, И. В. Амбросов², С. К. Матело², И. Е. Шохин³

¹ ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России

² ООО «ВДС Фарма»

³ ФГБУН НЦБМТ ФМБА России

Поступила в редакцию 12.01.2016 г.

Аннотация. Разработана и оптимизирована методика определения германия методом атомно-абсорбционной спектроскопии в новом германийорганическом соединении (ациклогерманий) в форме фармацевтической субстанции, а также в лекарственной форме (водорастворимом геле). Предложен план валидации разработанной методики.

Ключевые слова: германий, германийорганические соединения, атомно-абсорбционная спектроскопия, ациклогерманий

Abstract. Atomic absorption spectroscopy method for determination of germanium in the new organic germanium compound aciclogermanium in the form of pharmaceutical active ingredient and dosage form (water-soluble gel) is described. Plan of validation of the developed method is proposed.

Keywords: germanium, organic germanium, atomic absorption spectroscopy, aciclogermanium

Германий – химический элемент главной подгруппы 14 группы 4 периода периодической системы химических элементов Д. И. Менделеева, атомный номер 32, твердый металл серо-белого цвета, с металлическим блеском. В неорганических соединениях проявляет катионогенные и анионогенные свойства, устойчивые валентности +2 и +4, также существует в виде металлоорганических соединений различного строения. Согласно принятой в биогеохимии классификации германий относится к микроэлементам, его содержание в норме составляет 10^{-6} – 10^{-5} % от массы тела человека, суточное потребление в норме составляет от 0,4 до 1,5 мг [1]. Всемирной Организацией Здравоохранения признана жизненная необходимость (эссенциальность) ультрамикродоз

германия для нормального функционирования иммунной системы [2]. Различными исследованиями были доказаны терапевтические эффекты органических соединений германия, в частности, иммуномодулирующий, стимулирующий кровотока, противовоспалительный, противовирусный и др [3,4,5].

Органические соединения германия представляют безусловный интерес для медицины и фармации. Начиная с 1960-х годов были синтезированы несколько органических соединений германия, в частности, Ge-132 (противовирусное иммуномодулирующее средство), спирогерманий (противоопухолевое), санумгерман и др. [6].

В настоящее время российской компанией ООО «ВДС Фарма» проводятся исследования по созданию и изучению новых германийорганических соединений на основе разработанной ими оригинальной технологической платформы, кото-

рая позволяет также осуществлять модификации молекул различных лекарственных средств. В последнем случае исходными объектами исследования может выступать широкий спектр соединений, например, нуклеозидные аналоги (ацикловир и его производные), карбоновые кислоты (азелониновая, дихлоруксусная, салициловая и другие), аминокислоты и пептиды, антибиотики и другие малые и поли- молекулы.

Одной из целей таких исследований является создание новых патентоспособных лекарственных препаратов на основе проверенных временем действующих веществ (дженериков), при этом разработанные *me-too* и *me-better* молекулы должны обладать улучшенными биофармацевтическими и терапевтическими свойствами. Так, в частности, препарат ациклогерманий, полученный с использованием молекулы ацикловира, обладает, в отличие от исходного соединения, очень хорошей растворимостью в воде (>25% у ациклогермания vs 0,13% у ацикловира). На практике это также означает повышенную биодоступность лекарственного средства, что позволяет уменьшить дозировку препарата, что в свою очередь ведет к снижению степени выраженности побочных эффектов и медикаментозной токсичности. Кроме того, сравнительные доклинические исследования показали более высокую терапевтическую эффективность ациклогермания (при его существенно более низком эквивалентном содержании ацикловира), что связано с дополнительной иммуномодулирующей активностью германия в новом соединении. Формула ациклогермания в общем виде: $Ge_2[C_6H_5O_7]_4[C_8H_{11}N_5O_3][C_6H_{14}N_4O_2] \cdot [7]$.

Задачей настоящего исследования являлась разработка метода качественного и количественного определения германия в субстанции ациклогермания, а также в лекарственной форме водорастворимом геле. На основании осуществленного литературного поиска был сделан выбор в пользу применения атомно-абсорбционной спектроскопии как современного, высокоточного и высокоселективного метода качественного и количественного анализа металлов.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Целью настоящего исследования являлась разработка методики количественного определения германия в фармацевтической субстанции ациклогермания, а также в лекарственной форме (водорастворимом геле) методом атомно-абсорб-

ционной спектроскопии, с целью включения полученных данных в проект фармакопейной статьи предприятия.

Оборудование.

Исследование проводилось на спектрометре с электротермической атомизацией (ЭТА) и зеemannовской коррекцией неселективного поглощения модели Льюэкс МГА-915МД, с использованием лампы с полым германиевым катодом. Условия исследования приведены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1.

Общие условия испытания.

Линия монохроматора, нм	265.2
Автоподстройка	2.0
Напряжение ФЭУ, В	830.0
Раскачка модулятора	26.0
Длительность оценки нуля, с	250.0
Время интегрирования, с	1.5
Коэффициент расчета	4.0

Таблица 2.

Стадии атомно-абсорбционного анализа.

Стадии	Длительность, с	Температура, °С	Аргон внутренний	Аргон внешний
Сушка	35.0	120	Малый	Включен
Пиролиз I	25	400	Малый	Включен
Оценка нуля	7.0	400	Выключен	Включен
Атомизация	1.5	2400	Выключен	Включен
Очистка	1.7	2500	Большой	Включен
Пауза	70	0	Большой	Включен

РЕАКТИВЫ

В качестве стандарта был использован раствор германия диоксида (GermaniumOxide, ESPI Metals, США) в воде очищенной (класс чистоты Milli-Q).

Были проведены испытания растворов с различной концентрацией германия (по три испытания для каждой концентрации) и на основании полученных данных построен первичный калибровочный график (см. таблицу 3, рисунок 1).

Таблица 3.

Результаты анализа стандартных растворов германия.

Концентрация германия в стандартном растворе, мкг/мл	Поглощение резонансного излучения (интегр., среднее значение)
1	0.039
5	0.136
10	0.302
50	1.243
100	1.625
125	1.910
250	2.500

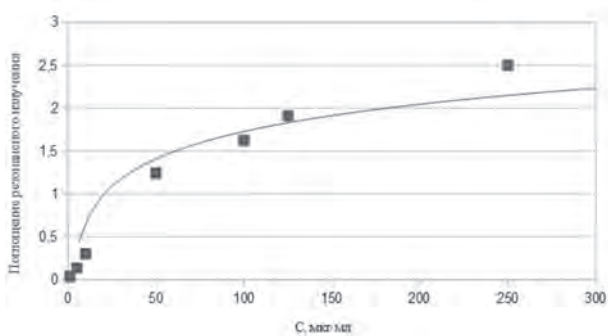


Рис. 1. Калибровочный график, соответствующий всему исследованному диапазону концентраций.

Уравнение регрессии (логарифмическая зависимость):

$$f(x) = 0.459 \ln(x) - 0.386.$$

$$R^2 = 0.905.$$

На основании полученных данных был выделен диапазон концентраций, в котором наблюдалась линейная зависимость, и построен соответствующий график (см. рисунок 2).

Уравнение регрессии (линейная зависимость):

$$f(x) = 0.024x + 0.027$$

$$R^2 = 0.998.$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для фармакопейной методики был предложено использовать построение калибровочного графика по трем точкам, используя диапазон концентраций стандартного раствора, обладающий наибольшей линейностью (см. рисунок 1), 1, 5 и 10 мкг/мл. Исходя из полученных данных, а также информации о строении комплексной молекулы ациклогермания, были предложены методики приготовления стандартных и испытуемых растворов, а также расчетная формула содержания германия.

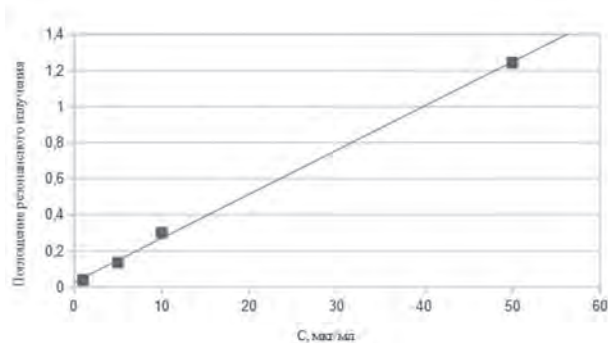


Рис. 2. Калибровочный график, соответствующий линейному диапазону концентраций.

Методика количественного определения германия в субстанции ациклогермания методом атомно-абсорбционной спектрометрии [8].

Исходный стандартный раствора германия (IV) (100 мкг/мл). Около 0,144 г (точная навеска) германия диоксида (GermaniumOxide, ESPI Metals, США, или другой аналогичного качества, соответствует около 0,1 г германия) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде и доводят объем раствора водой очищенной до метки. Непосредственно перед использованием 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Калибровочные растворы германия (IV). 1 мл, 5 мл и 10 мл исходного стандартного раствора германия помещают в мерные колбы вместимостью 100 мл, доводят объемы растворов водой до метки и перемешивают для получения стандартных растворов германия (VI) с концентрацией 1 мкг/мл, 5 мкг/мл и 10 мкг/мл соответственно. Используют свежеприготовленные растворы.

Испытуемый раствор. Около 0,896 г (точная навеска) испытуемой субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Непосредственно перед использованием 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объемы растворов водой до метки и перемешивают.

Измеряют поглощение калибровочных растворов германия (IV) на атомно-абсорбционном спектрометре при длине волны 265,2 нм, используя в качестве источника лампу с полым германиевым катодом. Базовую линию устанавливают по воде очищенной.

Строят калибровочный график зависимости величины поглощения от концентрации германия (мкг/мл).

В тех же условиях измеряют поглощение испытуемого раствора.

Содержание германия в субстанции в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \cdot 100 \cdot 10 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 5 \cdot 1000000} = \frac{C \cdot 2}{a}$$

где: С – концентрация германия в испытуемом растворе, определенная по калибровочному графику, в мкг/мл; а – навеска испытуемой субстанции в г. Содержание германия в

германия в субстанции должно быть в пределах от 10,0 % до 12,0 %

Методика количественного определения германия в трехпроцентном водорастворимом геле ациклогермания методом атомно-абсорбционной спектроскопии.

Исходный стандартный раствора германия (IV) (100 мкг/мл). Методика аналогична определению германия в субстанции.

Калибровочные растворы германия (IV). Методика аналогична определению германия в субстанции.

Испытуемый раствор. Около 1 г (точная навеска) испытуемого геля помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде очищенной, доводят объем раствора водой очищенной до метки, тщательно перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Непосредственно перед использованием 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают.

Измеряют поглощение калибровочных растворов германия (IV) на атомно-абсорбционном спектрометре при длине волны 265,2 нм, используя в качестве источника лампу с полым германиевым катодом. Базовую линию устанавливают по воде очищенной.

Строят калибровочный график зависимости величины поглощения от концентрации германия (мкг/мл).

В тех же условиях измеряют поглощение испытуемого раствора.

Содержание германия в препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \cdot 100 \cdot 10 \cdot 100}{a \cdot 2 \cdot 1000000} = \frac{C \cdot 0,05}{a}$$

где: C – концентрация германия в испытуемом растворе, определенная по калибровочному графику, в мкг/мл; а – навеска испытуемого геля в г;

Содержание германия в испытуемой субстанции должно быть в пределах от 0,3% до 0,37%.

Для разработанной методики представляется целесообразным осуществление процедуры валидации. Может быть проведено изучение следующих валидационных характеристик, предпочтительно, в ходе одного испытания: «Линейность», «Диапазон применения», «Правильность (точность)», «Предел обнаружения», «Предел количественного определения». Используемые критерии приемлемости: среднее квадратичное отклонение, относительное стандартное отклонение.

Линейность методики может быть оценена по графику результатов испытания раствора различной концентрации, как функцию отклика от концентрации аналита. Линейная зависимость должна быть подтверждена для диапазона применения методики. Требуется проведение испытания не менее чем по 7 точкам. Относительная погрешность должна составлять не более 20 % для нижнего диапазона линейности, не более 15 % для остальных точек. Коэффициент корреляции должен быть $\geq 0,990$. Следует отметить, что имеющихся данных недостаточно, чтобы сделать однозначный вывод о соответствии методики показателю «линейность», так как линейная зависимость установлена только по четырем точкам.

Диапазон применения методики может быть установлен согласно результатам изучения линейности. Минимальный диапазон применения должен лежать в пределах от 80 до 120% от определяемой концентрации аналита.

Правильность методики выражается в процентах относительной погрешности между измеренной и истинной величиной (отношение экспериментального значения к истинному значению) и может быть установлена по результатам исследования с использованием стандартных образцов. Может быть использована следующая формула:

$$Er\% = \frac{Cx}{C0} \times 100,$$

где: Er% = процент погрешности между измеренной и истинной величиной, %; Cx = измеренная концентрация раствора; C0 = истинная концентрация раствора.

Правильность должна оцениваться с использованием как минимум 3-х концентраций стандартного раствора при не менее чем 3-х измерениях для каждого. Значение Er% должно лежать в пределах от 95 до 105%.

Предел обнаружения (LOD) и Предел количественного определения (LOQ) методики могут быть оценены при помощи метода анализа калибровочной кривой с использованием следующих формул:

$$LOD = \frac{3s}{k},$$

для предела количественного определения:

$$LOQ = \frac{10s}{k},$$

где: s = стандартное отклонение отклика, определяемое как стандартное отклонение для повторных определений образцов плацебо; k =

наклон калибровочной кривой.

Полученные значения могут быть затем подтверждены путем независимого анализа приемлемого количества специально приготовленных образцов, содержащих германий в концентрации, близкой к рассчитанным значениям предела обнаружения и предела количественного определения [9].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования была разработана методика определения содержания германия в субстанции ациклогермания, которая с небольшими модификациями может быть использована и при анализе вещества в различных лекарственных формах, а также при анализе других германийсодержащих фармацевтических субстанций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Эмсли Д. Элементы / Д. Эмсли. — М.: Мир, 1993. — 259 с.
2. Antitumor effect in mice of an organic germanium compound (Ge-132) when different administration methods are used / H. Aso [et al.] // Gan to Kagaku Ryoho. Cancer & Chemotherapy. — 1985. — №12. — P. 2345-2351.

3. Ребров В.Г. Витамины и микроэлементы / В.Г. Ребров, О.А. Громова. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2003. — 315 с.

4. Yang M. Protective role of germanium-132 against paraquat-induced oxidative stress in the livers of senescence-accelerated mice / M. Yang, Y. Kim // Journal of Toxicology and Environmental Health. — 1999. — №12(58). — P. 289-297.

5. Германийорганические соединения как индукторы иммунного интерферона / А.М. Амченкова [и др.] // «Интерферон – 89»: Сб. науч. тр. — М., 1989. — С. 35-37.

6. Пат. 46-2964 Япония. Organogermanium compounds / Asai K., Makabe K. Оpubл. 1971.

7. Пат. № 2487878 РФ. Комплексные соединения германия с производными азотистых оснований пуринового ряда, способы их получения и содержащие их лекарственные средства / А.Д. Исаев, И.В. Амбросов и др. Оpubл. 2013.

8. Руководство по экспертизе лекарственных средств / А.Н. Миронов [и др.]. — М.: Гриф и Ко, 2013. — Том 2. — С. 25-40.

9. Руководство по инструментальным методам исследования при разработке и экспертизе качества лекарственных препаратов / под ред. С.Н. Быковского и др. — М.: Перо, 2014. — С. 80-118.

Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России

*Алешин С. В., аспирант НИИ Фармации,
E-mail: neos.1991@gmail.com.*

*Гегечкори В. И., аспирант НИИ Фармации
E-mail: vgegechkori@gmail.com.*

*ООО «ВДС Фарма»
Амбросов И. В., кандидат биологических наук
E-mail: igor.ambrosov@wdspharma.ru*

Матело С. К., кандидат медицинских наук.

*ФГБУН НЦБМТ ФБМА России
Шохин И. Е., кандидат фармацевтических наук, зав. лаборатории фармакокинетики и лекарственных форм*

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University

*Aleshin S. V., post-graduate student
E-mail: neos.1991@gmail.com.*

*Gegechkori V. I., post-graduate student
E-mail: vgegechkori@gmail.com.*

*WDS Pharma
Ambrosov I. V., Ph.D.
E-mail: igor.ambrosov@wdspharma.ru*

Matelo S. K., M.D..

Scientific center for biomedical technologies FMBA

Shohin I. E., Ph.D., head of pharmacokinetics and dosage form laboratory