

## ЦВЕТОМЕТРИЧЕСКАЯ АЛЬТЕРНАТИВА ФЛУОРИМЕТРИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ

Л. В. Рудакова<sup>1</sup>, Е. Н. Ветрова<sup>1</sup>, Я. О. Рудаков<sup>1</sup>, П. С. Шевелев<sup>2</sup>

*1* ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н. Н. Бурденко Минздрава России, г. Воронеж

*2* ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 14.01.2021 г.

**Аннотация.** Фармакопейная статья рекомендует использовать способность фолиевой кислоты образовывать продукты, обладающие флуоресценцией, для проведения качественной реакции, позволяющей устанавливать подлинность препарата. Для количественного определения предлагается метод ВЭЖХ. В настоящей статье на примере фолиевой кислоты показана возможность использования в качестве альтернативы гораздо более экономичного цветометрического подхода для количественного определения в растворе биологически активных веществ, обладающих собственной флуоресценцией или продуктов их взаимодействия, приобретающих в результате химического взаимодействия с реагентами способность к флуоресценции. В качестве аналитического сигнала в этом случае используется цифровое изображение образца, регистрируемое с помощью любых цифровых устройств: сканера, фото- или веб-камеры. В проведенном исследовании использовали смартфон, совмещающий фотокамеру и компьютер в одном устройстве. Жестким требованием при проведении цветометрических измерений является стандартизация условий освещения. Цветность образцов оценивали в рамках цветовой модели RGB, в которой цвет определяется как точка в трёхмерном цветовом пространстве в координатах трёх базовых цветовых компонент. Значения R, G, B параметров могут меняться от 0 до 255. Равенством всех трех параметров нулю описывается черный цвет, максимальными значениями – белый. Т.е. при увеличении интенсивности окраски образца значения RGB параметров уменьшаются.

Было показано, что интенсивности отдельных цветовых каналов и суммарная интенсивность цветности образцов фолиевой кислоты проявляют линейную зависимость от содержания препарата в растворе, причем с высокой степенью аппроксимации. Установленные зависимости можно использовать в качестве градуировочных для определения препарата в растворе.

Таким образом, фармакопейная реакция с образованием флуоресцирующих продуктов, рекомендованная ранее только для идентификации, может успешно использоваться для количественных определений в широком диапазоне концентраций. Предложенный подход позволяет использовать для анализа вместо специализированных приборов бытовые цифровые устройства, не требующие профессиональной подготовки персонала. Методика отличается низкой экономичностью, простотой исполнения, доступностью аппаратуры и программного обеспечения, имеет удовлетворительные метрологические характеристики (относительная погрешность определения не превышает 8%), пригодна для малобюджетных лабораторий.

**Ключевые слова:** фолиевая кислота, цифровая цветометрия, флуориметрия, фармацевтический анализ

В настоящее время разработано и производится аналитическое оборудование, позволяющее осуществлять контроль качества продукции с матрицей любой сложности. Однако, стоимость такого оборудования, как, например, ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором, пропорциональна его возможностям и доступна далеко не каждой лаборатории. Менее 30% аналити-

ческих лабораторий, занимающихся контролем качества фармацевтической продукции, имеют полностью укомплектованную приборную базу. В связи с этим разработка новых эффективных и при этом доступных аналитических методик для контроля качества и подлинности фармацевтических объектов является актуальной задачей современной аналитики.

Сделать анализ более экономичным, не требующим специального оборудования и специальной

© Рудакова Л. В., Ветрова Е. Н., Рудаков Я. О., Шевелев П. С., 2021

подготовки персонала, позволяет использование достижений цифровой техники, причем бытовых цифровых устройств и стандартных пользовательских программных продуктов. В работах [1-23] показано, что в качестве аналитического сигнала можно использовать результаты компьютерной оценки интенсивности цвета, полученных с помощью цифровых устройств изображений окрашенных объектов (например, лекарственных препаратов или цветных продуктов фармакопейных тестов). Была установлена возможность использования цвета для количественного анализа различных объектов.

В качестве цифровых устройств для регистрации изображений одинаково успешно могут быть использованы планшетные сканеры со слайд-адаптером, фото-, видео-, web-камеры, смартфоны [1-23]. В последнее время, в связи с усовершенствованием фотокамер в смартфонах, они все чаще используются как цветорегистрирующие устройства [24-26]. Цветность полученных изображений можно оценивать в рамках различных существующих цветовых моделей [24]. Чаще всего используется цветовое пространство RGB – самая распространенная и естественная система кодировки цвета, в которой цвет определяется как точка в трёхмерном цветовом пространстве в координатах трёх базовых цветовых компонент.

Шкала цветности RGB является аппаратно-зависимой. Проверка степени этой зависимости показала, что для суммы цветовых компонент разброс относительно среднего имеет значения, характерные для большинства инструментальных методов анализа.

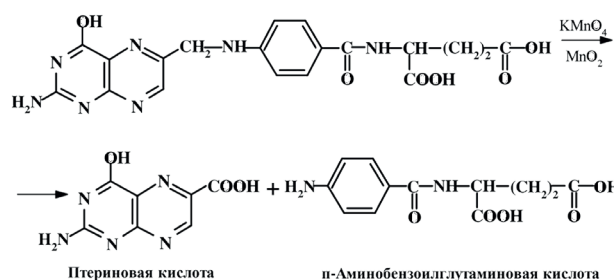
## МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Фолиевая кислота относится к витаминам группы В (витамин В<sub>9</sub>, витамин В<sub>9</sub>), отвечает за рост клеток и сохранение целостности ДНК, необходима для развития и работы кровеносной и иммунной систем, оказывает благотворное влияние на нервную систему. Однако в организме человека фолиевая кислота не синтезируется; в малых дозах она поступает с пищей и продуцируется нормальной микрофлорой кишечника. Для восстановления необходимого уровня содержания витамина в организме используется синтетический водорастворимый витамин в виде таблетированной формы чистой фолиевой кислоты, БАДов и витаминных комплексов.

Для исследования фолиевой кислоты была использована ее способность образовывать про-

дукты взаимодействия, обладающие флуоресценцией. Для приготовления стандартных растворов использовали аптечный препарат «Фолиевая кислота» с содержанием в 1 таблетке 1 мг фолиевой кислоты. В качестве вспомогательных веществ в лекарственную форму входят сорбит (подсластитель), тальк (агент антислеживающий), стеариновая кислота (стабилизатор). Нерастворимые компоненты отфильтровывали, сорбит не мешает определению действующего вещества.

Навеску препарата фолиевой кислоты растворяли в 5.0 см<sup>3</sup> 0.1М раствора гидроксида натрия, приливали 5.0 см<sup>3</sup> 0.1 М раствора соляной кислоты и 1.0 см<sup>3</sup> 0.05 н раствора перманганата калия. Раствор помещали на водяную баню с температурой 80–85 °С на 3 мин. В результате окисления перманганатом калия образуются птериновая (2-амино-4-гидрокси-птеридин-6-карбоновое кислоты) и пара-аминобензоилглутаминовая кислоты.



После охлаждения к раствору прибавляли 6 капель 3% раствора пероксида водорода для удаления избытка перманганата калия и отфильтровывали образовавшийся диоксида марганца. Полученный фильтрат, содержащий птериновую кислоту, имеет голубую флуоресценцию в ультрафиолетовом свете при длине волны 365 нм. Данная методика рекомендована фармакопейной статьей для проведения качественной реакции (установления подлинности препарата).

Были приготовлены стандартные растворы из навесок препарата, соответствующие содержанию субстанции в 3, 5, 7, 10, 12 и 15 таблетках препарата. После проведения пробоподготовки стандартные растворы в кювете толщиной 1 см помещали в облучатель хроматографический УФС 254/365. При длине волны 365 нм голубую флуоресценцию регистрировали с помощью смартфона SamsungGalaxyJ7 SM-J730FM с камерой 13Мп.

Для компьютерной обработки полученных цифровых изображений применили графический редактор AdobePhotoshop (версия CS3), который позволяет оценивать величины RGB параметров.

В табличном редакторе Microsoft Excel были построены и проанализированы зависимости этих параметров от содержания фолиевой кислоты в растворе.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенный цветометрический анализ для серии растворов препарата фолиевой кислоты показал наличие корреляции между концентрацией флуоресцирующих продуктов взаимодействия фолиевой кислоты и интенсивностью регистрируемых параметров. Наблюдалось возрастание интенсивности флуоресценции при увеличении содержания фолиевой кислоты в растворе.

Изменение RGB-параметров имеет закономерный характер в зависимости от концентрации стандартных растворов. Причем значения этих параметров при увеличении интенсивности окраски раствора уменьшаются, что соответствует цветовой модели RGB, в которой белый цвет описывается набором значений RGB (255, 255, 255), а черный - значениями RGB (0,0,0). Т.е., чем насыщеннее окраска, тем меньше величины параметров RGB. На рис.1 приведены концентрационные зависимости для параметров G и B, а на рис.2 – зависимость для общего значения интенсивности окраски раствора, т.е. суммы значений RGB.

Очевидно, что линейаризуются зависимости по

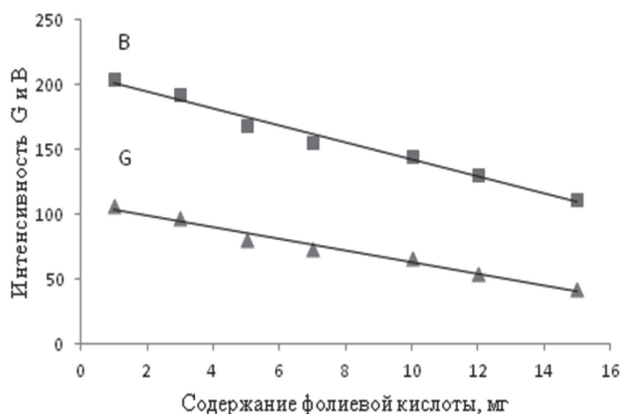


Рис. 1. Градуировочная зависимость интенсивности цветных компонент G и B от содержания фолиевой кислоты в анализируемом растворе.

выбранным компонентам с высокой степенью достоверности аппроксимации ( $R^2 > 0.98$ ), что позволяет использовать их в качестве градуировочных

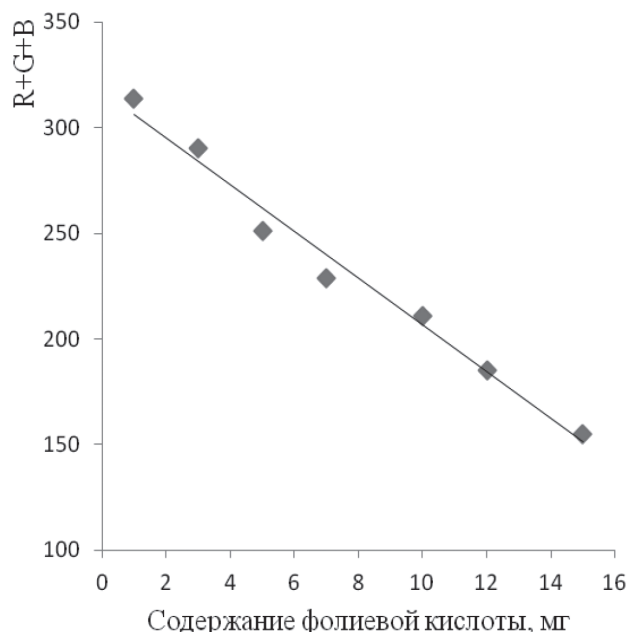


Рис. 2. Градуировочная зависимость суммарной интенсивности R+G+B от содержания фолиевой кислоты в анализируемом растворе.

для количественного анализа (табл.1).

Предложенная методика работает в широком диапазоне концентраций ( $C = 0.01 - 0.15$  мг/мл) и позволяет использовать для определения содержания фолиевой кислоты градуировочные уравнения по суммарной интенсивности цвета или по интенсивности одной из компонент цветности – G или B. Единственным жестким требованием является стандартизация условий при получении цифрового изображения анализируемого образца.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, фармакопейная реакция с образованием флуоресцирующих продуктов, рекомендованная ранее только для идентификации, может успешно использоваться для количественных определений в широком диапазоне концентраций. А предложенный подход с использовани-

Таблица 1

Градуировочные уравнения зависимости интенсивности компонент цветности и суммарной интенсивности от концентрации ( $n=5, P=0.95$ ), полученные для растворов фолиевой кислоты цветометрическим способом,  $C = 0.01 - 0.15$  мг/мл.

Параметр цветности	Градуировочное уравнение	$R^2$
G	$I(G) = -4.52 C + 108.48$	0.981
B	$I(B) = -6.57 C + 208.00$	0.983
R+G+B	$I(R+G+B) = -11.09 C + 317.53$	0.981

ем цифровых устройств (смартфонов) позволяет проводить анализ, не требуя специализированных приборов (таких, как флуориметр) и специальной подготовки персонала. Методика отличается низкой стоимостью единичного анализа, простотой исполнения, доступностью аппаратуры и программного обеспечения, имеет удовлетворительные метрологические характеристики (относительная погрешность определения не превышает 8%), пригодна для малобюджетных лабораторий.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Monogarova O.V., Oskolok K.V., Apyari V.V. // Journal of Analytical Chemistry. 2018. Т. 73. №11. P. 1076-1084.
2. Apyari V.V., Gorbunova M.V., Isachenko A.I. et al. // Journal of Analytical Chemistry. 2017. Т. 72. № 11. P. 1127-1137.
3. Байдичева О.В., Рудакова Л.В., Рудаков О.Б. // Бутлеровские сообщения. 2008. Т. 13. № 2. С. 50-61.
4. Рудакова Л.В., Селеменев В.Ф. Контроль качества и подлинности фармацевтической продукции с использованием цифровых технологий. В кн. «Проблемы аналитической химии», Т. 16 «Фармацевтический анализ», Москва, Аргамак Медиа, 2013, С. 269-308.
5. Чапленко А.А., Моногарова О.В., Осолок К.В. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2017. Т. 20. №3. С. 7-12.
6. Чапленко А.А., Моногарова О.В., Осолок К.В., Чапленко С.А. // Химико-фармацевтический журнал. 2017. Т. 51. №8. С. 55-59.
7. Чапленко А.А., Моногарова О.В., Осолок К.В., Чапленко С.А. // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. №3 (16). С. 134-137.
8. Хорохордина Е.А., Харитоновна Л.А., Рудакова Л.В. // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2015. №4. С. 41-45.
9. Чернова Р.К., Косырева И.В., Селифонова Е.И. // «Компьютерные науки и информационные технологии», материалы Международной научной конференции, 2016, С. 461-464.
10. Рудакова Л.В., Кудухова И.Г. // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2012. Т.78. №12. С. 20-25.
11. Рудаков О.Б., Рудакова Л.В., Кудухова И.Г., Головинский П.А., Хорохордина Е.А., Грошев Е.Н. // Аналитика и контроль. 2012. Т. 16. №4. С. 368-377.
12. Бузук Г.Н., Кузьмичева Н.А. // Вестник фармации. 2011. №3(53). С. 12-18.
13. Байдичева О.В., Хрипушин В.В., Рудакова Л.В., Рудаков О.Б. // Пищевая промышленность. 2011. №10. С. 26-28.
14. Апяри В.В., Дмитриенко С.Г., Золотов Ю.А. // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. 2011. Т. 52. №1. С. 36-42.
15. Рудакова Л.В., Рудаков О.Б. // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2015. № 2. С. 35-41.
16. Рудаков О.Б., Хорохордина Е.А., Рудакова Л.В., Чан Х.Д. // Сорбционные и хроматографические процессы. 2016. Т. 16. №5. С. 686-694.
17. Зрелова Л.В., Беляева Е.И., Марченко Д.Ю., Иванова Е.А., Санджиева Д.А., Дедов А.Г. // Журнал аналитической химии. 2018. Т. 73. №3. С. 198-204.
18. Рудаков О.Б., Черноусова О.В., Рудакова Л.В. // «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья», материалы VIII Всероссийской конференции с международным участием, 2020, С. 65-67.
19. Чапленко А.А., Моногарова О.В., Осолок К.В. // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2020. Т. 9. №1. С. 55-59.
20. Моногарова О.В., Чапленко А.А., Осолок К.В. // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. 2020. Т. 61. № 1. С. 3-10.
21. Рудакова Л.В., Ветрова Е.Н., Никитина Т.Н., Алёхина М.И. // Прикладные информационные аспекты медицины. 2019. Т. 22. №3. С. 104-109.
22. Шульц Э.В., Моногарова О.В., Осолок К.В. // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. 2019. Т. 60. № 2. С. 79-87.
23. Monogarova O.V., Chaplenko A.A., Oskolok K.V. Identification and quantification of chloramphenicol in medicines by multisensory digital colorimetry // Moscow University Chemistry Bulletin. 2020. Т. 75. №1. М. 1-7.
24. Рудакова Л.В., Рудаков О.Б. Информационные технологии в аналитическом контроле биологически активных веществ. Спб.: Лань, 2015, 361 с.
25. Рудаков О.Б., Черноусова О.В., Вострикова Т.О., Усачев С.М. // Химия, физика и механика материалов. 2019. № 3 (22). С. 35-48.
26. Nguyen H., Shih W.C. Dotlens smartphone microscopy and nano-colorimetry В сборнике: Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE. 5. Сер. "Optics and Biophotonics in Low-Resource Settings V" 2019. С. 108690М.

Рудакова Л. В., Ветрова Е. Н., Рудаков Я. О., Шевелев П. С.

ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н. Н. Бурденко  
Рудакова Л. В., заведующая кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии  
E-mail: vodoley65@mail.ru

Voronezh State Medical University  
L. V., PhD., DSci., Head of the Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Technology  
E-mail: vodoley65@mail.ru

Ветрова Е. Н., старший преподаватель кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии  
E-mail: elen.vetrova@yandex.ru

Vetrova E. N., Senior Lecturer, Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Technology  
E-mail: elen.vetrova@yandex.ru

Воронежский государственный университет  
Рудаков Я. О., аспирант кафедры аналитической химии  
E-mail: voroneth36@gmail.com

Voronezh State University  
Rudakov Ya. O. Post-graduate student, Department of Analytical Chemistry  
E-mail: voroneth36@gmail.com

Шевелев П. С., инженер кафедры аналитической химии  
E-mail: shpmaster@yandex.ru

Shevelev P. S. engineer, Department of analytical chemistry  
E-mail: shpmaster@yandex.ru

## COLOROMETRIC ALTERNATIVE OF FLUORIMETRY FOR DETERMINATION OF FOLIC ACID

L.V. Rudakova<sup>1</sup>, E.N. Vetrova<sup>1</sup>, Ya.O. Rudakov<sup>1</sup>, P.S. Shevelev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Voronezh State Medical University named after N.N.Burdenko

<sup>2</sup> Voronezh State University

**Abstract.** The pharmacopoeic article recommends the reaction of folic acid with a reagent to form a fluorescent product to identify the preparation. A HPLC method is proposed for quantification. This article shows the possibility of using digital color measurement as an alternative to a more economical method. The method can be used to quantify biologically active substances possessing their own fluorescence or products of their chemical interaction. Is shown using folic acid as an example. The analytical signal in the medium of digital color measurement is a digital image of a painted sample, recorded using any digital device: a scanner, camera or webcam. The study used a smartphone combining a camera and a computer in one device. Standardization of lighting conditions is a stringent requirement for color measurement. The chromaticity of the samples was evaluated within the RGB color model, in which color is defined as a point in three-dimensional color space in the coordinates of three basic color components. The values of R, G, B parameters can vary from 0 to 255. The equality of all three parameters to zero describes the black color, the maximum values – are white. Thus, as the color intensity of the sample increases, the RGB values of the parameters decrease.

The intensities of individual color channels within the RGB color model and the total color intensity of folic acid samples exhibit a linear dependence on the drug content in solution, and with a high degree of approximation. These dependences can be used as calibration for quantitative determination of the drug content in the analyzed solution.

Thus, the pharmacopoeic reaction to form fluorescent products, previously recommended only for identification, can be successfully used for quantitative determinations over a wide range of concentrations. The proposed approach allows the use of household digital devices for analysis instead of specialized devices, therefore it does not require special training of personnel. The technique is characterized by low economy, simplicity of execution, availability of equipment and software, has satisfactory metrological characteristics (relative error of determination does not exceed 8%). This method is suitable for low-budget laboratories.

**Keywords:** folic acid, digital colorimetry, fluorimetry, pharmaceutical analysis.

## REFERENCES

1. Monogarova O.V., Oskolok K.V., Apyari V.V., *Journal of Analytical Chemistry*, 2018, T. 73, No. 11, pp. 1076-1084.
2. Apyari V.V., Gorbunova M.V., Isachenko A.I. et al., *Journal of Analytical Chemistry*, 2017, T. 72, No. 11, pp. 1127-1137.
3. Bajdicheva O.V., Rudakova L.V., Rudakov O.B., *Butlerovskie soobshhenija*, 2008, T. 13, № 2, S. 50-61.
4. Rudakova L.V., Selemenev V.F. *Kontrol' kachestva i podlinnosti farmacevticheskoy produkcii s ispol'zovaniem cifrovyyh tehnologij*. V kn. «Problemy analiticheskoy himii», T. 16 «Farmaceuticheskij analiz», Moskva, Argamak. Media, 2013, pp. 269-308.
5. Chaplenko A.A., Monogarova O.V., Oskolok K.V., *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii*, 2017, T. 20, No. 3, pp. 7-12.
6. Chaplenko A.A., Monogarova O.V., Oskolok K.V., Chaplenko S.A., *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal*, 2017, T. 51, No. 8, pp. 55-59.
7. Chaplenko A.A., Monogarova O.V., Oskolok K.V., Chaplenko S.A., *Razrabotka i registracija lekarstvennyh sredstv*, 2016, No. 3 (16), pp. 134-137.
8. Horohordina E.A., Haritonova L.A., Rudakova L.V., *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta*, Serija: Himija. Biologija. Farmacija, 2015, No. 4, pp. 41-45.
9. Chernova R.K., Kosyreva I.V., Selifonova E.I., «Komp'yuternye nauki i informacionnye tehnologii», *materialy Mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii*, 2016, pp. 461-464.
10. Rudakova L.V., Kuduhova I.G., *Zavodskaja laboratorija. Diagnostika materialov*, 2012, T.78, No. 12, pp. 20-25.
11. Rudakov O.B., Rudakova L.V., Kuduhova I.G., Golovinskij P.A., Horohordina E.A., Groshev E.N., *Analitika i kontrol'*, 2012, T. 16, No. 4, pp. 368-377.
12. Buzuk G.N., Kuz'micheva N.A., *Vestnik farmacii*, 2011, No. 3 (53), pp. 12-18.
13. Bajdicheva O.V., Hripushin V.V., Rudakova L.V., Rudakov O.B., *Pishhevaja promyshlennost'*, 2011, No. 10, pp. 26-28.
14. Anjaru V.V., Dmitrienko S.G., Zolotov Ju.A., *Vestnik Moskovskogo universiteta*. Serija 2: Himija, 2011, T. 52, No. 1, pp. 36-42.
15. Rudakova L.V., Rudakov O.B., *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta*. Serija: Himija. Biologija. Farmacija, 2015, No. 2, pp. 35-41.
16. Rudakov O.B., Horohordina E.A., Rudakova L.V., Chan H.D., *Sorbcionnye i hromatograficheskie process*, 2016, T. 16, No. 5, pp. 686-694.
17. Zrelava L.V., Beljaeva E.I., Marchenko D.Ju., Ivanova E.A., Sandzhieva D.A., Dedov A.G., *Zhurnal analiticheskoy himii*, 2018, T. 73, No.3, pp. 198-204.
18. Rudakov O.B., Chernousova O.V., Rudakova L.V., «Novye dostizhenija v himii i himicheskoy tehnologii rastitel'nogo syr'ja», *materialy VIII Vserossijskoj konferencii s mezhdunarodnym uchastiem*, 2020, pp. 65-67.
19. Chaplenko A.A., Monogarova O.V., Oskolok K.V., *Razrabotka i registracija lekarstvennyh sredstv*, 2020, T. 9, No. 1, pp. 55-59.
20. Monogarova O.V., Chaplenko A.A., Oskolok K.V., *Vestnik Moskovskogo universiteta*. Serija 2: Himija, 2020, T. 61, No. 1, pp. 3-10.
21. Rudakova L.V., Vetrova E.N., Nikitina T.N., Aljohina M.I., *Prikladnye informacionnye aspekty mediciny*, 2019, T. 22, No. 3, pp. 104-109.
22. Shul'c Je.V., Monogarova O.V., Oskolok K.V., *Vestnik Moskovskogo universiteta*. Serija 2: Himija, 2019, Vol. 60, No. 2, pp. 79-87.
23. Monogarova O.V., Chaplenko A.A., Oskolok K.V., *Moscow University Chemistry Bulletin*, 2020, Vol. 75, № 1. pp. 1-7.
24. Rudakova L.V., Rudakov O.B. *Informacionnye tehnologii v analiticheskom kontrole biologicheskii aktivnyh veshhestv*. Spb.: Lan', 2015, 361 p.
25. Rudakov O.B., Chernousova O.V., Vostrikova T.O., Usachev S.M., *Himija, fizika i mehanika materialov*. 2019. No. 3 (22). pp. 35-48.
26. Nguyen H., Shih W.C. *Dotlens smartphone microscopy and nano-colorimetry* В сборнике: *Progress in Biomedical Optics and Imaging, Proceedings of SPIE*. 5, Сер. "Optics and Biophotonics in Low-Resource Settings V" 2019, С. 108690M.