



УДК 547.56:621.039.327

Усовершенствование экстракционно-инструментальных методик определения парацетамола с применением ВЭЖХ, ТСХ, фотоколориметрии и цифровой цветометрии

Рудакова Л.В.¹, Россихина Е.Ю.¹, Рудаков О.Б.²,
Хорохордина Е.А.², Чан Хай Данг²

¹Воронежская государственная медицинская академия, Воронеж

²Воронежский государственный архитектурно-строительный университет, Воронеж

Поступила в редакцию 5.03.2013 г.

Аннотация

Предложены условия определения парацетамола в водных растворах методом ВЭЖХ, ТСХ, фотоколориметрии и цифровой цветометрии. Для этапа пробоподготовки в определении парацетамола этими методами разработан способ жидкостно-жидкостной экстракции парацетамола из водных растворов ацетонитрилом с последующей реэкстракцией путем высаливания. Рассмотрен гибридный способ определения парацетамола, сочетающий ТСХ и цифровую цветометрию.

Ключевые слова: парацетамол, ацетонитрил, жидкостно-жидкостная экстракция, ВЭЖХ, ТСХ, фотоколориметрия, цифровая цветометрия.

The conditions of paracetamol determination in water solutions by HPLC, TLC, photocolourimetry and digital colorimetry are proposed. The method of the sample preparation for paracetamol determining is developed. This method consists of liquid-liquid extraction of paracetamol from water solutions of acetonitrile and followed reextraction by salting. A hybrid method of paracetamol determining combining of TLC and digital colorimeter is considered.

Keywords: paracetamol, acetonitrile, liquid-liquid extraction, HPLC, TLC, photocolourimetry, digital colorimetry

Введение

Жидкостно-жидкостная экстракция получила широкое применение в пробоподготовке для концентрирования и разделения аналитов при выполнении фотоколориметрических и хроматографических методик химического анализа, в том числе при определении фенолов и их производных в различных матрицах. В качестве экстрагентов для концентрирования фенолов из водных сред в последнее время всё чаще применяют гидрофильные растворители – ацетонитрил, изопропанол, диоксан, которые в присутствии высаливателя или при охлаждении образуют собственную фазу [1-6]. Нами предпочтение было отдано ацетонитрилу, так как водно-ацетонитрильные смеси обладают уникальным набором

хроматографических и оптических свойств (низкая вязкость, прозрачность в УФ диапазоне и др.) и чаще всего используются в обращенно-фазовой ВЭЖХ [7].

Наряду с традиционными фотокolorиметрическими методами анализа все более широкое применение в контроле качества пищевой, фармацевтической, технической продукции, обладающей определенной цветностью или меняющей цвет в зависимости от качества или сроков хранения (эксплуатации) находит цветометрический метод, в котором аналитическим сигналом служит электронное изображение окрашенного объекта, полученное с использованием цифрового устройства (фотоаппарат, сканер и др.) [8-17]. Из различных цветовых моделей для компьютерной обработки электронного изображения чаще всего в цветометрии применяют трехкомпонентную модель *RGB*, в которой каждая точка цветового пространства определяется набором 3-х координат – численно выраженных в диапазоне от 0 до 255 значений интенсивности красной, зеленой и голубой составляющих цвета.

Нами был предложен способ цветометрического определения парацетамола путем регистрации цифровым фотоаппаратом окрашенных продуктов взаимодействия парацетамола со специфическими реагентами (хлоридом железа (III) и с диазотированным *para*-нитроанилином). Для полученных изображений оценивали интенсивность цветовых *RGB* компонент. В качестве интегрального показателя использовали геометрические параметры диаграмм, построенных в полярных координатах, на 6 осях которых откладывали значения интенсивности каждой из 3 цветовых компонент для растворов, полученных после параллельного проведения двух цветных реакций. Теоретическое обоснование и методология подобного применения цифровых технологий в цветометрических измерениях представлены в [8-11,14-17].

Обсуждение результатов

В качестве объекта исследования использовали парацетамол: N-(4-гидроксифенил)ацетамид, в виде субстанции и в составе фармацевтического препарата □ суспензия «Парацетамол детский». Наряду с парацетамолом препарат содержит вспомогательные вещества: метилпарагидроксибензоат, сорбитол, глицерин, камедь ксантановая, краситель азорубин (кислотный красный 2С), ароматизатор клубничный и сахарозу.

Для извлечения парацетамола из суспензии был разработан усовершенствованный способ жидкостно-жидкостной экстракции (ЖЖЭ) из водного раствора ацетонитрилом, с последующей реэкстракцией путем высаливания. ЖЖЭ проводили следующим образом: 10 мл суспензии помещали в коническую плоскодонную колбу и приливали мерным цилиндром 10 мл ацетонитрила, встряхивали на вибросмесителе в течение 15 мин, после чего пипеткой отбирали 10 мл полученного водно-ацетонитрильного экстракта и помещали его в мерный цилиндр, вместимостью 50 мл. Для реэкстракции парацетамола к аликвоте добавляли мерным цилиндром 10 мл дистиллированной воды, раствор подщелачивали водным раствором NH_3 (1,6 моль/л) до $\text{pH} \sim 9$ и добавляли ~ 3 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Полученную экстракционную смесь встряхивали на вибросмесителе в течение 15 мин. После введения высаливателя краситель, используемый в суспензии, переходит полностью в органическую фазу, окрашивая ее в розовый цвет (сама суспензия имеет малиновую окраску), а водная фаза становится бесцветной, что позволяет выполнять фотометрические измерения. Для предложенной методики

ЖЖЭ коэффициент распределения парацетамола $D=42$, а степень его извлечения $R = 96\%$.

Для выполнения экстракционно-хроматографического анализа парацетамола с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХ применили условия, разработанные ранее Голубицким Г.Б. [18], которые хорошо сочетаются с усовершенствованными условиями пробоподготовки: в качестве неподвижной фазы использовали Zorbax SB CN (150×4.6 мм, размер частиц 3.5 мм), в качестве элюента смесь ацетонитрила и 0.02М раствора KH_2PO_4 (1:9), pH 5.7, температура 25 °С, скорость потока элюента 1 мл/мин, детектирование на длине волны 246 нм. Время удерживания парацетамола 4.2 мин.

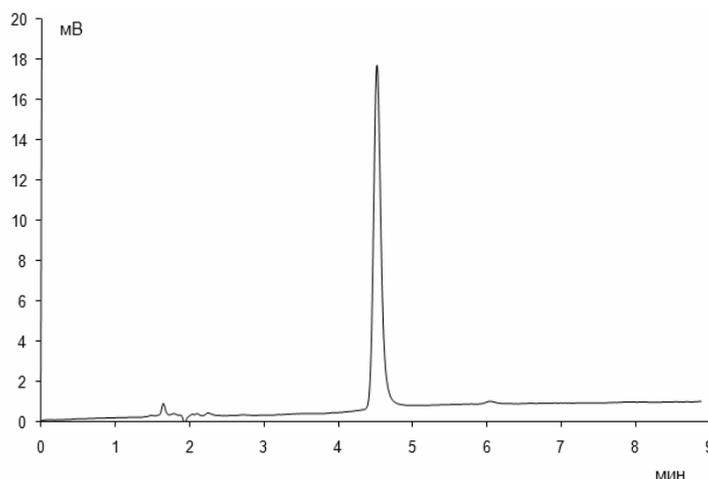


Рис. 1. Хроматограмма субстанции парацетамола

При проведении фотоколориметрического и цветиметрического анализа экстракта из суспензии отбирали 5 мл водной фазы, к которой добавляли 1 мл хромогенного реагента, в качестве которого использовали реакцию азосочетания фенолов с хромогенным агентом, полученным диазотированием *para*-нитроанилина (реакция 1), и реакцию с FeCl_3 (реакция 2) [17]. Фотоколориметрическое определение проводили на приборе КФК-3 при 380 нм по методике, предложенной для контроля фенолов в работе [3]. На рис. 2 и в табл. 1 представлены градуировочные зависимости оптической плотности A от концентрации парацетамола (по результатам проведения двух цветных реакций).

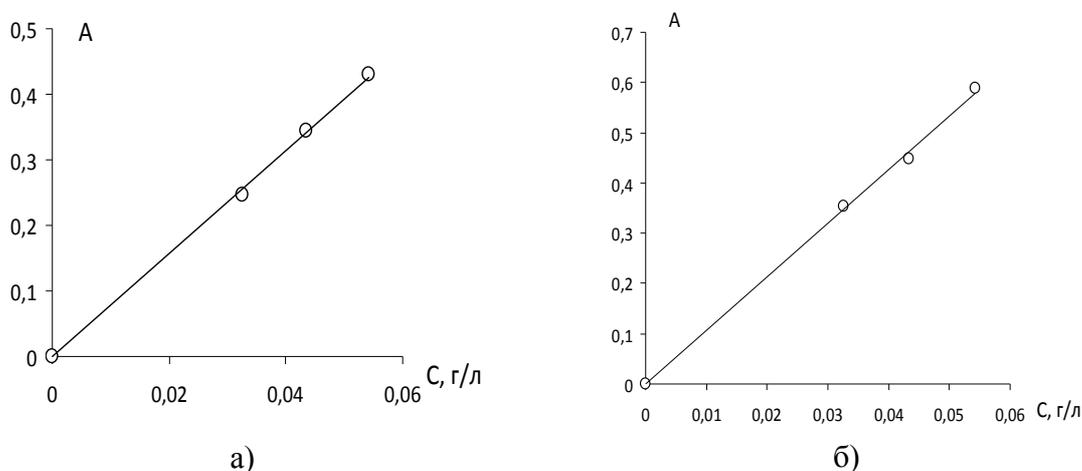


Рис. 2. Градуировочные зависимости оптической плотности от концентрации парацетамола в реакции а) с диазотированным 4-нитроанилином, б) FeCl_3

Таблица. 1. Градуировочные уравнения оптической плотности A от концентрации парацетамола в диапазоне $C=0-0.055$ г/л ($n=5$, $\alpha=0.05$)

Хромогенный реагент	Уравнение	R
Диазотированный пара-нитроанилин	$A=(7.948\pm 0.112)C-(0.0031\pm 0.0043)$	0.997
FeCl_3	$A=(10.705\pm 0.201)C-(0.0012\pm 0.0077)$	0.998

Для регистрации видеосигнала использовали цифровую фотокамеру Nikon D3000, установленную в специальном боксе, позволяющем стандартизировать условия освещения [8]. В бокс помещали кювету, заполненную исследуемым раствором, и регистрировали изображение. С целью уменьшения нежелательных засветок внутренняя поверхность бокса имела матовую черную окраску. Для освещения бокса использовали 2 галогеновые лампы общей мощностью 80 Вт. Условия съемки: формат сохранения графической информации – JPEG, размер изображения – 1 мегапиксель, вспышка – отключена, светочувствительность – 100 ISO или «Авто», параметры баланса белого – «Лампа накаливания».

При компьютерной обработке цифрового изображения применили графический редактор Adobe Photoshop (версия CS3). Обобщенные цветометрические данные представили в виде лепестковых диаграмм (ЛД) с 6-ю осями в полярных координатах, отражающими значения интенсивности (F_i) цветовых координат в модели RGB в одинаковой последовательности $R_1, G_1, B_1, R_2, G_2, B_2$, где индекс 1 и 2 относятся соответственно к 1-ой и 2-ой цветным реакциям. ЛД строили в оболочке электронных таблиц Microsoft Excel или MathCAD, в которых реализованы алгоритмы расчета геометрических размеров ЛД [17].

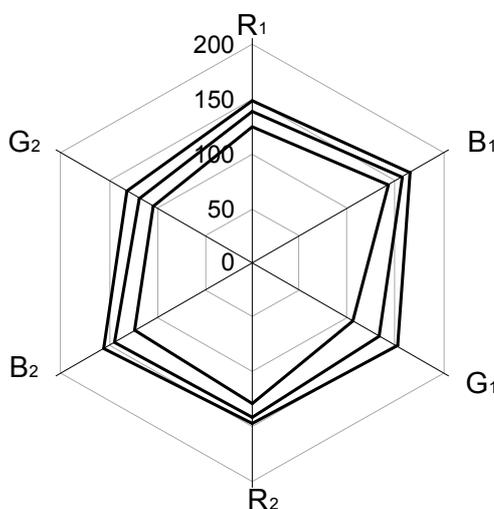


Рис. 3. ЛД цветности для растворов парацетамола после проведения специфической реакции 1 ($R_1G_1B_1$) и 2 ($R_2G_2B_2$) для $C=0.033-0.055$ г/л

На рис. 3 изображены, как пример, ЛД для трех растворов парацетамола после проведения 2-х цветных реакций. Нами была рассмотрена возможность применения ЛД в роли количественного аналитического сигнала в цветометрическом определении парацетамола. Для этого проанализировали зависимость ЛД от концентрации парацетамола и построили соответствующие диаграммы. Расчет показал, что их площади (S) и периметры (P) находятся в линейной зависимости от концентрации (C) причем зависимости имеют степень аппроксимации, достаточную для линейной градуировки (табл.2).

Таблица 2. Аналитические зависимости геометрических размеров ЛД от концентрации ($n=5$, $\alpha=0.05$), полученные для растворов парацетамола цветометрическим способом, $C=0.033-0.055$ г/л

Параметр ЛД	Уравнение	R
Площадь	$S=(-872680\pm 11760)C+(84460\pm 520)$	0.992
Периметр	$P=(-7530\pm 80)C+(1150\pm 10)$	0.989

Для идентификации и количественного определения парацетамола методом ТСХ использовали 2 хроматографические системы, в которых наблюдается удовлетворительное разделение парацетамола с его полупродуктом – *пара*-аминофенолом (табл. 3). Определение парацетамола проводили на пластине марки Sorbfil (Краснодар), размером 12,5×7 см, сорбент – силикагель с зернением 5-12 мкм. Расстояние, пройденное элюентом от линии старта до линии финиша 10 см. На стартовую линию пластинки с помощью микрошприца наносили 10 мкл раствора парацетамола и *пара*-аминофенола. После чего помещали пластинку в хроматографическую камеру, в которую предварительно налили 30 мл подвижной фазы, чтобы пятна были выше уровня элюента. Пластинку выдерживали до тех пор, пока фронт растворителя поднимается до линии финиша. Затем пластинку вынимали из камеры, высушивали на воздухе до полного удаления подвижной фазы. В качестве проявителя для определения парацетамола применили 2 проявляющих реакции: 1) пластинку помещали в пары йода на 10 минут, после чего проявлялись желтые пятна; 2) пластинку опрыскивали с помощью стеклянного пульверизатора смесью хлорид железа (III) – феррицианид, парацетамол давал синие пятно [19, 20]. Реакция азосочетания на тонкослойной пластинке не дала стабильного окрашивания.

Таблица. 3. Характеристики удерживания парацетамола и *n*-аминофенола в различных подвижных фазах на пластинах Sorbfil

Вещество	Элюент	R_f
парацетамол	Хлороформ-этилацетат – уксусная кислота (50:50:1)	0.32
<i>n</i> -аминофенол	Хлороформ-этилацетат – уксусная кислота (50:50:1)	0.60
парацетамол	Хлороформ-этилацетат (9:1)	0.06
<i>n</i> -аминофенол	Хлороформ-этилацетат (9:1)	0.17

Идентификацию хроматографических зон осуществляли по относительной скорости перемещения вещества на пластине (R_f) и по геометрическим параметрам ЛД, полученных по цветометрическим измерениям хроматографических пятен, цифровые изображения которых регистрировали сканерметрически на планшетном сканере HP ScanJet 3500 (рис. 4). Электронные изображения обрабатывали с помощью графического редактора Adobe Photoshop (версия CS3) по методике [17]. Регистрацию цветности пятен проводили сразу после проявления хроматографических зон на пластине.

Изучение концентрационной зависимости от интенсивности компонент цветности, выраженный в виде интегрального показателя – площади или периметра ЛД, установило, что этот показатель применим для количественных определений парацетамола по методике, сочетающей тонкослойное хроматографическое разделение аналитов с цифровыми цветометрическими измерениями. Были проанализированы зависимости геометрических параметров ЛД от концентрации

парацетамола и построены соответствующие диаграммы. Расчет показал, что их площади (S) и периметры (P) находятся в линейной зависимости от концентрации (C) причем зависимости имеют степень аппроксимации, достаточную для линейной градуировки (рис.5, табл.4).

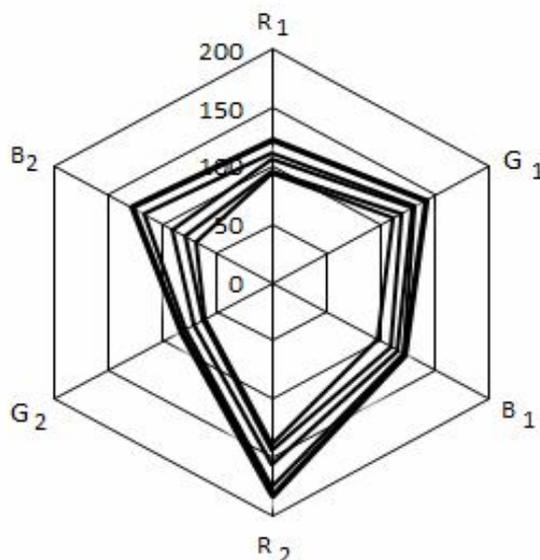


Рис. 4. Зависимость профиля ЛД от концентрации парацетамола в диапазоне $C=0.05-0.25$ г/л. Цветометрические измерения на тонком слое сорбента

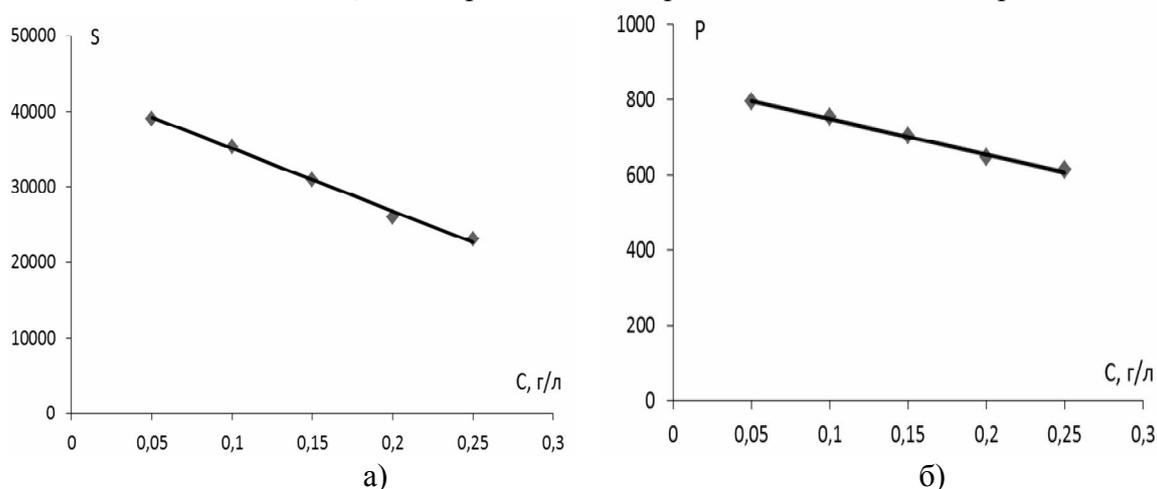


Рис. 5. Зависимость а) площади и б) периметра ЛД от концентрации парацетамола в растворе $C=0.05-0.25$ г/л

Таблица 4. Аналитические зависимости геометрических размеров ЛД от концентрации парацетамола ($C=0.05-0.25$ г/л, $n=5$, $\alpha=0.05$), полученные на тонкослойных пластинах

Параметр ЛД	Уравнение	R
Площадь	$S=(-82560\pm 1480)C+(43304\pm 75)$	0.995
Периметр	$P=(-947\pm 20)C+(844\pm 15)$	0.994

Наибольшее влияние на разделение веществ с помощью ТСХ оказывает состав подвижной фазы [19,20], поэтому нами была проведена работа по его подбору для определения парацетамола в присутствии пара-аминофенола и других низших

фенолов. Наиболее подходящей является подвижная фаза хлороформ – этилацетат – уксусная кислота (50:50:1), в которой парацетамол не остается на линии старта и хорошо разделяется с *para*-аминофенолом (табл. 3).

Таблица 5. Сравнительная характеристика используемых способов определения парацетамола в водных растворах

Способ	Число операций	Преимущества	Недостатки
Фотоколориметрический	6	Экспрессность анализа, небольшой расход реагентов, высокая чувствительность	Неселективность, высокая требовательность к точности воспроизведения условий фотометрической реакции
ВЭЖХ	7	Экспрессность анализа, высокая чувствительность и селективность, хорошая воспроизводимость параллельных определений	Дорогостоящее оборудование, необходимость высокой квалификации оператора, большой расход органического растворителя марки «осч».
ТСХ	9	Простая и недорогая аппаратура, низкий расход реагентов, умеренная селективность	Длительность анализа, не большая точность в количественных определениях по площади пятен
Цветометрический	4	Недорогое оборудование, возможность анализа более концентрированных растворов, повышение информативности за счет увеличения количества регистрируемых аналитических сигналов	Необходимы цифровые устройства (фото- и видео аппаратура, сканер и др.), специальное программное обеспечение
ТСХ с цветометрией	13	Простота приемов и оборудования, повышение информативности за счет увеличения количества регистрируемых аналитических сигналов, умеренная селективность	Необходимо проведение 2-х цветных реакций на 2-х пластинах для проведения одного анализа. Увеличение числа операций. Необходим сканер и специальное программное обеспечение

В табл. 5 приведен сравнительный анализ использованных для определения парацетамола экстракционно-инструментальных способов, который показывает, что для малобюджетных лабораторий наряду с экстракционно-фотоколориметрическим и тонкослойным хроматографическим способом контроля качества продукции, содержащей парацетамол, достаточно эффективными являются экстракционно-цветометрический способ и способ, сочетающий жидкостно-жидкостную экстракцию, ТСХ и цветометрию.

Заключение

Усовершенствованная экстракционная методика пробоподготовки для определения парацетамола в растворах и суспензиях с применением ВЭЖХ, ТСХ, фотоколориметрии и цветометрии позволила в 2,5 раза уменьшить количество высаливателя по сравнению с ранее описанными способами, она хорошо сочетается с методиками жидкостной хроматографии и оптическими способами регистрации аналитического сигнала.

Список литературы

1. Подолина Е. А., Рудаков О. Б. Современные способы концентрирования фенолов из объектов окружающей среды // Бутлеровские сообщения. – 2009. – Т. 15, № 2. – С. 24-36.
2. Рудаков О. Б., Хорохордина Е. А., Подолина Е. А., Бочарникова И. В. Экстракционно-спектрофотометрический и экстракционно-хроматографический анализ фенолов в отделочных строительных материалах // Бутлеровские сообщения. – 2009. – Т. 18, № 8. – С. 55-62.
3. Хорохордина Е.А., Фан Винь Тхинь, Рудаков О.Б., Подолина Е.А. Контроль свободных фенолов в строительных полимерах // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2008. – №1. – С. 47-54.
4. Подолина Е.А. Рудаков О.Б., Хорохордина Е.А., Харитонов Л.А. Применение ацетонитрила для извлечения двухатомных фенолов из водно-солевых растворов и анализа методом ВЭЖХ // Журнал аналитической химии. 2008. – Т. 63, № 5. – С. 514-518.
5. Подолина Е.А., Рудаков О.Б., Фан Винь Тхинь, Рудакова Л.В. Подолина Е.А. Низкотемпературная жидкостная экстракция как способ пробоподготовки фенолов для анализа методом обращённо-фазовой ВЭЖХ // Журнал аналитической химии. – 2009. – Т. 65, № 2. – С. 117-119.
6. Хорохордина Е.А., Подолина Е.А., Рудаков О.Б. Жидкостная экстракция смешанными растворителями. Применение в химическом анализе фенолов. Saarbrücken: LAP Lambert Academic Publishing, 2012. – 240 с.
7. Рудаков О.Б., Востров И.А., Федоров С.В., Филиппов А.А., Селеменев В.Ф., Приданцев А.А. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии. Воронеж: Водолей, 2004. – 528 с.
8. Хрипушин В.В., Рудакова Л.В., Рудаков О.Б., Байдичева О.В. Цветометрические методики определения цветного числа растительных масел // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2008. – № 5. – С. 9-12.
9. Байдичева О.В., Бочарникова И.В., Рудакова О.Б., Хрипушин В.В. Применение сканерметрии в контроле качества отделочных материалов // Научный вестник

ВГАСУ. Серия: Физико-химические проблемы строительного материаловедения. – 2008. – Вып. 1. – С. 100-105.

10. Байдичева О.В., Рудаков О.Б., Хрипушин В.В., Барсукова Л.Г. Определение цветности воды с использованием цифровых технологий // Безопасность жизнедеятельности. – 2009. – № 1. – С. 23-25.

11. Рудаков О.Б., Королькова Н.В., Полянский К.К., Котик О.В., Рудакова Л.В. Технохимический контроль жиров и жирозаменителей. С.-П.: Лань, 2011. – 576 с.

12. Soldat D.J., Barak Ph., Lepore B.J. Microscale Colorimetric Analysis Using a Desktop Scanner and Automated Digital Image Analysis // J. Chem. Educ. – 2009. – V. 86, № 5. – P. 617-620.

13. Hirayama E., Sugiyama T., Hisamoto H., Suzuki K. Visual and Colorimetric Lithium Ion Sensing Based on Digital Color Analysis // Anal. Chem. – 2000. – V. 72, № 3. – P. 465–474.

14. Иванов В.М., Кузнецова О.В. Химическая цветометрия: возможности метода, области применения и перспективы // Успехи химии. – 2001. – Т. 70, № 5. – С. 411-428.

15. Зяблов А.Н., Жиброва Ю.А., Селеменев В.Ф. Цифровая обработка изображений. Достоинства и недостатки // Сорбц. и хроматограф. процессы. – 2006. – Т. 6, № 6. – С. 1424-1429.

16. Байдичева О.В., Рудакова Л.В., Рудаков О.Б. Применение цифровых технологий в цветных тестах биологически активных веществ // Бутлеровские сообщения. – 2008. – Т. 13, № 2. – С. 50-61.

17. Рудаков О.Б., Рудакова Л.В., Кудухова И.Г., Головинский П.А., Хорохордина Е.А., Грошев Е.Н. Усовершенствование способа определения фенолов по цветным реакциям с применением цифровых технологий // Аналитика и контроль. – Т. 16, № 4. – С. 570-579.

18. Голубицкий Г.Б. Хроматографический анализ многокомпонентных полифункциональных лекарственных препаратов. Дисс. ... д-ра хим. Наук. – Воронеж, 2011. – 368 с.

19. Руководство по современной тонкослойной хроматографии / под ред. О.Г. Ларионова. - М.: Химия, 1994. – 311 с.

20. Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. М.: Мир, 1980. – Т.1. – 295 с.

Рудакова Людмила Васильевна - к.х.н., доцент кафедры фармацевтической химии и клинической фармации Воронежской государственной медицинской академии им. Н.Н. Бурденко, Воронеж,

Россихина Елена Юрьевна - слушатель подготовительных курсов Воронежской государственной медицинской академии им. Н.Н. Бурденко, Воронеж

Рудаков Олег Борисович – д.х.н., профессор, заведующий кафедрой физики и химии Воронежского государственного архитектурно-строительного университета, Воронеж

Хорохордина Елена Алексеевна - к.х.н., доцент кафедры физики и химии Воронежского государственного архитектурно-строительного

Rudakova Lyudmila V. - PhD., assistant professor of the chair of pharmaceutical chemistry and clinical pharmacy of Voronezh state medical academy, Voronezh

Rosikhina Elena Yu. - the listener of preliminary courses of Voronezh state medical academy, Voronezh

Rudakov Oleg B. - Dr Sc. Chem., professor Head of physics and chemistry department of the Voronezh State University of Architecture and Civil Engineering, Voronezh

Khorokhordina Elena A. - PhD, assistant professor of the chair of physics and chemistry of the Voronezh State University of Architecture

университета, Воронеж

Чан Хай Данг - аспирант кафедры физики и химии Воронежского государственного архитектурно-строительного университета, Воронеж

and Civil Engineering Voronezh

Chan Hai Dang - the post-graduate student of physics and chemistry department of the Voronezh State University of Architecture and Civil Engineering, Voronezh