

The Study of the Electrochemical Behavior of Triamcinolone Acetonide on the Carbon Paste Electrodes for its Voltammetric Determination

P.M. Zagrzewski^{†*}, K.N. Belikov^{†*}, I.A. Zinchenko[†]

[†] State Scientific Institution "Institute for Single Crystals" of NAS of Ukraine, Nauki ave, 60, Kharkiv, 61001, Ukraine;

^{*} V. N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., Kharkiv, 61022, Ukraine;

*e-mail pavel.voltammetry@meta.ua

Received: July 27, 2018; Accepted: September 26, 2018

DOI: 10.17721/moca.2018.136-140

The electrochemical properties of triamcinolone acetonide on carbon-paste electrodes have been studied. By the cyclic voltammetry method it was revealed that this steroid is irreversibly reduced at a potential from -0.9 to -1.4 V, depending on the solution pH and the potential sweep rate, while an increase in the sweep rate results in a shift of the peak position to more negative potentials. The limiting stage of the process of reducing triamcinolone acetonide on carbon-paste electrodes is diffusion. The calibration graph was linear in the concentration range from 2 to 46 $\mu\text{mol/L}$, the detection limit was 1.5 $\mu\text{mol/L}$. The possibility of using differential pulse voltammetry on carbon-paste electrodes for the determination of the active substance content in ampoules of a suspension of Kenalog 40 was shown.

Keywords: triamcinolone acetonide, triamcinolone, glucocorticosteroid, carbon-paste electrodes, cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry

Изучение электрохимического поведения триамцинолона ацетонида на угольно-пастовых электродах для его вольтамперометрического определения

П.М. Загрэвский^{†*}, К.Н. Беликов^{†*}, И.А. Зинченко[†]

[†] Научно-технологический комплекс "Институт монокристаллов" НАН Украины, просп. Науки, 60, г. Харьков, 61001, Украина;

^{*} Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, площадь Свободы 4, г. Харьков, 61022, Украина

*e-mail pavel.voltammetry@meta.ua

Поступила: 27 июля 2018 г; Принята: 26 сентября 2018 г

DOI: 10.17721/moca.2018.136-140

Исследованы электрохимические свойства триамцинолона ацетонида на угольно-пастовых электродах. Методом циклической вольтамперометрии установлено, что в зависимости от pH раствора и скорости развертки потенциала этот стероид необратимо восстанавливается при потенциале от -0.9 до -1.4 В, при этом увеличение скорости развертки приводит к смещению положения пика к более отрицательным потенциалам. Лимитирующей стадией процесса восстановления триамцинолона ацетонида на угольно-пастовых электродах является диффузия. Градуировочный график был линейным в диапазоне концентраций от 2 до 46 мкмоль/л, предел обнаружения составил 1.5 мкмоль/л. Показана возможность применения дифференциальной импульсной вольтамперометрии на угольно-пастовых электродах для определения содержания действующего вещества в ампулах суспензии препарата Кеналог 40.

Ключевые слова: триамцинолона ацетонид, триамцинолон, глюкокортикостероид, угольно-пастовые электроды, циклическая вольтамперометрия, дифференциальная импульсная вольтамперометрия

Триамцинолона ацетонид (ТА, 9 α -флуоро-11 β ,16 α ,17 α ,21-тетрагидрокси-1,4-прегнадиен-3,20-дион 16,17-ацетонид) представляет собой синтетический фторированный глюко-кортико-стероид, оказывающий противовоспалительное, иммунодепрессивное, противо-аллергическое,

противозудное и противоотечное действие. Терапевтическая активность ТА обуславливает его использование в качестве действующего вещества в составе препаратов различных форм выпуска для системного, наружного и местного применения. ТА рекомендован для лечения аллергических

ринитов, астмы, ревматоидных заболеваний (внутрисуставное введение), а также экземы, псориаза, нейродермита, различных видов дерматитов и некоторых офтальмологических заболеваний. ТА также применяется для лечения различных травм и растяжений, однако запрещен Всемирным антидопинговым агентством. В настоящее время много внимания уделяется фармакокинетическим исследованиям доставки действующего вещества [1-3]. Также проводятся исследования стабильности препаратов на основе ТА [4,5]. В связи с этим разработка простых и быстрых способов определения ТА в различных объектах продолжается.

В основном ТА определяют методами газовой и жидкостной хроматографии с ультрафиолетовыми [6,7] и масс-спектрометрическими детекторами [8,9]. Однако для реализации этих методов часто необходимы не только дорогостоящее оборудование и токсические растворители, но и время на дериватизацию и сложную пробоподготовку [10].

Для определения электроактивных соединений, в частности стероидов, успешно применяются чувствительные, простые и экспрессные электрохимические методы. Среди них особое место занимает вольтамперометрия, все более часто находящая применение для анализа фармацевтических препаратов [11].

Известно о восстановлении ТА на ртутном каплюющем [12] и на стеклоглеродном [13] электродах. Угольно-пастовые электроды, по сравнению с другими электродами для вольтамперометрии, обладают лучшими электрохимическими характеристиками – низкий фоновый ток, широкий рабочий диапазон потенциалов [14]. К тому же, они практичны, просты в изготовлении и имеют легко обновляемую поверхность. Более того, такие электроды предоставляют ряд возможностей по их модификации. Например, введение различных веществ непосредственно в пасту в некоторых случаях позволяет значительно улучшить электрохимические свойства электродов. При этом в настоящее время литературные данные о вольтамперометрии ТА на угольно-пастовых электродах отсутствуют.

Цель работы — исследование электрохимического поведения фторированных глюкокортикостероидов на угольно-пастовых электродах для изучения возможности их вольтамперометрического определения. Исследование проведено на примере известного глюкокортикостероида – триамцинолона ацетонида с иллюстрацией возможности его количественного определения в препарате Кеналог 40.

Экспериментальная часть

Исходный раствор ТА с концентрацией 0.004 моль/л готовили растворением 17.4 мг

субстанции ТА (Farmabios S.p.a, Italia) в 10 мл метанола (ч.д.а.). Для субстанции был снят спектр ^1H ЯМР (DMSO-d_6 , 400 MHz) на спектрометре Varian MR-400, характеристика сигналов: δ 7.24 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H); 6.19 (dd, $J=10.1, 1.8$, 1H); 5.98 (s, 1H); 5.35 (d, $J=4.2$, 1H); 5.08 (t, 1H); 4.87 (d, $J = 3.7$, 1H); 4.44 – 4.53 (m, 1H); 3.95 – 4.20 (m, 2H); 2.69 – 2.25 (m, 5H); 2.02 – 1.47 (m, 5H); 1.45 (s, 3H); 1.28 (s, 3H); 1.03 (s, 3H); 0.77 (s, 3H). Разбавляя исходный раствор ТА буферным раствором непосредственно перед измерениями, готовили рабочие растворы. Использовали универсальные буферные растворы, которые готовили из смеси уксусной, борной и ортофосфорной кислот с концентрацией каждой 0.04 М. Необходимое значение pH буферных растворов достигалось добавлением 0.01 М раствора гидроксида натрия. Все водные растворы были приготовлены с использованием ультрачистой деионизированной воды (удельное сопротивление 18.2 МОм $\times$ см).

Для приготовления угольной пасты для электродов использовали угольный порошок для спектрального анализа (Мега Сиб Груп, Киев, Украина) и связующую жидкость – тритолилфосфат (99%, смесь изомеров, ABCR). Предварительно угольный порошок обрабатывали 30%-м раствором перекиси водорода (Fluka). К навеске угольного порошка массой около 1 г добавляли 10 мл раствора перекиси водорода и после тщательного перемешивания оставляли на 12 ч. Затем отфильтровывали угольный порошок, несколько раз промывали его водой и высушивали при комнатной температуре. Следствием такой обработки становится увеличение количества кислородсодержащих групп на поверхности частиц и ускорение процесса переноса электронов в электрохимических реакциях [15]. Путем тщательного растирания смеси угольного порошка и связующего в соотношении 70:30 по массе, готовили пасту для электродов. Полученной пастой заполняли полиэтиленовую трубку диаметром 3 мм и помещали в нее токосъемник из серебряной проволоки. Поверхность электрода очищали перед каждой серией измерений, выдавливая и срезая из трубки небольшой слой пасты, после чего шлифовали поверхность фильтровальной бумагой.

Измерения выполняли на вольт-амперометрическом анализаторе 797VA-Computrace (Metrohm, Швейцария) с программным обеспечением версии 1.3. Использовалась трехэлектродная ячейка, включающая в себя рабочий угольно-пастовый электрод, хлорсеребряный электрод сравнения и платиновый вспомогательный электрод. Перед выполнением измерений растворы в ячейке в течение 120 с продували азотом.

Для определения содержания ТА в ампулах препарата «Кеналог 40» суспензию из ампулы количественно переносили в мерную колбу

вместимостью 50 мл, вымывая в нее содержимое метанолом, а затем небольшим количеством ультрачистой воды. Объем раствора в колбе доводили до метки метанолом. При помощи микропипетки аликвоту полученного раствора объемом 80 мкл помещали в ячейку, содержащую 10 мл универсального буферного раствора с pH 4. Затем вводили добавки стандартного раствора ТА с концентрацией 4 ммоль/л таким образом, чтобы сигнал после первой добавки примерно удвоился, а общее содержание ТА с учетом последующих добавок не превысило верхнюю границу диапазона линейности. Таким образом, первая добавка была объемом 40 мкл, а две последующие — по 15 мкл.

Для жидкостной хроматографии измерения проводили на хроматографе Shimadzu LC-2030C со спектрофотометрическим детектором, $\lambda = 240$ нм; колонка из нержавеющей стали размером 4.6 мм $\times$ 100 мм, заполненная сорбентом типа Spherisorb ODS 1 с размером частиц 5 мкм; подвижная фаза — вода для хроматографии, ацетонитрил

для хроматографии Р, (объемное соотношение 40:60); скорость потока — 1.0 мл/мин, температура колонки — 40°C; объем пробы — 10 мкл.

Результаты и обсуждение

С использованием циклической вольтамперометрии установлено, что ТА восстанавливается на угольно-пастовых электродах при потенциале около -1.2 В (скорость развертки — 0.04 В/с, pH 4). Отсутствие пика окисления при обратном сканировании (рис. 1а) указывает на то, что процесс восстановления ТА является необратимым. При увеличении скорости развертки положение пика смещается к более отрицательным потенциалам, а его высота растет. При этом угловой коэффициент зависимости логарифма силы тока от логарифма скорости развертки близок к 0.5 (рис. 1б). Следовательно, в соответствии с критерием Семерано, диффузия является лимитирующей стадией процесса восстановления ТА на угольно-пастовых электродах.

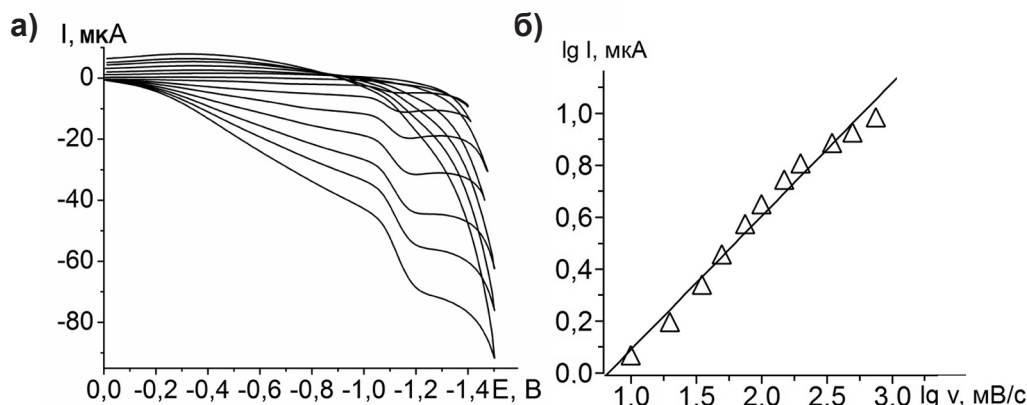


Рис. 1. а) циклические вольтамперограммы восстановления ТА, б) зависимость логарифма высоты пика от логарифма скорости развертки, $\lg I = 0.514 \lg v - 0.427$; $R^2 = 0.981$. $\{c = 5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $v = (0.01 - 0.75)$ В, pH 4.}

Исследование влияния pH в диапазоне от 2 до 9 на характеристики сигнала ТА в циклической вольтамперометрии показало, что при переходе к более щелочной среде высота пика плавно уменьшается (рис. 2а). Это сопровождается все более значительным уширением пика и постепенным его смещением в катодную область, при pH 8 и 9 пик становится плохо различимым. Максимальное значение сигнала достигается при pH 2.

В дифференциальном импульсном режиме изменение характеристик сигнала в зависимости от pH происходило аналогичным образом (рис. 2б). При pH 2 хотя и наблюдалось максимальное значение силы тока, происходило искажение формы пика, вызванное наложением сигнала восстановления фонового электролита. Как показали дальнейшие исследования, линейность концентрационной зависимости сигнала лучше соблюдалась для растворов с pH 4, чем с pH 3. Поэтому, несмотря на то, что более

высокие значения сигнала достигались при pH 2 и 3, в качестве оптимального было выбрано значение pH 4. В режиме дифференциальной импульсной вольтамперометрии ТА максимальное соотношение сигнал/фон достигается при следующих аппаратных параметрах: время и длительность импульса — 0.06 В и 0.05 с соответственно, скорость развертки — 0.04 В/с.

Для увеличения сигнала перед каждым измерением на угольно-пастовый электрод налагался потенциал в 1.5 В. Такое воздействие приводит к удалению продуктов электрохимических реакций с поверхности электрода [16,17] и к образованию на ней кислородсодержащих групп, ускоряющих процесс переноса электрона [15,18]. Применительно к исследованию поведения ТА, предварительное наложение потенциала в 1.5 В в течение 30 с позволило не только увеличить сигнал, но и устранить постепенно увеличивающееся с каждым последующим

измерением искажение формы пика.

При оптимальных условиях и предварительной обработке электрода концентрационная зависимость сигнала модельных растворов была

линейной в диапазоне значений 2-46 мкмоль/л (рис. 2в). При этом предел обнаружения, оцененный по критерию 3σ , составил 1.5 мкмоль/л.

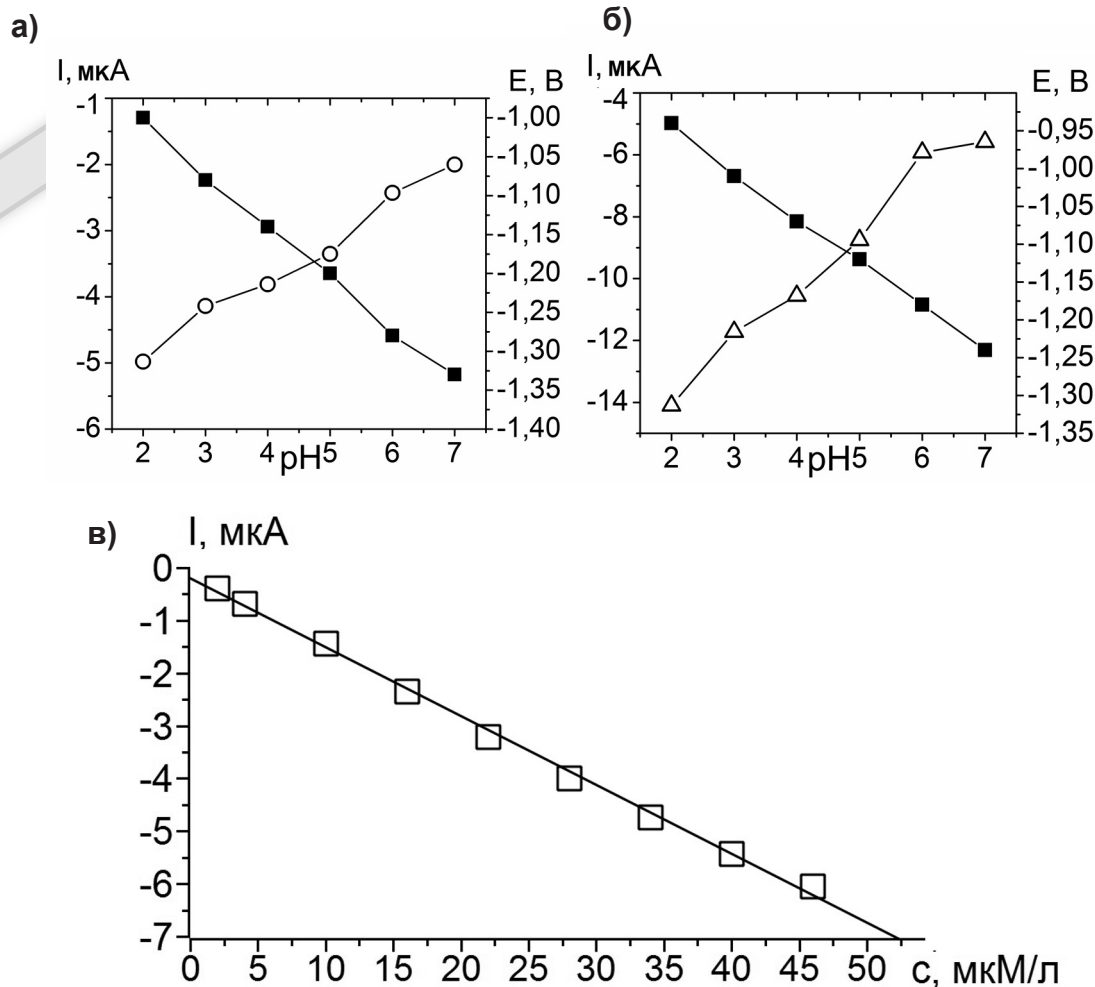


Рис. 2. Зависимости высоты пика и потенциала пика $c(\text{ТА}) = 4 \cdot 10^{-5}$ моль/л от pH в режиме а) циклической, $v = 0.1$ В/с и б) дифференциальной импульсной вольтамперометрии, $v = 0.2$ В/с; в) градуировочная зависимость ТА при оптимальных условиях дифференциальной импульсной вольтамперометрии, $I = -0.131c - 0.201$; $R^2 = 0.998$.

Возможность вольтамперометрического определения ТА в фармацевтических препаратах была проверена путем определения содержания действующего вещества в ампулах препарата «Кеналог 40» производства Крка, д.д, Ново-Место, Словения, с заявленной дозировкой 40 ± 2 мг/мл. Для сравнения результатов использовали независимый метод — жидкостную хроматографию. Результаты определения содержания ТА в препарате «Кеналог 40» представлены в табл. 1.

Сравнение двух дисперсий при помощи критерия Фишера для двух выборок данных, полученных при определении ТА двумя методами, показало их однородность, а сопоставление средних значений показало, что расхождение между ними незначимо.

Таблица 1. Результаты вольтамперометрического и хроматографического определения ТА в препарате «Кеналог 40».

Метод анализа	ДИВАМ*	Жидкостная хроматография
Найденное содержание ТА, мг/ампула ($n=3$; $P=0.95$)	41 ± 2	42.0 ± 0.6
$F_{\text{расч}} = 15.7$ ($F_{\text{крит}} = 19.2$; $f_1=2$, $f_2=2$; $P = 0.95$); $t_{\text{расч}} = 1.82$ ($t_{\text{крит}} = 2.78$; $f = 4$; $P=0.95$)		

* Дифференциальная импульсная вольтамперометрия

Выводы

Установлено, что ТА необратимо восстанавливается на угольно-пастовых электродах. Наложение потенциала в 1.5 В на 30 с перед каждым измерением позволяет увеличить сигнал ТА, а также устранить постепенное искажение его формы. Подобраны оптимальные условия и аппаратные параметры дифференциальной

импульсной вольтамперометрии ТА. Диапазон линейности аналитического сигнала — от 2 до 46 мкмоль/л, предел обнаружения составил 1.5 мкмоль/л. Для определения ТА в препарате Кеналог 40 может успешно применяться дифференциальная импульсная вольтамперометрия на угольно-пастовых электродах.

Литература

1. Raval, N.; Khunt, D.; Misra, M. Microemulsion-Based Delivery of Triamcinolone Acetonide to Posterior Segment of Eye Using Chitosan and Butter Oil as Permeation Enhancer: An in Vitro and in Vivo Investigation. *J. Microencapsulation* 2018, 35 (1), 62–77.
2. Kraisit, P.; Sarisuta, N. Development of Triamcinolone Acetonide-Loaded Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) for Buccal Drug Delivery Using the Box-Behnken Design. *Molecules* 2018, 23 (4), 982.
3. Altamirano-Vallejo, J. C.; Navarro-Partida, J.; Gonzalez-De la Rosa, A.; Hsiao, J. H.; Olguín-Gutiérrez, J. S.; Gonzalez-Villegas, A. C.; Keller, B. C.; Bouzo-Lopez, L.; Santos, A. Characterization and Pharmacokinetics of Triamcinolone Acetonide-Loaded Liposomes Topical Formulations for Vitreoretinal Drug Delivery. *J. Ocular Pharmacol. Ther.* 2018, 34 (5), 416–425.
4. van Heugten, A. J. P.; de Vries, W. S.; Markesteijn, M. M. A.; Pieters, R. J.; Vromans, H. The Role of Excipients in the Stability of Triamcinolone Acetonide in Ointments. *AAPS PharmSciTech* 2018, 19 (3), 1448–1453.
5. van Heugten, A. J. P.; de Boer, W.; de Vries, W. S.; Markesteijn, C. M. A.; Vromans, H. Development and Validation of a Stability-Indicating HPLC-UV Method for the Determination of Triamcinolone Acetonide and Its Degradation Products in an Ointment Formulation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018, 149, 265–270.
6. Pereira, A. D.; Santos, M. C. M.; Costa, V. M. et al. Development and validation of a high performance liquid chromatographic method for determination of triamcinolone acetonide from polyurethane intraocular implants. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2012, 4 (Suppl 4) 132–136
7. Sudsakorn, S.; Kaplan, L.; Williams, D. A. Simultaneous Determination of Triamcinolone Acetonide and Oxymetazoline Hydrochloride in Nasal Spray Formulations by HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 40 (5), 1273–1280.
8. Chu, K. O.; Ho, T. C.; Chiang, W. Y.; Wang, C. C.; Lam, D. S. C.; Pang, C. P. Measuring Triamcinolone Acetonide in Aqueous Humor by Gas Chromatography-Electron-Capture Negative-Ion Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2007, 847 (2), 199–204.
9. Matabosch, X.; Pozo, O. J.; Papaseit, E.; Farré, M.; Marcos, J.; Segura, J.; Ventura, R. Detection and Characterization of Triamcinolone Acetonide Metabolites in Human Urine by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry after Intramuscular Administration. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2014, 28 (16), 1829–1839.
10. Nicoli, R.; Guillaume, D.; Leuenberger, N.; Baume, N.; Robinson, N.; Saugy, M.; Veuthey, J.-L. Analytical Strategies for Doping Control Purposes: Needs, Challenges, and Perspectives. *Anal. Chem.* 2015, 88 (1), 508–523.
11. Dubenska, L. O.; Blazhejevskij, M. Y.; Plotycya, S. I.; Pylypets, M. Y.; Sarahman, O. M. Voltammetric Methods For The Determination Of Pharmaceuticals. *Methods Objects Chem. Anal.* 2017, 12 (2), 61–75. [in Ukr.].
12. Hammam E. Determination of triamcinolone acetonide in pharmaceutical formulation and human serum by adsorptive cathodic stripping voltammetry. *Chem. Anal. (Warsaw)* 2007, 52 (1), 43–53.15.
13. Vedhi, C.; Eswar, R.; Prabu, H. G. et al. Determination of triamcinolone acetonide steroid on glassy carbon electrode by stripping voltammetric methods. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2008, 3 (4), 509–158.
14. Švancara, I.; Vytrás, K.; Kalcher, K.; Walcarius, A.; Wang, J. Carbon Paste Electrodes in Facts, Numbers, and Notes: A Review on the Occasion of the 50-Years Jubilee of Carbon Paste in Electrochemistry and Electroanalysis. *Electroanalysis* 2009, 21 (1), 7–28.
15. Rice, M. E.; Galus, Z.; Adams, R. N. Graphite Paste Electrodes. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 1983, 143 (1–2), 89–102.
16. Zagrzewski P.M.; Belikov K.N. Electrochemical reduction of methandienone at a carbon paste electrode. *Ukr.Chem. J.* 2017, 83 (12), 105–110. [in Russ.].
17. Varchenko V.V.; Belikov K.N. Electrochemical oxidation of tropisetron at a carbon paste electrode. *Ukr.Chem. J.* 2016, 82 (3/4), 35–39. [in Russian].
18. Ravichandran, K.; Baldwin, R. P. Enhanced Voltammetric Response by Electrochemical Pretreatment of Carbon Paste Electrodes. *Anal. Chem.* 1984, 56 (9), 1744–1747.