



Оригинальная статья / Research article

Разработка и валидация методики количественного определения цинка в его хелатных комплексах с использованием энергодисперсионной рентгенофлуоресцентной спектроскопии

А. В. Марухленко*, Т. В. Максимова, Т. В. Плетенева, М. А. Морозова

ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

*Контактное лицо: Марухленко Алла Владимировна. E-mail: alla.marukhlenko@yandex.ru

ORCID: А. В. Марухленко – <https://orcid.org/0000-0003-0174-9489>; Т. В. Максимова – <https://orcid.org/0000-0002-0464-7798>; Т. В. Плетенева – <https://orcid.org/0000-0001-7297-980X>; М. А. Морозова – <https://orcid.org/0000-0003-1586-2183>.

Статья поступила: 21.06.2020

Статья принята в печать: 00.10.2021

Статья опубликована: 25.11.2021

Резюме

Введение. Производство, процесс стандартизации и контроль качества различных БАД, содержащих в составе хелатированный цинк, требуют применения валидированных количественных методик оценки. В настоящей работе предложена методика рентгенофлуоресцентной спектроскопии (РФС) для определения содержания цинка в составе координационных соединений на примере синтезированного хелатного комплекса с метионином.

Цель. Синтезировать хелатный комплекс состава $Zn(Met)_2$, разработать и валидировать методику его количественного анализа с применением метода РФС.

Материалы и методы. Синтезированный хелатный комплекс цинка был исследован методом ИК-спектроскопии. Для разработки методики количественной оценки содержания цинка в синтезированном комплексе был использован метод РФС. В качестве калибровочных стандартов были использованы сухие смеси моногидрата сульфата цинка и L-метионина в молярном соотношении Zn к Met – 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 и 1:16 и водные растворы смеси сульфата цинка и L-метионина в молярном соотношении Zn к Met 1:2 с концентрацией (по цинку) от 0,5 до 100 ммоль/л. В качестве арбитражного метода количественного определения содержания цинка в исследуемых образцах было использовано комплексонометрическое титрование.

Результаты и обсуждение. ИК-спектр хелатного комплекса подтвердил наличие донорно-акцепторной связи между Zn^{2+} и атомом азота аминогруппы метионина. Результаты комплексонометрии показали, что полученные в ходе синтеза хелатные соединения имеют состав, соответствующий стехиометрической формуле $Zn(Met)_2$. Анализ стандартных образцов сухих смесей цинка сульфата моногидрата и метионина методом РФС продемонстрировал наличие матричного эффекта и невозможность использования данной калибровочной модели для точной оценки содержания цинка в хелатном соединении. По данным спектров РФС водных растворов, содержащих цинка сульфат и метионин в соотношении 1:2 при концентрации цинка 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 10; 25; 50 и 100 ммоль/л, построен калибровочный график – зависимость интенсивности сигнала флуоресценции для Ka линии цинка от концентрации цинка в растворе ($r = 0,9996$). Методика оценена по следующим валидационным параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, аналитическая область. Специфичность валидируемой методики доказана в присутствии меди, железа и серебра.

Заключение. Разработанная методика позволяет с достаточной прецизионностью и правильностью определять методом РФС содержание Zn^{2+} в его водных растворах неорганической и органической природы в диапазоне концентраций от 3 до 100 ммоль/л без влияния матрицы.

Ключевые слова: рентгенофлуоресцентный анализ, хелатный комплекс, цинк метионат, определение содержания цинка, валидационные параметры

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. М. А. Морозова, Т. В. Максимова, Т. В. Плетенева придумали и разработали эксперимент. А. В. Марухленко, М. А. Морозова синтезировали образцы и провели качественную и количественную оценку полученных в результате синтеза комплексов метионина цинка. А. В. Марухленко проводила теоретические расчеты и участвовала в обработке данных. А. В. Марухленко, М. А. Морозова участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Марухленко А. В., Максимова Т. В., Плетенева Т. В., Морозова М. А. Разработка и валидация методики количественного определения цинка в его хелатных комплексах с использованием энергодисперсионной рентгенофлуоресцентной спектроскопии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):154–161. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-154-161>

Development and Validation of Method for the Quantitative Determination of Zinc in its Chelate Complexes Using Energy Dispersive X-ray Fluorescence Spectroscopy

Alla V. Marukhlenko*, Tatyana V. Maksimova, Tatyana V. Pleteneva, Mariya A. Morozova

Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

*Corresponding author: Alla V. Marukhlenko. E-mail: alla.marukhlenko@yandex.ru

ORCID: Alla V. Marukhlenko – <https://orcid.org/0000-0003-0174-9489>; Tatyana V. Maksimova – <https://orcid.org/0000-0002-0464-7798>; Tatyana V. Pleteneva – <https://orcid.org/0000-0001-7297-980X>; Mariya A. Morozova – <https://orcid.org/0000-0003-1586-2183>.

Received: 21.06.2020

Revised: 00.10.2021

Published: 25.11.2021

© Марухленко А. В., Максимова Т. В., Плетенева Т. В., Морозова М. А., 2021

© Marukhlenko A. V., Maksimova T. V., Pleteneva T. V., Morozova M. A., 2021

Abstract

Introduction. The production, standardization and quality control process of various dietary supplements containing chelated zinc requires validated quantitative assessment methods. In this work, we propose an X-ray fluorescence spectroscopy (XRF) technique for determining the zinc content in the composition of coordination compounds using the example of a synthesized chelate complex with methionine.

Aim. To synthesize Zn(Met)₂ chelate complex, to develop and validate a method for its quantitative analysis using the XRF method.

Materials and methods. The synthesized zinc chelate complex was investigated by IR spectroscopy. The XRF method was used to develop a method for quantifying the zinc content in the synthesized complex. We used dry mixtures of zinc sulfate monohydrate and L-methionine (Met) in a molar ratio of Zn to Met – 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 and 1:16 and also aqueous solutions of zinc sulfate and L-methionine in a molar ratio of Zn to Met 1:2 with Zn concentrations from 0.5 to 100 mmol/l as calibration standards. Complexometric titration was used as an arbitration method for the quantitative determination of zinc content in the samples under study.

Results and discussion. The IR spectrum of chelate complex confirmed the presence of a donor-acceptor bond between Zn²⁺ and the nitrogen atom of amino group in methionine. The titration results showed chelate compounds have a composition corresponding to the stoichiometric formula Zn(Met)₂. XRF analysis of dry standard mixed samples demonstrated the presence of matrix effect, that makes impossible an accurate assessment of zinc content in the chelate compound. According to the XRF spectra of aqueous solutions containing zinc sulfate and methionine in a ratio of 1:2 at a zinc concentration of 0.5; 1; 2; 3; 4; 5; 10; 25; 50 and 100 mmol/L, a calibration graph was constructed – the dependence of the fluorescence signal intensity for the K α line of zinc on the concentration of zinc in the solution ($r = 0.9996$). The method was evaluated by the following validation parameters: specificity, linearity, correctness, precision, and analytical range. The specificity of the validated method was proven in the presence of copper, iron, and silver.

Conclusion. The developed method make it possible to determine with sufficient precision and correctness the content of Zn²⁺ in its aqueous solutions of inorganic and organic nature by the XRF method in the concentration range from 3 to 100 mmol/l without the influence of the matrix.

Keywords: X-ray fluorescence analysis, chelate complex, zinc methioninate, determination of zinc content, validation parameters

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Mariya A. Morozova, Tatyana V. Maksimova, Tatyana V. Pleteneva planned the experiment in detail. Alla V. Marukhlenko, Mariya A. Morozova synthesized samples and carried out a qualitative and quantitative assessment of the obtained zinc methioninate complexes. Alla V. Marukhlenko performed theoretical calculations, participated in data processing. Alla V. Marukhlenko, Mariya A. Morozova participated in article text writing. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Marukhlenko A. V., Maksimova T. V., Pleteneva T. V., Morozova M. A. Development and validation of method for the quantitative determination of zinc in its chelate complexes using energy dispersive X-ray fluorescence spectroscopy. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4):154–161. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-154-161>

ВВЕДЕНИЕ

Производство, процесс стандартизации и контроль качества различных биологически активных и витаминно-минеральных добавок, содержащих в составе хелатированный цинк, требуют применения валидированных количественных методик оценки. Золотым стандартом элементного неорганического анализа, традиционно применяемого в фармации, считают метод атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (АЭС ИСП) и атомно-абсорбционную спектроскопию (ААС) [1–3]. Трудоемкая и дорогая пробоподготовка – неотъемлемая часть ААС и АЭС – один из факторов, ограничивающих применение этих чувствительных, селективных и точных методов [4]. В соответствии с директивой международной конференции по гармонизации [International Council for Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Guideline for Elemental Impurities Q3D (R1), 2019] энергодисперсионная рентгенофлуоресцентная спектрометрия (РФС) применима для скрининга лекарственных препаратов на наличие примесей тяжелых металлов. Этот простой и экономичный метод анализа является фармакопейным и дает возможность

получения стабильных во времени калибровок для количественного анализа металлсодержащих ЛС и БАД (ГФ XIV, ОФС. 1.2.1.1.0010.15 «Рентгеновская флуоресцентная спектрометрия») [5].

Нами предложена методика РФС для определения содержания цинка в составе координационных соединений на примере синтезированного хелатного комплекса с метионином, установлена аналитическая область методики, проведена оценка таких валидационных параметров, как специфичность, линейность, правильность и прецизионность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В научной периодике представлено достаточно способов синтеза комплексных соединений d-элементов с аминокислотами [6, 7]. В данной работе применили методику, которая характеризуется высоким процентом выхода продукта синтеза. К суспензии метионина (2 моль) в воде прибавляли гидроксид натрия (2 моль), перемешивали в течение 10 минут до полного растворения метионина и нагревали смесь до 60 °С. К гомогенному раствору порциями добавляли моногидрат сульфата цинка (1 моль), выдерживали при перемешивании в течение 20 минут при

температуре 60 °С [6]. Далее реакционную смесь охлаждали до 10 °С, выпавшие кристаллы отфильтровывали и промывали водой до отрицательной реакции фильтрата на сульфаты (по реакции осаждения с хлоридом бария) и свободный метионин (нингидриновая проба). Осадок дополнительно промывали этиловым спиртом и высушивали до постоянной массы при 105 °С в сушильном шкафу Binder RF 53 с принудительной конвекцией (Binder GmbH, Германия) [ГФ XIV, ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании» (способ 1)].

Для синтеза использовали L-метионин (pure, pharma grade, AppliChem, Германия) и моногидрат сульфата цинка (99,0 %, Acros Organics, Испания), качество всех прочих реактивов и растворителей (натрия гидроксид, этанол, вода очищенная) соответствовали фармакопейным стандартам.

Структуру синтезированного комплекса подтвердили при помощи спектрального анализа в ИК-области – ИК-Фурье спектрофотометр Agilent Cary 630 (Agilent Technologies, Inc., США), приставка НПВО с алмазной призмой. Спектральный диапазон – 4000–750 см⁻¹. Разрешение – менее 2 см⁻¹, правильность волнового числа 0,05 см⁻¹, воспроизводимость волнового числа – 0,005 см⁻¹.

Для разработки методики количественной оценки содержания цинка в синтезированном комплексе метионината цинка использовали энергодисперсионный рентгенофлуоресцентный спектрометр EDX-7000 (Shimadzu, Япония): диапазон измеряемых элементов – 11Na – 92U; рентгеновский генератор – трубка с Rh-анодом, воздушное охлаждение; напряжение 4–50 кВ, ток 1–1000 мкА; кремниевый дрейфовый детектор с термоэлектрическим охлаждением, метод подсчета – цифровой счетный фильтр; размер камеры 300 × 275 × 100 мм. Спектр рентгеновской флуоресценции при каждом измерении записывали при одинаковых настройках прибора: майларовая пленка, ширина коллиматора – 10 мм, время экспозиции – 100 с, атмосфера – воздух; количество повторных измерений для одного образца $n = 3$.

В качестве калибровочных стандартов использовали сухие, измельченные до однородного состояния смеси моногидрата сульфата цинка и L-метионина в молярном соотношении Zn к Met – 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 и 1:16. Также набор калибровочных стандартов включал водные растворы смеси сульфата цинка и L-метионина в молярном соотношении Zn к Met 1:2 с концентрацией (по цинку) от 0,5 до 100 ммоль/л. При подготовке сухих калибровочных смесей и водных растворов использовали поверенное лабораторное оборудование – весы аналитические лабораторные Radwag AS 220.X2 (RADWAG, Польша), pH-метр базовый лабораторный PB-11 (Sartorius, Германия).

Арбитражный метод количественного определения содержания цинка в калибровочных стандартах и синтезированном комплексе – комплексонометрическое титрование, выполненное в соответствии с методикой государственной фармакопеи (ГФ XIV, ОФС.1.2.3.0015.15 «Комплексонометрическое тит-

рование»; ГФ XIV, ФС.2.2.0036.18 «Цинка сульфат гептагидрат»).

При оценке специфичности методики анализа в качестве примесных компонентов использовали соли меди, железа и серебра: сульфат меди безводный (Merck, Германия), железа сульфат моногидрат (Sigma-Aldrich, Германия) и нитрат серебра (х.ч., ГОСТ 1277-75).

Для обработки результатов анализа и построения калибровочных моделей использовали ПО Microsoft Office Excel, OriginPro 2017 (OriginLab, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Качественная и количественная оценка полученных в результате синтеза комплексов метионината цинка

По описанной методике был дважды синтезирован метионинат цинка, представляющий собой белое кристаллическое соединение, нерастворимое в воде и этиловом спирте (далее по тексту – Zn(Met)₂ complex 1, Zn(Met)₂ complex 2). Выход продуктов синтеза в среднем составил 70,3 %.

Согласно литературным данным, для комплексов двухвалентных катионов металлов с метионином характерен O, N тип связывания без участия в комплексообразовании метилсульфидной группы [8]. Сравнение полученных ИК-спектров НПВО метионина и Zn(Met)₂ подтверждает предложенное строение (рисунок 1). На ИК-спектре комплекса наблюдаются две полосы координированной аминогруппы (3339, 3252 см⁻¹) с расщеплением между ними $\Delta\nu \approx 87$ см⁻¹, последнее согласуется с представлениями о донорно-акцепторной связи между металлом и атомом азота аминогруппы [9]. На спектре метионината цинка сохраняется полоса колебаний группы CH₃S– при

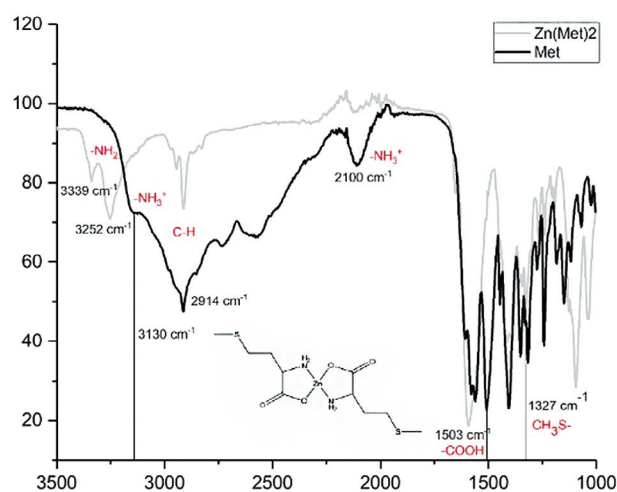


Рисунок 1. ИК-спектры НПВО L-метионина и синтезированного комплекса метионината цинка

Figure 1. ATR-IR spectra of L-methionine and synthesized zinc methioninate complex

1327 см⁻¹, т. е. атом серы не участвует в координации цинка. Отсутствие значимых полос поглощения в области частот выше 3450 см⁻¹ свидетельствует об отсутствии связи O–H, а, следовательно, и об отсутствии молекул как кристаллизационной, так и адсорбированной воды.

Количественный анализ синтезированных комплексов методом трилонометрии после растворения их в аммиачном буферном растворе (рН 11) показал, что содержание цинка составляет 18,23 % по массе в первом комплексе, 17,97 % – во втором. Результаты количественного анализа подтверждают факт, что полученные в ходе синтеза хелатные соединения цинка с метионином имеют состав, соответствующий стехиометрической формуле Zn(Met)₂.

Построение калибровочной модели для оценки содержания цинка методом РФА в его хелатных комплексах без разрушения матрицы (без пробоподготовки)

Государственная фармакопея регламентирует применение РФС в количественном анализе ЛС при условии предварительного установления для матрицы данного состава точной зависимости между интенсивностью линии флуоресценции и концентрацией элемента в стандартном образце (ГФ XIV, ОФС.1.2.1.1.0010.15 «Рентгеновская флуоресцентная спектрометрия»). В соответствии с этими указаниями, калибровочные смеси субстанций моногидрата сульфата цинка и метионина в различных мольных соотношениях были проанализированы методом РФА. Измеряли интенсивность сигнала флуоресценции при 0,1435 нм, что на спектре соответствует Ka линии цинка (8,632 кэВ). В этих же порошках арбитражным методом трилонометрии определили точное содержание металла (%). Проведенные измерения позволили построить калибровочную модель, отражающую линейный характер зависимости между сигналом флуоресценции и количеством цинка в испытуемых образцах (R = 0,9904). С применением модели определили содержание цинка в синтезированных комплексах метионината цинка – Zn(Met)₂ complex 1, Zn(Met)₂ complex 2. Однако полученный результат оказался завышенным, найденные по графику значения содержания цинка в комплексах отличались от действительных в среднем на 37 %.

Очевидно, что координация атома цинка двумя молекулами метионина за счет образования связей Zn–O и Zn–N приводит к значительным, непропорциональным содержанию металла, изменениям сигнала рентгеновской флуоресценции (рисунок 2). Наблюдаемый матричный эффект не позволяет без дополнительной коррекции использовать для точной оценки содержания цинка в хелатном соединении калибровочную модель, построенную с использованием стандартных образцов смеси цинка сульфата моногидрата и метионина [10]. Основные концепции математической коррекции матричных эф-

фектов в рентгенофлуоресцентном анализе широко описаны в научной литературе, однако отличаются сложностью [11]. С другой стороны, влияние матричного эффекта может быть нивелировано при помощи соответствующей пробоподготовки. В соответствии с указаниями государственной фармакопеи, для уменьшения эффектов поглощения и возбуждения, искривляющих калибровочные графики, анализируемую пробу разбавляют прозрачным для рентгеновских лучей веществом, в том числе водой.

Построение калибровочной модели для определения методом РФС содержания цинка в водных растворах его хелатных комплексов

Подготовленные водные растворы, содержащие цинка сульфат и метионин в соотношении 1:2 при концентрации цинка 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 10; 25; 50 и 100 ммоль/л, были исследованы методом РФС. По данным спектров рентгеновской флуоресценции и полученным результатам комплексонометрии этих же растворов вновь построили калибровочный график – зависимость интенсивности сигнала флуоресценции для Ka линии цинка от концентрации цинка в растворе, коэффициент корреляции 0,9996 (рисунок 3).

Полученная калибровочная модель легла в основу спектральной методики количественного определения цинка в водных растворах его хелатных комплексов, в частности метионината цинка, и была оценена по следующим валидационным параметрам: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность и прецизионность (ГФ XIV, ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик»).

- 1. Специфичность.** Оценка специфичности определяли по разрешению сигнала характерной рентгеновской флуоресценции цинка от сигналов других элементов – железа, серебра и меди, а также по стабильности уровня сигнала цинка. (ГФ XIV, ОФС.1.2.1.1.0010.15 «Рентгеновская флуоресцентная спектрометрия»). К исходному раствору, содержащему цинка сульфат и метионин в соотношении 1:2 с концентрацией цинка 25 ммоль/л, добавили модельную примесную смесь – раствор, содержащий сульфат меди, нитрат серебра и сульфат железа(III), концентрация каждого из металлов 25 ммоль/л. После чего записали спектр рентгеновской флуоресценции исходного раствора и раствора с добавленными примесями. Линии характеристической флуоресценции добавленных элементов (Ag – 22,105 кэВ, Fe – 6,400 кэВ, Cu – 8,042 кэВ) не перекрывают линии цинка, интенсивность сигнала флуоресценции цинка сохраняется на том же уровне, как и в отсутствии примесных элементов (рисунок 4).
- 2. Аналитическая область и линейность.** Согласно ГФ, аналитическая область методики должна быть применима в интервале от 80 до 120 % от

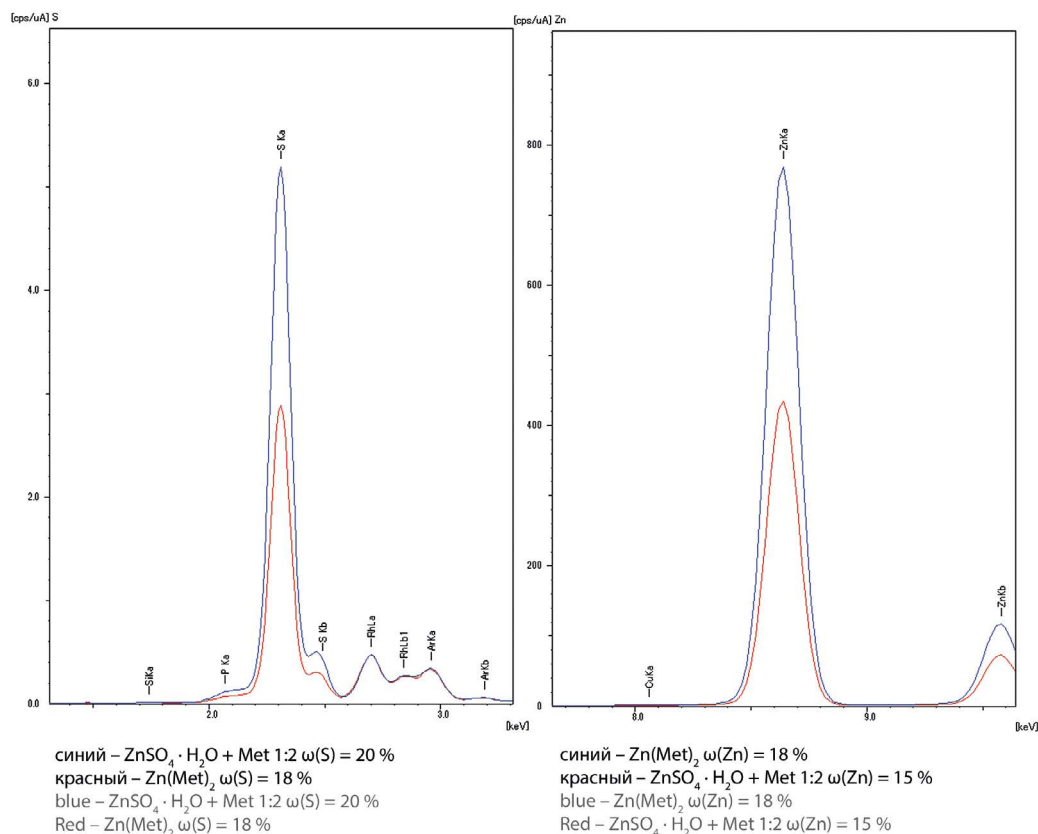


Рисунок 2. Иллюстрация матричного эффекта – усиление флуоресценции при координации атома цинка в составе хелатной структуры – спектр рентгеновской флуоресценции образца метионината цинка и смеси цинка сульфата моногидрата с метионином в молярном соотношении 1:2; слева – линия Ка серы – 2,308 кэВ; справа – линия Ка цинка – 8,632 кэВ

Figure 2. Illustration of the matrix effect – enhancement of fluorescence upon coordination of the zinc atom in the chelate structure – X-ray fluorescence spectrum of a sample of zinc methioninate and a mixture of zinc sulfate monohydrate with methionine in a molar ratio of 1:2; on the left – sulfur Ka line – 2,308 keV; on the right – zinc Ka line – 8,632 keV

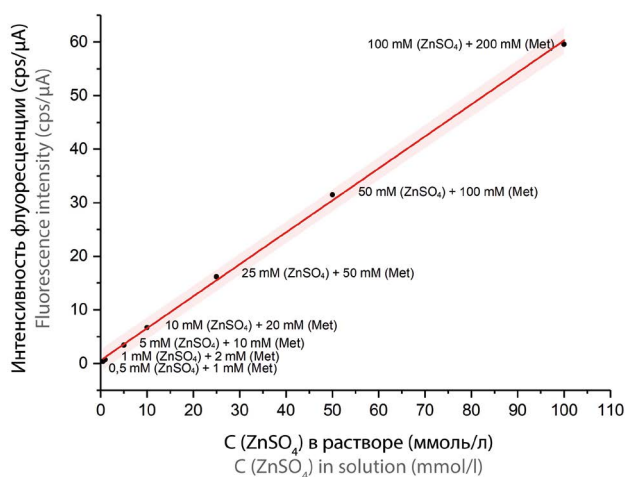


Рисунок 3. Зависимость интенсивности сигнала флуоресценции (Zn Ka) от концентрации цинка в водных растворах, содержащих сульфат цинка и метионин в соотношении 1:2, концентрация цинка от 0,5 до 100 ммоль/л (розовая область – 95 % прогнозируемый интервал линейной зависимости)

Figure 3. Dependence of the intensity of the fluorescence signal (Zn Ka) on the concentration of zinc in aqueous solutions containing zinc sulfate and methionine in a ratio of 1:2, the concentration of zinc from 0,5 to 100 mmol/l (pink area – 95 % prediction interval of linear dependence)

номинального значения определяемой аналитической характеристики (ГФ XIV, ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик»). Однако представленная ранее калибровочная модель (см. рисунок 3) охватывает очень широкий концентрационный диапазон (0,5–100 ммоль/л Zn), не соответствующий установленным требованиям. В указанном интервале концентраций были выделены 3 фрагмента (1–5; 5–25 и 25–100 ммоль/л Zn), каждый из которых рассматривали как отдельную калибровочную модель со своими валидационными параметрами линейности, правильности и прецизионности.

Аналитическую область оценивали для каждого из трех диапазонов концентраций по результатам измерений ($n = 3$) крайних значений и дальнейшему сравнению соответственно рассчитанных дисперсий. Для всех трех калибровочных моделей рассчитанное значение критерия Фишера оказалось меньше табличного ($F_{\text{табл.}} = 99$), что позволило сделать вывод об однородности дисперсий результатов измерений при низкой и высокой концентрации каждого из диапазонов и, следовательно, подтвердить выполнение параметра «аналитическая область» (таблица 1).

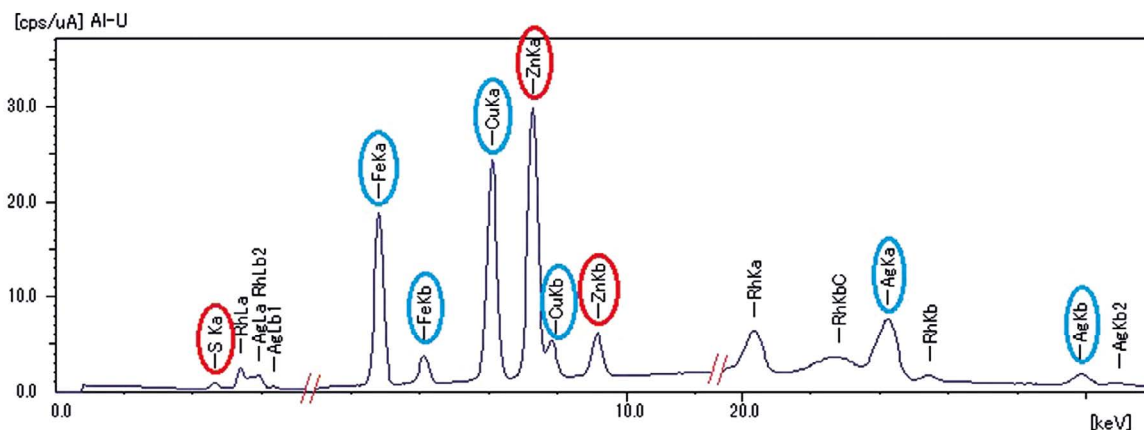


Рисунок 4. Спектр рентгеновской флуоресценции водного раствора, содержащего 25 ммоль/л сульфата цинка и 50 ммоль/л метионина, с добавлением примесей – 25 ммоль/л AgNO_3 , 25 ммоль/л CuSO_4 и 25 ммоль/л $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Figure 4. X-ray fluorescence spectrum of an aqueous solution containing 25 mmol/l zinc sulfate and 50 mmol/l methionine, with the addition of impurities – 25 mmol/l AgNO_3 , 25 mmol/l CuSO_4 and 25 mmol/l $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Для построенных калибровочных моделей было рассчитано уравнение линейной зависимости вида $y = b \cdot x + a$ и определен коэффициент корреляции (R). Характеристика «линейность» выполняется для всех трех аналитических областей предложенной методики (см. таблица 1).

Таблица 1. Результаты оценки параметров «аналитическая область» и «линейность» для методики РФА для количественного определения цинка в водных растворах его хелатных комплексов

Table 1. Results of evaluating the parameters "analytical area" and "linearity" for the XRF method for the quantitative determination of zinc in aqueous solutions of its chelate complexes

Калибровочная модель Calibration model	Аналитическая область, ммоль/л Zn Analytical area, mmol/l Zn	$F_{\text{расч}}$ ($P = 0,99; f_1 \text{ и } f_2 = 2$) $F_{\text{факт}}$ ($P = 0,99; f_1 \text{ и } f_2 = 2$)	R	b	a^*
1	1–5	40,95	0,9999	0,6992	-0,069
2	5–25	9,08	1	0,6781	-0,187
3	25–100	47,69	0,9999	0,6038	1,121

Примечание. * Тест с использованием критерия Стьюдента показал статистическую незначимость свободного члена регрессионного уравнения ($P = 0,95$ и $f = 8$), таким образом в трех концентрационных диапазонах методика дает результаты, свободные от систематической ошибки.

3. **Правильность** методики оценивали, применяя арбитражный метод комплексонометрического титрования. Исследовали водные растворы, содержащие сульфат цинка и метионин в соотношении 1:2 на нескольких уровнях концентраций – нижний (1 и 3 ммоль/л), средний (5 и 25 ммоль/л) и верхний (100 ммоль/л). В трех повторах были

записаны спектры рентгеновской флуоресценции, а затем проведено титрование. Результаты представлены в таблице 2. Ошибка определения превысила критическое значение в 3 % на самом нижнем аналитическом уровне – при концентрации цинка 1 ммоль/л.

Таблица 2. Результаты оценки правильности методики РФА для количественного определения цинка в водных растворах его хелатных комплексов

Table 2. Results of evaluating the correctness of the XRF method for the quantitative determination of zinc in aqueous solutions of its chelate complexes

Содержание цинка, ммоль/л Zinc content, mmol/l	C(ZnSO_4), ммоль/л C(ZnSO_4), mmol/l		Отклонение от действительного значения, % Measurement error, %
	Трилометрия Chelatometry	РФА XRF	
1	1,06	0,98	6,90
	1,04	1,01	3,25
	1,08	1,01	6,25
3	3,00	2,97	1,07
	3,02	3,00	0,62
	3,02	2,99	0,94
5	5,12	5,08	0,77
	5,04	5,08	0,82
	5,04	5,02	0,39
25	25,30	25,06	0,96
	25,00	24,89	0,44
	25,60	25,10	1,96
100	102,70	101,83	0,84
	103,30	102,55	0,73
	102,30	100,34	1,92
Среднее значение отклонения от действительного значения, % Mean measurement error, %			1,86

4. **Прецизионность (сходимость и внутрилабораторная прецизионность)** методики РФА оценивали по результатам трех определений водных растворов, содержащих сульфат цинка и метионин в соотношении 1:2, для каждого из трех уровней определяемых концентраций (нижнего, среднего и верхнего), лежащих в пределах данной аналитической области.

Сходимость (повторяемость) результатов оценивали по данным, полученным в одинаковых условиях в пределах короткого промежутка времени: один и тот же исполнитель, одна и та же кювета, один и тот же исследуемый раствор. Сходимость результатов аналитической методики представлена на рисунке 5. Относительное стандартное отклонение (RSD) результатов измерений для всех концентраций растворов составило не более 2 %. На графике продемонстрировано, что с увеличением концентрации раствора величина RSD снижается и достигает предельного постоянного значения. Первая точка на графике соответствует концентрации цинка в растворе 0,1 ммоль/л, значение RSD для нее превышает критическое значение в 2 % и составляет 2,48 %.

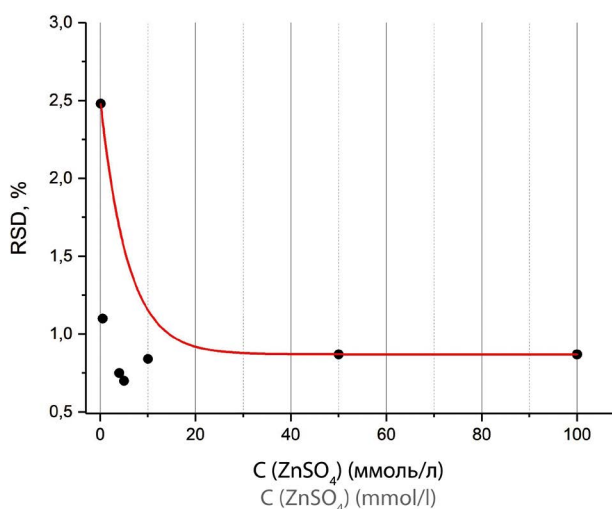


Рисунок 5. Зависимость величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) от концентрации Zn в растворе (оценка сходимости)

Figure 5. Dependence of the value of the relative standard deviation (RSD, %) on the concentration of Zn in solution (convergence assessment)

Промежуточную (внутрилабораторную) прецизионность оценивали по результатам, полученным в разные дни, разными исполнителями при использовании разных кювет. Результаты оценки внутрилабораторной прецизионности методики представлены в таблице 3.

Таким образом, в ходе проведенного исследования было показано, что валидационные характеристики разработанной методики РФА для количест-

венного определения цинка в водных растворах его хелатных комплексов выполняются и соответствуют нормативным требованиям. Методика дает правильные воспроизводимые результаты в концентрационном диапазоне содержания цинка от 3 до 100 ммоль/л.

Таблица 3. Результаты внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности методики РФА для количественного определения цинка в водных растворах его хелатных комплексов

Table 3. Results of the intralaboratory (intermediate) precision of the XRF method for the quantitative determination of zinc in aqueous solutions of its chelate complexes

C(ZnSO ₄), ммоль/л C(ZnSO ₄), mmol/l	Относительное стандартное отклонение (RSD), % Relative standard deviation (RSD), %
0,5	3,26
1	1,51
5	1,46
10	1,76
25	0,54
50	1,74
100	1,34

Функциональность созданной РФА методики количественного определения цинка проверили на примере водного раствора синтезированного метионината цинка (Zn(Met)₂ complex 2) с известной концентрацией металла – 50 ммоль/л. Для растворения комплекса использовали аммиачный буферный раствор (pH = 11). Далее записали спектр рентгеновской флуоресценции полученного раствора. По значению интенсивности флуоресценции для линии цинка с использованием калибровочной модели в диапазоне концентраций от 25 до 100 ммоль/л установили концентрацию металла в растворе (рисунок 6).

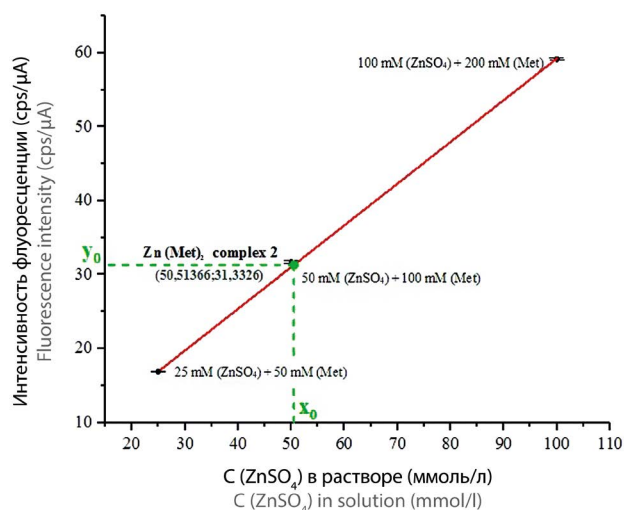


Рисунок 6. Определение концентрации цинка в растворе Zn(Met)₂ complex 2 по калибровочной модели в диапазоне концентраций от 25 до 100 ммоль/л Zn

Figure 6. Determination of zinc concentration in solution of Zn(Met)₂ complex 2 using a calibration model in the concentration range from 25 to 100 mmol/l of Zn

Концентрация цинка в водном растворе $Zn(Met)_2$ complex 2, определенная по калибровочной модели, составила 50,51 ммоль/л, ошибка определения – 1,02 %. Полученные результаты подтверждают отсутствие матричного эффекта и, следовательно, функциональность разработанной методики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная методика позволяет с достаточной правильностью и прецизионностью определять методом РФС содержание Zn^{2+} в его водных растворах неорганической и органической природы в диапазоне концентраций от 3 до 100 ммоль/л.

ЛИТЕРАТУРА

- Li G., Schoneker D., Ulman K. L., Sturm J. J., Thackery L. M., Kaufman J. F. Elemental Impurities in Pharmaceutical Excipients. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;104(12):4197–4206. DOI: 10.1002/jps.24650.
- Neubauer K., Hineman A. Meeting the USP and Guidelines with ICP-OES. *Spectroscopy*. 2018;33(9):8–15.
- Hineman A. Determination of Elemental Impurities in Antacids by ICP-MS According to the Validation Protocols Defined in USP Chapters and and ICH Q3D Step 4 Guidelines. *Spectroscopy*. 2017;32(7):36–40.
- Klopper R. Microwave Digestion for Elemental Impurities Analysis According to ICH and USP Guidelines. *Spectroscopy*. 2017;32(1):44–49.
- Furukawa H., Davis D. Using XRF as an Alternative Technique to Plasma Spectrochemistry for the New USP and ICH Directives on Elemental Impurities in Pharmaceutical Materials. *Spectroscopy*. 2017;32(7):12–17.
- Кадырова Р. Г., Кабиров Г. Ф., Муллахметов Р. Р. Синтез медных и цинковых солей метионина и глицина. *Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана*. 2013;1(213):109–115.
- Кадырова Р. Г., Кабиров Г. Ф., Муллахметов Р. Р. Синтез и свойства комплексных солей биогенных кислот макро- и микроэлементов. Казань: Казан. гос. энерг. ун-т; 2016. 115 с.
- Головнев Н. Н., Новикова Г. В., Васильев А. Д., Исакова Т. В., Ронжина Е. А. Синтез соединений d-элементов с аминокислотами. *Вестник Красноярского государственного университета. Естественные науки*. 2006;2:38–44.
- Mamun M. A., Ahmed O., Bakshi P. K., Ehsan M. Q. Synthesis and spectroscopic, magnetic and cyclic voltammetric characterization of some metal complexes of methionine: $[(C_5H_{10}NO_2S)_2MII]$; $MII=Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II)$ and $Hg(II)$. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2010;14(1):23–31. DOI: 10.1016/j.jscs.2009.12.005.
- Rousseau R. M. Concept of the influence coefficient. *The Rigaku Journal*. 2001;18(1):8–21.
- Rousseau R. M. Corrections for matrix effects in X-ray fluorescence analysis—A tutorial. *Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy*. 2006;61(7):759–777. DOI: 10.1016/j.sab.2006.06.014.

REFERENCES

- Li G., Schoneker D., Ulman K. L., Sturm J. J., Thackery L. M., Kaufman J. F. Elemental Impurities in Pharmaceutical Excipients. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;104(12):4197–4206. DOI: 10.1002/jps.24650.
- Neubauer K., Hineman A. Meeting the USP and Guidelines with ICP-OES. *Spectroscopy*. 2018;33(9):8–15.
- Hineman A. Determination of Elemental Impurities in Antacids by ICP-MS According to the Validation Protocols Defined in USP Chapters and and ICH Q3D Step 4 Guidelines. *Spectroscopy*. 2017;32(7):36–40.

- Klopper R. Microwave Digestion for Elemental Impurities Analysis According to ICH and USP Guidelines. *Spectroscopy*. 2017;32(1):44–49.
- Furukawa H., Davis D. Using XRF as an Alternative Technique to Plasma Spectrochemistry for the New USP and ICH Directives on Elemental Impurities in Pharmaceutical Materials. *Spectroscopy*. 2017;32(7):12–17.
- Kadyrova R. G., Kabirov G. F., Mullakhmetov R. R. *Sintez mednykh i tsinkovykh soley metionina i glitsina* [Synthesis of copper and zinc salts of methionine and glycine]. *Uchenye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny im. N. E. Baumana*. 2013;1(213):109–115. (In Russ.)
- Kadyrova R. G., Kabirov G. F., Mullakhmetov R. R. *Sintez i svoystva kompleksnykh soley biogennykh kislot makro- i mikroelementov* [Synthesis and properties of complex salts of biogenic acids of macro- and microelements]. Kazan: Kazanskiy gosudarstvennyy energeticheskiy universitet; 2016. 115 p. (In Russ.)
- Golovnev N. N., Novikova G. V., Vasil'ev A. D., Isakova T. V., Ronzhina E. A. *Sintez soedineniy d-elementov s aminokislottami* [Synthesis of d-element compounds with amino acids]. *Vestnik Krasnoyarskogo gosudarstvennogo universiteta. Estestvennye nauki*. 2006;2:38–44. (In Russ.)
- Mamun M. A., Ahmed O., Bakshi P. K., Ehsan M. Q. Synthesis and spectroscopic, magnetic and cyclic voltammetric characterization of some metal complexes of methionine: $[(C_5H_{10}NO_2S)_2MII]$; $MII=Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II)$ and $Hg(II)$. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2010;14(1):23–31. DOI: 10.1016/j.jscs.2009.12.005.
- Rousseau R. M. Concept of the influence coefficient. *The Rigaku Journal*. 2001;18(1):8–21.
- Rousseau R. M. Corrections for matrix effects in X-ray fluorescence analysis—A tutorial. *Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy*. 2006;61(7):759–777. DOI: 10.1016/j.sab.2006.06.014.