

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1530>
УДК 543.423.3



Оригинальная статья / Research article

Оптимизация способа спектрофлуориметрического определения примеси алюминия в субстанциях

Е. В. Вишняков¹✉, А. А. Толстикова¹, Ю. Э. Генералова¹, А. К. Калдыбаева²,
И. И. Тернинко¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

² Казахский национальный медицинский университет имени С. Д. Асфендиярова (КазНМУ). 050000, Республика Казахстан, г. Алматы, ул. Толе Би, д. 88, к. 4

✉ Контактное лицо: Вишняков Евгений Владимирович. E-mail: evgeniy.vishnyakov@pharminnotech.com

ORCID: Е. В. Вишняков – <https://orcid.org/0000-0002-4716-7866>; А. А. Толстикова – <http://orcid.org/0009-0007-6400-9951>;
Ю. Э. Генералова – <http://orcid.org/0000-0002-2573-6036>; А. К. Калдыбаева – <https://orcid.org/0000-0002-9328-457X>;
И. И. Тернинко – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>.

Статья поступила: 21.08.2023

Статья принята в печать: 25.12.2023

Статья опубликована: 09.01.2024

Резюме

Введение. Оценка содержания примесей является важнейшим этапом в подтверждении безопасности и эффективности при контроле качества лекарственного средства. Алюминий, являясь допустимой примесью в ряде фармацевтических субстанций, способен пагубно воздействовать на организм человека, вследствие чего его содержание нормируется. Примесь алюминия в Государственной фармакопее РФ XV определяется спектрофлуориметрическим методом с применением лиганда – 8-гидроксихинолина в хлороформе. В настоящей работе предлагается заменить 8-гидроксихинолин на более доступный рутин, который также образует с металлами флуоресцирующие комплексы. Данный подход предполагает исключение из пробоподготовки этапа экстракции комплекса алюминия в хлороформ, что способствует повышению точности методики, а замена хлороформа положительным образом сказывается на безопасности.

Цель. Создание альтернативного метода спектрофлуориметрического определения примеси алюминия с помощью рутина на примере субстанции калия хлорид.

Материалы и методы. В качестве материалов исследования использовали следующие субстанции и реактивы: ГСО алюминий-иона, 1 мг/мл (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия); ГСО железо-иона (II), 1 мг/мл (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия); ГСО цинк-иона, 1 мг/мл (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия); ГСО свинец-иона, 1 мг/мл (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия); ГСО никель-иона, 1 мг/мл (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия); ГСО медь-иона, 1 мг/мл (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия); стандарт катиона хрома (III), 1 мг/мл (имп., Sigma-Aldrich, США); рутин (имп., Sichuan Guangsong Pharmaceutical Co., Ltd., Китай); аммоний уксуснокислый (имп., Molekula GmbH, Германия), уксусная кислота ледяная (х. ч., АО «База № 1 Химреактивов», Россия); калия хлорид (ФС, ООО «МЗХР», Россия). Спектрофлуориметрическое исследование проводилось на приборе FL 6500 (PerkinElmer Inc., США). Содержание примеси алюминия также оценивалось с использованием атомно-эмиссионного спектрометра с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП) Optima 8000 (PerkinElmer Inc., США) и стандартного образца Multi-Element Solution (PerkinElmer Inc., США).

Результаты и обсуждение. Подход, приведенный в статье, исключает использование 8-гидроксихинолина в хлороформе и заменяет его на рутин в 70%-м спирте этиловом. Комплекс алюминия с рутином имеет длину волны возбуждения при 445 нм и длину волны эмиссии при 565 нм. Предложенная методика была апробирована на субстанции калия хлорид для оценки показателя «Алюминий», содержание которого не должно превышать 0,0001 %. Валидация методики осуществлялась по трем параметрам: «специфичность», «линейность» и «предел обнаружения» (ОФС.1.1.0012). Сопоставление полученных данных проводилось с применением атомно-эмиссионной спектроскопии, в ходе которой была доказана релевантность методики.

Заключение. Разработан эргономичный способ спектрофлуориметрического определения примеси алюминия с помощью рутина с апробацией на субстанции калия хлорид. Результаты, полученные в ходе эксперимента, были подтверждены методом АЭС-ИСП.

Ключевые слова: спектрофлуориметрия, рутин, алюминий, примеси, валидация, атомно-эмиссионная спектрометрия

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

Вклад авторов. И. И. Тернинко принадлежит идея и дизайн эксперимента. Е. В. Вишняков и И. И. Тернинко координировали все этапы эксперимента. А. А. Толстикова, Е. В. Вишняков провели спектрофлуориметрическое исследование и валидацию методики по определению допустимой примеси алюминия в субстанции «калия хлорид». Ю. Э. Генералова провела оценку содержания примеси алюминия в субстанции «калия хлорид» методом атомно-эмиссионной спектрометрии. А. К. Калдыбаева, Е. В. Вишняков осуществляли поиск научной литературы. Все авторы участвовали в написании текста статьи и в обсуждении результатов.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр» ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Вишняков Е. В., Толстикова А. А., Генералова Ю. Э., Калдыбаева А. К., Тернинко И. И. Оптимизация способа спектрофлуориметрического определения примеси алюминия в субстанциях. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):18–25. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1530>

Optimization of the Method for Spectrofluorimetric Determination of Aluminum Impurities in Substances

Evgeniy V. Vishnyakov¹✉, Alexandra A. Tolstikova¹, Julia E. Generalova¹,
Aigul K. Kaldybaeva², Inna I. Terninko¹

¹ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

² Asfendiyarov Kazakh National Medical University. 88/4, Tole Bi str., Almaty, 050000, Republic of Kazakhstan

✉ Corresponding author: Evgeniy V. Vishnyakov. E-mail: evgeniy.vishnyakov@pharminnotech.com

ORCID: Evgeniy V. Vishnyakov – <https://orcid.org/0000-0002-4716-7866>; Alexandra A. Tolstikova – <http://orcid.org/0009-0007-6400-9951>;

Julia E. Generalova – <http://orcid.org/0000-0002-2573-6036>; Aigul K. Kaldybaeva – <https://orcid.org/0000-0002-9328-457X>;

Inna I. Terninko – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>.

Received: 21.08.2023

Revised: 25.12.2023

Published: 09.01.2024

Abstract

Introduction. Evaluation of the content of impurities is the most important step in confirming the safety and efficacy in the quality control of the medicinal product. Aluminum, being an acceptable impurity in a number of pharmaceutical substances, can adversely affect the human body, as a result of which its content is normalized. The admixture of aluminum in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation XV is determined by the spectrofluorimetric method using the ligand – 8-hydroxyquinoline in chloroform. In the present work, it is proposed to replace 8-hydroxyquinoline with the more accessible rutin, which also forms fluorescent complexes with metals. This approach involves the exclusion of the stage of extraction of the aluminum complex into chloroform from sample preparation, which improves the accuracy of the technique, and the replacement of chloroform has a positive effect on safety.

Aim. To create an alternative approach for the spectrofluorimetric determination of aluminum impurities using rutin and "potassium chloride" as an active pharmaceutical ingredient.

Materials and methods. The following substances and reagents were used as research materials: CRS of aluminum ion 1 mg/ml (LLC "EKROSHIM", Russia), CRS of iron ion (II) 1 mg/ml (LLC "EKROSHIM", Russia), CRS of zinc ion 1 mg/ml (LLC "EKROSHIM", Russia), CRS of lead-ion 1 mg/ml (LLC "EKROSHIM", Russia), CRS nickel-ion 1 mg/ml (LLC "EKROSHIM", Russia), CRS copper-ion 1 mg/ml (LLC "EKROSHIM", Russia), chromium (III) cation standard 1 mg/ml (imp., Sigma-Aldrich, USA) rutin (imp., Sichuan Guangsong Pharmaceutical Co., Ltd., China), ammonium acetic acid (imp., Molekula GmbH, Germany), glacial acetic acid (chemically pure, JSC "Base No. 1 Himreaktivov", Russia), potassium chloride (pharmaceutical substance, LLC "MZHR", Russia). The spectrofluorimetric study was carried out on an FL 6500 instrument (PerkinElmer Inc., USA). The aluminum impurity content was also evaluated using an Optima 8000 inductively coupled plasma atomic emission spectrometer (ICP AES) (PerkinElmer Inc., USA) and a Multi-Element Solution standard sample (PerkinElmer Inc., USA).

Results and discussion. The approach given in the article eliminates the use of 8-hydroxyquinoline in chloroform and replaces it with rutin in 70 % ethyl alcohol. The aluminum-rutin complex has an excitation wavelength at 445 nm and an emission wavelength at 565 nm. The proposed method was tested on the substance "Potassium chloride" to assess the indicator "Aluminum", the content of which should not exceed 0.0001 %. Method validation was carried out according to three parameters "Specificity", "Linearity" and "Limit of detection". Comparison of the data obtained was carried out using atomic emission spectroscopy, during which the relevance of the technique was proved.

Conclusion. An ergonomic approach has been developed for the spectrofluorimetric determination of aluminum impurities using rutin with approbation on the substance "Potassium chloride". The results obtained during the experiment were confirmed by the ICP AES method.

Keywords: spectrofluorimetry, rutin, aluminum, impurities, validation, atomic emission spectrometry

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. Inna I. Terninko owns the idea and design of the experiment. Evgeniy V. Vishnyakov and Inna I. Terninko coordinated all stages of the experiment. Alexandra A. Tolstikova, Evgeniy V. Vishnyakov conducted a spectrofluorimetric study and validation of the methodology for determining the permissible admixture of aluminum in the substance "potassium chloride". Julia E. Generalova assessed the content of aluminum impurities in the substance "potassium chloride" by atomic emission spectrometry. Aigul K. Kaldybaeva, Evgeniy V. Vishnyakov carried out a search for scientific literature. All authors participated in writing the text of the article and in discussing the results.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center" of the Federal State. Budgetary Educational University of Higher Education SPCPU of the Ministry of Health of Russia in the framework of agreement № 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Vishnyakov E. V., Tolstikova A. A., Generalova J. E., Kaldybaeva A. K., Terninko I. I. Optimization of the method for spectrofluorimetric determination of aluminum impurities in substances. *Drug development & registration*. 2024;13(1):18–25. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1530>

ВВЕДЕНИЕ

Вопросы стандартизации и контроля качества продолжают оставаться актуальным направлением фармацевтического анализа, так как являются основным способом оценки безопасности и эффектив-

ности лекарственного средства (ЛС) [1, 2]. Одним из основных элементов качества ЛС являются примеси, к оценке которых предъявляются строгие требования и реализуются новые регуляторные решения. Так, решение Коллегии ЕЭК от 4.10.2022 № 138 «Об

утверждении Требований к проведению исследований (испытаний) лекарственных средств в части оценки и контроля содержания примесей»¹ содержит четкую алгоритмизацию действий при составлении спецификаций на новые и воспроизведенные лекарственные средства при определении примесей.

Примеси металлов на сегодняшний момент находятся в фокусе внимания специалистов аналитического сектора ввиду неоднозначных (полуколичественных) способов оценки, рекомендованных фармакопеей, а также ввиду возможного токсического действия на организм человека [3–5]. При этом вышеуказанный регуляторный документ выделяет примеси элементов в отдельную категорию и приводит их четкую классификацию в ЛС и подходы к оценке «польза – риск». Алюминий – металл, который относится к низкотоксичным элементам, поэтому для его примеси не установлен класс токсичности и не рассчитано допустимое суточное воздействие. Однако при контроле качества лекарственных препаратов, которые применяются для коррекции нарушения функции почек (например, «Вода для гемодиализа»), оценка содержания алюминия необходима. Кроме того, алюминий – экзогенный фактор развития анемии, рахита, а также болезни Альцгеймера [6].

В литературных источниках представлено большое количество методик, основанных на различных аналитических методах, которые позволяют определять примесь алюминия в ЛС и пищевых продуктах. Стоит отметить, что оценка элементных примесей исходя из требований руководства ICH Q3 должна осуществляться в первую очередь инструментальными методами. Например, примесь алюминия можно определять атомно-абсорбционной спектроскопией (ААС), атомно-эмиссионной спектроскопией (АЭС) с различными вариантами атомизации и детекции (спектрофотометрический, масс-селективный детекторы), рентгенофлуоресцентным анализом, спектрофлуориметрией и др. [7–9].

В литературе [10–12] представлены хроматографические методики обнаружения примеси алюминия с применением ион-парной хроматографии с детектором светорассеяния или со спектрофлуориметрическим детектором. В качестве лиганда рекомендованы алюминон, 8-гидроксихинолин. В работе [10] оценку содержания примесей алюминия в сточных водах проводили с применением обращенно-фазовой хроматографии с УФ-детектором. В качестве лиганда использовали кверцетин – агликон рутина.

Метод потенциометрического детектирования алюминия [13] основан на применении алюминиевого датчика, где в качестве нейтрального носителя используется АІМСМ-41 в матрице из поливинилхлорида (ПВХ).

¹ Решение Коллегии ЕЭК от 04.10.2022 № 138 «Об утверждении Требований к проведению исследований (испытаний) лекарственных средств в части оценки и контроля содержания примесей». Доступно по: <https://www.alta.ru/tamdoc/22kr0138/> Ссылка активна на 10.09.2023.

На данный момент в ГФ РФ XV представлена методика спектрофлуориметрического определения алюминия² с использованием 8-гидроксихинолина в хлороформе, которая применяется в анализе некоторых фармацевтических субстанций: лимонной кислоты³, калия хлорида⁴, натрия хлорида⁵, воды для инъекций⁶, воды очищенной⁷. Но, учитывая токсичность хлороформа и высокую стоимость лиганда (8-гидроксихинолина), а также наличие стадии экстракции полученного комплекса, что может приводить к количественным девиациям и увеличивать неопределенность методики, актуальным является вопрос о коррекции спектрофлуориметрической методики определения алюминия. Руководствуясь тем, что рутин может образовывать флуоресцирующие комплексы с катионами металлов [14] и при этом является более доступным и дешевым лигандом по сравнению с 8-гидроксихинолином, можно прийти к заключению, что целесообразность его использования для контроля содержания алюминия в различных лекарственных средствах с помощью спектрофлуориметрического метода является оправданной. Исходя из этого, **целью настоящего исследования** было создание альтернативного метода спектрофлуориметрического определения алюминия с помощью рутина с последующей апробацией оптимизированной методики на субстанции калия хлорид. Для реализации поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**: определить длину волны возбуждения и эмиссии комплекса алюминия с рутином; подобрать условия анализа, опираясь на методику, представленную в ГФ; разработать альтернативную методику определения примеси алюминия; провести валидацию пред-

² ОФС.1.2.2.2.0001 «Алюминий». Государственная фармакопея РФ. XV изд. Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-2/1-2-2-2/alyuminiy/?sphrase_id=341995. Ссылка активна на 10.09.2023.

³ ФС.2.1.0024.15 «Лимонная кислота». Государственная фармакопея РФ. XIV изд. Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14/2/2-1/limonnaya-kislota-limonnaya-kislota-acidum-citricum/?sphrase_id=341997. Ссылка активна на 10.09.2023.

⁴ ФС.2.2.0009 «Калия хлорид». Государственная фармакопея РФ. XV изд. Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/2/2-2/kaliya-khlid/?sphrase_id=341998. Ссылка активна на 10.09.2023.

⁵ ФС.2.2.0014 «Натрия хлорид». Государственная фармакопея РФ. XV изд. Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/2/2-2/natriya-khlid/?sphrase_id=342000. Ссылка активна на 10.09.2023.

⁶ ФС.2.2.0019 «Вода для инъекций». Государственная фармакопея РФ. XV изд. Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/2/2-2/voda-dlya-inektsiy/?sphrase_id=342002. Ссылка активна на 10.09.2023.

⁷ ФС.2.2.0020 «Вода очищенная». Государственная фармакопея РФ. XV изд. Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/2/2-2/voda-ochishchennaya/?sphrase_id=342006. Ссылка активна на 10.09.2023.

ложенной методики; апробировать данную методику на субстанции калия хлорид; для подтверждения достоверности полученных данных сопоставить их с результатами другого аналитического метода, например атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материалов исследования применялись следующие субстанции и реактивы: ГСО алюминий-иона, 1 мг/мл (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия); ГСО железо-иона (II), 1 мг/мл (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия); ГСО цинк-иона, 1 мг/мл (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия); ГСО свинец-иона, 1 мг/мл (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия); ГСО никель-иона, 1 мг/мл (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия); ГСО медь-иона, 1 мг/мл (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия); стандарт катиона хрома (III), 1 мг/мл (имп., Sigma-Aldrich, США); рутин (имп., Sichuan Guangsong Pharmaceutical Co., Ltd., Китай); аммоний уксуснокислый (имп., Molekula GmbH, Германия); уксусная кислота ледяная (х. ч., АО «База № 1 Химреактивов», Россия); калия хлорид (ФС, ООО «МЗХР», Россия). Подбор оптимальных условий с целью создания альтернативной методики определения содержания примеси алюминия в лекарственных средствах с дальнейшей ее апробацией опирался на уже имеющиеся подходы, представленные в ГФ РФ, ОФС.1.2.2.2.0001 «Алюминий» и ФС.2.2.0009 «Калия хлорид».

Определение оптимальной длины волны возбуждения и эмиссии комплекса алюминия с рутином проводилось с использованием спектрофлуориметра FL 6500 (PerkinElmer Inc., США) в режиме синхронизированного сканирования. Раствор комплекса готовили следующим образом: в мерную колбу объемом 50 мл помещали 10 мл стандартного раствора алюминий-иона (1 мкг/мл) (ОФС.1.2.2.2.0001 «Алюминий»), 10 мл ацетатного буферного раствора (pH 6,0) для создания среды, затем 10 мл раствора рутина в 70%-м спирте с концентрацией 0,5 мг/мл, перемешивали, доводили до метки буферным раствором (pH 6,0), приготовленным с использованием pH-метра (Mettler Toledo, Швейцария) по методике, приведенной в ОФС.1.3.0003 «Буферные растворы». Предварительно определяли интенсивность флуоресценции рутина с концентрацией 0,1 мг/мл при длине волны возбуждения и эмиссии комплекса.

Построение градуировочной зависимости интенсивности флуоресценции комплекса от содержания алюминия (мкг) осуществлялось для оценки валидационных параметров «предел обнаружения» и «линейность» (ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик»)¹. В мерные колбы вместимостью 50 мл по-

мещали стандартный раствор алюминий-иона ($C = 1$ мкг/мл): 2, 3, 4, 5 и 6 мл соответственно. В каждую колбу добавляли 10 мл ацетатного буфера (pH 6,0), затем 10 мл раствора рутина в 70%-м спирте с концентрацией 0,5 мг/мл, перемешивали и доводили до метки буферным раствором. Измеряли интенсивность флуоресценции комплекса рутина с алюминием при его характерной длине волны возбуждения (445 нм) и длине волны эмиссии (565 нм). Исходя из этого, линейный диапазон включал в себя пять точек, среди которых две (2, 3 мкг) были ниже, а две другие (5, 6 мкг) – выше предельной (4 мкг), установленной для субстанции калия хлорида (ФС.2.2.0009 «Калия хлорид»).

Для определения алюминия в образце хлорида калия методом АЭС-ИСП готовили и использовали следующие растворы.

Растворитель – 1%-й раствор азотной кислоты, для приготовления которой использована концентрированная азотная кислота (х. ч., ООО «НПФ Химмедсервис», Россия), свежеперегнанная.

Стандартный образец Multi-Element Solution (растворитель – 5%-й HNO_3 , концентрация алюминия – 10 мг/л, производитель – PerkinElmer, США).

Градуировочные растворы готовили путем разбавления мультиэлементного стандартного раствора ($C = 10$ мг/л) до концентраций 0,1; 0,5; 1,0 мг/л.

Испытуемые растворы – образец хлорида калия массой 1 г (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли и доводили до метки растворителем. При норме содержания алюминия в образце не более 0,0001 % значение интенсивности эмиссии в испытуемом растворе не должно превышать нижней точки градуировки.

Раствор для проверки правильности – образец хлорида калия массой 1 г (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли в 5 мл растворителя, добавляли 1 мл градуировочного раствора с концентрацией 1,0 мг/л, доводили до метки растворителем. Измерения проводили в условиях, представленных в таблице 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлены спектры возбуждения и эмиссии комплекса, на которых отмечены соответствующие максимумы. Исходя из этого можно сделать вывод о том, что наибольшая интенсивность флуоресценции при 565 нм возникает при длине волны возбуждения 445 нм.

Альтернативный подход к определению алюминия в субстанции калия хлорида опирался на методику, представленную в ГФ, ФС.2.2.0009 «Калия хлорид» (показатель «Алюминий»). Суть коррекции состоит в замене лиганда 8-гидроксихинолина в хлороформе на рутин в 70%-м спирте. Таким образом, в альтернативном подходе исключается использование токсичного растворителя, а также происходит замена дорогостоящего лиганда (8-гидроксихиноли-

¹ ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик». Государственная фармакопея РФ. XV изд. Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-1/validatsiya-analiticheskikh-metodik/?sphrase_id=342054. Ссылка активна на 10.09.2023.

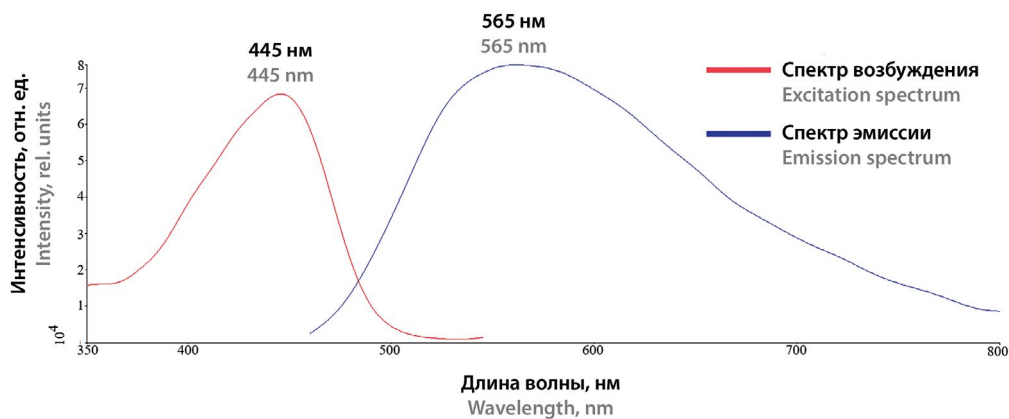


Рисунок 1. Спектры возбуждения и эмиссии комплекса рутина с алюминием

Figure 1. Excitation and emission spectra of the complex of rutin with aluminum

на) на более дешевый (рутин). Стоит отметить и экспрессность альтернативной методики по сравнению с предусмотренной ГФ методикой в связи с отсутствием этапа экстракции алюминия из водной фазы в хлороформ, содержащий лиганд. Кроме того, процесс экстракции не всегда сопровождается полным количественным переходом, что существенно отражается на точности полученных данных.

Таблица 1. Условия анализа методом АЭС-ИСП

Table 1. Conditions for ICP AES analysis

Длины волн Wavelengths	237,313 нм 394,401 нм 396,153 нм 237,313 нм 394,401 нм 396,153 нм
Время интегрирования Integration time	1 с 1 sec
Число повторов интегрирования Number of integration iterations	5
Скорость потока плазмообразующего газа Plasma gas flow rate	10 л/мин 10 L/min
Скорость потока дополнительного газа Additional gas flow rate	0,2 л/мин 0,2 L/min
Скорость потока газа для распыления пробы Sample spray gas flow rate	0,7 л/мин 0,7 L/min
Мощность плазмы Plasma power	1300 Вт 1300 W
Положение обзора эмиссии Emission statement	Аксиальный Axial
Скорость подачи образца Sample feed rate	1,5 мл/мин 1,5 ml/min

Экспериментально нами ранее было подтверждено, что оптимальным значением pH для связывания металла с лигандом является 6,0. При более высоких значениях водородного показателя увеличивается вероятность образования осадка гидроксида алюминия, что приводит к снижению интенсивности флуоресценции комплекса. При более низких значениях pH происходит недостаточное депротониро-

вание лиганда (рутина), что уменьшает вероятность образования комплекса и, как следствие, также снижает интенсивность флуоресценции. Объем рутина (0,5 мг/мл), который необходимо добавить к навеске, содержащей алюминий-ион, составил 10 мл, что оптимально с точки зрения избытка лиганда и чувствительности методики.

Исходя из вышесказанного, мы предлагаем следующую альтернативную методику определения примеси алюминия в субстанции калия хлорида. В мерную колбу вместимостью 50 мл к испытуемому раствору (4,0 г субстанции калия хлорида в 10 мл ацетатного буферного раствора с pH 6,0) добавляют 10 мл раствора рутина в 70%-м спирте (C = 0,5 г/мл), доводят до метки ацетатным буферным раствором (pH 6,0). В мерные колбы вместимостью 50 мл к эталонному раствору (4 мл стандартного раствора алюминий-иона 1 мкг/мл) и контрольному раствору (10 мл ацетатного буферного раствора с pH 6,0) добавляли 10 мл буферного раствора (pH 6,0), затем 10 мл раствора рутина в 70%-м спирте (C = 0,5 мг/мл), доводили до метки ацетатным буферным раствором с pH 6,0. Измеряли интенсивность флуоресценции испытуемого, эталонного и контрольного растворов при характерной длине волны возбуждения (445 нм) и длине волны флуоресценции (565 нм) комплекса алюминия с рутином. Флуоресценция испытуемого раствора не должна превышать флуоресценцию эталонного раствора.

Валидацию методики проводили по параметрам «специфичность», «предел обнаружения», «линейность».

Линейность. Построение градуировочной зависимости проводилось на пяти пробах с различным содержанием алюминий-иона (2, 3, 4, 5, 6 мкг). Линейная зависимость интенсивности эмиссии комплекса от содержания алюминия с коэффициентом корреляции более 0,995 представлена на рисунке 2.

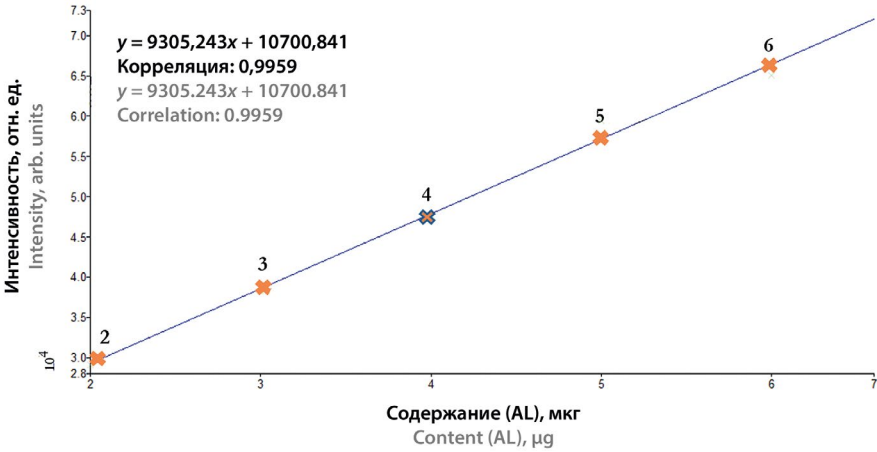


Рисунок 2. Градуировочная зависимость интенсивности флуоресценции комплекса алюминия с рутином от концентрации алюминий-иона

Figure 2. Calibration dependence of the fluorescence intensity of the complex of aluminum with rutin on the aluminum ion concentration

Специфичность. Значения максимумов на спектрах возбуждения и эмиссии составили (445 ± 2) нм и (565 ± 2) нм соответственно (см. рисунок 1). Для характеристики специфичности предложенной альтернативной методики также оценено влияние сопутствующих ионов (Zn^{2+} , Fe^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{2+} , Ni^{2+}) на определение примеси алюминия при возможном совместном присутствии (таблица 2).

Данные таблицы 2 дают возможность экспериментально подтвердить отсутствие влияния других катионов (Zn^{2+} , Fe^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{2+} , Ni^{2+}) при заданных условиях на результат анализа примеси алюминия. Однако необходимо отметить, что при совместном присутствии всех анализируемых катионов возможно частичное уменьшение интенсивности флуоресценции комплекса алюминия, что приводит к незначительному снижению количественных характеристик результатов анализа.

Исходя из данных таблицы 3 также показано, что матрица субстанции калия хлорида не мешает обнаружению катиона алюминия после добавления стандартной добавки (4 мкг).

Предел обнаружения. Предел обнаружения (ПО) рассчитывали по величине стандартного отклонения сигнала и угловому коэффициенту градуировочного графика:

$$ПО = 3,3 \cdot \frac{S}{b} = \frac{3,3 \cdot 1785,23}{9305,243} = 0,7 \text{ мкг},$$

где S – стандартное отклонение аналитического сигнала; b – коэффициент чувствительности, представляющий собой отношение аналитического сигнала к определяемой величине (тангенс угла наклона калибровочной кривой). Стандартное отклонение аналитического сигнала оценивалось путем определения интенсивности флуоресценции раствора рутина с концентрацией 0,1 мг/мл (контрольный раствор) в пяти повторностях.

Таблица 2. Оценка влияния катионов Zn^{2+} , Fe^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{2+} , Ni^{2+} на количественное определение примеси алюминия

Table 2. Evaluation of the effect of Zn^{2+} , Fe^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{2+} , Ni^{2+} cations on the quantitative determination of aluminum impurity

Растворы (состав). Содержание ионов в мкг Solutions. Ion content in µg	Интенсивность флуоресценции, отн. ед. arb. units	Измеренное содержание Al, мкг Measured Al content, µg	Доверительный интервал Confidence interval $\bar{x} \pm SD$
Al^{3+} , 4 мкг	50062	4,23	$4,21 \pm 0,04$
Zn^{2+} , 4 мкг	49783	4,20	
Al^{3+} , 4 мкг	49876	4,21	
Al^{3+} , 4 мкг	49783	4,20	$4,19 \pm 0,03$
Fe^{2+} , 4 мкг	49597	4,18	
Al^{3+} , 4 мкг	49689	4,19	
Al^{3+} , 4 мкг	49410	4,16	$4,16 \pm 0,04$
Pb^{2+} , 4 мкг	49597	4,18	
Al^{3+} , 4 мкг	49318	4,15	
Al^{3+} , 4 мкг	49465	4,17	$4,16 \pm 0,02$
Cr^{3+} , 4 мкг	49603	4,18	
Al^{3+} , 4 мкг	49201	4,14	
Al^{3+} , 4 мкг	49803	4,20	$4,19 \pm 0,02$
Ni^{2+} , 4 мкг	49744	4,20	
Al^{3+} , 4 мкг	49500	4,17	
Al^{3+} , 4 мкг	49404	4,16	$4,14 \pm 0,02$
Cu^{2+} , 4 мкг	49186	4,14	
Al^{3+} , 4 мкг	49005	4,12	
Al^{3+} , 4 мкг	48504	4,06	$4,04 \pm 0,03$
Zn^{2+} , Fe^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{2+} , Ni^{2+} , по 4 мкг	48333	4,04	
Al^{3+} , 4 мкг	48015	4,01	

Таблица 3. Оценка влияния матрицы субстанции калия хлорида на количественное определение примеси алюминия

Table 3. Evaluation of the influence of the substance matrix of potassium chloride on the quantitative determination of aluminum impurities

№	Интенсивность флуоресценции, отн. ед. Fluorescence intensity, arb. units	Содержание, мкг Content, µg	Доверительный интервал Confidence interval $\bar{x} \pm SD$
KCl 4,0 г + Al ³⁺ 4 мкг KCl 4.0 g + Al ³⁺ 4 µg			
I	48201	4,03	4,03 ± 0,05
II	48387	4,05	
III	48015	4,01	

Апробация методики осуществлялась на субстанции калия хлорида. В таблице 4 представлены значения интенсивности флуоресценции эталонного, контрольного и испытуемых растворов.

Таблица 4. Значения интенсивности флуоресценции эталонного, контрольного и испытуемых растворов

Table 4. Intensities of reference, control and test solutions

№	Интенсивность эталонного раствора (I ₂) (0,0001 %), отн. ед. Reference solution intensity (I ₂) (0.0001 %), arb. units	Интенсивность контрольного раствора (I ₃), отн. ед. Control solution intensity (I ₃), arb. units	Интенсивность испытуемого раствора (I ₁), отн. ед. Test solution intensity (I ₁), arb. units	Заключение Conclusion
1	47720,18	1785,23	6353,78	I ₂ - I ₃ > I ₁ - I ₃
2			7324,28	I ₂ - I ₃ > I ₁ - I ₃
3			7208,78	I ₂ - I ₃ > I ₁ - I ₃

Исходя из данных, представленных в таблице, можно сделать заключение о том, что содержание алюминия в субстанции калия хлорида не превышает содержания алюминия в эталонном растворе (не более 0,0001 %).

Достоверность данных подтверждали сравнением результатов анализа, полученных скорректированным спектрофлуориметрическим методом, с данными, полученными методом АЭС-ИСП. Для анализа использовали несколько длин волн, для которых характерны разные значения пределов обнаружения, величины шумов и мешающего влияния других компонентов пробы. На каждой длине волны были записаны спектры эмиссии и измерены интенсивности эмиссии растворителя и градуировочных растворов, рассчитаны метрологические характеристики. Результаты расчетов представлены в таблице 5.

Следует отметить, что, несмотря на приемлемые результаты коэффициента корреляции на всех длинах волн, измерения при 308,215 и 309,271 нм отличаются высокими пределами обнаружения, высоким сигналом шума, наложением спектральных линий

марганца и железа соответственно (указанные элементы могут содержаться в следовых количествах в растворителе и перекрывать спектр эмиссии стандартного образца алюминия в низких концентрациях). При этом длина волны 396,153 нм характеризуется наибольшей чувствительностью и выбрана как основная для дальнейших исследований.

Таблица 5. Метрологические характеристики измерений при разных длинах волн

Table 5. Metrological characteristics of measurements at different wavelengths

Длина волны, нм Wavelength, nm	Коэффициент корреляции, r Correlation coefficient, r	Предел обнаружения, мкг/л Limit of detection, µg/L	Предел обнаружения, % Limit of detection, %
237,313	0,9984	10	1 × 10 ⁻⁵
308,215	0,9960	400	4 × 10 ⁻⁴
309,271	0,9996	90	1 × 10 ⁻⁴
394,401	0,9999	5	5 × 10 ⁻⁶
396,153	0,9999	1,3	1.3 × 10 ⁻⁶

Анализ испытуемых образцов показал отсутствие максимума на спектре эмиссии на трех аналитических длинах волн, то есть содержание алюминия не превышает нормируемого значения. При этом при анализе раствора для проверки правильности полученных результатов спектр имел максимум эмиссии на установленных длинах волн. Следовательно, очень высокий сигнал фона основного вещества не мешает определению алюминия в образцах хлорида калия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенной работы была предложена альтернативная методика определения примеси алюминия с помощью рутинного спектрофлуориметрического метода. Были определены длины волн возбуждения и эмиссии для комплекса рутин с алюминием при 445 и 565 нм соответственно. Предложенная методика прошла валидационную оценку по параметрам «специфичность», «предел обнаружения», «линейность». Специфичность характеризуется конкретными значениями длин волн возбуждения и флуоресценции комплекса и отсутствием постороннего влияния других ионов, наличие которых в субстанциях возможно. В ходе построения калибровочной зависимости интенсивности эмиссии от концентрации алюминий-иона был рассчитан коэффициент регрессии 0,9959 (>0,99) и получено уравнение графика линейной функции. Предел обнаружения составил 0,7 мкг. Данная методика была апробирована на субстанции калия хлорида. Результаты исследования показали, что содержание алюминия в субстанции не превышает предельную концентрацию (не более 0,0001 %), установленную в

фармакопейной статье (т.е. интенсивность флуоресценции испытуемого раствора меньше интенсивности флуоресценции эталона). Способность методики давать достоверные результаты подтверждена сопоставимостью с данными, полученными методом АЭС-ИСП.

Предложенная методика эргономична, экспрессна, экономически более выгодна и безопасна по сравнению с подходом, представленным в ГФ РФ. Это связано с тем, что исключена стадия экстракции комплекса алюминия с рутином в органический слой. В результате этого нивелируется токсическое влияние хлороформа на организм человека и окружающую среду. Кроме того, альтернативный подход способствует повышению точности полученных данных ввиду отсутствия стадии экстракции и уменьшения потерь комплекса.

Данная методика в предложенном варианте может быть рекомендована для включения в ГФ РФ и использована фармацевтическими предприятиями при анализе АФС на предмет содержания примеси алюминия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Эпштейн Н. А. Трансфер методик определения примесей: сравнительное испытание, валидация, критерии приемлемости (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):137–146. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-137-146.
2. Внешние стандартные образцы или относительные факторы отклика: вопросы количественного определения примесей в фармацевтических препаратах. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(3):16–20.
3. Rajagopalan R. Review of regulatory guidance on impurities. *Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceuticals*. 2004;27–37. DOI:10.1016/s0149-6395(03)80004-1.
4. Jaishankar M., Tseten T., Anbalagan N., Mathew B.B., Beeregowda K.N. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology*. 2014;7(2):60–72. DOI: 10.2478/intox-2014-0009.
5. Balali-Mood M., Naseri K., Tahergorabi Z., Khazdair M. R., Sadeghi M. Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12. DOI: 10.3389/fphar.2021.643972.
6. Kushwaha P. Metallic Impurities in Pharmaceuticals: An Overview. *Current Pharmaceutical Analysis*. 2021;17(8):960–968. DOI: 10.2174/1573412916999200711151147.
7. Robert T. Elemental Impurities in Pharmaceuticals. *Measuring Elemental Impurities in Pharmaceuticals*. 2018;29:11–29. DOI: 10.1201/b21952-2.
8. Balam V. Recent advances in the determination of elemental impurities in pharmaceuticals – Status, challenges and moving frontiers. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016;80:83–95. DOI: 10.1016/j.trac.2016.02.001.
9. Aleluia A. C. M., de Souza Nascimento M., dos Santos A. M. P., dos Santos W. N. C. L., de Freitas Santos Júnior A., Costa Ferreira S. L. Analytical approach of elemental impurities in pharmaceutical products: A worldwide review. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2023;205:106689. DOI: 10.1016/j.sab.2023.106689.
10. Rekhi H., Kaur R., Rani S., Malik A. K., Kabir A., Furton K. G. Direct Rapid Determination of Trace Aluminum in Various Water Samples with Quercetin by Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography Based on Fabric Phase Sorptive Extraction Technique. *Journal of Chromatographic Science*. 2018;56(5):452–460. DOI: 10.1093/chromsci/bmy015.
11. Giordano R., Ciaralli L., Ciprotti M., Camoni I., Costantini S. Applicability of High-Performance Ion Chromatography (HPIC) to the Determination of Fosetyl-Aluminum in Commercial Formulations. *Microchemical Journal*. 1995;52(1):68–76. DOI: 10.1006/mchj.1995.1068.
12. Tria J., Haddad P. R., Nesterenko P. N. Determination of aluminium using high performance chelation ion chromatography. *Journal of Separation Science*. 2008;31(12):2231–2238. DOI: 10.1002/jssc.200800046.
13. Arvand M., Kermanian M., Zanjanchi M. A. Direct determination of aluminium in foods and pharmaceutical preparations by potentiometry using an AIMCM-41 modified polymeric membrane sensor. *Electrochimica Acta*. 2010;55(23):6946–6952. DOI: 10.1016/j.electacta.2010.06.083.
14. Kasprzak M. M., Erxleben A., Ochocki J. Properties and applications of flavonoid metal complexes. *RSC Advances*. 2015;5(57):45853–45877. DOI: 10.1039/c5ra05069c.

REFERENCES

1. Epshtein N. A. Transfer of Impurities Determination Methods: Comparative Testing, Validation, Acceptance Criteria (Review). *Drug development & registration*. 2021;10(2):137–146. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-137-146.
2. External Reference Standards or Relative Response Factors: Considerations for Quantitation of Impurities in Pharmaceuticals. *Drug development & registration*. 2021;10(3):16–20. (In Russ.)
3. Rajagopalan R. Review of regulatory guidance on impurities. *Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceuticals*. 2004;27–37. DOI:10.1016/s0149-6395(03)80004-1.
4. Jaishankar M., Tseten T., Anbalagan N., Mathew B.B., Beeregowda K.N. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology*. 2014;7(2):60–72. DOI: 10.2478/intox-2014-0009.
5. Balali-Mood M., Naseri K., Tahergorabi Z., Khazdair M. R., Sadeghi M. Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12. DOI: 10.3389/fphar.2021.643972.
6. Kushwaha P. Metallic Impurities in Pharmaceuticals: An Overview. *Current Pharmaceutical Analysis*. 2021;17(8):960–968. DOI: 10.2174/1573412916999200711151147.
7. Robert T. Elemental Impurities in Pharmaceuticals. *Measuring Elemental Impurities in Pharmaceuticals*. 2018;29:11–29. DOI: 10.1201/b21952-2.
8. Balam V. Recent advances in the determination of elemental impurities in pharmaceuticals – Status, challenges and moving frontiers. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016;80:83–95. DOI: 10.1016/j.trac.2016.02.001.
9. Aleluia A. C. M., de Souza Nascimento M., dos Santos A. M. P., dos Santos W. N. C. L., de Freitas Santos Júnior A., Costa Ferreira S. L. Analytical approach of elemental impurities in pharmaceutical products: A worldwide review. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2023;205:106689. DOI: 10.1016/j.sab.2023.106689.
10. Rekhi H., Kaur R., Rani S., Malik A. K., Kabir A., Furton K. G. Direct Rapid Determination of Trace Aluminum in Various Water Samples with Quercetin by Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography Based on Fabric Phase Sorptive Extraction Technique. *Journal of Chromatographic Science*. 2018;56(5):452–460. DOI: 10.1093/chromsci/bmy015.
11. Giordano R., Ciaralli L., Ciprotti M., Camoni I., Costantini S. Applicability of High-Performance Ion Chromatography (HPIC) to the Determination of Fosetyl-Aluminum in Commercial Formulations. *Microchemical Journal*. 1995;52(1):68–76. DOI: 10.1006/mchj.1995.1068.
12. Tria J., Haddad P. R., Nesterenko P. N. Determination of aluminium using high performance chelation ion chromatography. *Journal of Separation Science*. 2008;31(12):2231–2238. DOI: 10.1002/jssc.200800046.
13. Arvand M., Kermanian M., Zanjanchi M. A. Direct determination of aluminium in foods and pharmaceutical preparations by potentiometry using an AIMCM-41 modified polymeric membrane sensor. *Electrochimica Acta*. 2010;55(23):6946–6952. DOI: 10.1016/j.electacta.2010.06.083.
14. Kasprzak M. M., Erxleben A., Ochocki J. Properties and applications of flavonoid metal complexes. *RSC Advances*. 2015;5(57):45853–45877. DOI: 10.1039/c5ra05069c.