

УДК 6.61.615.1

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖЕЛЕЗА В ГЕМОСТАТИЧЕСКОМ СРЕДСТВЕ

Ю.Н. Барсукова^{1*}, О.А. Мельникова¹, М.Ю. Мельников¹

Резюме. В статье представлены данные по разработке методики фотометрического определения хлорида железа (III) в гемостатическом средстве с помощью химической реакции образования салицилатов железа. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным характеристикам: специфичность, линейность, правильность, сходимость. По результатам исследования основные валидационные характеристики метода соответствуют критериям приемлемости. Методика предназначена для определения железа в окрашенных растворах лекарственных препаратов в диапазоне 0,04-0,1 г/мл. Относительная погрешность измерения 0,83%.

Ключевые слова: гемостатическое средство, хлорид железа, количественное определение.

METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION OF PHOTOMETRIC DETERMINATION OF IRON IN HEMOSTATIC TOOL

Yu.N. Barsukova^{1*}, O.A. Melnikova¹, M. Yu. Melnikov¹

Abstract. The article presents data on the development of a technique of photometric determination of ferric chloride (III) as a hemostatic tool, through the formation of salicylates iron. The developed method was validated for following validation characteristics: specificity, linearity, accuracy. The results of the study the main validation characteristics of the method meet the acceptance criteria. The technique is intended for definition of iron in the painted solutions of medicines in the range of 0,04-0,07 g/ml. Relative error of measurement of 0,83%.

Keywords: hemostatic agent, ferric chloride, bleeding, quantitative determination.

1 – ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3

1 – Urals State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 3, Repin str., Yekaterinburg, 620028, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: iulija.barsukowa@yandex.ru, newfarmacia@mail.ru

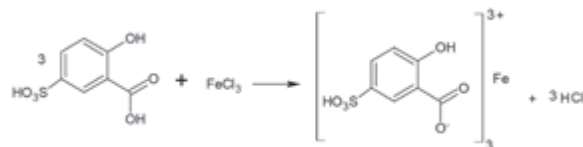
Тел.: 8 (909) 003 21 22

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время широкое применение для остановки наружного кровотечения в нейрохирургии находят гемостатические средства местного применения. Как правило, это губка гемостатическая коллагеновая, тахокомб, желпластан, изогенная фибринная пленка, фибриновый клей и другие. Однако несмотря на широкий ассортимент гемостатических лекарственных средств, поиск наиболее безопасных и эффективных средств данной группы сохраняет свою актуальность. В рамках поставленной задачи нами был разработан состав гемостатического средства, включающий хлорид железа (III), аминокaproновую кислоту и гидроксиэтилкрахмал. Железо содержится в гемоглобине крови, участвует в кроветворении, введение его в данный препарат приводит к проявлению гемостатических свойств и предотвращает развитие анемии. Введение аминокaproновой кислоты ингибирует активаторы профибринолизина и тормозит его превращение в фибринолизин. Плазмозамещающее средство гидроксиэтилкрахмал длительно циркулирует в кровяном русле, обеспечивая общий объем циркулирующей крови, способст-

вует нормализации и улучшению гемодинамических показателей, поддерживает артериальное давление [1].

В качестве метода количественного определения железа в созданной лекарственной форме предложена фотометрия с сульфосалициловой кислотой. Химизм реакции можно представить схемой:



Как видно из рисунка, ион железа III образует с сульфосалициловой кислотой ряд комплексов, состав и окраска которых зависят от кислотности раствора. При pH=3 образуется соединение фиолетового цвета состава 1:1. Светопоглощение этого комплекса максимально при $\lambda=510$ нм ($\epsilon=1600$).

Целью данного исследования является разработка методики фотометрического определения железа с сульфосалициловой кислотой в лекарственной форме гемостатического средства и ее валидация.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования является гемостатическое средство. Его состав представлен в таблице 1.

Таблица 1.

Состав гемостатического средства

Ингредиент	Масса, г (Объем, мл)
Хлорид железа III	5,0*
Гидроксиэтилкрахмал	2,5
Кислота аминакапроновая	1,25
Вода очищенная	100,0

Примечание: * – концентрация хлорида железа в растворе 0,05 г/мл.

Аппаратура: Фотометр КФК-3 ЗОМЗ (Загорский опытный завод пластмасс, Россия); лабораторные аналитические весы CE-224C («Сартогосм», Россия, технология Sartorius, Германия).

Реактивы. В экспериментальных исследованиях использовали:

- хлорид железа III 6-водный (х.ч., ОАО «Бром», Россия);
- гидроксиэтилкрахмал (ОАО НПК «Эском», Россия);
- кислоту аминакапроновую (х.ч., ООО «Полисинтез», Россия);
- кислоту сульфосалициловую 2-водную (х.ч., 25% раствор, ЗАО «Ереванский завод химреактивов», Армения);
- квасцы железоммонийные (ЖАК) (ч., ЗАО «НПО ЭКРОС», Россия);
- кислоту серную (х.ч., 0,05 М раствор, «Химитекс», Россия);
- кислоту азотную разв. (х.ч., ООО «ХимТТ», Россия);
- воду очищенную.

Посуда. Пипетка градуированная (10 см³) и простая (2 см³) (ГОСТ 29227-9). Колба плоскодонная мерная с цилиндрической горловиной (50 и 250 см³). Цилиндры мерные (10 и 25 см³) (ГОСТ 29044-91 и ГОСТ 1770-74).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

При разработке методики учитывали такие параметры, как объем аликвоты, длина волны, при которой светопоглощение комплекса максимально. В результате предложенная нами методика состоит из следующих этапов.

1. Приготовление стандартных растворов сульфосалицилата железа

Отбирают 2, 4, 6, 8, 10, 12 и 14 мл рабочего раствора железоммонийных квасцов в мерные колбы

объемом 50 мл, в каждую колбу добавляют 3 мл раствора сульфосалициловой кислоты, 1 мл серной кислоты и доводят до метки дистиллированной водой. Затем отбирают 10 мл раствора в колбу объемом 250 мл, доводят объем колбы водой до метки.

Приготовление основного стандартного раствора железоммонийных квасцов. 30 г квасцов железоммониевых растворяют в 100 мл воды; к раствору прибавляют разведенную азотную кислоту до перехода коричневой окраски в желто-зеленую. Раствор хранят в защищенном от света месте [2].

Приготовление рабочего раствора железоммонийных квасцов. Полученный основной стандартный раствор разбавляют в 30 раз. Концентрация составляет 0,01 г/мл.

2. Снятие спектра поглощения сульфосалицилата железа, выбор светофильтра

Раствор с наибольшей концентрацией [$C(Fe^{3+}) = 0,192$ мг/мл] наливают в кювету фотоэлектроколориметра ($l=1$ см); в качестве раствора сравнения используют воду. Измеряют оптическую плотность полученного раствора в диапазоне длин волн 400–600 нм. Выбирают для дальнейшей работы светофильтр, соответствующий максимуму поглощения света окрашенным соединением (λ_{max}). Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Выбор оптимальной длины волны

Длина волны, нм	Оптическая плотность
416	0,734
510	1,127
520	1,016
545	0,914

Максимальное значение оптической плотности при данном разведении наблюдается при длине волны $\lambda=510$ нм (зелёный светофильтр). Таким образом, светопоглощение образовавшегося комплекса максимально при данной длине волны.

3. Построение градуировочного графика (рисунок 1)

Для построения градуировочного графика измеряют оптическую плотность приготовленных стандартных растворов железоммонийных квасцов, содержащих различное количество железа.

Измеряют оптическую плотность стандартных растворов (A_{CT}) при длине волны $\lambda=510$ нм (три параллельных измерения для каждого раствора). Данные заносятся в таблицу 3.

Таблица 3.

Построение градуировочного графика железоаммонийных квасцов

C(Fe ³⁺), мг/мл	Оптическая плотность A			
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{ср}
0,016	0,219	0,220	0,219	0,219
0,032	0,234	0,234	0,234	0,234
0,064	0,301	0,297	0,297	0,298
0,096	0,505	0,505	0,510	0,506
0,126	0,569	0,567	0,570	0,569
0,160	0,784	0,782	0,783	0,783
0,192	1,127	1,126	1,126	1,126

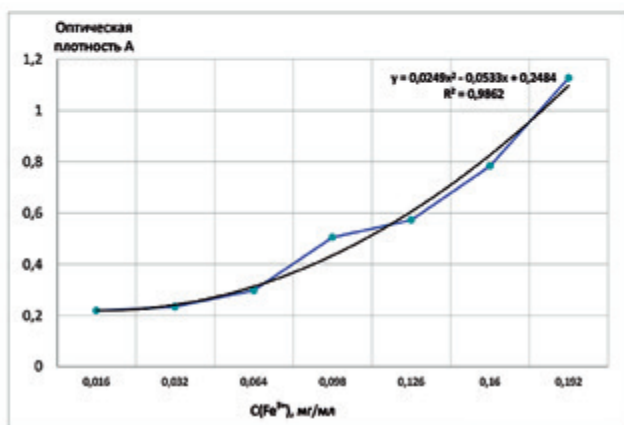
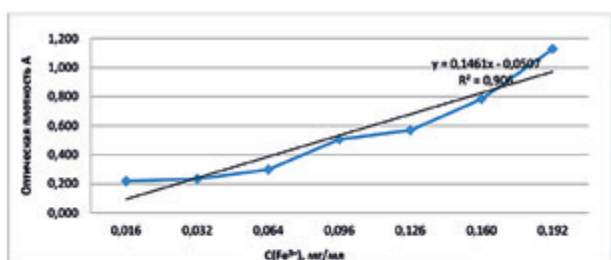


Рисунок 1. Градуировочный график железоаммонийных квасцов с концентрацией рабочего стандартного раствора 0,01 г/мл

4. Фотометрирование гемостатического средства

10 мл гемостатического средства (состав представлен в таблице 1) помещают в колбу объемом 250 мл (V₁) и доводят до метки дистиллированной водой. Перемешивают, отбирают аликвоту 10 мл (V_n) и помещают ее в колбу объемом 250 мл (V₂). Затем в нее добавляют 3 мл сульфосалициловой кислоты, 1 мл серной кислоты и доводят до метки. Измеряют оптическую плотность A_x (шесть параллельных определений) при длине волны λ=510 нм (l=1 см). Раствор сравнения – вода дистиллированная. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4.

Значение оптической плотности гемостатического средства при длине волны λ=510 нм

Оптическая плотность	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A _{ср}
Гемостатическое средство	0,885	0,874	0,878	0,884	0,879	0,883	0,881

По градуировочному графику (рисунок 1) рассчитывают концентрацию ионов железа (при использовании уравнения кривой **y = 0,1461x – 0,0507**).

Далее производят расчет количественного содержания иона железа III по формуле:

$$g = \frac{C(Fe^{3+}) \cdot V_2 \cdot V_1}{1000 \cdot V_n} = \frac{C(Fe^{3+}) \cdot 250 \cdot 250}{1000 \cdot 10 \cdot 10}$$

где C(Fe³⁺) – концентрация ионов железа III, вычисленная с использованием градуировочного графика, мг/мл; V₁ – объем мерной колбы, мл; V₂ – объем мерной колбы, мл; V_n – объем раствора, взятый из мерной колбы для анализа, мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты, полученные в результате фотометрического определения железа III, и данные их статистической обработки с использованием Microsoft Excel представлены в таблице 5.

Таблица 5.

Статистическая обработка результата фотоколориметрического определения иона железа III в гемостатическом средстве. Метрологическая характеристика метода анализа (P = 95 %; n = 6)

№	A	C(Fe), мг/мл	X, г/мл	X _{ср} , г/мл	ΔX	ε, %	X _{абсол}	X _{ср} ±ΔX, г/мл
1	0,885	0,0785985	0,049124063	0,048713	0,000405	0,832086	0,05	0,0487±0,0004
2	0,874	0,0769914	0,048119625					
3	0,878	0,0775758	0,048484875					
4	0,884	0,0784524	0,04903275					
5	0,879	0,0777219	0,048576188					
6	0,883	0,0783063	0,048941438					
		y = 0,1461x – 0,0507			f=6-1=5			

Примечание: Полученный результат: X(Fe³⁺)=0,0487±0,0004, г/мл.

РАСЧЕТ ВАЛИДАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИКИ

Валидацию методики фотометрического определения железа с сульфосалициловой кислотой в гемостатическом средстве проводили по таким характеристикам, как специфичность, линейность, правильность и сходимость (повторяемость) [3].

1. Специфичность методики

Специфичность аналитической методики считается доказанной, если ни растворитель, ни компоненты плацебо не искажают результат. Для определения данного показателя необходимо приготовить ряд модельных смесей.

Для установления специфичности методики требуется проанализировать модельные смеси по следующей методике: 10 мл каждой модельной смеси поместить в колбу объемом 250 мл (V_1), довести до метки дистиллированной водой. Перемешать, отобрать аликвоту 10 мл (V_n) и поместить ее в колбу объемом 250 мл (V_2), добавить 3 мл сульфосалициловой кислоты, 1 мл серной кислоты и довести до метки дистиллированной водой. Измерить оптическую плотность A_x (шесть параллельных определений) при длине волны $\lambda=510$ нм ($l=1$ см). Состав модельных смесей и результаты представлены в таблице 6.

Заключение по показателю «специфичность»: таким образом, полученные результаты соответствует требованию валидации по показателю специфичность фотометрического определения железа с сульфосалициловой кислотой, так как модельные смеси № 1, 2, 3, 4 не поглощают свет при длине волны 510 нм, а модельная смесь № 5 – поглощает.

2. Линейность методики

Линейность методики – это наличие линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации или количества определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики.

Линейность выражается уравнением $y=ax+b$. Это уравнение называют линейной регрессией. Параметр b градуировочной функции характеризует отрезок, отсекаемый на оси ординат и соответствующий значению холостого опыта, а коэффициент a характеризует наклон градуировочной кривой и является отражением чувствительности методики. В нашем случае градуировочный график железоаммонийных квасцов (рисунок 1) представлял собой полиномиальную функцию ($y=0,0249x^2-0,0533x+0,2484$), поэтому для построения линейности нами был выбран линейный диапазон с концентрацией железа от 0,04 до 0,1 г/мл.

Для проверки линейности следует брать не менее 6 экспериментальных точек. При этом наиболее правильно использовать отдельные навески и затем готовить из них растворы соответствующих концентраций.

На характер градуировочного графика и на линейность в значительной степени могут оказывать влияние условия выполнения анализа: количество реактивов, концентрации анализируемых растворов и др.

Линейность аналитической методики показывает, что внутри заданного диапазона методики существует прямо пропорциональное соотношение между концентрациями исследуемого вещества в растворе и оптической плотностью при выбранной длине волны (510 нм).

Линейность доказывалась на 5 разных разведениях модельной смеси гемостатического средства: 0,04 мг/мл, 0,064 мг/мл, 0,08 мг/мл, 0,096 мг/мл, 0,112 мг/мл. Графическое представление линейности методики показано на рисунке 2.

Растворы модельной смеси готовили путем увеличения аликвоты по следующей схеме: отбираем 5, 8, 10, 12 и 14 мл гемостатического средства в мерные колбы объемом 250 мл, в каждую колбу добавляем 3 мл раствора сульфосалициловой кислоты, 1 мл серной кислоты и доводим до метки дистиллированной водой. Затем отбираем 10 мл раствора и помещаем в колбу на 250 мл, доводим объем колбы водой до метки. Измеряем оптическую плотность каждого раство-

Таблица 6.

Состав модельных смесей для показателя «специфичность методики»

№	Состав модельной смеси	Оптическая плотность							
		A_1	A_2	A_2	A_2	A_2	A_2	A_2	A_{cp}
1.	Вода (растворитель)	0,001	0,000	0,000	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000
2.	2,5% водный раствор гидроксиэтилкрахмала	0,001	0,002	0,003	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002
3.	1,25% водный раствор аминокaproновой кислоты	0,003	0,003	0,002	0,001	0,002	0,003	0,003	0,002
4.	Смесь 2+3	0,004	0,004	0,005	0,005	0,005	0,005	0,003	0,004
5.	5% водный раствор хлорида железа III	0,823	0,836	0,822	0,823	0,824	0,823	0,824	0,825

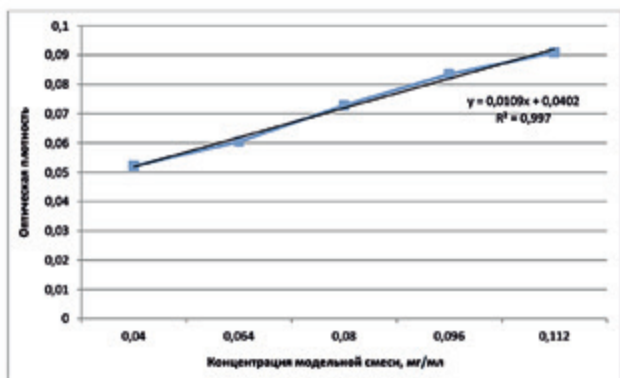


Рисунок 2. Графическое представление линейности фотометрического определения железа в гемостатическом средстве

ра на фотометре КФК-3 ЗОМЗ при λ=510 нм. Результаты представлены в таблицах 7 и 9.

Таблица 7.

Зависимость оптической плотности от концентрации

C _x , мг/мл	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A _{ср}
0.04	0,053	0,052	0,052	0,053	0,051	0,052	0,052167
0.064	0,061	0,06	0,06	0,061	0,06	0,061	0,0605
0.08	0,074	0,072	0,07	0,075	0,075	0,071	0,072833
0.096	0,081	0,085	0,082	0,081	0,088	0,084	0,0835
0.112	0,095	0,09	0,089	0,09	0,089	0,092	0,090833

Полученные данные следует представлять в виде градуировочного графика с линией тренда, уравнения графика и величины коэффициента корреляции.

Основной характеристикой линейности является коэффициент корреляции, мера взаимосвязи изменяемых явлений (взаимосвязь).

Коэффициент корреляции составил 0,997.

Формулы и расчеты коэффициентов градуированного графика:

$$a = \frac{n \cdot \sum x_i \cdot y_i - \sum x_i \cdot \sum y_i}{n \cdot \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}$$

$$b = \frac{\sum x_i^2 \cdot \sum y_i - \sum x_i \cdot \sum x_i \cdot y_i}{n \cdot \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}$$

Коэффициент корреляции (обозначается R) рассчитывается по специальной формуле:

$$r = \frac{m \times \sum_1^m x_i \times y_i - \sum_1^m x_i \times \sum_1^m y_i}{\sqrt{\left[m \times \sum_1^m x_i^2 - \left(\sum_1^m x_i \right)^2 \right] \times \left[m \times \sum_1^m y_i^2 - \left(\sum_1^m y_i \right)^2 \right]}}$$

Данные для расчетов представлены в таблице 8.

Таблица 8.

Результаты определения оптической плотности и концентрации. Расчёты

	x _i	y _i	x _i ·y _i	x ²	y ²
	0,04	0,048056	0,001922222	0,0016	0,002309
	0,064	0,061833	0,003957333	0,004096	0,003823
	0,08	0,074611	0,005968889	0,0064	0,005567
	0,096	0,087833	0,008432	0,009216	0,007715
	0,112	0,098278	0,011007111	0,012544	0,009659
Σ=	0,784	0,741222	0,062575111	0,067712	0,058145

Примечание: x – концентрация, мг/мл; y – аналитический сигнал (оптическая плотность).

Таблица 9.

Результаты методики по показателю «линейность»

Характеристика	Статистические характеристики	Результаты
Линейность	Уравнение прямой	y=0,0109x+0,0402
	Наклон (a)	0,0109
	Коэффициент корреляции	R ² =0,997
	Отрезок на оси ординат b: 95% доверительный интервал	0,0402

Заключение по показателю «линейность»: для аналитических целей можно использовать только ту методику, для которой зависимость функций от аргумента коррелируется с коэффициентом r, который должен быть ≥0,99.

Таким образом, полученные результаты находятся в пределах допустимых отклонений, так как валидация по показателю «линейность» может варьироваться в незначительных пределах.

3. Правильность методики

Правильностью аналитической методики называется степень близости экспериментальных результатов к истинному значению во всей области измерений. Главным фактором, определяющим правильность, является значение систематической погрешности.

Для оценки правильности методик количественного определения субстанции применимы следующие подходы:

- применение аналитической методики к образцу с известной степенью чистоты, например к стандартному образцу;
- сравнение результатов анализа, полученных с использованием валидируемой методики и арбитражного метода, правильность и прецизионность которого известны;

- заключение о правильности можно сделать после того, как установлены прецизионность, линейность и специфичность.

Оценка проводилась путем расчета процента определения известной концентрации, стандартного отклонения, коэффициента вариации (КВ) и доверительного интервала среднего значения (P=95%). Результаты представлены в таблице 10.

Таблица 10.

Правильность фотометрического определения железа III

Уровень концентрации, %	Масса навески, г	A _{ср}	X, г/мл	R, %
80%	0,0411	0,734	0,0356	86,62
80%	0,0416	0,743	0,0362	87,02
80%	0,0418	0,748	0,0367	87,80
100%	0,0510	0,881	0,0486	97,2
100%	0,0505	0,879	0,0486	97,2
100%	0,0518	0,884	0,049	98,0
			$y=0,1461x - 0,0507$	
			$(C(Fe) \cdot V_2 \cdot V_1) / (1000 \cdot V_n)$	

Для тестирования методики на правильность готовятся модельные смеси с точным содержанием каждого из компонентов, включая и вспомогательные вещества. Согласно рекомендациям ICH (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) необходимо проанализировать не менее 9 образцов на 3 уровнях концентраций [3]. Правильность методики устанавливается в указанном диапазоне ее применения. Для оценки полученных результатов наиболее простым и наглядным критерием служит открываемость (R), которая вычисляется по формуле:

$$R = \frac{\text{найденно аналита}}{\text{взято аналита}} \cdot 100\%$$

При проведении анализа будут получены 9 значений открываемости.

Для более детальной оценки следует статистически обработать полученные значения R, рассчитав стандартное и относительное стандартное отклонение. Данные значения занесены в таблицу 11.

Заключение по показателю «правильность»: полученные результаты показывают, что методика соответствует требованиям валидации.

4. Сходимость (повторяемость) методики

Сходимость показывает, что методика анализа при проведении в одинаковых условиях обеспечивает получение сравнимых показателей. Сходимость была доказана при помощи испытаний проб действующего

вещества – хлорида железа III. Результаты представлены в таблице 12.

Таблица 11.

Правильность фотометрического определения железа III, статистические характеристики

Статистические характеристики	Результат, %
Среднее значение	92,31
Стандартное отклонение	2,32
Коэффициент вариации (КВ)	5,95
Нижняя граница доверительного интервала (P=0,95)	86,26
Верхняя граница доверительного интервала (P=0,95)	98,26

Таблица 12.

Повторяемость фотометрического определения железа III

Проба	Оптическая плотность, A	Концентрация ионов железа III в пробе, мг/мл	Содержание хлорида железа III в пробе, г/мл
1	0,885	0,0785985	0,049124063
2	0,874	0,0769914	0,048119625
3	0,878	0,0775758	0,048484875
4	0,884	0,0784524	0,04903275
5	0,879	0,0777219	0,048576188
6	0,883	0,0783063	0,048941438

Оценка проводилась путем расчета процента определения известной концентрации, стандартного отклонения и доверительного интервала (P=95%). Расчеты приведены в таблице 5.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика фотометрического определения хлорида железа III в гемостатическом средстве. Проведена валидация разработанной методики; были доказаны специфичность, линейность, правильность и прецизионность методики. Диапазон аналитической методики 0,04–0,1 г/мл. Методика может быть воспроизведена в лабораторных условиях с доверительной вероятностью 95% и $X_{ср} \pm \Delta X = 0,0487 \pm 0,0004$ г/мл.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю.Н. Барсукова, О.А. Мельникова. Состояние фармацевтического рынка гемостатических лекарственных препаратов российской федерации// Сборник материалов «Современные тенденции развития науки и технологий» XVI Международной научно-практической конференции. Агентство перспективных научных исследований (АПНИ). 2016. № 7 (3). С. 13–15
2. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. МЗ СССР. 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1990. 399 с.
3. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик // Государственная фармакопея. XIII изд.
4. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. ICH Q2B «Validation of Analytical Procedures: Methodology». ICH: Geneva, 1997.