

В. А. Молоток, С. Э. Ржеусский, М. В. Яцко, Д. А. Сабирова

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЮМИНИЯ ХЛОРИДА В ПЕНЕ МЕДИЦИНСКОЙ КРОВООСТАНАВЛИВАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ

**Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
г. Витебск, Республика Беларусь**

*Одним из важных этапов фармацевтической разработки лекарственного препарата является выбор методики количественного определения действующего вещества. В предыдущих исследованиях нами был определен состав лекарственного препарата в виде пены медицинской на основе алюминия хлорида для остановки паренхиматозных кровотечений и оценена его эффективность и безопасность в опытах *in vivo*. Целью данной работы было разработать и валидировать методику количественного определения действующего вещества в данном лекарственном препарате. За основу методики взята реакция исследуемого катиона с ксиленоловым оранжевым при значении $pH = 3,5$, позволяющая получить окрашенный светопоглощающий комплекс, оптическую плотность которого возможно измерить на спектрофотометре. В ходе работы определены и обоснованы необходимые время и температура нагревания испытуемого раствора лекарственного препарата, необходимые объемы пеногасителя, органического реагента, вспомогательных компонентов для создания pH среды. Также определена оптимальная масса алюминия хлорида гексагидрата в испытуемом растворе лекарственного препарата для получения сходимых результатов. Полученная методика валидирована по критериям специфичности, линейности, правильности, точности. Установлено, что диапазон применения данной методики, в которой она обладает всеми необходимыми валидационными характеристиками, составляет 80–120% от номинального содержания алюминия хлорида гексагидрата в пене медицинской.*

Ключевые слова: *алюминия хлорид, пена медицинская, спектрофотометрия, ксиленоловый оранжевый, контроль качества, количественное определение, валидация.*

ВВЕДЕНИЕ

В предыдущих исследованиях нами был разработан лекарственный препарат в виде пены медицинской кровоостанавливающего действия на основе алюминия хлорида в 10% концентрации [1].

На сегодняшний день спектрофотометрия является одним из самых доступных и удобных методов количественного определения соединений алюминия. Существует большое количество органических реагентов, с которыми ионы данного металла образуют окрашенные соединения. Сюда относятся, например, трифенилметановые красители, представителем которых является ксиленоловый оранжевый [2, 3]. Известна методика анализа минеральных руд на основе образования светопоглощающего комплекса ионов алюминия с ксиленоловым оранжевым, а также ее модифика-

ции для контроля содержания алюминия в пищевых продуктах и лекарственных препаратах [4, 5].

Целью данной работы было разработать и валидировать методику количественного определения алюминия хлорида в пене медицинской на основе фотометрической реакции с ксиленоловым оранжевым.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Количественное определение алюминия хлорида гексагидрата в пене медицинской проводили методом спектрофотометрии на приборе SPECORD 250 в диапазоне длин волн 500–600 нм при толщине поглощающего слоя 1 см.

За основу методики была взята реакция исследуемого катиона с ксиленоловым оранжевым при значении $pH = 3,5$, позво-

ляющая получить окрашенный светопоглощающий комплекс [4].

Для разработки методики определяли следующие параметры: температуру и время нагревания испытуемого раствора пены медицинской; объем пеногасителя 96% этилового спирта; объем 1 М раствора уксусной кислоты для создания среды с $\text{pH} = 3,0$; объем ацетатного буферного раствора с $\text{pH} = 3,5 \pm 0,05$; объем 0,1% раствора ксиленолового оранжевого; оптимальное количество алюминия хлорида гексагидрата в испытуемом растворе лекарственного препарата.

Для определения объема пеногасителя 96% этилового спирта добавляли в 25 мл разбавленного раствора пены медицинской по 0,1 мл и визуально оценивали полноту пенообразования и возможность доведения раствора в мерной колбе до метки. Максимальный внесенный в колбу объем пеногасителя был равен 1,0 мл.

Оптимальные температурные условия для проведения реакции определяли путем измерения оптической плотности испытуемых растворов лекарственного препарата после воздействия на них температур в 60 °С, 70 °С, 80 °С, 90 °С в течение 3, 5, 7 мин. Для каждого сочетания времени и температуры измерение оптической плотности проводили 3 раза. Множественное сравнение результатов проводили с помощью *t*-теста (критический уровень значимости 0,05).

Оптимальное количество алюминия хлорида гексагидрата в испытуемом растворе устанавливали в ходе измерений оптической плотности растворов. Необходимо было определить массу действующего вещества, при которой значения оптической плотности находятся в диапазоне от 0 до 1, поскольку в данном диапазоне значений прибор обеспечивает требуемую точность показаний. Также исследовали разброс значений оптической плотности путем вычисления относительного стандартного отклонения (не должно превышать 2%).

Объем 0,1% раствора ксиленолового оранжевого рассчитывали, исходя из того, что, согласно литературным данным, количество реагента должно превышать количество алюминия хлорида гексагидрата в 2–3 раза [5].

Необходимые объемы 1 М раствора уксусной кислоты и ацетатного буферно-

го раствора $\text{pH} = 3,5$ определяли путем измерения pH на pH -метре при введении в испытуемый раствор лекарственного препарата различных объемов данных реактивов.

Растворы реагентов для проведения методики количественного определения алюминия хлорида в пене медицинской готовили следующим образом:

Приготовление 1 М раствора натрия гидроксидов и 0,1 М раствора уксусной кислоты проводили согласно ГФ РБ II том 1 [6].

Приготовление ацетатного буферного раствора $\text{pH} = 3,5$: смешивают 1000,0 мл 0,1 М раствора уксусной кислоты и 5,3 мл 1 М раствора натрия гидроксидов. Доводят значение pH уксусной кислотой ледяной *P* до 3,5 ($\pm 0,05$).

Приготовление 0,1% раствора ксиленолового оранжевого: в мерную колбу объемом 100,0 мл вносят 0,1 г ксиленолового оранжевого *P* и растворяют в 70 мл воды *P*, доводят до соответствующего объема этим же растворителем.

Приготовление 1 М раствора уксусной кислоты: в колбу объемом 50,0 мл вносят 25 мл воды *P*, 3,0 мл уксусной кислоты ледяной *P*, доводят до соответствующего объема тем же растворителем.

Валидацию методики количественного определения проводили согласно ТКП 432–2012 (02041) «Производство лекарственных средств. Валидация методик испытаний» и Фармакопеи Евразийского экономического союза (том 1, часть 2) [7, 8].

Обработку результатов проводили в программе Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изготовлении испытуемого раствора лекарственного препарата наблюдали образование пены, что препятствовало точному доведению его объема до метки. Для устранения образующейся пены использовали 96% этиловый спирт. Доказано, что добавление 0,1 мл пеногасителя в испытуемый раствор лекарственного препарата является достаточным для предотвращения образования пены. Дальнейшее увеличение объема 96% этилового спирта на процесс пеногашения не влияло.

Так как окрашенный комплекс алюминия с ксиленоловым оранжевым образует-

ся медленно, нами были изучены способы ускорения данной реакции. В научной литературе описано применение различных температур и времени нагревания [3–5] для растворов данного комплекса, поэтому для точного определения необходимых условий нами было изучено влияние температур 60 °С, 70 °С, 80 °С, 90 °С и времени нагревания в 3, 5, 7 мин на оптическую плотность испытуемого раствора лекарственного препарата. Полученные значения оптической плотности статистически значимо не отличались друг от друга в диапазоне температур 70–90 °С и при нагревании в течение 3–7 мин ($p > 0,05$). Оптическая плотность при воздействии на раствор температуры 60 °С в течение 3, 5, 7 мин была статистически значимо меньше значений, полученных при нагревании испытуемых растворов в диапазоне 70–90 °С ($p < 0,05$). Так как не было обнаружено значимых различий для диапазона температур 70–90 °С и времени нагревания 3–7 мин, для разрабатываемой методики было установлено время нагревания испытуемого раствора лекарственного препарата (b) 5 ± 2 мин при температуре 80 ± 10 °С.

Согласно литературным данным [5], до внесения ксиленолового оранжевого в мерную колбу pH среды должен составлять 2–3, что гарантирует максимальный перевод ионов алюминия в активную форму Al^{3+} . Нами установлено, что для этого в испытуемый раствор пены медицинской (b) достаточно внести 0,1 мл 1 М раствора уксусной кислоты.

С целью обеспечения полноты реакции конечное значение водородного показателя среды после внесения ксиленолового оранжевого должно быть $3,5 \pm 0,1$, что достигается при использовании ацетатного буферного раствора [5]. Определено, что для создания $pH = 3,5 \pm 0,1$ необходимо 10 мл данного буферного раствора.

Содержание алюминия хлорида гексагидрата в разработанной пене медицинской составляет 10 г на 100 мл раствора. Для получения оптических плотностей окрашенного продукта реакции в диапазоне от 0 до 1 необходимо уменьшить содержание действующего вещества в испытуемом растворе путем разбавления лекарственного препарата *водой Р*. Установлено, что оптимальное содержание алюминия хлорида гексагидрата в конечном растворе составляет 0,24 мг.

Установлено, что для реакции с 0,24 мг алюминия хлорида гексагидрата необходимо 2,0 мл 0,1 % раствора ксиленолового оранжевого. Результаты измерений оптической плотности с таким объемом органического реагента обладали минимальным разбросом значений.

В результате проведенных исследований нами разработана следующая методика количественного определения алюминия хлорида в пене медицинской.

1. Приготовление компенсационного раствора

1.1. *Компенсационный раствор (а)*

В мерную колбу вместимостью 25,0 мл вносят 20 мл *воды Р*, 0,1 мл 96% *спирта Р*, доводят до соответствующего объема этим же растворителем. Далее в мерную колбу вместимостью 25,0 мл вносят 1,0 мл полученного раствора и доводят до соответствующего объема *водой Р*.

1.2. *Компенсационный раствор (в)*

В мерную колбу вместимостью 25,0 мл вносят 1,5 мл компенсационного раствора (а), прибавляют 0,1 мл 1 М раствора уксусной кислоты, 2,0 мл 0,1 % раствора ксиленолового оранжевого, 10,0 мл ацетатного буферного раствора с $pH = 3,5 \pm 0,05$. Нагревают на водяной бане при температуре 80 ± 10 °С в течение 5 мин. Охлаждают в ледяной бане до комнатной температуры и доводят до соответствующего объема *водой Р*.

2. Приготовление испытуемого раствора лекарственного препарата

2.1. *Испытуемый раствор лекарственного препарата (а)*

В мерную колбу вместимостью 25,0 мл вносят 20 мл *воды Р*, 1,0 мл пены медицинской, 0,1 мл 96% *спирта Р*, доводят до соответствующего объема *водой Р*. Далее в мерную колбу вместимостью 25,0 мл вносят 1,0 мл полученного раствора и доводят до соответствующего объема *водой Р*.

2.2. *Испытуемый раствор лекарственного препарата (в)*

В мерную колбу вместимостью 25,0 мл вносят 1,5 мл испытуемого раствора лекарственного препарата (а), прибавляют 0,1 мл 1 М раствора уксусной кислоты, 2,0 мл 0,1 % раствора ксиленолового оранжевого, 10,0 мл ацетатного буферного раствора с $pH = 3,5 \pm 0,05$. Нагревают на водяной бане при температуре 80 ± 10 °С в течение 5 мин. Охлаждают в ледяной бане до комнатной температуры и доводят до

соответствующего объема водой *P*.

3. Приготовление стандартного раствора

3.1. Стандартный раствор (а)

В мерную колбу вместимостью 25,0 мл вносят 20 мл воды *P*, 0,100 г стандартного образца алюминия хлорида гексагидрата, 0,1 мл 96% спирта *P*, доводят до соответствующего объема водой *P*. Далее в мерную колбу объемом 25,0 мл вносят 1,0 мл полученного раствора и доводят до соответствующего объема водой *P*.

3.2. Стандартный раствор (в)

В мерную колбу вместимостью 25,0 мл вносят 1,5 мл стандартного раствора (а), прибавляют 0,1 мл 1 М раствора уксусной кислоты, 2,0 мл 0,1% раствора ксиленолового оранжевого, 10,0 мл ацетатного буферного раствора $pH = 3,5 \pm 0,05$. Нагревают на водяной бане при температуре $80 \pm 10^\circ C$ в течение 5 мин. Охлаждают в ледяной бане до комнатной температуры и доводят до соответствующего объема водой *P*.

4. Проведение испытания

Измеряют оптическую плотность

стандартного раствора (в) и испытуемого раствора лекарственного препарата (в) при длине волны 536 нм относительно компенсационного раствора (в).

Содержание алюминия хлорида гексагидрата (г) в 100 мл пены медицинской рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot m_{ст} \cdot w}{A_{ст}},$$

где $m_{ст}$ – масса стандартного образца алюминия хлорида гексагидрата, г;

A_x – среднее значение оптической плотности испытуемого раствора лекарственного препарата (б);

$A_{ст}$ – среднее значение оптической плотности стандартного раствора (б);

w – массовая доля алюминия хлорида гексагидрата в стандартном образце, %.

Спектр поглощения комплекса алюминия хлорида и ксиленолового оранжевого, полученный согласно вышеописанной методике, представлен на рисунке 1.

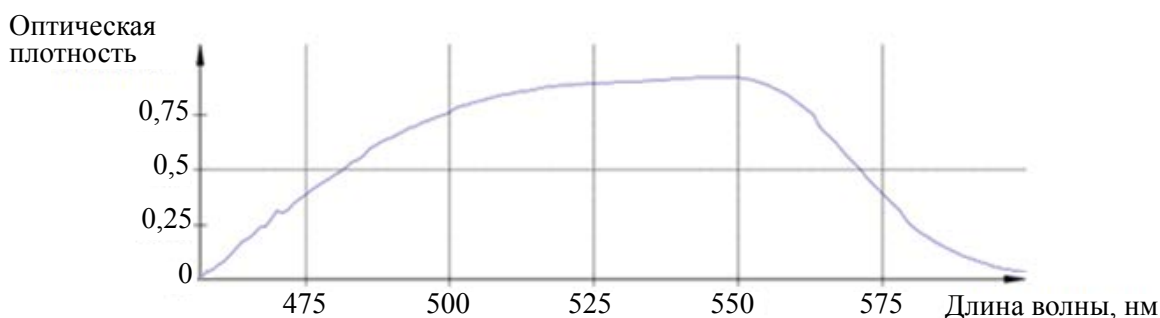


Рисунок 1. – Спектр поглощения комплекса алюминия хлорида и ксиленолового оранжевого, полученный согласно разработанной методике

При оценке специфичности разработанной методики было определено, что для испытуемого раствора лекарственного препарата оптическая плотность при 536 нм равна 0,7404, для стандартного раствора – 0,7451, для плацебо равна -0,0040. Данные значения доказывают то, что методика количественного определения является специфичной.

При изучении линейности методики в диапазоне 80–120% был получен график, представленный на рисунке 2.

Коэффициент детерминации R^2 для данного диапазона составил 0,9991, коэффициент корреляции – 0,9995. Открыва-

емость значений находилась в диапазоне 99,98–101,18%, что не превышает критерия приемлемости 98–102%. Следовательно, изучаемая методика количественного определения алюминия хлорида является линейной в диапазоне 80–120%. Полученные значения представлены в таблице 1.

При оценке правильности методики количественного определения алюминия хлорида гексагидрата в пене медицинской определено, что в диапазоне концентраций 80–120% от номинального содержания найденные разности между средними значениями и истинными для каждой концен-

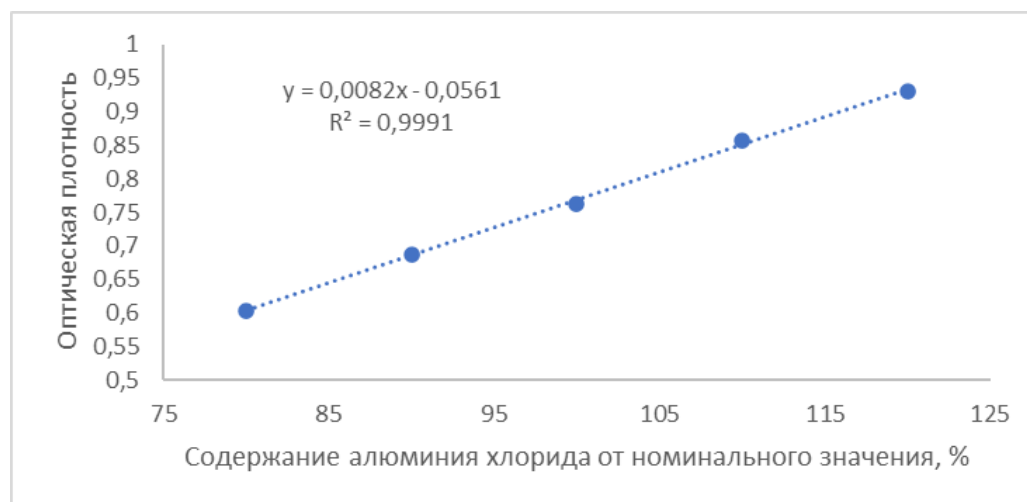


Рисунок 2. – График зависимости оптической плотности от концентрации алюминия хлорида гексагидрата в диапазоне 80–120%

Таблица 1. – Результаты полученных данных при исследовании линейности разработанной методики в диапазоне 80–120%

Содержание алюминия хлорида гексагидрата в стандартном растворе от номинального, %	Оптическая плотность	Полученное содержание алюминия хлорида гексагидрата, %	Открываемость, %	Отклонение точек от градуировочной прямой, %
80	0,6037	80,46	100,58	0,58
90	0,6864	90,55	100,61	0,61
100	0,7637	99,98	99,98	0,02
110	0,8565	111,29	101,18	1,18
120	0,9308	120,35	100,29	0,29

трации находились в пределах 0,02–1,80%, а среднее значение для всех концентраций составляло 99,6% при критерии приемлемости 99,0–100,0% (таблица 2).

При определении сходимости методики количественного определения установлено, что относительное стандартное отклонение составило 1,29% (критерий приемлемости не более 2,0%). При про-

ведении методики в другой день и другим аналитиком значение RSD составило 0,87%. Относительное стандартное отклонение между результатами двух аналитиков – 1,05% при критерии приемлемости 3,0% (таблица 3).

Работа выполнялась в рамках гранта БРФФИ «Наука-М» 2022 (договор № M22M-029).

Таблица 2. – Результаты полученных данных при исследовании правильности разработанной методики

Содержание алюминия хлорида гексагидрата от номинального значения, %	Теоретическая масса алюминия хлорида, гексагидрата г	Среднее значение найденной массы алюминия хлорида гексагидрата, г	Разность среднего значения найденной массы от теоретического, %
80	7,7756	7,6355	1,80
100	9,7195	9,7217	0,02
120	11,6634	11,7185	0,47

Таблица 3. – Результаты исследования прецизионности методики количественного определения алюминия хлорида в пене медицинской

Определяемый показатель	№ определения					
	1	2	3	4	5	6
Сходимость. Аналитик № 1						
Оптическая плотность	0,798	0,799	0,8072	0,7869	0,7908	0,7785
Содержание алюминия хлорида гексагидрата, г	10,09	10,11	10,21	9,95	10,00	9,85
Среднее значение	10,0 ± 0,1					
RSD аналитика № 1, %	1,29					
Сходимость. Аналитик № 2						
Оптическая плотность	0,7983	0,7879	0,8007	0,8062	0,7925	0,8038
Содержание алюминия хлорида гексагидрата, г	10,04	9,91	10,07	10,13	9,97	10,11
Среднее значение	10,04 ± 0,09					
RSD аналитика № 2, %	0,87					
Внутрилабораторная прецизионность						
Среднее значение	10,0 ± 0,1					
RSD между результатами двух аналитиков, %	1,05					

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложена спектрофотометрическая методика количественного определения алюминия хлорида в пене медицинской кровоостанавливающего действия на основе фотометрической реакции с ксиленоловым оранжевым.

Установлено, что для выполнения данной методики необходимо использовать 96% этиловый спирт объемом 0,1 мл для предупреждения образования пены и точного доведения раствора лекарственного препарата до метки.

Определено, что достаточным временем нагревания испытуемого раствора лекарственного препарата является 5 ± 2 мин при температуре 80 ± 10 °C.

Показано, что для создания необходимых значений среды необходимо использовать 0,1 мл 1 М раствора уксусной кислоты и 10 мл ацетатного буферного раствора с $pH = 3,5 \pm 0,05$.

Доказано, что оптимальной массой алюминия хлорида гексагидрата в испытуемом растворе лекарственного препарата (b) является 0,24 мг. Для реакции с таким количеством действующего вещества необходимо добавление 2,0 мл 0,1% раствора ксиленолового оранжевого.

Установлено, что методика количественного определения алюминия хлорида в пене медицинской кровоостанавливающего действия на основе фотометрической реакции с ксиленоловым оранжевым является специфичной, а также линейной, правильной и точной для диапазона определя-

емых содержаний 80–120% от номинального количества действующего вещества.

SUMMARY

V. A. Malatok, S. E. Rzhessky,
M. V. Yatsko, D. A. Sabirova
DEVELOPMENT AND VALIDATION
OF ASSAY METHOD OF ALUMINUM
CHLORIDE IN MEDICATED
HEMOSTATIC FOAM

One of the important stages in the pharmaceutical development of a drug is the development of an assay method of the active substance. In previous studies, we developed the drug composition in the form of medicated foam based on aluminum chloride to stop parenchymal bleeding, and its efficacy and safety in the studies *in vivo* was evaluated. The purpose of this work was to develop and validate an assay method of the active substance in this drug. The method was based on the reaction of the studied cation with xylenol orange at $pH = 3.5$, allowing to obtain a stained light-absorbing product optical density of which can be measured on a spectrophotometer. During the study the time needed and the temperature to heat the working solution of the drug, necessary amount of defoamer, organic reagent and auxiliary components for creating the pH medium were determined and justified. Also the optimal mass of aluminum chloride hexahydrate in the working solution for obtaining reproducible results was determined. The resulting method was validated according to the criteria of specificity, linearity, precision and accuracy. It was found that the range of

application of this technique in which it has all the necessary validation characteristics is 80–120% from the nominal contents of aluminum chloride hexahydrate in the medicated foam.

Keywords: aluminum chloride, medicated foam, spectrophotometry, xylenol orange, quality control, assay, validation.

ЛИТЕРАТУРА

1. Молоток, В. А. Фармацевтическая разработка пены медицинской кровоостанавливающего действия / В. А. Молоток, С. Э. Ржеуский // Вестн. фармации. – 2021. – № 4. – С. 22–25.

2. Тихонов, Т. Н. Аналитическая химия алюминия / Т. Н. Тихонов. – Москва: Наука, 1971. – 266 с.

3. Makoto, O. The Spectrophotometric Determination of Aluminum with Xylenol Orange / O. Makoto // Bull. of the chem. society of Japan. – 1963. – Vol. 36, N 7. – P. 809–813.

4. Разработка методики количественного спектрофотометрического определения квасцов жженных в стоматологических пленках / Н. Н. Гужва [и др.] // Науч. ведомости Белгород. гос. ун-та. Сер.: Медицина. Фармация. – 2011. – № 16. – С. 232–234.

5. Юрьева, И. В. Спектрофотометрическое определение алюминия (III) в продуктах питания / И. В. Юрьева, Е. В. Радион, С. А. Сафонов // Тр. Белорус. гос. технолог. ун-та. Сер. 3. Химия и технология неорганических веществ. – Минск: БГТУ, 2003. – Вып. 11. – С. 124–134.

6. Государственная фармакопея Республики Беларусь (ГФ РБ II): в 2 т.: введ. в действие с 1 янв. 2013 г. приказом М-ва здравоохранения РБ от 25.04.2012 г. № 453. – Т. 1 : Общие методы контроля качества лекарственных средств / М-во здравоохранения Республики Беларусь, Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении ; [под общ. ред. А. А. Шерякова]. – Молодечно: Победа, 2012. – 1220 с.

7. Производство лекарственных средств. Валидация методик испытаний: ТКП 432-2012 (02041). – Введ. 01.03.2013. – Минск: Департамент фармацевт. пром-сти М-ва здравоохранения Респ. Беларусь, 2012. – 18 с.

8. Фармакопея Евразийского экономического союза [Электронный ресурс]. – Том 1, ч. 2. – Режим доступа: https://eec.eaeunion.org/upload/medialibrary/9de/2-chast-1-toma-Farmakopei-Soyuza-_s-vozmozhnostyu-poiska_.pdf. – Дата доступа: 22.03.2024.

REFERENCES

1. Molotok VA, Rzhеusskii SE. Pharmaceutical development of medical hemostatic foam. Vestn farmatsii. 2021;(4):22–5. doi: 10.52540/2074-9457.2021.4.22. (In Russ.)

2. Tikhonov TN. Analytical chemistry of aluminum. Moskva, RF: Nauka; 1971. 266 s. (In Russ.)

3. Makoto O. The Spectrophotometric Determination of Aluminum with Xylenol Orange. Bull Chem Soc Jpn. 1963;36(7):809–13

4. Guzhva NN, Likhota TT, Maksimenko TI, Zaitsev VP. Development of a method for quantitative spectrophotometric determination of burnt alum in dental films. Nauch vedomosti Belgorod gos un-ta. Serii: Meditsina. Farmatsiia. 2011;(16):232–4. (In Russ.)

5. Iur'eva IV, Radion EV, Safonov SA. Spectrophotometric determination of aluminum (III) in food products. Tr Belorus gos tekhnolog un-ta. Ser 3. Khimiia i tekhnologiia neorganicheskikh veshchestv. Minsk, RB: BGTU; 2003. vyp. 11. s. 124–34. (In Russ.)

6. Ministerstvo zdravookhraneniia Respubliki Belarus', Tsentr ekspertiz i ispytaniy v zdravookhraneni. State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus: v 2 t. T. 1, General methods of quality control of medicines. Sheriakov AA, redactor. Molodechno, RB: Pobeda; 2012. 1220 s. (In Russ.)

7. Manufacturing of medicinal products. Validation of test methods: ТКП 432-2012 (02041). Vved 2013 Mart 1. Minsk, RB: Departament farmatsevt prom-sti M-va zdravookhraneniia Resp Belarus'; 2012. 18 s. (In Russ.)

8. Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union [Elektronnyi resurs]. Tom 1, ch. 2. Rezhim dostupa: https://eec.eaeunion.org/upload/medialibrary/9de/2-chast-1-toma-Farmakopei-Soyuza-_s-vozmozhnostyu-poiska_.pdf. Data dostupa: 22.03.2024. (In Russ.)

Адрес для корреспонденции:

210009, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,
УО «Витебский государственный ордена
Дружбы народов медицинский университет»,
кафедра организации и экономики фармации,
тел. +375333104731,
e-mail: veronikanovitskaya1998@gmail.com,
Молоток В. А.

Поступила 01.04.2024 г.