

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-103-107
УДК 543.253:(0888)

Определение микропримесей ртути в лекарственном средстве протамина сульфат методом инверсионной вольтамперометрии

Н. О. Ким^{1*}, Е. А. Ивановская¹

1 – ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 630091, г. Новосибирск, ул. Красный проспект, д. 52

* Контактное лицо: Ким Надежда Олеговна. E-mail: Kim_Nadia@mail.ru. Тел.: 8 (383) 226 98 11.

Статья получена: 05.10.2018. Статья принята к печати: 17.05.2019

Резюме

Введение. В статье представлены данные по количественному определению ртути в водном растворе фармацевтической субстанции протамина сульфата методом инверсионной вольтамперометрии на графитовых электродах, модифицированных золотополлимерной композицией. Существующая методика определения примеси ртути в протамине сульфат согласно Европейской фармакопее – многостадийное титрование с дитизоном – трудоемка и не позволяет достичь воспроизводимости.

Цель. Проведение анализа содержания примеси биоаккумуляционной ртути в растворе протамина сульфата методом инверсионной вольтамперометрии.

Материалы и методы. Субстанция протамина сульфата (Производитель Альпс Фармасьютикал Индастри Ко.Лтд). Экспериментальные данные получены на полуавтоматическом анализаторе ТА-4 (ООО НПП «Томьяналит», г. Томск) с программным обеспечением VALabTx в комплекте.

Результаты и обсуждение. Адаптирована методика определения ртути в воде и представлены результаты ее апробации на растворе протамина сульфат. Приведены результаты проверки работы электродов методом «введено-найденно», полученные результаты единичного анализа ртути входили в интервал 0,0038–0,0063 мг/л, что подтверждает их готовность к работе. Данный интервал прописан в методике и означает границы допустимых отклонений. Пределы обнаружения ртути на приборе составляют 10^{-6} – 10^{-10} моль/л. Из исследуемой нами субстанции протамина сульфат мы приготовили раствор с концентрацией 10 мг/мл и произвели измерения на подготовленных к работе электродах. Содержание ртути в исследуемой пробе составило 0,00034 мг/л. Согласно сертификату анализа на продукт протамина сульфата содержание ртути должно быть ≤ 10 мд. Было изучено влияние изменения времени накопления. Оптимальное время накопления составило 80 с, поскольку при стандартных условиях ртуть не вся успевает сконцентрироваться на поверхности электрода, а выше 80 с не происходит существенного увеличения содержания ртути.

Заключение. Предложенная методика определения ртути в воде методом инверсионной вольтамперометрии на графитовых электродах, модифицированных золотополлимерной композицией может быть адаптирована для определения биоаккумуляционной ртути в фармацевтической субстанции протамина сульфат. Полученные данные свидетельствуют о том, что данный метод можно применять в контроле качества лекарственных средств, как альтернативный экспресс-метод для определения примеси ртути существующему методу многостадийного титрования с дитизоном.

Ключевые слова: инверсионная вольтамперометрия, ртуть, протамина сульфат.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Для цитирования: Ким Н. О., Ивановская Е. А. Определение микропримесей ртути в лекарственном средстве протамина сульфат методом инверсионной вольтамперометрии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(2): 103–107.

Determination of Mercury Impurities in Protamine Sulfate Medicament by Stripping Voltammetry

N. O. Kim^{1*}, E. A. Ivanovskaja¹

1 – Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Novosibirsk State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 52, Krasny prospect, Novosibirsk, 630091, Russia

*Corresponding author: Nadezhda O. Kim. E-mail: Kim_Nadia@mail.ru. Tel.: 8 (383) 226 98 11.

Received: 05.10.2018. Accepted: 17.05.2019

Abstract

Introduction. The article presents data of the quantitative mercury determination in an aqueous solution of the pharmaceutical substance protamine sulfate by stripping voltammetry on graphite electrodes modified with a gold-polymer composition. The existing method to determine the mercury impurity in protamine sulfate according to the European Pharmacopoeia – multistage titration with dithizone – is laborious and does not allow to achieve repeatability.

Aim. Analyzing the content of bioaccumulative mercury impurities in a protamine sulfate solution by stripping voltammetry.

Materials and methods. Protamine Sulfate Substance (Manufacturer Alps Pharmaceutical Industry Co.Ltd). Experimental data were obtained on a TA-4 semi-automatic analyzer (OOO NPP Tomianalit, Tomsk) with VALabTx software.

Results and discussion. We adapted the method for mercury determination in water and presented the results of its testing on protamine sulfate solution. The results of testing the electrode operation using the «entered-found» method are given, the results of a single mercury analysis were included in the interval 0, 0038–0,0063 mg/l, which confirms their readiness for work. This interval is registered in the methodology and means the limits of permissible deviations. The limits of detection of mercury on the device are 10^{-6} – 10^{-10} mol/l. We prepared a solution with concentrations of 10 mg/m from the protamine sulfate substance and measured it on prepared electrodes. The mercury content in the test sample was 0.00034 mg/l. According to the certificate of protamine sulfate, the mercury content should be ≤ 10 ppm. We studied the effect in changing of accumulation time. The optimal accumulation time was 80 seconds, because under standard conditions, not all mercury concentrates on the electrode surface, and above 80 seconds there is no significant increase in mercury content.

Conclusion. The proposed method for mercury determination in water by stripping voltammetry on graphite electrodes modified with a gold-polymer composition can be adapted to determine bioaccumulative mercury in the pharmaceutical substance protamine sulfate. The findings suggest that this method can be used in quality control of medicines, as an alternative express method for mercury impurities determination to the existing multistage titration method with dithizone.

Keywords: pectoral species, dry extract, phenolic compounds, HPLC, standardization.

Conflict of interest: no conflict of interest.

For citation: Kim N. O., Ivanovskaja E. A. Determination of mercury impurities in protamine sulfate medicament by stripping voltammetry. *Drug development & registration*. 2019; 8(2): 103–107.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее вредных загрязнений для биосферы Земли, имеющих разнообразные вредные последствия, как для здоровья людей, так и для жизнедеятельности живых организмов, являются загрязнения тяжелыми металлами [1]. Ртуть – один из наиболее токсичных элементов, широко используемых в различных областях науки и техники. Большой интерес к проблеме определения ртути вызван ее миграцией в объектах окружающей среды, способностью к биоаккумуляции в живых организмах и в созданных на их основе лекарственных препаратах [2]. Одним из таких препаратов является протамина сульфат, который получают из субстанции рыбных протаминов сальмина и клупина [3, 4].

Известно, что токсичные эндогенные формы ртути поступают к человеку с морепродуктами и гидробионтами, образуясь в результате деятельности живых клеток и трансформации экзогенных форм при взаимодействии с макромолекулами (протеинами, аминокислотами и другими биологическими структурами), а также низкомолекулярными органическими лигандами [2]. В технологии изготовления протамина сульфат так же предполагается наличие ртути в микродозах. Поэтому в соответствии с современными представлениями, оценка безопасности лекарственного препарата органического происхождения должна учитывать все потенциальные факторы риска, специфичные для данной группы лекарственных средств. В связи с этим определение примеси ртути в субстанции протамина сульфата, широко применяющегося в клинической практике, является важным моментом на этапе входного контроля.

Современный уровень развития науки и техники требования к методам анализа следовых количеств токсических веществ постоянно повышаются. Высокая токсичность ртути обуславливает ее низкие значения ПДК, что требует применения чувствительных методов аналитической химии. Поиск нового метода определения ртути в протамина сульфат обусловлен тем, что существующая методика, предложенная в Европейской фармакопее [5] – титрование с дитизином – является достаточно трудоемкой.

Одним из методов, отвечающим требованиям определения ртути по пределу обнаружения и диапа-

зону определяемых концентраций, является инверсионная вольтамперометрия [6]. Инверсионная вольтамперометрия не является фармакопейным методом и используется для определения достаточно малых количеств концентрации вещества. Суть метода заключается в предварительном накоплении анализируемого вещества путем электролиза на электроде с последующим электрохимическим его растворением при линейно снижающемся потенциале. Предварительное накопление производится катодной поляризацией на стационарном электроде (для определения катионов) с последующим анодным растворением [7].

При определении низких концентраций ртути методом катодной вольтамперометрии на углеродном электроде возрастают трудности образования новой фазы на поверхности твердого электрода, что делает невозможным определение микродоз. Известно, что в некоторых случаях модифицирование поверхности электрода позволяет снизить определяемую концентрацию металла. В частности, в работе [8] изучено влияние металлов-модификаторов углеродных электродов Au, Cu, Ti, Cd при определении ртути методом анодной инверсионной вольтамперометрии и установлено, что использование золота позволяет получить условия устойчивого определения ртути на уровне низких концентраций (до 0,02 мкг/л).

В статье [9] показано, что на графитовом электроде из растворов, содержащих менее $4 \cdot 10^{-7}$ г-ион/л Hg^{2+} , последняя вообще не выделяется, если при этом не происходит одновременное осаждение некоторых металлов, в частности меди, свинца или кадмия, которые, вероятно, играют роль центров осаждения ртути.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведение анализа содержания примеси биоаккумуляционной ртути в растворе протамина сульфата методом инверсионной вольтамперометрии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта мы использовали субстанцию Протамина сульфат. Производитель Альпс Фармасьютикал Индастри Ко.Лтд, 10-50, Furukawacho Mukaimachi Nichome, Hida, Gifu, 509-4241, Japan, Япония.

Нормативная документация: ФС 001078-211216, 2016, Протамина сульфат.

Образец предназначен в целях разработки, исследований, контроля безопасности, качества и эффективности лекарственных средств в рамках осуществления государственной регистрации лекарственного препарата; 1800 грамм, серия 515091, 514061, 514111.

Измерения проводили на электрохимическом анализаторе TA-4 (ООО НПП «Томьаналит», г. Томск) с программным обеспечением VALabTx в комплексе методом вольтамперометрии путем регистрации поляризационных кривых с предварительным электрохимическим накоплением ртути на поверхности электрода в стандартных условиях согласно методике вольтамперометрического определения ртути в водных растворах [10, 11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно методики поверхность углеродсодержащего электрода электрохимически покрывали золотом из раствора ГСО хлорида золота (III) с концентрацией 500 мг/л изготовленного из раствора ГСО золота концентрации 10000 мг/л (ГСО 8429-2003). В качестве электрода сравнения использовали хлорсеребряный электрод.

Проверка работы золотоуглеродсодержащего электрода проводилась по следующей методике. Сначала проводили отмывку стаканчиков и электродов. Для этого вносили в стаканчики 10 мл бидистиллированной воды, затем добавляли 20 мкл HNO_3 (конц.) и нажимали кнопку «отмывка» в программе. Потом снимали чистый фон [с добавлением 20 мкл 0,1 М хлорида калия и 20 мкл HNO_3 (конц.)] (рисунок 1а). Отсутствие пиков на вольтамперограммах и значение высоты пиков не превышающее 5 нА свидетельствуют о чистоте фона. После этого добавляли 50 мкл пробы – приготовленный раствор 0,1 мг/л ртути из раствора ГСО. Отмечали наличие пика ртути в пределах от 0,35–0,65 В. (рисунок 1б). В конце добавляли добавку – 50 мкл 0,1 мг/л раствора ртути. При этом высота сигнала увеличивалась примерно в два раза (рисунок 1в).

Источником информации служили вольтамперограммы – для фона, пробы и добавки. Параметры стандартных измерений – время накопления 60 с, растворения 10 с, успокоения 5 с.

Некоторые результаты проверки готовности электродов к работе приведены в таблице 1.

Как видно из таблицы результаты единичного анализа ртути перед началом измерений входят в интервал 0,0038–0,0063 мг/л – это значит, электроды готовы

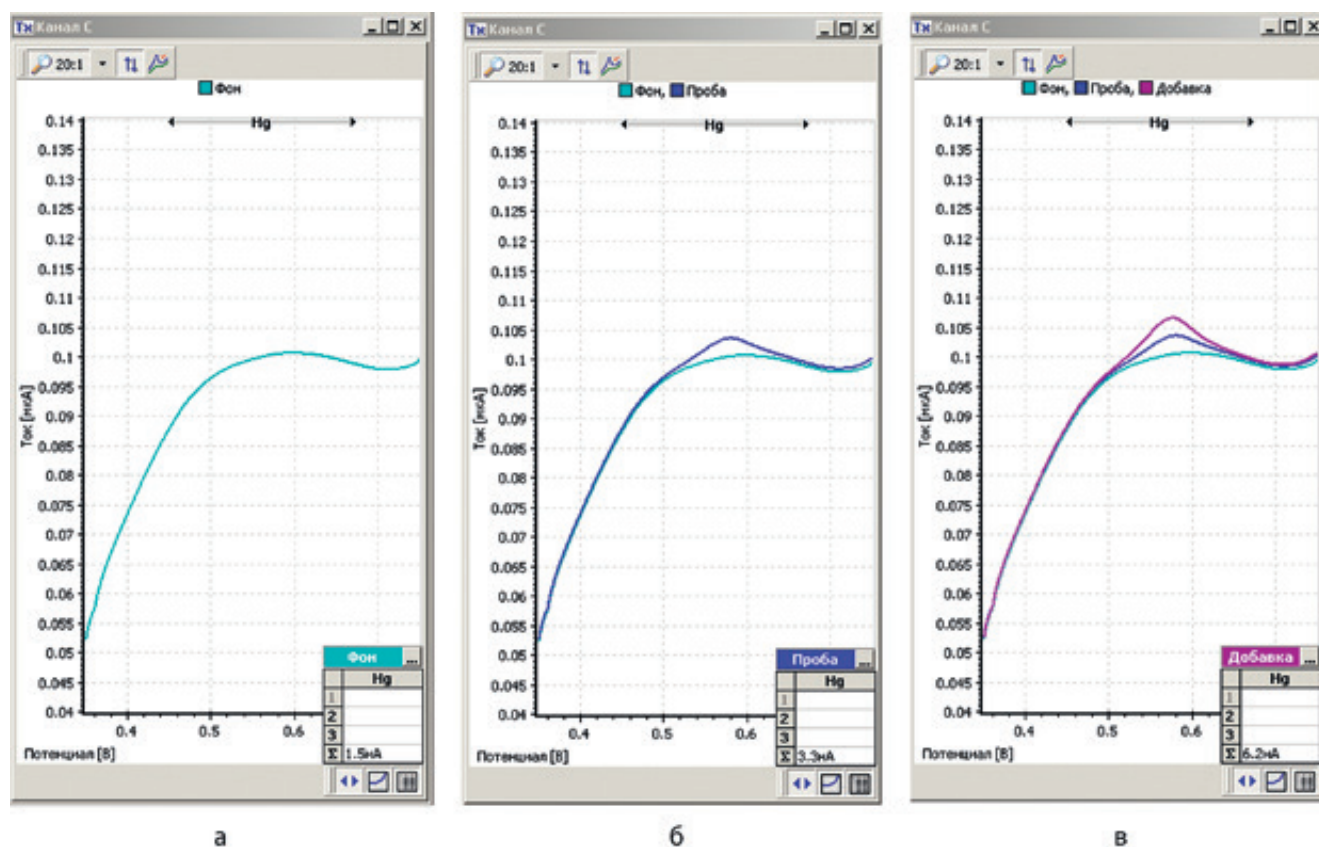


Рисунок 1. А – вольтамперограмма чистого фона (голубая линия); б – вольтамперограмма для пробы (синяя линия); в – вольтамперограмма с добавкой (розовая линия)

Figure 1. А – voltammogram of a clean background (blue line); б – voltammogram for the sample (blue line); в – voltammogram with additive (pink line)

к работе и на них можно производить дальнейшие измерения исследуемой субстанции. Электроды работают достаточно стабильно при правильной их подготовке к работе.

Таблица 1. Концентрация аттестованного раствора ртути 0,1 мг/л. Объем добавки – 50 мкл. Объем аликвоты – 50 мкл

Table 1. Concentration of a certified mercury solution of 0.1 mg/l. The volume of the additive is 50 µl. The aliquot volume is 50 µl

№	Средняя высота пика фона, нА	Средняя высота пика пробы, нА	Средняя высота пика с добавкой, нА	Результат, мг/л
1	1,23	3,73	6,87	0,0039
2	1,67	4,87	8,47	0,0044
3	0,83	2,83	5,23	0,0038
4	1,83	4,03	6,60	0,0047
5	1,3	3,93	6,80	0,0053
6	1,95	3,35	5,15	0,0053
7	0,77	1,87	3,30	0,0044
8	1,47	3,13	6,53	0,0045
9	2,26	4,15	6,15	0,0046
10	2,37	3,35	5,15	0,0038

Расчет результатов анализа производились в автоматическом режиме. Прибор считает по специальной формуле, в которой учитывается разница высоты пиков ртути на кривых с добавкой и без, а также с учетом фона.

$$C_{\text{в пробе}} = \frac{I_{\text{пробы}} \cdot C_{\text{добавки}} \cdot V_{\text{добавки}} \cdot V_{\text{минерализата}}}{(I_{\text{проба с добавкой}} - I_{\text{проба}}) \cdot V_{\text{аликвоты}} \cdot M_{\text{навески}}},$$

где $I_{\text{пробы}}$ – высота пика элемента на кривой пробы, мкА; $C_{\text{добавки}}$ – концентрация аттестованного раствора, мг/л; $V_{\text{добавки}}$ – объем добавки, мл; $V_{\text{минерализата}}$ – объем минерализата, мл; $I_{\text{проба с добавкой}}$ – высота пика элемента на кривой пробы с добавкой, мкА; $V_{\text{аликвоты}}$ – объем аликвоты, мл; $M_{\text{навески}}$ – величина навески, г или мл.

Для начала определили содержание ртути в холостой пробе (бидистиллированная вода), а затем проводили анализ на содержание ртути в объекте исследования.

Для исследования из субстанции протамина сульфат готовили водный раствор с концентрацией 10 мг/мл.

Результаты исследования приведены на вольтамперограмме (рисунок 2).

Как видно из вольтамперограммы в исследуемой пробе присутствует ртуть, но измерения при стандартных параметрах давали очень слабый сигнал, поэтому было изучено влияние изменения времени накопления. Объем аликвоты (исследуемый раствор) – 50 мкл. Объем добавки (аттестованный раствор ртути

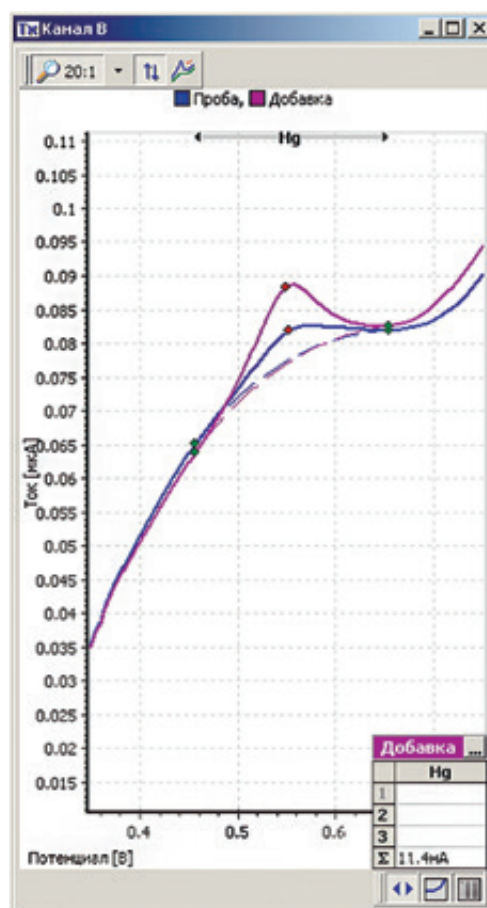


Рисунок 2. Вольтамперограмма протамина сульфат (нижняя кривая – проба протамина сульфат, верхняя кривая – добавка ГСО ртути)

Figure 2. Protamine sulfate voltammogram (the lower curve is a sample of protamine sulfate, the upper curve is the addition of GSO mercury)

с концентрацией 0,1 мг/л) – 50 мкл. Время накопления увеличивали от до 60 до 120 с интервалом 20 секунд. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Содержание ртути в растворе протамина сульфата в зависимости от времени накопления

Table 2. The mercury content in the solution of protamine sulfate, depending on the accumulation time

№	Время накопления, с	Содержание ртути, мг/л	SR, стандартное отклонение
1	60	0,00027	0,00004
2	80	0,00044	0,00002
3	100	0,00047	0,00005
4	120	0,00045	0,00007

Из таблицы видно, что при стандартных условиях ртуть не вся успевает сконцентрироваться на поверхности электрода, а выше 80 секунд не происходит существенного увеличения содержания ртути при средней ее концентрации в растворе протамина сульфата 0,0453 мкг/л, что ниже предельно допустимой нормы (10 мкг/л).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследований, можно сделать заключение, что методика определения ртути в воде методом инверсионной вольтамперометрии на графитовых электродах, модифицированных золотополимерной композицией может быть адаптирована для определения биоаккумуляционной ртути в фармацевтической субстанции протамина сульфат. Полученные данные свидетельствуют о том, что данный метод можно применять в контроле качества лекарственных средств, как альтернативный экспресс-метод для определения примеси ртути существующему методу многостадийного титрования с дитизионом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузубова Л. И., Шуваева О. В., Аношин Г. Н. Метилртуть в окружающей среде (распространение, образование в природе, методы определения). Новосибирск: ГПНТБ СО РАН. 2000; 82.
2. Петросян В. С. Ртуть и ее соединения в окружающей среде // Человек и среда его обитания. М.: Мир. 2003; 282–290.
3. Eirin-Lopez J. M., Frehlick L. J., Ausio J. Protamines, in the footsteps of linker histone evolution. *J Biol Chem.* 2006; 281: 21–24.
4. Frehlick L. J., Eirin-Lopez J. M., Prado A., Su H. W., Kasinsky H. E., Ausio J. Sperm nuclear basic proteins of two closely related species of Scorpaeniform fish (*Sebastes maliger*, *Sebastolobus* sp.) with different sexual reproduction and the evolution of fish protamines. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.* 2006; 305: 277–287.
5. European Pharmacopoeia 8.0. Available at: <https://archive.org/stream/EuropeanPharmacopoeia80/European-Pharmacopoeia-8-0#page/n6/mode/2up>.
6. Шелковников В. В., Анищенко М. В., Шульга А. Н., Минаев К. М. Графитовые электроды, модифицированные золотополимерной композицией, для определения ртути методом инверсионной вольтамперометрии. *Вестник Томского государственного университета.* 2013; 368: 204–207.
7. Хенце Г. Полярграфия и вольтамперометрия. Теоретические основы и аналитическая практика / Пер. с нем. А. В. Гармаша и А. И. Каменева. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. 2008; 284.
8. Ларина Л. Н. ИВА определение ртути в объектах окружающей среды на модифицированных металлами углеродных электродах: автореф. дис. ... канд. хим. наук. Томск. 2004; 23.
9. Матвейко Н. П., Брайкова А. М., Бушило К. А., Садовский В. В. Инверсионно-вольтамперометрический контроль содержания тяжелых металлов в лекарственном растительном сырье и препаратах на его основе. *Вестник витебского государственного технологического университета.* 2016; 1(30): 82–85.
10. Галимова В. Электрохимический контроль микроколичеств ртути в воде. *Вестник Львовского университета. Серия химическая.* 2016; 57(2): 588–592.
11. ФР.1.31.2005.01450 «Воды природные, питьевые, технологически чистые, очищенные сточные. Вольтамперометрический метод измерения массовой концентрации ртути». Томск. 2004.

REFERENCES

1. Kuzubova L. I., Shuvaeva O. V., Anoshin G. N. Methylmercury in the environment (distribution, education in nature, methods of determination). Novosibirsk: GPNTB so ran. 2000; 82.
2. Petrosyan V. S. Mercury and its compounds in the environment // Man and his environment. M.: World. 2003; 282–290.
3. Eirin-Lopez J. M., Frehlick L. J., Ausio J. Protamines, in the footsteps of linker histone evolution. *J Biol Chem.* 2006; 281: 21–24.
4. Frehlick L. J., Eirin-Lopez J. M., Prado A., Su H. W., Kasinsky H. E., Ausio J. Sperm nuclear basic proteins of two closely related species of

Scorpaeniform fish (*Sebastes maliger*, *Sebastolobus* sp.) with different sexual reproduction and the evolution of fish protamines. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.* 2006; 305: 277–287.

5. European Pharmacopoeia 8.0. Available at: <https://archive.org/stream/EuropeanPharmacopoeia80/European-Pharmacopoeia-8-0#page/n6/mode/2up>.
6. Shelkovnikov V. V., Anishchenko M. V., Shulga A. N., Minaev K. M. Graphite electrodes modified by gold-polymer composition for mercury determination by inversion voltammetry. *Bulletin Of Tomsk State University.* 2013; 368: 204–207.
7. Henze G. Polarography and voltammetry. Theoretical foundations and analytical practice / translated from German V. A. Garmash, A. I. Kamenev. – M.: BINOM. Knowledge laboratory. 2008; 284.
8. Larina L. N. IVA determination of mercury in environmental objects on carbon electrodes modified by metals: autoref. dis. ... kand. chem. Sciences. Tomsk. 2004; 23.
9. Matveiko N. P., Braikova A. M., Bachilo K. A., V. V. Sadovskii K. A. Inversion-voltammetric monitoring of heavy metals in herbal drugs and preparations on its basis. *Vestnik of Vitebsk state technological University.* 2016; 1(30): 82–85.
10. Galimova V. Electrochemical control of micro-quantities of mercury in water. *Bulletin of Lviv University. Series chemical.* 2016; 57(2): 588–592.
11. ФР.1.31.2005.01450 «Vody prirodnye, pit'evye, tehnologicheski chistye, ochishhennye stochnye. Vol'tamperometricheskij metod izmerenija massovoj koncentracii rtuti». Tomsk, 2004.