

Оригинальная статья/Research article

Валидация методики определения микропримесей ртути в протамине сульфата методом инверсионной вольтамперометрии

Н. О. Ким^{1*}, Е. А. Ивановская¹

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

*Контактное лицо: Ким Надежда Олеговна. E-mail: Kim_Nadia@mail.ru

Статья получена: 07.10.2019. Статья принята к печати: 05.02.2020

Резюме

Введение. В статье представлены результаты валидации разработанной нами методики – инверсионной вольтамперометрии (ИВА) – по определению примеси ртути в лекарственном препарате протамин сульфат. Оценили показатели правильности и прецизионности (сходимость, внутрилабораторная прецизионность), специфичности и определили предел количественного определения (ПКО). Для подтверждения правильности и специфичности результатов методики ИВА было определено содержание ртути в протамине сульфата следующими методами: атомно-адсорбционной спектроскопией (ААС), рентгенфлуоресцентной спектрометрией (РФС) и фармакопейным методом, согласно Европейской фармакопеи.

Цель. Валидация разработанной нами методики (метод инверсионной вольтамперометрии) определения микропримеси ртути в протамине сульфата.

Материалы и методы. Протамин сульфат раствор для инъекций 10 мг/мл (производитель – ОАО «Новосибхимфарм», г. Новосибирск, Россия) был взят в качестве объекта исследования. Методика инверсионной вольтамперометрии была разработана на полуавтоматическом анализаторе ТА-4 (ООО НПП «Томьаналит», г. Томск) с программным обеспечением VALabTx в комплекте. Атомно-адсорбционная спектроскопия была выполнена в институте неорганической химии им. А. В. Николаева (ИНХ СО РАН). Рентген – флуоресцентный анализ выполнен на базе ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный университет». Определение ртути фармакопейным методом проводили совместно с ОАО «Новосибхимфарм».

Результаты и обсуждение. Провели валидацию разработанной методики на правильность и повторяемость. Повторяемость оценивали по 10-ти измерениям, коэффициент вариации составил 7,8. Провели проверку внутрилабораторной прецизионности по 6-ти измерениям, коэффициент вариации составил 7,9 и 7,4 у аналитика № 1 и аналитика № 2 соответственно. Согласно нашей методики содержание ртути в протамине сульфата составляет 0,03 ppm. Сравнили результаты с другими методами определения ртути в органических объектах. При определении ртути методом ААС результат получился ≤0,5 ppm, при РФС – 0,1 ppm. Результаты фармакопейного метода нельзя считать достоверными ввиду отсутствия повторяемости и воспроизводимости.

Заключение. Провели валидацию разработанной нами ранее методики определения примеси ртути в протамине сульфата методом инверсионной вольтамперометрии. Результаты нашей методики сопоставимы с результатами других методов анализа, таких как ААС и РФС. Разработанная нами методика может быть использована для контроля качества этого лекарственного препарата.

Ключевые слова: инверсионная вольтамперометрия, валидация метода, протамин сульфат.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Е. А. Ивановская придумала эксперимент. Н. О. Ким разработала методику определения ртути в протамине сульфата, провела валидацию методики, обработку данных. Е. А. Ивановская, Н. О. Ким проводили интерпретацию результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Ким Н. О., Ивановская Е. А. Валидация методики определения микропримесей ртути в протамине сульфата методом инверсионной вольтамперометрии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(1): 60–64.

Validation of Method for Mercury Impurities Determination in Protamine Sulfate by Stripping Voltammetry

Nadezhda O. Kim^{1*}, Elena A. Ivanovskaja¹

1 – Novosibirsk State Medical University NOVOSIBSMU, 52, Krasny prospect, Novosibirsk, 630091, Russia

*Corresponding author: Nadezhda O. Kim. E-mail: Kim_Nadia@mail.ru

Received: 07.10.2019. Accepted: 05.02.2020

Abstract

Introduction. The article presents the results of the validation of our developed method – stripping voltammetry (SVA) used for mercury impurities determination in protamine sulfate. Procedure was validated in terms of specificity, accuracy, precision (repeatability and intermediate precision), and LLOQ. To confirm the results of the SVA method, we choose as comparative analyzes for mercury content determination in protamine sulfate generally accepted methods: atomic absorption spectroscopy (AAS), X-ray fluorescence spectrometry (XRF), and the pharmacopeia method according to the European Pharmacopoeia.

Aim. Validation of method developed for mercury impurities determination in protamine sulphate by stripping voltammetry.

Materials and methods. Protamine sulfate solution for injection 10 mg/mL (Novosibhimpharm, Novosibirsk, Russia) was used as a study object. The method of stripping voltammetry was performed at TA-4 semi-automatic analyzer (Tomanalit, Tomsk) with VALabTx software included. At the A. V. Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry (Institute of Inorganic Chemistry SB RAS) atomic absorption spectroscopy was performed. At the Pacific State University was carried out X-ray fluorescence spectrometry. We carried out the pharmacopeia method in conjunction with «Novosibhimpharm» factory.

Results and discussion. We validated the developed method for accuracy and precision. We evaluated the repeatability by 10 measurements; the coefficient of variation was 7.8. We tested the intermediate precision for six measurements; the coefficient of variation was 7.9 and 7.4 for analyst № 1 and analyst № 2, respectively. According to our methodology, the mercury impurities content in protamine sulfate is 0.03 ppm. We compared our results with other generally accepted methods for the mercury determination in organic objects. When determining mercury by the AAS method, the result was ≤ 0.5 ppm, with XRF – 0.1 ppm. Pharmacopeia method results cannot be reliable due to the lack of repeatability.

Conclusion. We validated the previously developed method for mercury impurities determination in protamine sulfate by stripping voltammetry. The results of our method are comparable with the results of other methods, such as AAS and XRF. That Therefore stripping voltammetry can be used in quality control of protamine drug products.

Keywords: stripping voltammetry, mercury, validation of the method, protamine sulfate.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Elena A. Ivanovskaja invented the experiment. Nadezhda O. Kim developed the method, held the validation. Elena A. Ivanovskaja, Nadezhda O. Kim held results interpretation. All authors took part in the discussion of the results and writing the text of the article.

For citation: Kim N. O., Ivanovskaja E. A. Validation of method for mercury impurities determination in protamine sulfate by stripping voltammetry. *Drug development & registration*. 2020; 9(1): 60–64.

ВВЕДЕНИЕ

Аналитические методы широко применяются на всех стадиях разработки лекарственных средств (ЛС), включая синтетические, технологические, биофармацевтические, фармакокинетические исследования. Этап перехода к промышленному производству сопровождается адаптацией разработанных методик к условиям фармацевтического предприятия, а также проверки стабильности основных показателей качества на опытно-промышленных сериях ЛС [1]. Определение токсических элементов в ЛС органического происхождения в наше время является актуальной проблемой. Ртуть относится к таким элементам [2]. Согласно Европейской фармакопее (Ph. Eur.) [3] протамина сульфат состоит из сульфатов основных пептидов, извлеченных из спермы или икры рыб, обычно видов *Salmonidae* и *Clupeidae*. На сегодняшний день протамины – это единственные препараты, которые используют в медицинской практике для нейтрализации гепарина [4], и благодаря этому свойству протамин используется в кардиохирургии, сосудистой хирургии и интервенционных радиологических процедурах [5]. Согласно нормативной документации (сертификат анализа) в субстанции протамина содержится примесь ртути (количество которой не должно превышать 10 ppm). В связи с этим нами была разработана методика для определения примеси ртути методом инверсионной вольтамперометрии. Каждая новая методика требует валидации и подтверждения.

Проведя литературный обзор по существующим методам определения ртути в ЛС, остановились на трех методах для проверки правильности нашей методики.

Фармакопейный метод – экстракционно-фотолориметрический, основанный на использовании при определении ртути дитизона для количественного определения данного элемента в биологических объ-

ектах с образованием желто-оранжевого комплекса ртуть(II)-иона с дитизоном и последующим спектрофотометрическим определением [6].

Атомно-адсорбционная спектроскопия с индуктивно связанной плазмой (метод «холодного пара»). Метод заключается в восстановлении ионов ртути до металлической ртути, получении с помощью генератора атомного пара паров ртути, последующей их отгонке потоком воздуха или инертного газа в абсорбционную ячейку атомно-абсорбционного спектрометра. Концентрацию паров ртути определяют по резонансному абсорбционному поглощению УФ-света с длиной волны 253,7 нм от ртутной лампы [7].

Рентгенофлуоресцентная спектрометрия (РФС) – позволяет определять концентрацию элементов от Be (№ 4) до U (№ 92) в диапазоне от ppm до 100 % в различных веществах и материалах. Метод основан на зависимости интенсивности рентгеновского излучения от концентрации элемента в образце. В работе используются волнодисперсионные спектрометры с флуоресцентным излучением, которое разлагается в спектр при помощи кристаллов-монокроматоров, а затем детектируется и количественно измеряется его интенсивность [8].

Цель исследования. Валидация разработанной нами методики определения примеси ртути в растворе протамина сульфата инверсионной вольтамперометрией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили протамины сульфат раствор для инъекций 10 мг/мл. Производитель ОАО «Новосибхимфарм» (г. Новосибирск).

Методику определения примеси ртути в протамине сульфата методом инверсионной вольтамперометрии разработали на электрохимическом анализаторе ТА-4 (ООО НПП «Томъаналит», г. Томск) с программным обеспечением VALabTx в комплекте.

Для проверки специфичности и правильности разработанной методики использовали атомно-адсорбционную спектроскопию (метод «холодного пара»), рентгенофлуоресцентную спектрометрию и фармакопейный метод.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Объектом исследования является бесцветная прозрачная жидкость раствор для инъекций протамин-сульфат с концентрацией 10 мг/мл. Ранее нами была разработана методика определения примеси ртути в протамине сульфата методом инверсионной вольтамперометрии. Установлены параметры измерения: время растворения – 10 с, время накопления – 80 с, уровень вибрации на этапе накопления – 9 с, время успокоения – 5 с. Содержание ртути рассчитывается автоматически по формуле:

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

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.

Валидацию разработанной методики провели в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи (ГФ) по ОФС 1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [9]. При валидации методики количественного определения примесей должны быть обязательно проверены показатели специфичности и ПКО.

Для определения специфичности и правильности методики мы сравнили полученные нами результаты с результатами, выданными методами атомно-адсорбционной спектрометрии (являющейся заведомо специфичной для определения примесей ртути согласно ОФС 1.2.2.2.005.15), рентген-флуоресцентной спектрометрии и фармакопейного метода анализа.

Атомно-адсорбционный метод был выполнен в институте неорганической химии им. А. В. Николаева (ИНХ СО РАН). Содержание ртути в растворе серии 40216 составило $\leq 0,5$ ppm. Расчет производится автоматически. Погрешность определения ± 10 %.

Рентген – флуоресцентный анализ выполнен на базе ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный университет» на приборе «СПЕКТРОСКАН МАКС-GV». Содержание ртути в образце (раствор серии 40216) составило 0,0001 мас. % (0,1 ppm). Расчет производится автоматически. Погрешность метода варьируется в пределах 0,2–3 %. График с пиком ртути представлен на рисунке 1.

Фармакопейный метод выполняли совместно с ОАО «Новосибхимфарм». Согласно методики 2,0 г субстанции протамин сульфата вносят в коническую

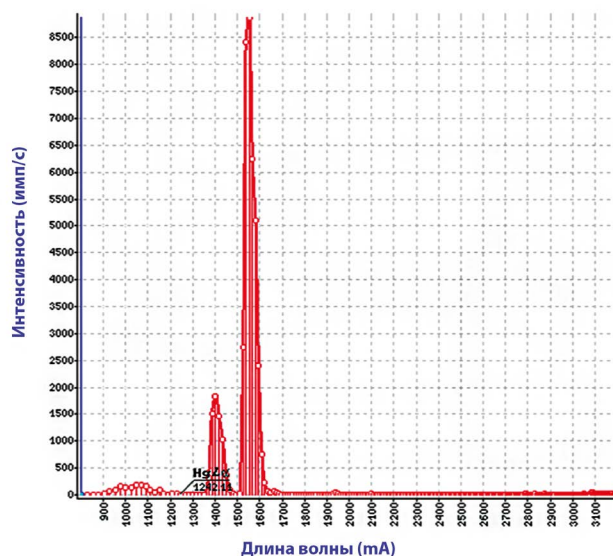


Рисунок 1. Спектр образца раствора серии 40216, полученный на спектрометре «СПЕКТРОСКАН МАКС-GV»

Figure 1. The spectrum of a sample of a solution of the 40216 series obtained on the spectrometer «СПЕКТРОСКАН МАКС-GV»

колбу вместимостью 250 мл с притертой пробкой, прибавляют 20 мл смеси, состоящую из равных объемов азотной концентрированной и серной концентрированной кислот, кипятят с обратным холодильником в течение 1 ч, охлаждают до комнатной температуры и, с осторожностью прибавляют 100 мл воды. Кипятят до удаления азотных паров. Раствор охлаждают до комнатной температуры, осторожно прибавляют воды до 200 мл, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр. 50 мл фильтрата помещают в делительную воронку, встряхивают с последовательно добавляемыми небольшими количествами хлороформа до обесцвечивания хлороформного слоя. Хлороформный слой отбрасывают. К водному слою прибавляют 25 мл серной кислоты разведенной, 115 мл воды и 10 мл раствора гидроксилламина гидрохлорида концентрацией 200 г/л. Полученный раствор титруют раствором дитизона R2, встряхивая 20 раз смесь после каждого добавления титранта, к концу титрования удаляют хлороформный слой и далее титруют до получения голубовато-зеленой окраски раствора. Рассчитывают содержание ртути, используя эквивалентное содержание ртути в мкг/мл титранта, определяемое по стандартному раствору дитизона R2.

Дитизона раствор R2 готовят следующим образом: растворяют 40,0 мг дитизона в хлороформе и прибавляют до 1000,0 мл тем же растворителем. Разводят 30,0 мл полученного раствора до 100,0 мл хлороформом [3]. Для минерализации протамин сульфата использовали 80 мл формальдегида с помощью которого маскировались окислители. Спектр протамин больше схож по конфигурации со спектрами эталонных растворов (есть отличие в гипсохромном сдвиге, сдвиге в длинноволновую область). Спектр «поднял-

ся» по оси ординат (ось оптической плотности) и расположился выше отрицательной области. Оптическая плотность в максимуме поглощения дитизоната ртути была чуть больше оптической плотности дитизоната ртути эталонного раствора, содержащего 15 мкг ионов ртути. Результаты по фармакопейному методу считать достоверными нельзя, так как отсутствует повторяемость и воспроизводимость этого метода.

Прецизионность оценивали в двух вариантах. Проверили повторяемость методики на растворе серии 40216. Оценку проводили по независимым результатам, полученным в одинаковых условиях в одной лаборатории [9]. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты повторяемости разработанной методики инверсионной вольтамперометрии

Table 1. Repeatability results of the developed inversion voltammetry technique

№ анализа	Содержание ртути, мг/л
1	0,00283
2	0,00275
3	0,00294
4	0,00253
5	0,00229
6	0,00292
7	0,00297
8	0,00252
9	0,00291
10	0,00271
Среднее значение, мг/л	0,00274
Стандартное отклонение	0,000214
Коэффициент вариации, %	7,8

В результате исследования коэффициент вариации составил меньше 10 %, что говорит о незначительной изменчивости вариационного ряда.

Внутрилабораторная прецизионность проверялась двумя аналитиками в разные дни по результатам 6-ти измерений. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Из таблицы 2 видно, что коэффициент вариации у двух разных аналитиков составил 7,9 и 7,5 %, что дает право утверждать, что методика валидирована по прецизионности.

Для определения предела количественного определения (ПКО) были приготовлены растворы с концентрацией от $1,0 \cdot 10^{-1}$ до $1,0 \cdot 10^{-7}$ мг/л, путем разбавления в 10 раз. Анализ растворов проводили при стандартных условиях – время растворения 10 с, время накопления 60 с, время успокоения 5 с. В качестве добавки использовали раствор ртути с концентрацией 0,1 мг/л. Результаты приведены в таблице 3.

Таблица 2. Результаты определения внутрилабораторной прецизионности

Table 2. The results of the determination of intralaboratory precision

	Образец	Содержание ртути, мг/л	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации, %
Аналитик № 1	1	0,00272	0,000198	7,9
	2	0,00218		
	3	0,00259		
	4	0,00270		
	5	0,00233		
	6	0,00240		
	Среднее (n = 6)	0,00249		
Аналитик № 2	1	0,00273	0,000180	7,5
	2	0,00253		
	3	0,00236		
	4	0,00218		
	5	0,00226		
	6	0,00241		
	Среднее (n = 6)	0,00241		

Таблица 3. Определение предела количественного определения

Table 3. The definition of the limit of quantification

Концентрация ртути в приготовленном растворе (проба), мг/л	Концентрация ртути, определяемая прибором, мг/л	Предел повторяемости, г, %	Ошибка
$1 \cdot 10^{-1}$	$1,1 \cdot 10^{-1}$	0,0211	$\pm 0,03$
$1 \cdot 10^{-2}$	$1,0 \cdot 10^{-2}$	0,00209	$\pm 0,003$
$1 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^{-3}$	0,000307	$\pm 0,0003$
$1 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-4}$	0,0000332	$\pm 0,00005$
$1 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-5}$	0,00000103	$\pm 0,000004$
$1 \cdot 10^{-6}$	$1,25 \cdot 10^{-6}$	0,000000183	$\pm 0,0000005$
$1 \cdot 10^{-7}$	Сигнал не обнаружен		

Как следует из результатов, порядок определяемой концентрации стандартного раствора совпадает, а погрешность измерения составляет не более ± 20 %. При концентрации $1,0 \cdot 10^{-7}$ мг/л пика ртути на вольтамперограмме нет. С уменьшением концентрации точность измерения уменьшается.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные методом инверсионной вольтамперометрии, сопоставимы с результатами других аналитических методов, таких как ААС и РФС. Фармакопейный метод не имеет воспроизводимых результатов, поэтому его результаты не могут считаться

достоверным на данный момент. Согласно выполненной валидационной оценке, методика определения микропримесей ртути в протамине сульфата инверсионной вольтамперометрии является правильной, воспроизводимой и специфичной. Установили, что при концентрации $1,0 \cdot 10^{-7}$ мг/л пик ртути отсутствует на вольтамперограмме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляев В. А., Федота Н. В., Горчаков Э. В. Фармацевтическая химия. Учебно-методическое пособие. АГРУС. 2013: 33.
2. Человек и среда его обитания. Хрестоматия. В. С. Петросян автор главы: ртуть и ее соединения в окружающей среде. *Мир*. 2003: 282–290.
3. European Pharmacopoeia 8.0. Available at: <https://archive.org/stream/EuropeanPharmacopoeia80/European-Pharmacopoeia-8-0#page/n6/mode/2up>.
4. Eirin-Lopez J. M., Lewis J. D., Howe I. A., Ausio J. Common phylogenetic origin of protamine-like (PL) proteins and histone H1: Evidence from bivalve PL genes. *Mol Biol Evol*. 2006; 23: 1304–1317.
5. Van Den Bussche R. A., Hoofer S. R., Hansen E. W. Characterization and phylogenetic utility of the mammalian protamine P1 gene. *Mol Phylogenetics Evol*. 2002, 22: 333–341.
6. Костенко Е. Е., Штокало М. И. Твердофазная спектрофотометрия – эффективный метод определения тяжелых металлов в пищевых объектах. *РЖ 19ГД. Аналитическая химия. Оборудование лабораторий*. 2005; 59(13): 1276–1282.
7. Спирова С. Н. Исследование содержания примесных элементов (кадмий, свинец, ртуть) в лекарственных средствах и сырье природного происхождения. *Автореферат дис. ... канд. фарм. н.: 15.00.02*. 1995: 24.
8. van Sprang H. A. Fundamental parameter methods in XRF spectroscopy. *Advances in X-ray Analysis*. 2000; 42.
9. Государственная фармакопея российской Федерации. Т. I. МЗСР РФ. 13-е изд. Научный центр экспертизы средств медицинского применения. 2015: 1470.

REFERENCES

1. Belyaev V. A., Fedota N. V., Gorchakov E. V. Pharmaceutical Chemistry. Teaching aid. AGRUS. 2013: 33 (in Russ.).
2. Man and his environment. An anthology. V. S. Petrosyan author of the chapter: mercury and its compounds in the environment. *World*. 2003: 282–290 (in Russ.).
3. European Pharmacopoeia 8.0. Available at: <https://archive.org/stream/EuropeanPharmacopoeia80/European-Pharmacopoeia-8-0#page/n6/mode/2up>.
4. Eirin-Lopez J. M., Lewis J. D., Howe I. A., Ausio J. Common phylogenetic origin of protamine-like (PL) proteins and histone H1: Evidence from bivalve PL genes. *Mol Biol Evol*. 2006; 23: 1304–1317.
5. Van Den Bussche R. A., Hoofer S. R., Hansen E. W. Characterization and phylogenetic utility of the mammalian protamine P1 gene. *Mol Phylogenetics Evol*. 2002, 22: 333–341.
6. Kostenko E. E., Shtokalo M. I. Solid-phase spectrophotometry is an effective method for determining heavy metals in food objects. *RZh 19GD. Analytical chemistry. Laboratory equipment*. 2005; 59(13): 1276–1282 (in Russ.).
7. Spirova S. N. Investigation of the content of impurity elements (cadmium, lead, mercury) in medicines and raw materials of natural origin. *Abstract of the dissertation of the Cand. of Sci.: 15.00.02*. 1995: 24 (in Russ.).
8. van Sprang H. A. Fundamental parameter methods in XRF spectroscopy. *Advances in X-ray Analysis*. 2000; 42.
9. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. T. I. MHSD of the Russian Federation. 13th ed. *Scientific center for the examination of medical applications*. 2015: 1470 (in Russ.).