

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БРИЛЛИАНТОВОГО ЗЕЛЕННОГО И ЙОДА КРИСТАЛЛИЧЕСКОГО В СПИРТОСОДЕРЖАЩИХ АНТИСЕПТИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ

АДАМЕНКО Г.В., МАРЦИНКЕВИЧ А.Ф.

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

Вестник ВГМУ. – 2020. – Том 19, №2. – С. 89-95.

VALIDATION OF QUANTITATIVE DETERMINATION METHODS OF BRILLIANT GREEN AND CRYSTALLINE IODINE IN ALCOHOL-CONTAINING ANTISEPTIC MEDICINAL AGENTS

ADAMENKO G.V., MARTSINKEVICH A.F.

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2020;19(2):89-95.

Резюме.

Валидация аналитической методики проводится с целью экспериментального доказательства пригодности методики для решения предполагаемой задачи. Валидации подлежат методики количественного определения, в том числе методики определения примесей и методики определения предела содержания. При валидации методик количественного определения активных фармацевтических субстанций и других компонентов ЛС применяют одинаковые валидационные характеристики. При валидации проводится оценка аналитической методики по следующим характеристикам: специфичности, пределу обнаружения, пределу количественного определения, аналитической области, линейности, правильности, прецизионности, устойчивости. Выбор характеристики зависит от типа методики.

Целью исследования являлась адаптация и валидация методик количественного определения бриллиантового зелёного в антисептических лекарственных средствах «Витасепт-СКЗ» и «Витасепт-СКЗ-А» и йода кристаллического в «Витасепт-СКИ».

Объекты исследований – ЛС на основе спирта этилового с бриллиантовым зелёным («Витасепт-СКЗ», «Витасепт-СКЗ-А»), йодом кристаллическим («Витасепт-СКИ») для профилактической антисептики.

Предмет исследования – методики количественного определения в ЛС бриллиантового зелёного («Витасепт-СКЗ», «Витасепт-СКЗ-А») и йода кристаллического («Витасепт-СКИ») методом титрования.

Валидацию проводили в соответствии с ТКП 432-2012 (02041) «Производство лекарственных средств. Валидация методик испытаний» и ТКП 438-2012 (02041) «Производство лекарственных средств. Применение статистических методов валидации».

Адаптированы и валидированы методики количественного определения бриллиантового зелёного в антисептических ЛС «Витасепт-СКЗ» и «Витасепт-СКЗ-А» и йода кристаллического в антисептическом ЛС «Витасепт-СКИ» методом титрования по показателям специфичности, линейности, сходимости, внутрилабораторной прецизионности, правильности и диапазону определяемых содержаний.

Ключевые слова: валидация, титрование, йодометрия, Витасепт-СКЗ, Витасепт-СКИ, Витасепт-СКЗ-А, бриллиантовый зелёный, йод кристаллический.

Abstract.

The validation of the analytical methodology is carried out with the aim to prove experimentally the suitability of the methods for solving the proposed problem. Quantitative determination methods, including impurity determination ones

and those used for determining the content limit are subject to validation. When validating the methods for quantitative determination of active pharmaceutical substances and other components of drugs, the same validation characteristics are used. During validation, the analytical methodology is evaluated according to the following characteristics: specificity, detection limit, limit of quantification, analytical domain, linearity, correctness, precision, stability. The characteristics choice depends on the technique type.

The aim of the study was the adaptation and validation of quantitative determination methods of brilliant green in the antiseptic drugs «Vitasept-SKZ» and «Vitasept-SKZ-A» and crystalline iodine in «Vitasept-SKI».

Drugs based on ethyl alcohol with brilliant green («Vitasept-SKZ», «Vitasept-SKZ-A»), crystalline iodine («Vitasept-SKI») used for prophylactic antiseptics served as an object of research.

The subject of the study was the methods for quantitative determination of brilliant green («Vitasept-SKZ», «Vitasept-SKZ-A») and crystalline iodine («Vitasept-SKI») in drugs by means of titration.

Validation was carried out in accordance with TKP 432-2012 (02041) «Production of medicines. Validation of test methods» and TKP 438-2012 (02041) «Production of medicines. Application of statistical validation methods».

The techniques for quantitative determination of brilliant green in «Vitasept-SKZ» and «Vitasept-SKZ-A» and crystalline iodine in «Vitasept-SKI» antiseptic medicinal agents with the help of titration method according to the indices of specificity, linearity, convergence, intralaboratory precision, correctness and range of defined contents have been adapted and validated.

Key words: validation, titration, iodometry, Vitasept-SKZ, Vitasept-SKI, Vitasept-SKZ-A, brilliant green, crystalline iodine.

Качество является важнейшей составляющей наряду с безопасностью и эффективностью в характеристике лекарственного средства (далее ЛС). Для достижения качества ЛС должны выдерживать установленные для них требования, изложенные в нормативной документации. Одним из показателей качества ЛС является содержание активных фармацевтических субстанций. Содержание активных фармацевтических субстанций и других компонентов определяется различными аналитическими методами. Все методики количественного определения должны проходить процедуру валидации [1-4].

При валидации методик количественного определения активных фармацевтических субстанций и других компонентов ЛС применяют одинаковые валидационные характеристики. Методику количественного определения валидируют по таким показателям, как правильность, прецизионность, внутрилабораторная прецизионность, специфичность, линейность, диапазон применения [3-5].

Для определения бриллиантового зеленого и йода кристаллического в водных и неводных растворителях применяют титриметрический метод количественного определения. Широко используется йодометрия, которая представляет собой метод количественного химического анализа, в основе которого лежат окислительно-восстановительные свойства йода. По сравнению с другими титриметрическими методами йодометрия

отличается высокой степенью точности и надежности полученных данных. Кроме того, йод хорошо растворяется в неводных растворителях, в частности в спирте этиловом [6-9].

Целью исследования являлась адаптация и валидация методик количественного определения бриллиантового зеленого в антисептических лекарственных средствах «Витасепт-СКЗ» и «Витасепт-СКЗ-А» и йода кристаллического в «Витасепт-СКИ».

Материал и методы

Объекты исследований – ЛС на основе спирта этилового марки «Люкс» производства ОАО «Бобруйский завод биотехнологий» с бриллиантовым зелёным («Витасепт-СКЗ», «Витасепт-СКЗ-А»), йодом кристаллическим («Витасепт-СКИ») для профилактической антисептики. Предмет исследования – методики количественного определения в ЛС бриллиантового зеленого («Витасепт-СКЗ», «Витасепт-СКЗ-А») и йода кристаллического («Витасепт-СКИ») методом титрования.

В работе использовали следующее оборудование: бюретки для титрования, колбы для титрования, химические реактивы (серная кислота 16,0%, 0,05 М йод, 0,01 М натрия тиосульфат).

Методика количественного определения бриллиантового зеленого: 6,0 мл ЛС помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибав-

ляют 10 мл серной кислоты разведенной Р 16%, 25,0 мл 0,01 М раствора йода, взбалтывают, доводят объем раствора водой очищенной Р до метки, перемешивают и отстаивают на протяжении 10 мин. Полученный раствор быстро фильтруют через вату, отбрасывая первые 15 мл фильтрата. 50,0 мл полученного фильтрата титруют 0,01 М раствором натрия тиосульфата (индикатор – 0,5 мл раствора крахмала) до обесцвечивания раствора. Параллельно проводят контрольный опыт. Для расчета используют формулу (1):

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \times K \times 0,005932 \times 100 \times 100}{50 \times V} \quad (1)$$

где:

V_1 – объем 0,01 М раствора натрия тиосульфата, использованный на титрование в контрольном опыте, в миллилитрах;

V_2 – объем 0,01 М раствора натрия тиосульфата, использованный на титрование испытуемого раствора, в миллилитрах;

K – поправочный коэффициент к молярности 0,01 М раствора натрия тиосульфата;

V – объем ЛС, взятый для анализа, в миллилитрах;

0,005932 – количество бриллиантового зеленого, соответствующее 1 мл 0,01 М раствора йода [10].

Методика количественного определения йода кристаллического: 2,0 см³ лекарственного средства помещали в коническую колбу вместимостью 200,0 см³ с притертой пробкой и титровали 0,01 М раствором натрия тиосульфата до обесцвечивания. Содержание йода в средстве вычисляли по формуле (2):

$$X = \frac{V_1 \times k_1 \times 1,269}{V} \quad (2)$$

где:

X – содержание йода в средстве, мг/см³;

V_1 – объем 0,01 М раствора натрия тиосульфата, в см³;

V – объем ЛС, взятого на титрование, в см³;

k_1 – поправочный коэффициент 0,01 М раствора натрия тиосульфата;

1,269 – количество йода, мг, соответствующее 1,0 см³ 0,01 М раствора натрия тиосульфата [10].

Валидацию проводили в соответствии с ТКП 432-2012 (02041) «Производство лекарственных средств. Валидация методик испытаний» и ТКП 438-2012 (02041) «Производство лекарственных средств. Применение статистических методов валидации» [3-5].

Результаты и обсуждение

Методика количественного определения бриллиантового зеленого в антисептических ЛС «Витасепт-СКЗ» и «Витасепт-СКЗ-А» методом титрования позволяла проводить определение бриллиантового зеленого в присутствии других компонентов, входящих в состав ЛС. Величина аналитического сигнала, получаемого при исследовании плацебо, была равна 0,00% от значения аналитического сигнала, соответствующего нижней границе определяемого содержания бриллиантового зеленого в ЛС, и, таким образом, не превышала пороговое значение в 2,0%, что подтверждало специфичность методики.

При определении линейности методики были приготовлены стандартные растворы с содержанием бриллиантового зеленого (0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,125 и 0,15 мг/см³). Полученные результаты титрования приведены в таблице 1.

По полученным данным строили график зависимости содержания анализируемого вещества и визуально оценивали линейность по графику (рис. 1).

Коэффициент аппроксимации (R^2) был равен 0,9999, что удовлетворяет критериям приемлемости. Пересечения с осью Y при значении аналитического сигнала, соответствующего 100% содержанию бриллиантового зеленого, состави-

Таблица 1 – Результаты титрования испытуемых растворов

С, мг/см ³ стандартного раствора	С, мг/см ³ испытуемого раствора (среднее)
0,01	0,010
0,025	0,025
0,05	0,051
0,1	0,102
0,125	0,126
0,15	0,152

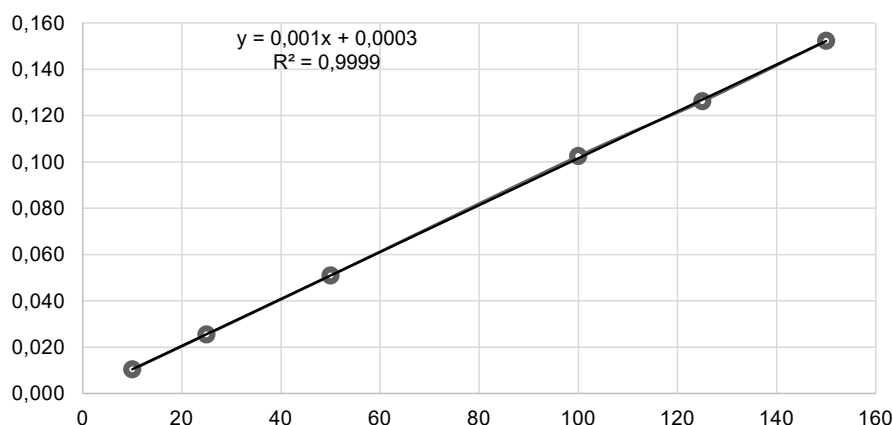


Рисунок 1 – Градуировочный график, уравнение регрессии, коэффициент аппроксимации R^2 .

Таблица 2 – Полученные результаты титрования испытуемых растворов и обработка данных

$C_{\text{введено}}, \text{мг/см}^3$	$C_{\text{найденно}}, \text{мг/см}^3$					$\bar{N}, \text{мг/см}^3$	RSD, %
0,01	0,010	0,010	0,010	0,011	0,010	0,010	1,92
0,025	0,025	0,025	0,026	0,025	0,026	0,025	1,65
0,050	0,050	0,052	0,051	0,050	0,050	0,051	1,40
0,100	0,102	0,101	0,103	0,102	0,105	0,102	1,58
0,125	0,126	0,125	0,128	0,125	0,125	0,126	1,03
0,150	0,154	0,150	0,155	0,151	0,151	0,152	1,41

Таблица 3 – Полученные результаты титрования испытуемых растворов при исследовании внутрилабораторной прецизионности

Номер образца	Аналитик 1/День 1	Аналитик 2/День 2
1	0,102	0,102
2	0,101	0,101
3	0,103	0,102
4	0,102	0,102
5	0,105	0,103
Среднее	0,102	0,101
%RSD	1,58	0,54
Общее среднее	0,102	
Общее %RSD	0,61	
Разность	0,001	

ло 0,29% и не превышало заданных требований (2,0%). Открываемость R, рассчитываемая как отношение средней концентрации, определенной по градуировочному графику, и номинальной концентрации, умноженная на 100%, была в пределах 98-102% и составила в среднем 99,86%. Следовательно, методика является линейной.

Для оценки прецизионности методики были приготовлены на одной среде растворения (спирт этиловый 72,0 об/об %) в течение всего периода исследования модельные растворы бриллиантового зеленого (0,01; 0,1 и 0,125 мг/см³). Результаты исследования модельных рас-

творов приведены в таблице 2.

Относительное стандартное отклонение (RSD) для количественного определения модельных растворов было равно в среднем 1,50% и не превышало 2,0%, что позволяет сделать вывод о прецизионности методики.

Для определения внутрилабораторной прецизионности 5 измерений той же серии были проанализированы другим аналитиком в другой день. Согласно полученным результатам %RSD соответствовало критериям приемлемости (менее 2,0%) и было равно 0,61% (табл. 3).

Была установлена степень соответствия

между истинным значением определяемой величины и результатами, полученными по валидируемой методике. Правильность контролируется путем приготовления модельных растворов бриллиантового зеленого в предполагаемом диапазоне определяемых содержаний методики. Полученное таким образом среднее значение открываемости было равно 99,86% и лежало в диапазоне от 99,42% до 100,91%, что соответствовало заданным требованиям.

Диапазон определяемых содержаний по разработанной методике составляет 0,01-0,15 мг/см³ бриллиантового зеленого.

Методика количественного определения йода кристаллического в антисептическом ЛС «Витасепт-СКИ» методом титрования позволяла проводить определение йода кристаллического в присутствии других компонентов, входящих в состав ЛС. Величина аналитического сигнала, получаемого при исследовании плацебо, не превышала по модулю более чем на 2,0% значение аналитического сигнала, соответствующего нижней границе определяемого содержания бриллиантового зеленого в ЛС, что подтверждало специфичность методики.

При определении линейности методики

были приготовлены стандартные растворы с содержанием йода кристаллического (3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 и 6,0 мг/см³). Полученные результаты титрования приведены в таблице 4.

По полученным данным строили график зависимости содержания анализируемого вещества и визуально оценивали линейность по графику (рис. 2).

Коэффициент аппроксимации (R^2) соответствовал заданным требованиям (не менее 0,99 (0,9999) и был равен 0,9999. Пересечения с осью Y было не более 2,0% значения аналитического сигнала, соответствующего 100% содержанию йода кристаллического, и составило 0,52%. Открываемость R, рассчитываемая как отношение средней концентрации, определенной по градуировочному графику, и номинальной концентрации, умноженная на 100%, была в пределах 98-102%. Следовательно, методика является линейной.

Для оценки прецизионности методики были приготовлены на одной среде растворения (спирт этиловый 72,0 об/об %) в течение всего периода исследования модельные растворы йода кристаллического (3,5, 4,0, 4,5; 5,0; 5,5 и 6,0 мг/см³). Результаты исследования модельных растворов приведены в таблице 5.

Таблица 4 – Результаты титрования испытуемых растворов

С, мг/см ³ стандартного раствора	С, мг/см ³ испытуемого раствора (среднее)
3,50	3,50
4,00	4,00
4,50	4,51
5,00	5,00
5,50	5,51
6,00	5,99

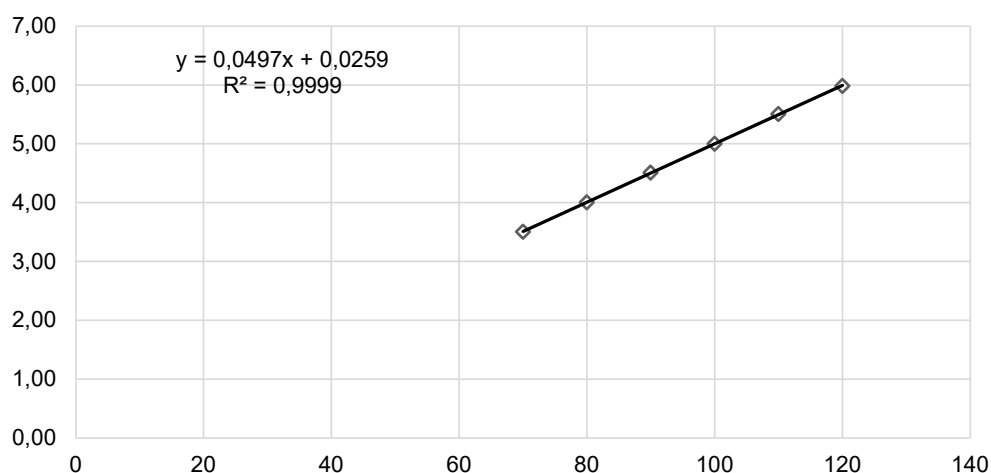


Рисунок 2 – Градуировочный график, уравнение регрессии, коэффициент аппроксимации R^2 .

Таблица 5 – Полученные результаты титрования испытуемых растворов и обработка данных

$C_{\text{введено}}, \text{мг/см}^3$	$C_{\text{найденно}}, \text{мг/см}^3$					$\bar{N}, \text{мг/см}^3$	RSD, %
3,50	3,51	3,49	3,51	3,51	3,50	3,50	0,26
4,00	4,01	4,00	4,00	4,00	4,01	4,00	0,14
4,50	4,51	4,50	4,51	4,52	4,51	4,51	0,16
5,00	5,01	5,00	5,01	4,99	4,99	5,00	0,20
5,50	5,51	5,51	5,51	5,51	5,50	5,51	0,08
6,00	5,99	5,98	5,99	5,99	5,98	5,99	0,09

Таблица 6 – Полученные результаты титрования испытуемых растворов при исследовании внутрилабораторной прецизионности

Номер образца	Аналитик 1/День 1	Аналитик 2/День 2
1	5,01	5,01
2	5,00	5,01
3	5,01	5,01
4	4,99	5,01
5	4,99	5,00
Среднее	5,00	5,01
%RSD	0,20	0,09
Общее среднее	5,00	
Общее %RSD	0,13	
Разность	-0,008	

Относительное стандартное отклонение (RSD) для количественного определения модельных растворов не превышало 2,0% и в среднем составило 0,15%, следовательно, методика прецизионна.

Для определения внутрилабораторной прецизионности 5 измерений той же серии были проанализированы другим аналитиком в другой день. Полученные результаты не отличались (табл. 6).

Была установлена степень соответствия между истинным значением определяемой величины и результатами, полученными по валидируемой методике. Правильность контролируется путем приготовления модельных растворов йода кристаллического в предполагаемом диапазоне определяемых содержаний методики. Значения открываемости находились в диапазоне от 99,84% до 100,18% и в среднем составили 100,00%.

Диапазон определяемых содержаний по разработанной методике составляет 3,5-6,0 мг/см³ йода кристаллического.

Заключение

Адаптированы и валидированы методики количественного определения бриллиантового

зеленого в антисептических ЛС «Витасепт-СКЗ» и «Витасепт-СКЗ-А» и йода кристаллического в антисептическом ЛС «Витасепт-СКИ» методом титрования по показателям специфичности, линейности, сходимости, внутрилабораторной прецизионности, правильности и диапазону определяемых содержаний.

Литература

1. Государственная фармакопея Республики Беларусь : разработана на основе Европейской Фармакопеи : в 2 т. / под общ. ред. А. А. Шерякова. – Молодечно : Победа, 2012. – Т. 1 : Общие методы контроля качества лекарственных средств. – 1220 с.
2. Производство лекарственных средств. Контроль качества : ТКП 428-2017 (33050). – Введ. 2018-04-01. – Изд. офиц. – Минск : М-во здравоохранения Республики Беларусь, 2018. – 40 с.
3. Гризодуб, А. И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств / А. И. Гризодуб. – Харьков : Украин. науч. фармакоп. центр качества лекарств. средств, 2016. – 396 с.
4. Производство лекарственных средств. Валидация методик испытаний : ТКП 432-2012 (02041). – Введ. 2013-03-01. – Изд. офиц. – Минск : Департамент фармацевт. пром-сти М-ва здравоохранения Республики Беларусь, 2012. – 24 с.
5. Производство лекарственных средств. Применение статистических методов валидации : ТКП 438-2012 (02041). – Введ. 2013-03-01. – Изд. офиц. – Минск : Департамент

- фармацевт. пром-сти М-ва здравоохранения Республики Беларусь, 2012. – 32 с.
6. Жебентяев, А. И. Аналитическая химия. Химические методы анализа : учеб. пособие для студентов вузов по фармацевт. и хим. специальностям / А. И. Жебентяев, А. К. Жерносек, И. Е. Талуть. – Минск : Новое знание, 2010. – 541 с.
7. Жебентяев, А. И. Аналитическая химия. Практикум : учеб. пособие / А. И. Жебентяев, А. К. Жерносек, И. Е. Талуть. – Минск : Новое знание ; Москва : ИНФРА-М, 2013. – 428 с.
8. Фармацевтическая химия : учеб. пособие / под ред. А. П. Арзамасцева. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 640 с.
9. Беликов, В. Г. Фармацевтическая химия : учеб. для вузов : в 2 ч. / В. Г. Беликов. – Изд. 3-е, перераб. и доп. – Петрозаводск, 2003. – 720 с.
10. Государственная фармакопея Российской Федерации [Электронный ресурс]. Т. 3 / ред.: Г. В. Авраменко, О. Г. Потанина, Е. В. Буданова. – 13-е изд. – Москва, 2015. – 1294 с. – Режим доступа: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_3_html/HTML/. – Дата доступа: 04.04.2020.

Поступила 12.02.2020 г.

Принята в печать 25.03.2020 г.

References

1. Sheryakov AA, red. State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus: razrab na osnove Evropeiskoi Farmakopei: v 2 t. Molodechno, RB: Pobeda, 2012. T 1: Obshchie metody kontrolya kachestva lekarstvennykh sredstv. 1220 p. (In Russ.)
2. Production of medicines. Quality control: TKP 428-2017 (33050). Vved 2018-04-01. Izd ofits. Minsk, RB: M-vo zdravookhraneniia Respubliki Belarus'; 2018. 40 p. (In Russ.)
3. Grizodub AI. Standardized validation procedures for drug quality control procedures. Kharkov, Ukraine: Ukrain nauch farmakop tsentr kachestva lekarstv sredstv; 2016. 396 p. (In Russ.)
4. Production of medicines. Validation of test procedures: TKP 432-2012 (02041). Vved 2013-03-01. Izd ofits. Minsk, RB: Departament farmatsevt prom-sti M-va zdravookhraneniia Respubliki Belarus'; 2012. 24 p. (In Russ.)
5. Production of medicines. Application of statistical validation methods: TKP 438-2012 (02041). Vved. 2013-03-01. Izd ofits. Minsk, RB: Departament farmatsevt prom-sti M-va zdravookhraneniia Respubliki Belarus'; 2012. 32 p. (In Russ.)
6. Zhebentyaev AI, Zhernosek AK, Talut' IE. Analytical chemistry. Chemical analysis methods: ucheb posobie dlia studentov vuzov po farmatsevt i khim spetsial'nostiam. Minsk, RB: Novoe znanie; 2010. 541 p. (In Russ.)
7. Zhebentyaev AI, Zhernosek AK, Talut' IE. Analytical chemistry. Workshop: ucheb posobie. Minsk, RB: Novoe znanie; Moscow, RF: INFRA-M; 2013. 428 p. (In Russ.)
8. Arzamastsev AP, red. Pharmaceutical chemistry: ucheb posobie. Moscow, RF: GEOTAR-Media; 2008. 640 p. (In Russ.)
9. Belikov VG. Pharmaceutical chemistry: ucheb dlia vuzov: v 2 ch. Izd 3-e, pererab i dop. Pyatigorsk, RF; 2003. 720 p. (In Russ.)
10. Avramenko GV, Potanina OG, Budanova EV, red. State Pharmacopoeia of the Russian Federation [Elektronnyi resurs]. T 3. 13-e izd. Moscow, RF; 2015. 1294 r. Rezhim dostupa: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_3_html/HTML/. Data dostupa: 04.04.2020. (In Russ.)

Submitted 12.02.2020

Accepted 25.03.2020

Сведения об авторах:

Адаменко Г.В. – старший преподаватель кафедры организации и экономики фармации с курсом ФПК и ПК, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет;
Марцинкевич А.Ф. – к.б.н., старший преподаватель кафедры общей и клинической биохимии с курсом ФПК и ПК, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет.

Information about authors:

Adamenko G.V. – senior lecturer of the Chair of Organization & Economy of Pharmacy with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;
Martsinkevich A.F. – Candidate of Biological Sciences, senior lecturer of the Chair of General & Clinical Biochemistry with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210009, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, кафедра организации и экономики фармации с курсом ФПК и ПК. E-mail: geniusadam@mail.ru – Адаменко Геннадий Владимирович.

Correspondence address: Republic of Belarus, 210009, Vitebsk, 27 Frunze ave., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Chair of Organization & Economy of Pharmacy with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining. E-mail: geniusadam@mail.ru – Gennadiy V. Adamenko.