

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|--|----|
| РЕФЕРАТ..... | 3 |
| СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ..... | 4 |
| ВВЕДЕНИЕ | 5 |
| Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР | 7 |
| 1.1 Основные методы определения серебра в фармацевтических препаратах | 7 |
| 1.2 Использование одноразовых толстопленочных электродов в фармацевтическом анализе..... | 15 |
| 1.3 Характеристика исследуемых лекарственных средств..... | 22 |
| 1.4 Постановка задачи..... | 25 |
| Глава 2. Материалы и методы | 27 |
| 2.1 Объекты исследования..... | 27 |
| Глава 3. Разработка и валидация методики потенциметрического определения серебра в фармацевтической субстанции «Аргамид»..... | 29 |
| 3.1 Выбор индикаторного электрода и технология его изготовления | 29 |
| 3.2 Подбор оптимальных условий определения содержания серебра в фармацевтической субстанции сульфадимидина серебра | 31 |
| 3.3 Валидация разработанной методики количественного определения серебра в фармацевтической субстанции «Аргамид» | 37 |
| Глава 4. Определение серебра в готовой лекарственной форме (1% креме «Аргамид»)..... | 54 |
| 4.1. Оценка возможности применения метода осадительного титрования с потенциметрической индикацией КТТ для анализа крема «Аргамид» | 54 |
| 4.2 Разработка методики определения серебра в 1 % креме «Аргамид»..... | 59 |
| 4.3 Валидация разработанной методики количественного определения серебра в 1% креме «Аргамид»..... | 63 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... | 75 |
| БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК | 77 |

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация: «Электрохимическое определение серебра как основного антибактериального компонента в фармацевтической субстанции и готовой лекарственной форме».

Страниц 83, рисунков 15, таблиц 21, библиографических наименований 84.

Ключевые слова: серебряная соль сульфадимидина, количественное определение серебра, потенциметрическое титрование, толстопленочные электроды, метод трафаретной печати, валидация аналитических методик.

Объектами исследования служили фармацевтическая субстанция «Аргамид» и готовая лекарственная форма 1% крем «Аргамид» на основе серебряной соли сульфадимидина (Приоритетная справка на выдачу патента № 2015153574 от 14.12.2015). Данная соль и лекарственные средства на ее основе были разработаны на базе кафедры фармации УГМУ с целью обеспечения российского фармацевтического рынка эффективными антибактериальными и ранозаживляющими лекарственными препаратами отечественного производства согласно стратегии развития фармацевтической промышленности «ФАРМА-2020».

Цель работы: разработка и валидация методик количественного определения серебра в исследуемых лекарственных средствах.

Анализ литературных данных показал, что оптимальным методом определения серебра является метод осадительного титрования с потенциметрической индикацией конечной точки титрования. При этом, учитывая содержание серебра в анализируемых лекарственных средствах, для его определения в субстанции был выбран метод роданометрического, а в готовой лекарственной форме – йодометрического титрования.

Для анализируемых лекарственных средств были подобраны оптимальные условия пробоподготовки: масса навески, концентрация растворителя; время и температура обработки пробы. В качестве индикаторного вместо дорогостоящего импортного серебряного дискового электрода использовали отечественный толстопленочный серебросодержащий электрод.

Положительные результаты валидационной оценки разработанных методик, проведенной согласно требованиям Государственной Фармакопеи РФ XIII изд., позволяют считать их приемлемыми и рекомендовать для включения в проекты фармакопейных статей на исследуемые лекарственные средства. Контроль содержания серебра по разработанным методикам не требует дорогостоящего оборудования, привлечения высококвалифицированного персонала, отличается относительно коротким временем анализа, а, следовательно, может применяться испытательными лабораториями предприятия в процессе производства и центрами контроля качества во время обращения на фармацевтическом рынке исследуемых лекарственных средств.

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

ФС – фармацевтическая субстанция

ГЛФ – готовая лекарственная форма

КТТ – конечная точка титрования

РФС - метод рентгенофлуоресцентной спектрометрии

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

USP - Фармакопея США

Ph. Eur. - Европейская Фармакопея

ТлПЭ – толстоленочный электрод

УПЭ – угольно-пастовый электрод

ПАБК – парааминобензойная кислота

МР – модельные растворы

Е – электродный потенциал

ВВЕДЕНИЕ

Ежегодно в России регистрируется более 12 млн больных с инфицированными ранами, ожогами разной степени тяжести, местными гнойными процессами. На сегодняшний день для лечения данных заболеваний широко используются мягкие лекарственные формы на основе серебряных солей сульфаниламидных препаратов (сульфадиазина и сульфатиазола). Длительное антимикробное действие указанных препаратов обусловлено тем, что олигодинамическое бактериостатическое и бактерицидное действие серебра дополняется противомикробным эффектом сульфаниламида. Однако, в Российской Федерации ни данные препараты, ни фармацевтические субстанции, входящие в их основу, не производятся, несмотря на доказанную эффективность против широко спектра инфекционных заболеваний.

Учитывая потребность в указанном классе препаратов и политику импортозамещения в фармацевтической промышленности, на базе кафедры фармации УГМУ были синтезированы серебряные соли разных сульфаниламидных препаратов, обладающие противомикробным и ранозаживляющим действием (Приоритетная справка на выдачу патента № 2015153574 от 14.12.2015). На их основе были изготовлены готовые (мягкие) лекарственные формы – крема. Результатом данной работы должны стать разработанные фармакопейные статьи на фармацевтические субстанции и лекарственные препараты (крема), включающие методики качественного и количественного анализа. В частности, важной составляющей указанных документов, регламентирующих качество лекарственных средств, должна стать методика количественного определения серебра, поскольку в случае солей достаточным является количественный анализ только фармакологически активного иона, в данном случае – иона серебра [1].

Цель настоящего исследования: разработка методик количественного определения серебра в фармацевтической субстанции и готовой лекарственной форме – 1% креме «Аргамид», на основе серебряной соли сульфадимидина, и их валидационная оценка.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- изучить и проанализировать данные научной литературы о методах определения содержания серебра в лекарственных средствах (фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах), уделив особое внимание анализу лекарственных веществ, схожих по химической природе с объектами исследования;
- выбрать оптимальный метод определения с учетом характера анализируемого соединения – серебряной соли сульфадимидина;

- оценить возможность применения в качестве индикаторного электрода – толстопленочного электрода на основе серебросодержащей пасты, изготовленного на базе ООО НПП «ЭкоБиоТест», Екатеринбург;

- подобрать оптимальные условия пробоподготовки: выбрать массу навески, концентрацию растворителя; время и температуру обработки пробы;

- проверить полноту вскрытия пробы;

- выбрать титрант и его концентрацию для определения содержания серебра в фармацевтической субстанции и 1% креме «Аргамид», учитывая концентрацию действующего вещества в указанных лекарственных средствах;

- провести полную валидационную оценку разработанных методик определения серебра в объектах исследования по актуальным требованиям Государственной Фармакопеи РФ XIII издания.

- составить отчеты по валидации аналитических методик количественного определения серебра в фармацевтической субстанции «Аргамид» и крема «Аргамид»- оценить применимость разработанных методик в фармацевтическом анализе и возможность их дальнейшего использования в контрольно-аналитических целях.

Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Основные методы определения серебра в фармацевтических препаратах

Существует большое количество методов, которые могут быть использованы для количественного определения серебра в различных объектах (природных, промышленных, биологических, фармацевтических, фотографических и т.д.). Основные из них представлены в виде схемы на рисунке 1.

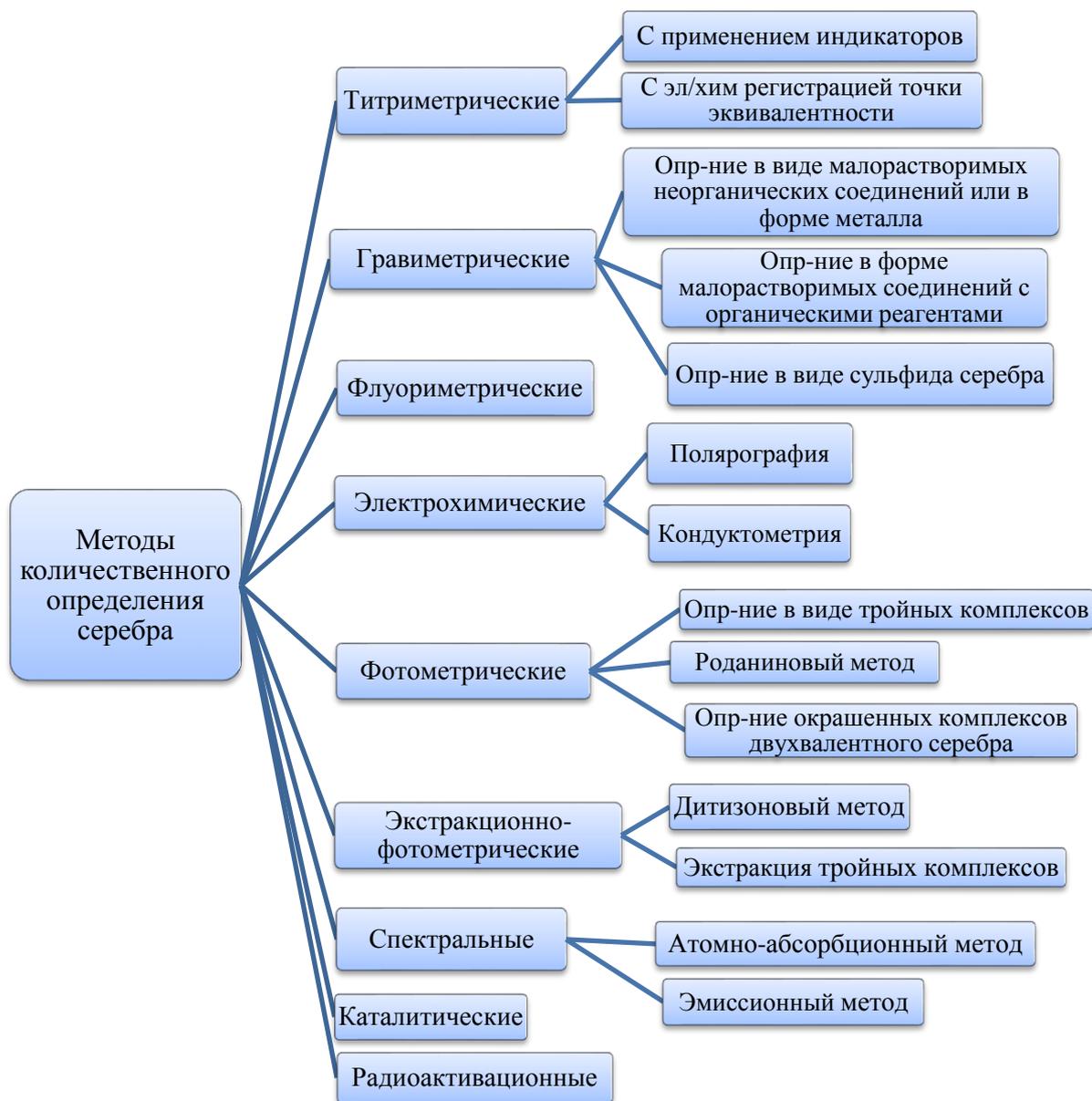


Рисунок 1 - Методы количественного определения серебра

При этом для целей фармацевтического анализа в основном применяются титриметрические, фотометрические и спектральные методы [2]. Некоторые из них рассмотрены ниже более подробно.

Автором [3] еще в 1963 году для количественного определения серебра в лекарственных препаратах предлагалось использовать *метод рентгенофлуоресцентной спектроскопии* (РФС). Однако в нашей стране данный метод стал фармакопейным только в 2015 году, когда был внесен в Государственную Фармакопею РФ XIII издания (ОФС ОФС.1.2.1.1.0010.15) [4]. Метод основан на измерении характеристических спектров флуоресценции атомов в анализируемом и стандартном образцах и их последующем сравнении.

К преимуществам следует отнести:

- ✓ широкий диапазон определяемых концентраций (от 10^{-4} до 100 масс. %);
- ✓ отсутствие необходимости в предварительной деструкции пробы (неразрушающий метод);
- ✓ относительно короткое время выполнения анализа (в среднем 15 мин);
- ✓ наличие отечественных спектрометров, необходимых для выполнения данного вида анализа.

Однако, учитывая тот факт, что метод стал фармакопейным недавно, контрольно-аналитические лаборатории пока не имеют оборудования, необходимого для применения метода РФС в рутинном анализе.

Известен также *экстракционно-фотометрический метод* определения серебра в гомеопатических лекарственных препаратах – дитизоновый метод. Метод основан на экстракции серебра раствором дитизона в четыреххлористом углероде в слабокислой среде (рН 1,5 - 2,0). В результате образуется соединение желтого цвета - дитизонат серебра (AgHDz), которое в дальнейшем фотометрируют при определенной длине волны [5].

К недостаткам данного метода относится то, что он может применяться лишь для количественного анализа препаратов, в которых серебро находится в ионной форме, а т.к. сейчас наблюдается тенденция к созданию препаратов, содержащих серебро в форме коллоидных и наночастиц, то определение данным методом потребует расширения процедуры пробоподготовки, что увеличит время анализа.

Стоит уделить внимание и электрохимическим методам определения серебра в лекарственных препаратах. Так, среди работ, посвященных количественному анализу серебра в лекарственных препаратах методом вольтамперометрии, можно выделить следующие публикации. В работе [6] описано применение метода катодной вольтамперометрии на стеклоуглеродном электроде для количественного определения серебра в субстанции «Протаргол», в которой серебро находится в ионизированном виде, стабилизированное белками и различными аминокислотами. Авторами [7]

опубликованы результаты количественного определения серебра в мягких лекарственных формах на основе серебряных солей сульфадиазина и сульфатиазола методом анодной инверсионной вольтамперометрии с использованием не модифицированного угольно-пастового электрода (УПЭ).

Однако, несмотря на все достоинства метода: недорогое и портативное оборудование, низкие пределы обнаружения при широкой области определяемых концентраций (от 10^{-12} до 10^{-1} М) и относительно небольшое время анализа, вольтамперометрия до сих пор не включена в Государственную Фармакопею РФ и может применяться в настоящее время только в научно-исследовательских, но не практических целях [8, 9, 10].

Фармакопейными электрохимическими методами являются лишь методы потенциометрического и амперометрического титрования. Использование последнего способа для количественного определения серебра в лекарственных препаратах описано в работе [11]. По указанной методике серебро осаждают избытком *n*-додецилмеркаптана, после чего избыток реагента титруют амперометрически раствором нитрата серебра при потенциале -0,23 В с платиновым микроэлектродом.

Однако, на сегодняшний день самым распространенным в фармацевтическом анализе, является титриметрический метод. Процент монографий, в которых используется указанный метод, составляет 40,5% для Фармакопеи США (USP) и 67,5% для Европейской Фармакопеи (Ph. Eur.). В российских проектах ФС на субстанции, подготовленных для 3 ч. ГФ XII, титриметрия использовалась для определения содержания лекарственных веществ в 80% публикаций [12, 13].

Титриметрический метод определения имеет следующие преимущества:

- ✓ малое время, требуемое для выполнения анализа;
- ✓ простота и низкая стоимость оборудования (благодаря этому, практически каждая контрольно-аналитическая лаборатория имеет все необходимое для выполнения титриметрического анализа);
- ✓ отсутствие необходимости использования стандартных образцов;
- ✓ применимость к лекарственным веществам различной природы [14, 15].

В основе титриметрических методов определения серебра, как правило, лежат реакции осаждения и комплексообразования, а также окислительно-восстановительные реакции. В осадительных методах в качестве титрантов могут использоваться растворы роданидов, галогенидов или цианидов щелочных металлов [2].

Так, для количественного определения серебра в давно известных и широко представленных на российском фармацевтическом рынке препаратах «Колларгол» и

«Протаргол», в которых серебро находится в виде коллоидных частиц, стабилизированных гидролизатами белков (казеина, альбумина), рекомендуется титриметрический метод, а именно - *метод роданометрии* [16, 17]. При этом сначала для перевода серебра в ионное состояние препараты минерализуют при нагревании концентрированными серной и азотной кислотами, после этого образовавшиеся ионы серебра титруют роданидом аммония (калия).

Метод роданометрического титрования также широко используется для количественного определения серебра в составе серебряных солей органических соединений. Так автором [18] для количественного анализа серебра в субстанции и готовой лекарственной форме «Аргокрисстон», на основе серебряной соли кристафона, используется роданометрический метод, конечную точку титрования (КТТ) определяют визуально, используя индикатор (железоаммонийные квасцы). Пробоподготовку в данном случае проводят следующим образом: навеску серебряной соли кристафона массой 0,1 г растворяют в 30 мл разбавленной HNO_3 (что соответствует концентрации 3 моль/л по [8]) при нагревании (желтый раствор). Полученный раствор кипятят в течение 15 мин для освобождения от оксидов азота, мешающих анализу (раствор обесцвечивается) и добавляют разбавленную азотную кислоту до 30 мл. В приготовленный таким образом раствор добавляют 1 мл индикатора (железоаммонийных квасцов) и 1 мл хлороформа или бензола, для более четкого определения конца титрования.

Как видно, роданометрический метод нашел широкое применение в фармацевтическом анализе лекарственных препаратов органической и неорганической природы, содержащих серебро. В методе используется малая растворимость роданида серебра, который образуется при использовании в качестве осадителя - титрованного раствора, содержащего роданид-ионы SCN^- (NH_4SCN или KSCN):



В качестве индикатора для определения точки эквивалентности, как упоминалось выше, используют насыщенный раствор железоаммонийных квасцов ($\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$). До тех пор, пока титруемая жидкость содержит ионы серебра, прибавляемые к ним роданид-ионы связываются с выделением осадка роданида серебра (AgSCN) и не взаимодействуют с ионами железа (Fe^{3+}). Определить точку эквивалентности удастся благодаря тому, что добавление малейшего избытка титранта (раствора роданида аммония или калия) вызывает образование кроваво-красных ионов $[\text{Fe}(\text{SCN})]^{2+}$ и $[\text{Fe}(\text{SCN})_2]^+$. Перед титрованием требуется нейтрализовать исследуемый щелочной раствор путем добавления азотной кислоты с целью предупреждения

образования ионами железа, входящими в состав индикатора, осадка гидроксида железа (III).

Детектировать КТТ в роданометрическом методе можно не только визуально, но и потенциометрически. Так, в работе [19] сообщалось об определении серебра в протарголе без разрушения с помощью метода потенциометрического титрования. Метод потенциометрического установления точки эквивалентности по своим возможностям превосходит титриметрические методы с применением цветных индикаторов. Он обладает большей точностью, чувствительностью, позволяет анализировать окрашенные и мутные растворы, допускает возможность дифференцированного определения веществ в одном растворе и позволяет автоматизировать процесс титрования. Кроме того, при потенциометрической индикации не требуется использование хлороформа - высоко опасного вещества (2 класс опасности), который добавляется в раствор при визуальной оценке для более четкого определения конца титрования.

Фармакопея США (USP) для определения серебра в фармацевтической субстанции на основе серебряной соли другого сульфаниламидного препарата – сульфадиазина также регламентирует метод роданометрического титрования с потенциометрической индикацией КТТ. В данном случае пробоподготовку осуществляют следующим образом: точную навеску серебряной соли сульфадиазина массой 500 мг помещают в стакан, прибавляют 150 мл воды и 50 мл 3 М азотной кислоты и растирают в течение 15 мин. Титруют потенциометрически 0,1 М раствором тиоционата калия, используя серебряный индикаторный электрод и двухключевой электрод сравнения [20].

Фармакопеей США также регламентируются методики качественного и количественного анализа для готовой лекарственной формы – крема на основе серебряной соли сульфадиазина. Однако в данном случае, регламентируется содержание не иона серебра, а собственно молекулы сульфадиазина серебра. Для этого рекомендуется использовать метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Пробоподготовка включает экстракцию навески крема метанолом, центрифугирование в течение 15 мин, отсасывание и отбрасывание метанола, нагревание остатка на водяной бане в метаноле при 60 С° в течение 15 мин и фильтрацию [20].

Указанный метод не может быть использован нами для разработки методики определения серебра в креме «Аргамид» по следующим причинам:

- ✓ методика не специфична к содержанию серебра в молекуле;

- ✓ метанол является токсичным веществом. Для его использования в работе необходимо получение соответствующих разрешительных документов от органов Госнарконтроля либо службы МЧС по представлению Санэпидстанции.
- ✓ ввиду высокой стоимости оборудования ВЭЖХ, не каждая лаборатория может осуществлять контроль по данному методу.

Известен также метод определения серебра в готовой лекарственной форме (1% крем серебряной соли сульфаниламидного препарата) с использованием метода инверсионной вольтамперометрии на немодифицированном угольно-пастовом электроде на фоне 10% раствора фталевой кислоты с продувкой инертным газом для удаления растворенного кислорода [7].

Пробоподготовку проводят следующим образом: навеску образца массой около 17 мг помещают в колбу Кьельдаля, содержащую смесь серной и азотной кислот (по 2 мл каждая), и нагревают до сухого остатка, затем добавляют несколько капель пероксида водорода (30 %) и воды и продолжают нагревать до обесцвечивания раствора. Полученный раствор переносят в мерную колбу и разводят дистиллированной водой до 50 мл. Получают испытуемый раствор (ИР) пробы. Аликвоту ИР пробы помещают в мерную колбу объемом 10 мл, содержащую 10% раствор фталевой (1,2-бензолдикарбоновой) кислоты и проводят вольтамперометрическое измерение [7].

Обозначенный метод не может быть выбран нами за основу при разработке методики для количественного определения серебра в креме «Аргамид», поскольку:

- ✓ метод не является фармакопейным;
- ✓ метод очень чувствителен к составу матрицы и предполагает полную минерализацию образца;
- ✓ требуется специфическое оборудование для проведения вольтамперометрического анализа и обученный персонал.

Для определения серебра в готовой лекарственной форме (2% мази «Аргосульфан» на основе сульфатаиозола серебра) автором [21] предлагается использовать метод осадительного (йодометрического) титрования с потенциометрической индикацией КТТ. Для анализа навеску мази массой 1 г помещают в тигель, добавляют 6 мл 6 М HNO_3 при нагревании и переводят в мерную колбу вместимостью 100 мл. Затем отбирают 5 мл раствора в мерную колбу вместимостью 500 мл, добавляют 5 г KNO_3 и доводят объем бидистиллированной водой до метки. Аликвотную часть (50 мл) полученного раствора титруют раствором

$4 \cdot 10^{-5}$ KI, в качестве индикаторного электрода используют серебряный металлический электрод в паре с хлоридсеребряным электродом сравнения.

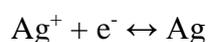
При потенциометрическом определении используется гальванический элемент, состоящий из индикаторного (рабочего) электрода и электрода сравнения. Классификация индикаторных электродов, используемых в потенциометрическом методе анализа, представлена на рисунке 2.



Рисунок 2 - Классификация индикаторных электродов, используемых в потенциометрии согласно ИЮПАК

Для определения содержания серебра методом осадительного титрования с потенциометрической индикацией конечной точки титрования в России и за рубежом в качестве индикаторного электрода используют серебряный металлический электрод (реже, сульфид-селективный, стеклоуглеродный) в паре с хлорид-серебряным электродом сравнения [22, 23].

Серебряный электрод представляет собой электрод I рода - металл, погруженный в раствор собственных ионов. Согласно реакции



их потенциал определяется активностью катиона Ag^+ .

Для серебряного металлического электрода уравнение Нернста имеет вид:

$$E = E^0_{\text{Ag}^+/\text{Ag}} + 0,059 \cdot \lg a_{\text{Ag}^+} = E^0_{\text{Ag}^+/\text{Ag}} + 0,059 \lg C(\text{Ag}^+)$$

В потенциометрическом титровании индикация точки эквивалентности проводится по резкому скачку величины измеряемой ЭДС, которая изменяется благодаря изменению равновесного потенциала индикаторного электрода ($E_{\text{инд.}}$) в результате химической реакции с участием потенциалопределяющего компонента. Величина скачка связана с заменой одной потенциалопределяющей реакции, протекающей до точки эквивалентности, на другую после ее достижения. Кривые титрования, построенные в координатах ЭДС (мВ) – объем титранта (мл), аналогичны расчетным кривым титрования в разных методах титриметрии с использованием индикаторов [24, 25, 26, 27].

Титриметрическое определение с потенциометрической индикацией КТТ не требует привлечения высококвалифицированного персонала и дорогостоящего оборудования (большинство испытательных лабораторий и центров сертификации и контроля качества оснащены всем необходимым для его выполнения). Учитывая указанные достоинства титриметрического метода, и то, что для схожих по химическому строению с исследуемыми объектами соединений используется метод осадительного титрования с потенциометрической индикацией КТТ, данный метод был выбран за основу при разработке методик. Для определения серебра в субстанции «Аргамид» был опробован роданометрический метод [20], а в 1 % крем «Аргамид» - йодометрический метод, описанный автором [21].

1.2 Использование одноразовых толстопленочных электродов в фармацевтическом анализе

Важнейшими требованиями, которым должен отвечать индикаторный электрод, являются химическая устойчивость в различных средах (органических и неорганических) и возможность легкой многократной регенерации для получения воспроизводимой поверхности.

При этом роданометрический метод, выбранный нами для количественного определения серебра в объектах исследования, имеет ряд особенностей, которые должны быть учтены при выборе материала индикаторного электрода. В данном методе определение проводят в кислой среде, а результатом реакции является образование малорастворимого осадка. Учитывая эти обстоятельства, оптимальным будет выбор одноразовых (тонко- и толстопленочных) электродов, поверхность которых не нужно будет тщательно очищать либо беречь от растворения в среде азотной кислоты. Пленочные электроды изготавливают промышленным способом. Они имеют невысокую стоимость и вполне доступны. После каждого измерения электрод заменяют на новый, хотя после соответствующей очистки поверхности, его можно использовать повторно [28].

Существуют следующие технологии изготовления пленочных электродов:

- метод трафаретной печати (шелкографии) - способ нанесения слоев путем продавливания паст через трафареты, накладываемые на непроводящую основу;
- метод тампонной печати – слои электрода формируют отдельно от подложки, а затем переносят на нее с помощью силиконовой подушечки;
- метод струйной печати - проводящие «чернила» набрызгиваются на подложку, соответствующую рисунку благодаря поляризации капель чернил электростатическим полем;
- метод фотолитографии, вакуумное напыление и травление - слои получают путем избирательного растворения или осаждения сверхтонких пленок металлов (для получения электродов сложной геометрии).

Наибольший интерес среди одноразовых электродов в настоящее время вызывают электроды, изготовленные методом трафаретной печати, в зарубежной литературе называемые «screen-printed или thick-film electrodes», что в переводе означает толстопленочные, так как технология трафаретной печати позволяет получать плёнки толщиной более 20 мкм (толстые) [29, 30].

Типовой толстоплёночный электрод (ТлПЭ) (рисунок 3) состоит из неэлектропроводной подложки (полимерной или керамической), на которую в виде

полоски нанесена электропроводящая паста или чернила. Для выделения рабочей части поверхность электрода сверху изолируют путем нанесения чернил, содержащих диэлектрики (чаще всего, силикат магния).

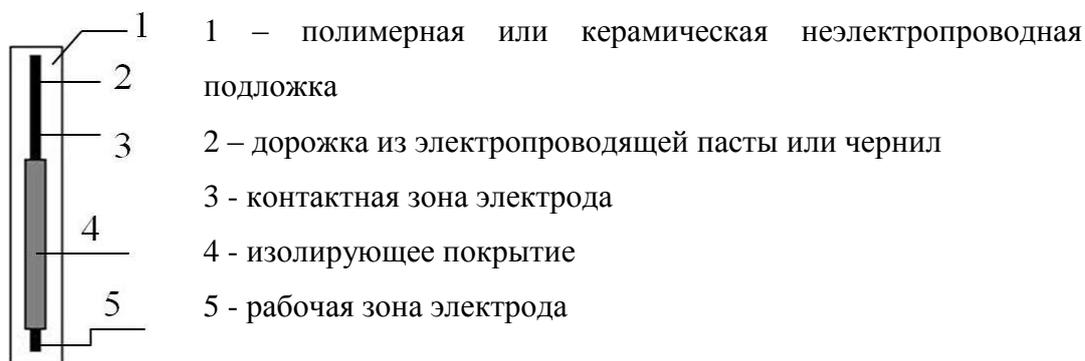


Рисунок 3 - Общий вид толсто пленочного электрода

При получении ТлПЭ электропроводящую пасту наносят через накладной трафарет. В дальнейшем она может закрепляться на подложке высокотемпературным (600 °С и выше) или низкотемпературным (250 °С и ниже) способом. В первом случае, сначала при температуре от 300 до 4000 °С выжигают (испаряют) растворитель, способствуя тем самым переходу пасты из полужидкого состояния в твёрдое, а затем выжигают затвердевшее вещество пасты в подложку – спекают при температуре от 500 до 7000 °С (в зависимости от состава пасты). При низкотемпературном способе паста высушивается на подложке в сушильном шкафу [31].

В качестве электропроводящего слоя чаще всего используются углеродсодержащие, серебряные, золотые, реже - платиновые пасты и чернила. Углеродсодержащие пасты имеют некоторые преимущества по сравнению с металлическими, такие как невысокая стоимость, химическая инертность и легкость модифицирования.

Кроме того, чернила для трафаретной печати содержат некоторые полимерные связующие, например; поливинилхлорид (ПВХ), ацетат целлюлозы, полианилин, поливиниловый спирт привитой сополимер с акриламидом, фталаты или кремниевые связующие [32, 33, 34] для улучшения адгезии. Для того чтобы улучшить медленный перенос электронов, который может возникать в результате включения в пасту некоторых полимеров, к пасте добавляют некоторые благородные металлы или оксиды металлов (например $MnOx$ или $BiOx$), которые выступают в качестве электрокатализаторов и улучшают общую производительность электрода [35]. Серебряные чернила могут быть напечатаны на большом диапазоне подложек, таких как стекло, кремний, тефлон, бумага и полиэтилентерефталат (ПЭТ). Получение наночастиц серебра легче и экономнее, чем золотых частиц. Поэтому их можно

включить в состав чернил, которые могут быть широко использованы. Например, в качестве печатных электродов (сенсоров), сварных низковольтных схем и биосенсоров [36, 37]. В то время как для изготовления золотой пасты получают молекулярные соединения или наночастицы золота в подходящих растворителях, таких как ксилол, после чего их спекают с полимерными добавками путем применения инфракрасного излучения для получения токопроводящих электродов. Кроме того, электроды, полученные с помощью самособранных монослоев, могут быть использованы в качестве металлических, фармацевтических сенсоров и биосенсоров для клинической диагностики [38, 39].

Отличительным преимуществом толсто пленочных электродов также является удобство их модификации, позволяющей улучшить их рабочие характеристики и расширить сферу применения. Технология трафаретной печати обеспечивает широкие возможности для модификации поверхности ТлПЭ различными наночастицами и структурно родственными материалами (графен, углеродные нанотрубки, наночастицы серебра или золота), что позволяет получить электроды, не требующие предварительной обработки с помощью полировки или электрохимической обработки посредством электролитического осаждения, которые часто применяются для обычных стеклоуглеродных электродов [40-44]. Учитывая свойства металлических наночастиц, такие как высокая электропроводность и большая площадь поверхности, использование их для модификации толсто пленочных электродов позволяет улучшить скорость электрохимической реакции и понизить предел обнаружения [45].

Кроме того, можно модифицировать поверхность ТлПЭ, используя широкий спектр субстратов, таких как полимеры, основания Шиффа или биомолекулы, которые обеспечивают высокую селективность электрохимической системы [46, 47]. В случае иммобилизации биомолекул аналит-специфичная часть биосенсора работает как чувствительный элемент системы. Для получения биосенсоров (иммуносенсоров, сенсоров для ферментов и генов) могут быть использованы некоторые антитела, ферменты и нуклеиновые кислоты (рисунок 4).

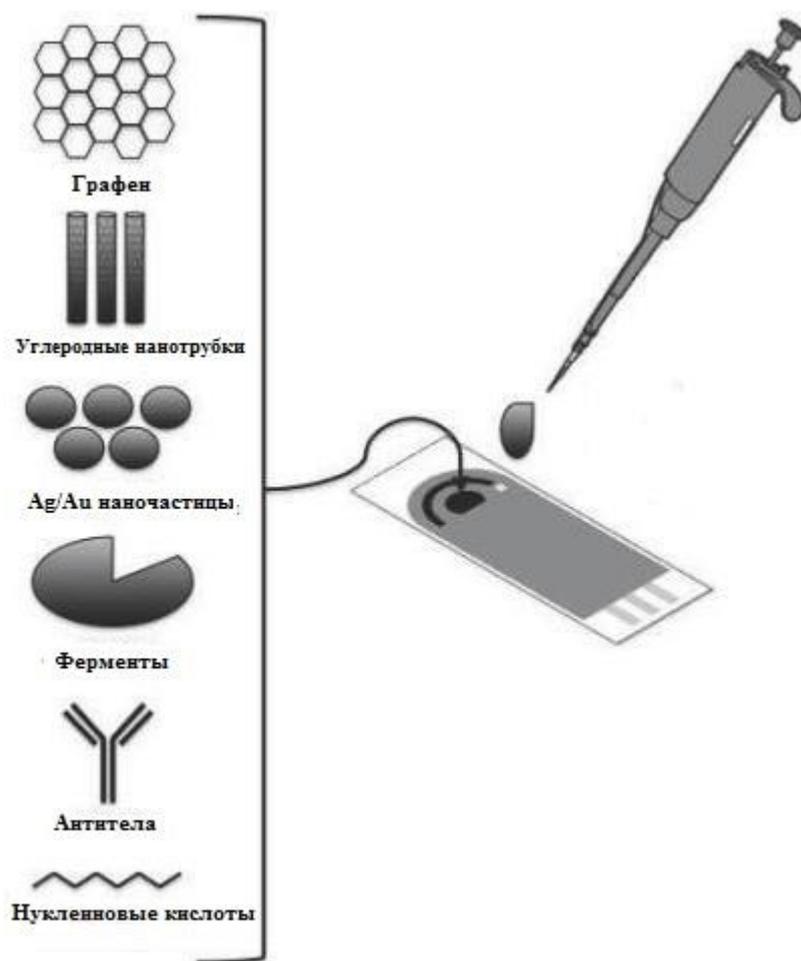


Рисунок 4 - Способы модификации толстопленочных электродов, используемые в фармацевтическом анализе

Помимо этого для модификации поверхности ТлПЭ могут быть применены и другие методы. Один из наиболее часто применимых методов состоит в изменении состава печатных красок путем добавления различных веществ, таких как металлы, ферменты, полимеры, наноматериалы, медиаторные системы и комплексообразователи. Другие подходы включают в себя модификацию изготовленных электродов путем осаждения различных веществ на поверхности ТлПЭ. Во всех случаях покрытие поверхности электродов различными агентами ускоряет процесс перенос электрона и увеличивает селективность к аналиту. Электроды с покрытием затем используют в качестве рабочих в электрохимических сенсорах, что позволяет определять широкий круг веществ быстро, просто и недорого.

Таким образом, отличительными свойствами электродов, изготовленных по технологии трафаретной печати, являются:

- ✓ простота изготовления;
- ✓ возможность модификации поверхности различными способами и агентами;
- ✓ компактность;

- ✓ низкая стоимость, позволяющая использовать электроды как разовые;
- ✓ малый объем пробы;
- ✓ простота эксплуатации;
- ✓ устранение проблем, связанных с применением токсичного и неудобного ртутного электрода и обновлением поверхности твердого электрода.

Благодаря своим преимуществам ТлПЭ нашли широкое применение в биологическом, промышленном, медицинском и фармацевтическом анализе [48-53].

В частности, данные электроды могут быть использованы в анализе лекарственных средств различной природы с помощью электрохимических методов, таких как:

- прямая потенциометрия, в которой определяют концентрацию аналита по величине сигнала, т.е. потенциала электрода. Чаще всего концентрацию определяют с помощью градуировочного графика;
- потенциометрическое титрование, где конечная точка титрования определяется путем измерения потенциала индикаторного электрода, изменяющегося в зависимости от добавленного объема титранта.
- вольтамперометрические определения, в которых информацию об аналите получают путем измерения тока в зависимости от приложенного напряжения к электродам электрохимической ячейки (дифференциальная импульсная вольтамперометрия, квадратно-волновая вольтамперометрия, вольтамперометрия с линейной разверткой потенциала и др.) [54-57].

Так как для данного исследования за основу был выбран потенциометрический метод, то особое внимание было уделено работам, посвященным использованию данного метода в анализе лекарственных препаратов различных фармакотерапевтических групп. В частности, были изучены условия анализа, вид используемого толстопленочного электрода и способ его модификации. Основные результаты кратко изложены в таблице 1.

Как видно, электроды, изготовленные методом трафаретной печати (как модифицированные, так и не модифицированные), широко применяются в фармацевтическом анализе.

Таблица 1 - Потенциометрический метод с использованием толстопленочных электродов, изготовленных методом трафаретной печати, в анализе лекарственных средств

| Определяемое лекарственное средство | Фармакологическая группа | Модификация толстопленочного электрода | Вид потенциометрического определения | Предел обнаружения, М | Ссылка |
|-------------------------------------|--|---|--|-----------------------|--------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Дифенгидрамина гидрохлорид | Н ₁ -антигистаминное средство | Немодифицированный УПЭ | Потенциометрическое титрование | $9,7 \times 10^{-7}$ | [58] |
| | | УПЭ, модифицированный «in-situ» ионными парами | | $9,68 \times 10^{-7}$ | [59] |
| Нафазолина гидрохлорид | Сосудосуживающее средство | Немодифицированный УПЭ | Потенциометрическое титрование | $3,5 \times 10^{-6}$ | [60] |
| Силденафила цитрат | Регулятор потенции | Немодифицированный УПЭ | Прямая потенциметрия (метод градуировочного графика) | $3,5 \times 10^{-7}$ | [61] |
| | | Модифицированный ионными парами УПЭ, изготовленный методом трафаретной печати | | $5,62 \times 10^{-7}$ | [62] |
| | | Модифицированный ионными парами УПЭ, изготовленный другим способом | | $7,07 \times 10^{-7}$ | |
| Декстрометорфан | Противокашлевое средство | Немодифицированный ТлПЭ | Потенциометрическое титрование | 6×10^{-6} | [63] |
| | | ТлПЭ, модифицированный комплексом лекарство-ионная пара | | 6×10^{-6} | |
| | | ТлПЭ, модифицированный агентом, образующим ионную пару | | 1×10^{-5} | |
| Септонекс | Антисептическое средство | ТлПЭ, модифицированный комплексом септонекс-тетрафенилборат | Потенциометрическое титрование | 9×10^{-7} | [64] |

Продолжение таблицы 1

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--------------------------|---|---|--------------------------------|--|------|
| Циталопрама гидробромид | Антидепрессант | ТлПЭ, модифицированный тетракис(<i>n</i> -хлорфенил)боратом калия | Прямая потенциометрия | $4,9 \times 10^{-7}$ | [65] |
| | | ТлПЭ, модифицированный комплексом циталопрам-фосфовольфромат | | $1,0 \times 10^{-6}$ | |
| Цетилпиридиния хлорид | Антисептическое средство | Модифицированные электроды | Потенциометрическое титрование | 8×10^{-7} М | [66] |
| Дулоксетина гидрохлорид | Антидепрессант | Плоские (вымоченные) и модифицированные электроды (<i>a</i> и <i>b</i>) | Прямая потенциометрия | 5×10^{-7} | [67] |
| Пиоглитазона гидрохлорид | Гипогликемическое средство | ТлПЭ, на основе многослойных углеродных нанотрубок и поливинилхлорида | Прямая потенциометрия | 8×10^{-7} | [68] |
| Пироксикам | Нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) - Оксикамы | ТлПЭ, на основе многослойных углеродных нанотрубок и циклодекстрина | Потенциометрическое титрование | 4×10^{-6} | [69] |
| Теноксикам | | | | 5×10^{-6} | |
| Мелоксикам | | | | 1×10^{-6} | |
| Лорноксикам | | | | 1×10^{-6} 6×10^{-7} | |
| Галламина триэтиодид | Миорелаксант с курареподобным действием | Галламин-модифицированный УПЭ | Прямая потенциометрия | 1×10^{-6} | [70] |

1.3 Характеристика исследуемых лекарственных средств

В последнее время все чаще для ускорения заживления ран (при ожогах, обморожениях, инфицированных ранах, трофических язвах, пролежнях, инфицированных дерматитах) используются крема, содержащие серебро. При этом особое распространение получили серебросодержащие сульфаниламидные препараты для местного и наружного применения (мази и крема сульфадиазина и сульфатиазола серебра), оказывающие длительное антимикробное действие, обусловленное тем, что олигодинамическое бактериостатическое и бактерицидное действие серебра дополняется противомикробным эффектом сульфаниламида [71, 72].

Сульфаниламиды близки по химическому строению к парааминобензойной кислоте (ПАБК), которая необходима бактериям для синтеза фолиевой кислоты, участвующей в образовании пуриновых и пиримидиновых оснований, обеспечивающих рост и развитие микроорганизмов. За счет схожести, микробная клетка вместо ПАБК захватывает сульфаниламиды. В результате останавливается рост и развитие микробов (бактериостатическое действие). Однако из-за своей схожести с ПАБК, сульфаниламиды не влияют на бактерии, которые сами образуют данную кислоту. Кроме того, раневое содержимое обычно содержит большое количество ПАБК (кровь, гной, продукты некролиза), поэтому в ране сульфаниламиды не эффективны. Применение сульфаниламидных препаратов в виде серебряных солей позволяет увеличить эффективность данных препаратов против широкого круга возбудителей, в частности против основных возбудителей раневых инфекций – золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*) и синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*). Серебро, находясь в комплексе с сульфаниламидом, медленно высвобождаясь, связывается с ДНК возбудителя микробной инфекции (оказывает бактерицидное действие), при этом на его эффективность не влияет ПАБК [73, 74].

Известно, что впервые серебряная соль сульфадиазина была получена американским ученым Чарльзом Льюисом Фоксом в 1966 году. Два года спустя крем на основе данного соединения впервые применили для лечения ожоговой инфекции. Эффективность препарата была обусловлена не только его бактерицидным и антимикробным действием, но и возможностью создания «влажной» раневой среды – оптимальной для заживления [75]. Благодаря этим свойствам, серебросодержащие мягкие лекарственные формы активно используются для лечения обожженных, при этом эффективность их применения была подтверждена в многочисленных исследованиях в России и за рубежом [76, 77, 78].

Так в обзоре [79] и в работе [80], посвященных композициям для обработки и лечения ожоговых и хронических ран, авторы сообщают, что и через тридцать лет после введения в медицинскую практику сульфадиазин серебра по-прежнему наиболее приемлем для лечения ожогов, тот же факт подтверждается и для остальных соединений серебра [81].

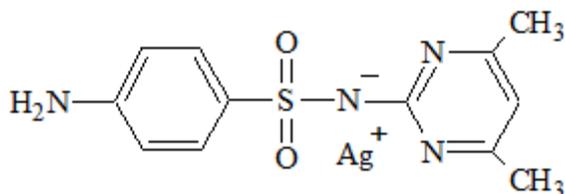
Помимо многочисленных исследований, подтверждающих эффективность серебросодержащих сульфаниламидных препаратов при лечении ожоговых ран, доказана их эффективность при местном лечении венозных трофических [82] и пролежневых язв [83], благодаря уменьшению микробной обсемененности язвенной поверхности, уменьшения риска развития инфекционных осложнений, сокращению фазы воспаления и более быстрому заживлению. У больных сахарным диабетом применение мягких лекарственных форм и раневых покрытий, содержащих серебро, также положительно влияет на динамику раневого процесса и способствует более ранней подготовке гнойных ран к кожной пластике [75].

Кроме того, многочисленные фармакоэкономические исследования доказывают, что применение серебросодержащих кремов и серебросодержащих раневых покрытий целесообразно экономически, т.к. позволяет снизить общие расходы на курс лечения пациента [75,79, 82].

Хорошее бактерицидное и ранозаживляющее действие серебросодержащих сульфаниламидных препаратов, их относительно невысокая цена, доступность, удобство пользования, экономический эффект в результате сокращения сроков стационарного лечения и уменьшения трудоемкости лечебного процесса, обеспечили высокую востребованность данных препаратов комбустиологии, хирургии (в т.ч. гнойной), травматологии, акушерстве и гинекологии, гастроэнтерологии, офтальмологии, отоларингологии, дерматологии и других областях медицины. К сожалению, на сегодняшний день производство серебряных солей сульфаниламидных препаратов и готовых лекарственных форм на их основе полностью отсутствует.

Учитывая потребность в эффективных лекарственных препаратах отечественного производства для лечения инфицированных и ожоговых ран, на базе кафедры фармации УГМУ была синтезирована серебряная соль сульфадимидина (фармацевтическая субстанция «Аргамид» с содержанием серебра около 28 %), обладающая противомикробным и ранозаживляющим действием (Приоритетная справка на выдачу патента № 2015153574 от 14.12.2015).

Полученное соединение представляет собой молекулу 2-(*n*-аминобензолсульфамидо)-4,6-диметилпиримидина, в которой ион водорода у азота сульфамидной группы замещен ионом серебра:



На основе данной соли был приготовлен 1 % крем «Аргамид». Данный крем представляет собой мягкую лекарственную форму эмульсионного типа, в которой действующее вещество – серебряная соль сульфадимидина содержится в количестве 1 г на 100 г крема. Состав (на 100 г крема) приведен (см. таблицу 2) согласно технологии получения (в порядке смешивания ингредиентов внутри группы, а затем между собой). Таблица 2 - Состав действующих и вспомогательных веществ, содержащихся в 1% креме «Аргамид»

| Группа ингредиентов | Наименование ингредиента | Количество |
|---------------------|--|--------------|
| Группа 1 | Вазелин Рег.№ ЛСР-005886/08 Серия 200413 ЗАО «Медхим» (Россия) | 54 г |
| | Моноглицериды дистиллированные насыщенные (твердые) марка 1 (ТУ-9145-357-00334623-2003) (ОАО «Нижегородский масло-жировой комбинат») | 6 г |
| Группа 2 | Желатин | 1,2 г |
| | Вода очищенная | 18,6 мл |
| | Твин 80 | 0,44 г |
| Группа 3 | Серебряная соль сульфадимидина | 1,0 г |
| | Пропиленгликоль | 18,6 мл |
| | Метилпарабен | 0,2 г |

Следующим этапом должна стать разработка нормативно-технической документации на разработанную фармацевтическую субстанцию и мягкую лекарственную форму на основе серебряной соли сульфадимидина. В частности, необходимо, учитывая физико-химические характеристики соли, разработать методику количественного определения серебра, как фармакологически активного иона.

1.4 Постановка задачи

Анализ литературных данных показал, что, несмотря на большое количество методов, которые могут быть использованы для количественного определения серебра, в фармацевтическом анализе чаще всего применяется титриметрический метод. В частности, для определения серебра в лекарственных препаратах, как российскими так и международными фармакопеями регламентируется метод осадительного титрования. Чаще всего используется роданометрический метод. При этом установление конечной точки титрования потенциометрически позволяет получить более точные результаты, нежели с помощью индикатора (визуально). Потенциометрическое определение не требует дорогостоящего оборудования и привлечения высококвалифицированного персонала. Т.к. большинство испытательных лабораторий и центров сертификации и контроля качества оснащены необходимым оборудованием, то данный метод был выбран за основу в данном исследовании.

Анализ научных публикаций также показал, что для потенциометрического анализа лекарственных средств различной природы широко используются толсто пленочные индикаторные электроды, изготовленные по технологии трафаретной печати. В целом, наблюдается мировая тенденция к миниатюризации используемого оборудования. Данному требованию отвечают малогабаритные, недорогие и портативные толсто пленочные электроды. Благодаря простоте их производства и относительно небольшой стоимости они могут использоваться как одноразовые, что избавляет исследователя (аналитика) от необходимости очищать поверхность электрода между исследованиями. Данное обстоятельство позволяет использовать толсто пленочные электроды в различных (концентрированных и/или мутных) растворах и, в целом, существенно экономит время анализа.

Вследствие вышесказанного целью настоящей работы являлась разработка методик количественного определения серебра в фармацевтической субстанции и готовой лекарственной форме – 1% креме «Аргамид», на основе серебряной соли сульфадимидина, методом осадительного титрования с потенциометрической индикацией КТГ, а именно подбор оптимальных условий подготовки пробы и выбор индикаторного электрода, а также валидация разработанных методик.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

– изучить и проанализировать данные научной литературы о методах определения содержания серебра в лекарственных средствах (фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах), уделив особое внимание анализу лекарственных веществ, схожих по химической природе с объектами исследования;

- выбрать оптимальный метод определения с учетом характера анализируемого соединения – серебряной соли сульфадимидина;
- оценить возможность применения в качестве индикаторного электрода – толстопленочного электрода на основе серебросодержащей пасты, изготовленного на базе ООО НПП «ЭкоБиоТест», Екатеринбург;
- подобрать оптимальные условия пробоподготовки: выбрать массу навески, концентрацию растворителя; время и температуру обработки пробы;
- проверить полноту вскрытия пробы;
- выбрать титрант и его концентрацию для определения содержания серебра в фармацевтической субстанции и 1% креме «Аргамид», учитывая концентрацию действующего вещества в указанных лекарственных средствах;
- провести полную валидационную оценку разработанных методик определения серебра в объектах исследования по актуальным требованиям Государственной Фармакопеи РФ XIII издания.
- составить отчеты по валидации аналитических методик количественного определения серебра в фармацевтической субстанции «Аргамид» и крема «Аргамид»- оценить применимость разработанных методик в фармацевтическом анализе и возможность их дальнейшего использования в контрольно-аналитических целях.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Объекты исследования

2.1.1 Фармацевтическая субстанция «Аргамид» (МНН: сульфадимидин серебра)

2.1.2 Крем 1% «Аргамид» (действующее вещество: сульфадимидин серебра - 1 г в 100 г крема)

2.2 Реактивы

В работе применяли реактивы квалификации «ос.ч.» и «х.ч.». Все растворы готовили на деионизированной воде, полученной на комбинированной мембранной установке серии ДВС-М/1 НА(18)-N («Медиана-Фильтр», г. Москва).

В работе использовали следующие реактивы и растворы:

- кислота азотная, х. ч., ГОСТ 4461-77;
- аммоний роданистый, х. ч., массовая доля NH_4SCN не менее 99,5 %, ГОСТ 27067-86;
- калий йодистый, х.ч., массовая доля KI не менее 99,5 %, ГОСТ 4232-74;
- калий азотнокислый, х.ч., массовая доля KNO_3 в высушенном препарате не менее 99,8 %, ГОСТ 4217-77;
- буферные растворы для поверки рН-метра по ГОСТ 8.135-2004:
- калий гидрофталат $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ с $\text{pH}=4,01$ при $25\text{ }^\circ\text{C}$;
- натрий тетраборат 10-водный $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ с $\text{pH}=9,18$ при $25\text{ }^\circ\text{C}$.

Посуду перед использованием обезжиривали 10 % раствором гидроксида натрия, промывали деионизированной водой. Затем обрабатывали концентрированной серной кислотой и многократно промывали деионизированной водой.

2.3 Оборудование и средства измерений

Взвешивания проводили на аналитических весах Shimadzu AUX220 1-го класса точности («Shimadzu», Япония).

Для осадительного титрования с потенциометрической индикацией конечной точки применялись:

- нагревательная лабораторная плитка ИКА С-MAG HS 7 («ИКА», Германия);
- рН-метр "Эксперт-рН" (ООО «Эконикс-эксперт», Москва) с функцией измерения ЭДС и интерфейсом RS-232 для измерения потенциала.

Применялась двухэлектродная электрохимическая ячейка объемом 10 см^3 .

В качестве электрода сравнения использовался хлоридсеребрянный электрод ($\text{Ag}/\text{AgCl}/ 3,5\text{ моль/л } \text{KNO}_3$) с двумя мембранами («Metrohm», Швейцария), заполненный раствором нитрата калия.

В качестве индикаторного электрода использовались:

- дисковый серебряный электрод диаметром 2 мм «6.1204.130» («Metrohm», Швейцария);
- толстопленочный электрод на основе серебросодержащей пасты ПСХП-1 от ООО НПП «Дельта-пасты» (г. Зеленоград, Россия), изготовленный методом трафаретной печати ООО «НПП ЭкоБиоТест» (УрФУ, г. Екатеринбург, Россия).

В работе также использовались:

- пипетки вместимостью 1 см³, 2 см³, 5 см³ по ГОСТ 29227-91;
- цилиндр мерный вместимостью 100 см³ по ГОСТ 1770-74;
- стаканчик для взвешивания тип СВ по ГОСТ 25336-82;
- колба коническая плоскодонная термически и химически стойкого стекла вместимостью 100 см³ по ГОСТ 25336-82;
- колба мерная коническая плоскодонная вместимостью 1 дм³ по ГОСТ 1770;
- бюретка градуированная вместимостью 10 см³, 1 класс точности по ГОСТ 29251-91;
- дозаторы механические одноканальные переменного объема («Sartorius Biohit Liquid Handling Oy», Финляндия).

Глава 3. Разработка и валидация методики потенциометрического определения серебра в фармацевтической субстанции «Аргамид»

3.1 Выбор индикаторного электрода и технология его изготовления

Анализ литературных данных показал, что толсто пленочные технологии трафаретной печати являются простым, быстрым и очень дешевым методом массового производства одноразовых электрохимических сенсоров с очень высокой степенью точности и с широким спектром конфигураций. Они могут быть использованы для печати целых электродных систем, включающих электроды: рабочий, вспомогательный и сравнения, что обеспечивает существенную миниатюризацию и упрощение конструкции электрохимической ячейки. Одноразовое использование печатных электродов позволяет предотвратить загрязнение поверхности электрода продуктами реакций и устранить проблему потери чувствительности сенсора в процессе эксплуатации. Это особенно важно, учитывая то, что в данном случае определение проводится в кислой среде, а в результате титриметрической реакции образуется осадок, который загрязняет поверхность электрода.

Таким образом, в качестве индикаторного, вместо дорогостоящего импортного серебряного дискового электрода типа «б.1204.130» от Metrohm (Швейцария), нами впервые были опробованы толсто пленочные электроды на основе серебряносодержащей пасты (см. рисунок 5). Данные электроды обладает существенно меньшей стоимостью, не требуют процедуры специальной подготовки поверхности и просты в использовании.

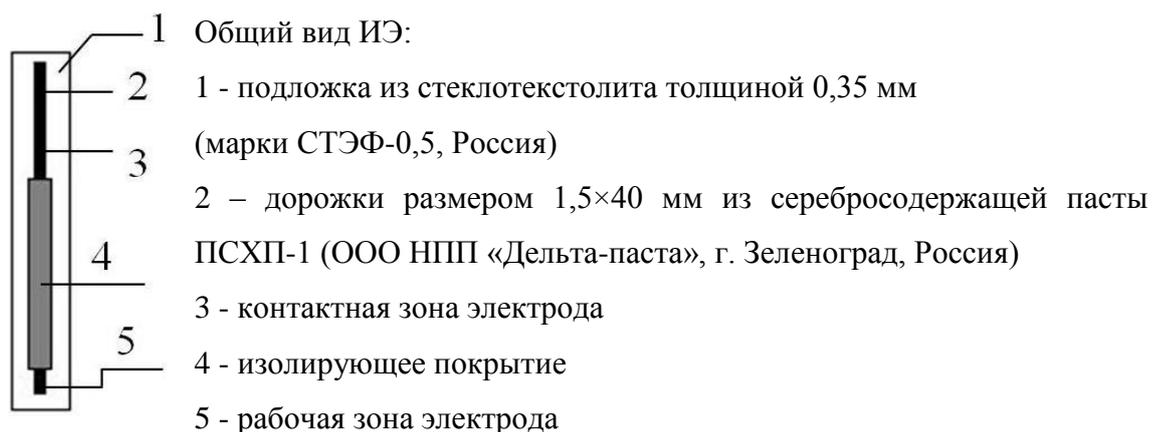


Рисунок 5 – Общий вид индикаторного (толсто пленочного) электрода

Технология изготовления представлена следующими этапами:

1. Готовят подложки из стеклотекстолита толщиной 0,35 мм (марки СТЭФ-0,5, Россия), для чего нарезают пластинки размером 140×50 мм (на одной подложке – 26 электродов). Пластинки моют водопроводной водой, вымачивают в течение 3 ч

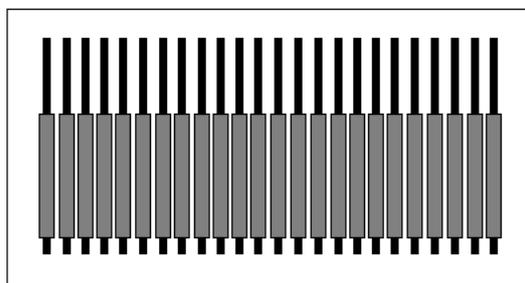
в 0,5 М растворе хлористоводородной кислоты, тщательно ополаскивают дистиллятом до $\text{pH} \approx 7$ и сушат на воздухе.

2. На подложки методом трафаретной печати наносят дорожки размером $1,5 \times 40$ мм из серебрясодержащей пасты ПСХП-1. Подложки с пастой сушат в сушильном шкафу при 100°C в течение 2 ч.

3. С помощью другого сетчатого трафарета наносят изолирующий слой (соответственно рисунку). Сушат в сушильном шкафу при 100°C в течение 1 ч.

4. При помощи мультиметра контролируют сопротивление электрода (R до 5 Ом) и проверяют внешний вид (не должно быть отслоений, трещин, просветов в слоях серебрясодержащей пасты и изолятора).

5. Подложку с дорожками разрезают на отдельные электроды.



3.2 Подбор оптимальных условий определения содержания серебра в фармацевтической субстанции сульфадимидина серебра

Как упоминалось во введении, исследуемое вещество – фармацевтическая субстанция сульфадимидина серебра была синтезирована впервые, что вызвало необходимость разработать методику определения содержания серебра в ней. Изучив литературные данные, для определения серебра в субстанции «Аргамид» был выбран метод роданометрического титрования с потенциометрической индикацией КТТ [16 - 20], что позволяет получать более точные результаты по сравнению с визуальной.

За основу в работе был взят метод роданометрического определения серебра с электрохимической регистрацией точки эквивалентности, регламентированный USP, в соответствии с которым навеску серебряной соли массой 0,5 г растирают в растворе воды и 3М азотной кислоты в течение 15 мин [20].

Растирание указанной навески синтезированного нами препарата сульфадимидина в растворе азотной кислоты рекомендуемой концентрации не обеспечивает полноты растворения пробы. Кроме того, в процессе титрования ионов серебра в растворе 3М азотной кислоты, серебряный стержень дискового индикаторного электрода («Metrohm», Швейцария) через 2 – 3 определения подрастворяется, что делает его непригодным для дальнейшего использования без дополнительной процедуры механической срезки и полировки поверхности. Помимо экономического ущерба в виду высокой стоимости материала электрода, это существенно увеличивает время анализа.

Недостатком предлагаемого способа пробоподготовки является также и большая масса (0,5 г) навески субстанции дорогостоящей серебряной соли, что повышает как стоимость рутинного анализа, так и его продолжительность за счет увеличения времени растворения пробы.

Нами была опробована методика вскрытия пробы, описанная для субстанции «Аргокристон» [18], в соответствии с которой навеску растворяли в 3М азотной кислоте при нагревании на плитке. Данный способ пробоподготовки был опробован для исследуемой фармацевтической субстанции. Нагревание навески субстанции при 100 °С позволило добиться полноты вскрытия пробы и сократить время пробоподготовки в 2,5 раза (5-7 мин вместо 15 мин). Однако в данном методе также используется достаточно крепкий раствор азотной кислоты, что негативно влияет на материал индикаторного электрода.

Указанные недостатки обусловили следующие задачи:

- подбор массы навески и выбор концентрации растворителя, обеспечивающей полное растворение пробы за минимальное время;

- выбор более дешевого и доступного индикаторного электрода.

Во-первых, масса навески дорогостоящей субстанции серебряной соли сульфадимидина была снижена в 10 раз (0,05 г).

Следующим шагом стал выбор концентрации растворителя. Путем последовательного растворения пробы в растворах азотной кислоты различной концентрации (от 3 моль/л и ниже) было установлено, что снижение концентрации азотной кислоты до 0,1 моль/л незначительно увеличивает время растворения пробы при нагревании и способствует полному растворению пробы. Таким образом, концентрация растворителя была снижена в 30 раз (таблица 3).

Таблица 3 – Результаты оптимизации условий пробоподготовки

| Концентрация раствора HNO_3 | Результаты обработки пробы при массе навески 0,05 г и нагревании до 100 °С | | Количество параллельных определений, которые можно выполнить с помощью одного электрода в среде растворителя |
|--------------------------------------|--|---------------------------|--|
| | Время растворения пробы | Степень растворения пробы | |
| 1,5 моль/л | 3-5 мин | Полное растворение | 1 определение |
| 0,7 моль/л | 4-6 мин | Полное растворение | 3 определения |
| 0,1 моль/л | 5-7 мин | Полное растворение | 5 определений |

Используемые толсто пленочные электроды на основе серебросодержащей пасты, в подобранных условиях сохраняют рабочие характеристики в течение 5 определений.

В результате была сформулирована следующая методика определения содержания серебра в серебряной соли сульфадимидина.

«Количественное определение.

Титриметрия.

Около 0,05 г (точная навеска) субстанции растворяют в 15 мл 0,1 М азотной кислоты и кипятят до растворения осадка (в течение 5-7 мин). После охлаждения раствора, аликвоту объемом 2,5 мл титруют потенциометрически 0,1 М раствором роданида калия (или роданида аммония), применяя в качестве индикаторного электрода - толстопленочные серебросодержащие электроды, в качестве электрода сравнения - двухключевой электрод, заполненный раствором нитрата калия.

1 мл 0,1 М раствора роданида калия (или роданида аммония) соответствует 10,79 мг серебра.

В субстанции «Аргамид» (серебряной соли сульфадимидина) должно быть найдено не менее 27,72 % и не более 28,28 % серебра».

Расчеты по методике:

1. Расчет титра раствора титранта (например, роданида аммония) по серебру:

$$T_{(NH_4SCN/Ag)} = \frac{T_{NH_4SCN} \times M_{Ag}}{M_{NH_4SCN}} = \frac{0,007612 \times 107,8682}{76,12} = 0,01079 \text{ (г/мл)}$$

Таким образом, 1 мл NH_4SCN реагирует с 0,01079 г серебра.

2. Предварительный расчет объема титранта, который будет затрачен на титрование аликвоты навески серебряной соли сульфадимидина:

$$V = \frac{X \times a \times V_{ал}}{K \times T \times 100 \times V_{колбы}},$$

где X – содержание серебра в серебряной соли сульфадимидина, в % .

Следовательно, на титрование навески серебряной соли массой 0,05 г, в которой должно быть найдено 28 % серебра, должно пойти около:

$$V = \frac{28 \times 0,05 \times 2,5}{0,01079 \times 100 \times 15} = 0,22 \text{ (мл)}.$$

3. Расчет количественного содержания серебра в % (X) в серебряной соли сульфадимидина проводили по формуле:

$$X = \frac{V \times K \times T \times 100 \times V_{колбы}}{a \times V_{ал}},$$

где V – объем титранта, израсходованный на титрование, мл;

K - поправочный коэффициент титранта;

T- титр титранта по определяемому веществу;

$V_{ал}$ – объем аликвоты (количество мл, взятые на анализ из разведения), мл;

$V_{колбы}$ – объем колбы для приготовления разведения, мл;

a - масса определяемого лекарственного вещества, взятая на анализ (навеска), г;

Интегральная кривая потенциометрического титрования сульфадимидина серебра 0,1 М раствором роданида аммония в координатах $E \div V$ (см. рисунок 6) и дифференциальная кривая потенциометрического титрования сульфадимидина серебра 0,1 М раствором роданида аммония в координатах $\Delta E/\Delta V \div V$ (см. рисунок 7), построенные по результатам титрования представлены ниже.

Результаты определения содержания серебра в субстанции «Аргамид» методом осадительного (роданометрического) титрования с потенциометрической индикацией конечной точки титрования и метрологические характеристики методики представлены в разделе 3.3.

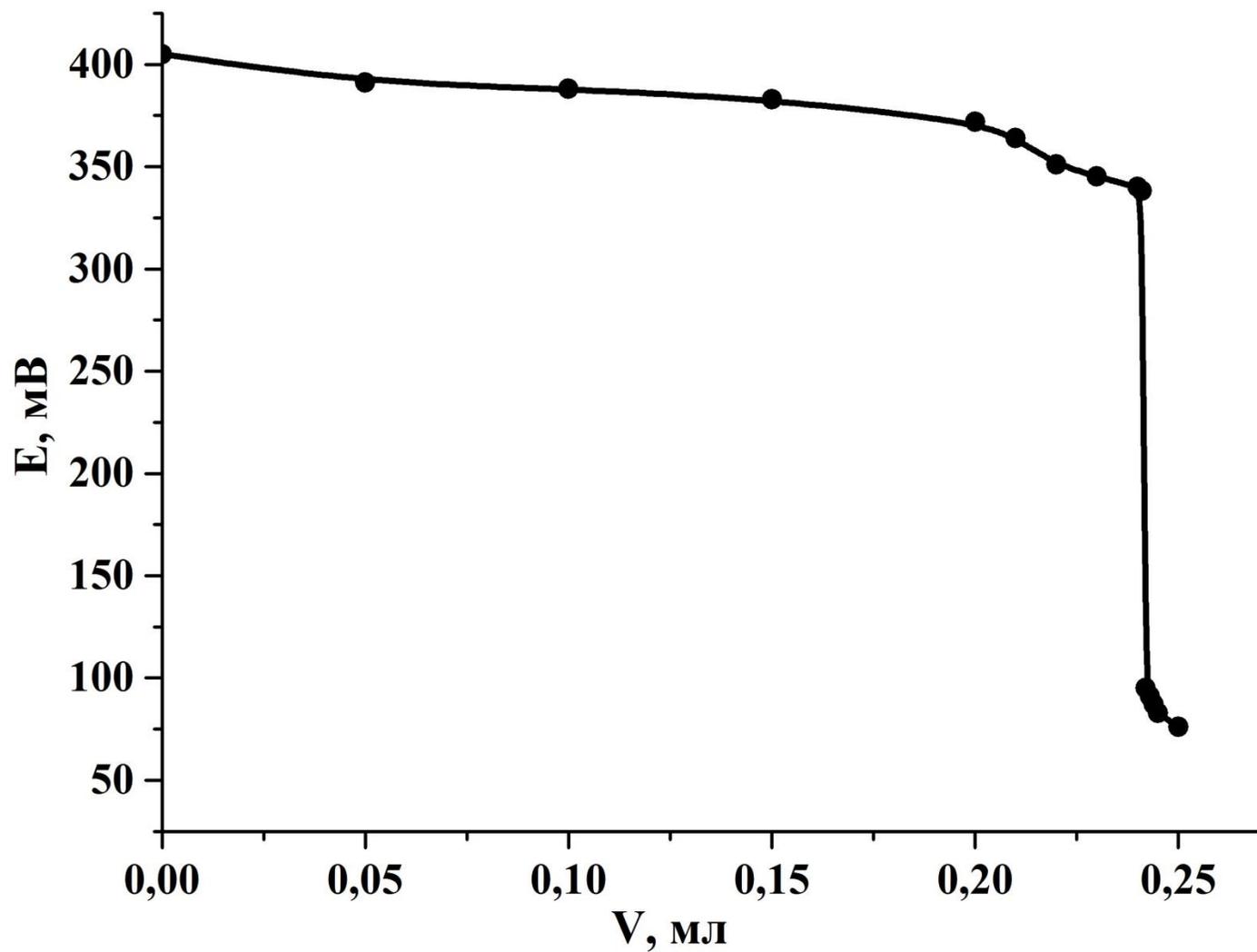


Рисунок 6 - Интегральная кривая титрования серебра, содержащегося в фармацевтической субстанции «Аргамид» 0,01 М раствором роданида аммония с потенциометрической индикацией КТТ

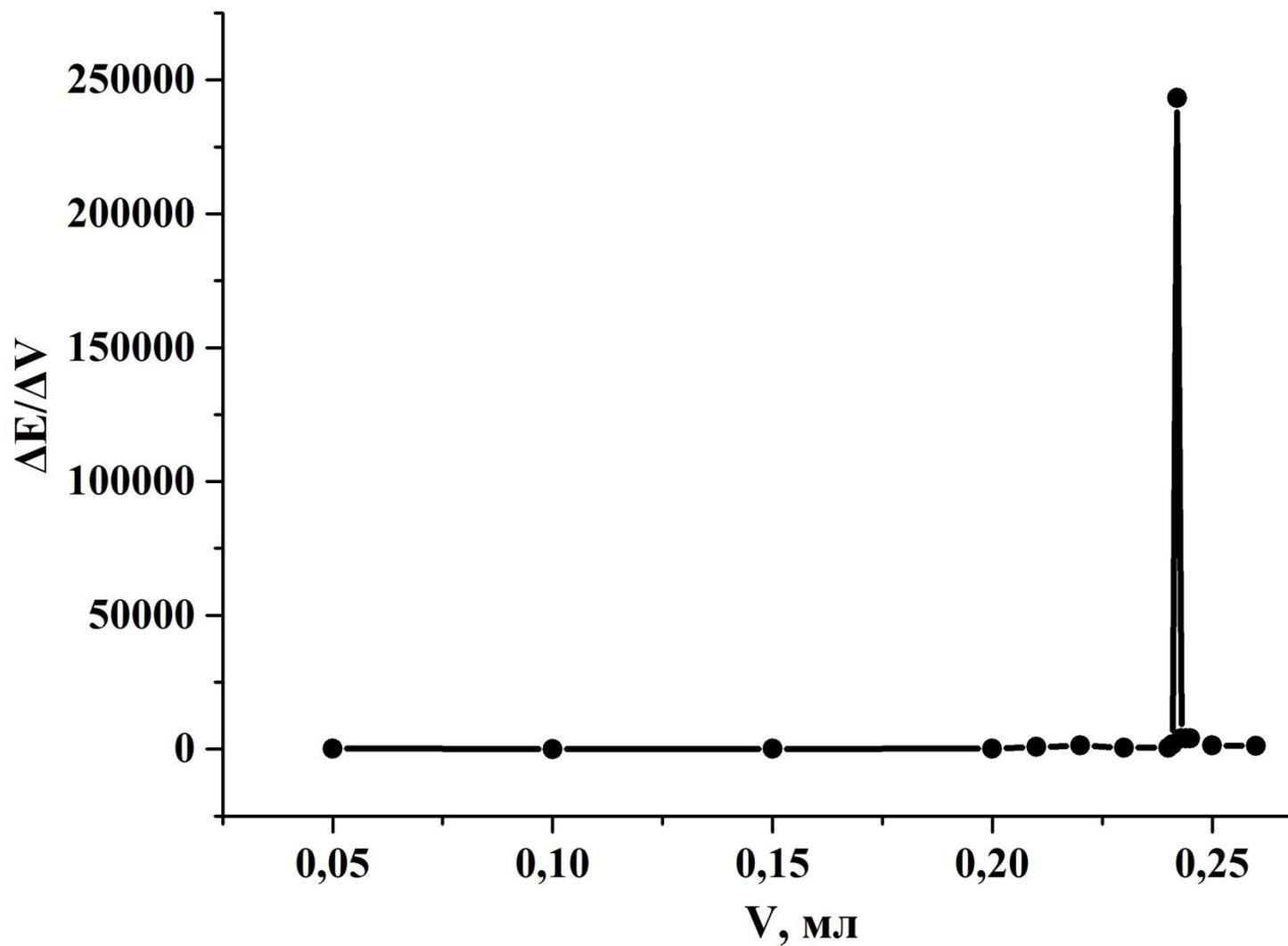


Рисунок 7 – Дифференциальная кривая титрования серебра, содержащегося в фармацевтической субстанции «Аргамид» 0,01 М раствором роданида аммония с потенциометрической индикацией КТТ

3.3 Валидация разработанной методики количественного определения серебра в фармацевтической субстанции «Аргамид»

Валидация проводилась в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик». Статистическая обработка полученных результатов проводилась в соответствии с ОФС ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента». В результате валидации был составлен отчет следующего содержания.

Отчет по валидации методики роданометрического определения серебра с потенциометрической индикацией КТТ в субстанции «Аргамид»

| | Вид валидации | Подвиды валидации |
|---|--|---|
| (+) новый продукт /метод | <input type="checkbox"/> перспективная | <input type="checkbox"/> бреккетинг - валидация |
| <input type="checkbox"/> наладка, ремонт, изменения | <input type="checkbox"/> ретроспективная | <input type="checkbox"/> валидация переноса |
| <input type="checkbox"/> ревалидация | <input type="checkbox"/> сопутствующая | (+) частичная |
| <input type="checkbox"/> прочее | (+) периодическая | <input type="checkbox"/> полная |

Основание: Валидация методики

| | Должность | ФИО | Подпись | Дата |
|---------------------|---|----------------|----------------|-------------|
| Разработано: | Магистрант кафедры аналитической химии ХТИ УрФУ | Скосырева Н.С. | | |
| Согласовано: | Старший преподаватель кафедры аналитической химии ХТИ УрФУ | Марина Н.В. | | |
| Утверждено: | Руководитель НИР к.х.н., доцент кафедры аналитической химии ХТИ УрФУ | Малахова Н.А. | | |

Содержание

1. Пояснительная записка
 - 1.1 Цель
 - 1.2 Класс методики
 - 1.3 Предмет
2. Организация работ
 - 2.1 Ответственность
 - 2.2 Перечень мероприятий
 - 2.3 Сроки проведения мероприятий
3. Выбор проверяемых параметров и критериев приемлемости. Термины и определения
 - 3.1 Выбор проверяемых параметров
 - 3.2 Термины и определения
 - 3.3 Критерии приемлемости
4. Условия проведения испытаний
 - 4.1 Приборы
 - 4.2 Посуда
 - 4.3 Реактивы
 - 4.4 Условия окружающей среды при проведении испытаний
5. Описание процедуры проведения валидируемой методики
 - 5.1 Подготовительные работы
 - 5.2 Методика анализа
6. Проведение тестов и статистическая обработка результатов валидации
 - 6.1 Специфичность
 - 6.2 Аналитическая область
 - 6.3 Линейность
 - 6.4 Правильность
 - 6.5 Прецизионность:
 - 6.5.1 Повторяемость (сходимость)
 - 6.5.2 Промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность
7. Выводы
8. Документация и литература

1. Пояснительная записка

1.1 Цель

Целью валидации методики количественного определения серебра в фармацевтической субстанции «Аргамид» является документированное подтверждение того, что методика анализа позволяет получить ожидаемые, достоверные и воспроизводимые результаты, соответствующие поставленным задачам и удовлетворяющие всем установленным критериям приемлемости.

1.2 Класс методики

Валидируемая методика количественного определения серебра в фармацевтической субстанции «Аргамид» относится к классу С (количественное определение содержания определяемого компонента в фармацевтической субстанции).

При валидации методики в другой лаборатории (например, на предприятии-производителе) методика будет классифицирована в соответствии со стандартной операционной процедурой (СОП) предприятия, описывающей процедуру валидации аналитических методик.

1.3 Предмет

Данный отчет распространяется на раздел «Количественное определение серебра» проекта ФСП на фармацевтическую субстанцию «Аргамид». При выполнении валидации методик были использованы соответствующие методические подходы [4, 84].

2. Организация работ

2.1 Ответственность

Лица, принявшие участие в разработке плана:

| ФИО | Должность |
|----------------|--|
| Скосырева Н.С. | Магистрант кафедры АХ ХТИ УрФУ |
| Малахова Н.А. | Старший преподаватель кафедры аналитической химии ХТИ УрФУ |

Лица, ответственные за контроль валидации:

| ФИО | Отдел |
|---------------|---|
| Малахова Н.А. | Руководитель НИР к.х.н., доцент аналитической химии ХТИ УрФУ |

2.2 Перечень мероприятий

| № пп | Наименование мероприятия | Ответственный |
|------|---|----------------|
| 1 | Разработка протокола/отчета | Скосырева Н.С. |
| 2 | Проведение испытаний и регистрация данных | Скосырева Н.С. |
| 3 | Проверка испытаний | Скосырева Н.С. |
| 4 | Отбор образцов | Скосырева Н.С. |
| 5 | Оборудование, средства измерения | Скосырева Н.С. |
| 6 | Подготовка протокола/отчета | Скосырева Н.С. |
| 7 | Проверка протокола/отчета | Марина Н.В. |
| 8 | Утверждение протокола/отчета | Малахова Н.А. |
| 9 | Оценка методики | Скосырева Н.С. |
| 10 | Оформление результатов | Скосырева Н.С. |

2.3 Сроки проведения валидации

| Запланированное начало: | Запланированное окончание: |
|-------------------------|----------------------------|
| 7.09.2015 г. | 31.10.2015 г. |

3. Выбор проверяемых параметров и критериев приемлемости. Термины и определения

3.1 Выбор проверяемых параметров

В соответствии с ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [4] валидационными параметрами методики количественного определения серебра в фармацевтической субстанции «Аргамид» являются:

- Специфичность;
- Аналитическая область;
- Линейность;
- Правильность;
- Прецизионность:
 - повторяемость (сходимость);
 - промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность.

3.2 Термины и определения

Специфичность – это способность аналитической методики однозначно оценивать определяемое вещество в присутствии сопутствующих компонентов. Как правило, ими являются примеси, растворители, продукты распада, плацебо и т.д.

Аналитическая область методики – это интервал между верхним и нижним значением аналитических характеристик определяемого компонента в объекте анализа (его количества, концентрации, активности и т. п.). В этом интервале результаты, получаемые с использованием валидируемой методики, должны иметь приемлемый уровень правильности и внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности.

Методики количественного определения должны быть применимы в интервале от 80 до 120 % от номинального значения определяемой аналитической характеристики.

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

При валидации методики ее линейность в аналитической области проверяют экспериментально измерением аналитических сигналов для не менее чем 5 проб с различными количествами или концентрациями определяемого вещества. Экспериментальные данные обрабатывают методом наименьших квадратов с использованием линейной модели ($y = b \cdot x + a$).

Правильность методики характеризуется отклонением среднего результата определений, выполненных с ее использованием, от значения, принимаемого за истинное.

Валидируемая методика признается правильной, если значения, принимаемые за истинные, лежат внутри доверительных интервалов соответствующих средних результатов анализов, полученных экспериментально по данной методике.

Прецизионность – это характеристика рассеяния результатов, получаемых с ее использованием, относительно величины среднего результата. Мерой такого рассеяния является величина стандартного отклонения результата отдельного определения, полученная для выборки достаточно большого объема.

Прецизионность может оцениваться в трех вариантах:

- как повторяемость (сходимость);
- как внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность;
- как межлабораторная прецизионность (воспроизводимость).

Результаты оценки методики анализа по каждому из вариантов прецизионности обычно характеризуются соответствующим значением величины стандартного отклонения результата отдельного определения.

Обычно при разработке оригинальной методики определяется повторяемость (сходимость) результатов, получаемых с ее использованием. При необходимости включения разработанной методики в нормативную документацию дополнительно определяется ее внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность.

Повторяемость (сходимость)

Повторяемость аналитической методики оценивают по независимым результатам, полученным в одинаковых регламентированных условиях в одной лаборатории (один и тот же исполнитель, одно и то же оборудование, один и тот же набор реактивов) в пределах короткого промежутка времени.

Внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность

Внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность валидируемой методики оценивается в условиях работы одной лаборатории (разные дни, разные исполнители, разное оборудование и т. д.).

3.3 Критерии приемлемости

Одним из основных этапов валидационных испытаний является установление критериев приемлемости. В данном случае критерии (см. таблицу 4) выбраны исходя из содержания в образце определяемых соединений и фармакопейных требований [4, 84].

Таблица 4 - Критерии приемлемости титриметрического определения

| Параметр валидации | Критерии приемлемости |
|--|---|
| Количественное определение (титриметрический метод) | |
| 1. Специфичность | Ни растворители и реактивы, используемые для подготовки пробы, ни компоненты плацебо не искажают результат. |
| 2. Линейность | Коэффициент корреляции (r) $\geq 0,990$. |
| 3. Правильность | Среднее значение: 99 – 101 %. Коэффициент вариации $\leq 2,0\%$. Доверительный интервал среднего результата анализа должен включать 100% значение. |

Продолжение таблицы 4

| | |
|--|---|
| 4. Прецизионность | |
| 4.1. Повторяемость (сходимость) | Выборка 1: коэффициент вариации $\leq 1,5\%$ ($n \geq 6$). |
| 4.2. Внутрिलाбораторная прецизионность | $n \geq 6$. Выборка 2: коэффициент вариации $\leq 1,5\%$. Коэффициент вариации по двум выборкам $\leq 2,5\%$. F- и t-критерии менее табличных. |

4. Условия проведения испытаний

4.1 Приборы

- 1) Весы аналитические Shimadzu AUX220 1-го класса точности («Shimadzu», Япония).
- 2) Нагревательная лабораторная плитка ИКА С-MAG HS 7 («ИКА», Германия);
- 3) рН-метр "Эксперт-рН" (ООО «Эконикс-эксперт», Москва) с функцией измерения ЭДС и интерфейсом RS-232 для измерения потенциала;
- 4) Магнитная мешалка без подогрева "ПЭ-6100" (Россия);
- 5) Двухэлектродная электрохимическая ячейка объемом 10 см³, включающая индикаторный электрод - толстопленочные электроды на основе серебросодержащей пасты ПСХП-1 от ООО НПП «Дельта-пасты» (г. Зеленоград, Россия), изготовленный методом трафаретной печати ООО «НПП ЭкоБиоТест» (УрФУ, г. Екатеринбург, Россия) и электрод сравнения - хлоридсеребрянный электрод (Ag/AgCl/ 3,5 моль/л KNO₃) с двумя мембранами («Metrohm», Швейцария), заполненный раствором нитрата калия.

4.2 Посуда

- пипетки вместимостью 1 см³, 2 см³, 5 см³ по ГОСТ 29227-91;
- цилиндр мерный вместимостью 100 см³ по ГОСТ 1770-74;
- стаканчик для взвешивания тип СВ по ГОСТ 25336-82;
- колба коническая плоскодонная термически и химически стойкого стекла вместимостью 100 см³ по ГОСТ 25336-82;
- колба мерная коническая плоскодонная вместимостью 1 дм³ по ГОСТ 1770;
- бюретка градуированная вместимостью 10 см³, 1 класс точности по ГОСТ 29251-91.

4.3 Реактивы

- деионизированная вода;
- кислота азотная, х. ч., ГОСТ 4461-77;

- аммоний роданистый, х. ч., массовая доля основного вещества не менее 99,5 %, ГОСТ 27067-86;

- калий азотнокислый, х.ч., ГОСТ 4217-77;

- буферные растворы для поверки рН-метра по ГОСТ 8.135-2004:

1. калий гидрофталат $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ с $\text{pH}=4,01$ при $25\text{ }^\circ\text{C}$;

2. натрий тетраборат 10-водный $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ с $\text{pH}=9,18$ при $25\text{ }^\circ\text{C}$.

4.4 Условия окружающей среды при проведении испытаний

При проведении испытаний проводился постоянный мониторинг температурно-влажностного режима. Цель мониторинга – обеспечить условия для стабильной работы оборудования и условия хранения образцов лекарственного препарата и реактивов.

Ниже приведены условия, при которых проводились исследования.

| Показатели | Лаборатория кафедры аналитической химии УрФУ |
|-------------------------------|--|
| Температура, $^\circ\text{C}$ | 22-25 |
| Влажность, % | 29,9-33,2 |

5. Описание процедуры проведения валидируемой методики

5.1 Подготовительные работы

5.1.1 Приготовление 0,1 М раствора роданида аммония.

7,7 г роданистого аммония растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 1 дм^3 и доводят объем раствора водой до метки. Раствор хранят в склянке из темного стекла.

5.1.2 Приготовление 0,1 М раствор кислоты азотной.

34,4 мл кислоты азотной разведенной (плотность $1,095\text{ г/см}^3$) помещают в мерную колбу вместимостью 1 дм^3 , предварительно заполненную на $2/3$ водой. Затем раствор перемешивают, доводят объем раствора водой до метки и вновь тщательно перемешивают.

5.1.3 Приготовление буферных растворов для поверки рН-метра.

Буферные растворы готовились из стандарт-титров для поверки рН-метра. приготовления 1 дм^3 буферного раствора с $\text{pH}=4,01$ использовался стандарт-титр, содержащий 10,120 г калия гидрофталата.

Для приготовления 1 дм^3 буферного раствора с $\text{pH}=9,18$ использовался стандарт-титр, содержащий 19,012 г натрия тетрабората 10-водного.

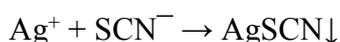
Методика приготовления буферных растворов из стандарт-титров:

- ✓ Стандарт-титр переносят в мерную колбу вместимостью 1 дм³.
- ✓ Извлекают флакон (ампулу) из упаковки.
- ✓ Промывают поверхность флакона (ампулы) водой и просушивают фильтровальной бумагой.
- ✓ Вставляют в колбу воронку, вскрывают флакон (ампулу) в соответствии с инструкцией изготовителя, дают содержимому полностью высыпаться в колбу, промывают флакон (ампулу) изнутри водой до полного удаления вещества с поверхностей, промывные воды сливают в колбу.
- ✓ Заполняют колбу водой примерно на две трети объема, взбалтывают до полного растворения содержимого.
- ✓ Заполняют колбу водой, не долив воды до метки 5-10 см³. В течение 30 мин термостатируют колбу в водяном термостате при температуре 20 °С.
- ✓ Доводят водой объем раствора в колбе до метки, закрывают пробкой и тщательно перемешивают содержимое.

5.2 Методика анализа

5.2.1 Принцип метода

Осадительное титрование (роданометрический метод):



5.2.2 Описание методики (согласно проекту ФСП).

Около 0,05 г (точная навеска) субстанции растворяют в 15 мл 0,1 М азотной кислоты и кипятят до растворения осадка (в течение 5-7 мин). После охлаждения раствора, аликвоту объемом 2,5 см³ титруют потенциометрически 0,1 М раствором роданида калия (или роданида аммония), применяя в качестве индикаторного электрода - толстопленочный электрод на основе серебросодержащей пасты, в качестве электрода сравнения - хлоридсеребряный электрод (Ag/AgCl/3,5 моль/л KCl) с двумя мембранами, заполненный раствором нитрата калия.

1 мл 0,1 М раствора роданида калия (или роданида аммония) соответствует 10,79 мг серебра.

В субстанции «Аргамид» (серебряной соли сульфадимидина) должно быть найдено не менее 27,72 % и не более 28,28 % серебра.

5.2.3 Проведение анализа

Перед началом измерения, проводят поверку рН-метра по документу КТЖГ.414318.008МП «рН-метры ЭКСПЕРТ-рН. Методика поверки», утвержденному ФГУП «ВНИИФТРИ» 28.12.2006 г.

После поверки, в электрохимическую ячейку переносят аликвоту анализируемого раствора объемом 2,5 см³. стакан с титруемым раствором помещают на столик корпуса магнитной мешалки (эксперимент проводят при постоянном перемешивании), опускают в стакан магнитный якорь, серебряный индикаторный электрод и хлоридсеребряный электрод сравнения (Ag/AgCl/ 3,5 моль/л KCL) с двумя мембранами, заполненный раствором нитрата калия.

Микробюретку заполняют 0,1 М раствором роданида аммония (калия) и закрепляют в штативе так, чтобы кончик бюретки был опущен в стакан, но не соприкасался с поверхностью титруемого раствора.

В начале проводят ориентировочное титрование, прибавляя из бюретки по 0,02 см³ раствора титранта и измеряя потенциал (E) после каждой его порции. Значение э.д.с. измеряют только после достижения ее постоянного значения (изменение э.д.с. не должно превышать 2-3 мВ в течение 1 мин). Титрование продолжают до тех пор, пока изменение э.д.с. (ΔE) или не достигнет своего максимального значения, а при дальнейшем прибавлении новых порций раствора титранта постепенно не уменьшится до малой величины.

Далее приступают к точному титрованию в области скачка E, для чего после тщательного промывания электрода сравнения и индикаторного электрода в чистый стакан для титрования вносят новую аликвоту анализируемого раствора и выполняют операции, указанные выше.

Записывают результаты титрования.

5.2.4 Обработка результатов определения

Расчет количественного содержания серебра в % (X) в субстанции «Аргамид» (серебряной соли сульфадимидина) в *i*-м параллельном определении проводили по формуле:

$$X = \frac{V \times K \times T \times 100 \times V_{\text{колбы}}}{a \times V_{\text{ал}}},$$

где V – объем титранта, израсходованный на титрование, мл;

K - поправочный коэффициент титранта (K=0,99);

T- титр раствора роданида аммония (калия) по серебру, равный 0,01079 г/мл;

V_{ал} – объем аликвоты (количество мл, взятые на анализ из разведения), мл;

$V_{\text{колбы}}$ – объем колбы для приготовления разведения, мл;

a - масса определяемого лекарственного вещества, взятая на анализ (навеска), г.

6. Проведение тестов и статистическая обработка результатов

6.1 Специфичность

При валидации титриметрических методик для подтверждения специфичности должны приниматься во внимание химические свойства определяемых и сопутствующих веществ, а так же вещества, используемые для приготовления титрованного раствора. Специфичность аналитической методики считается доказанной, если ни растворитель, ни компоненты плацебо не искажают результат.

В данном случае для подтверждения специфичности титровали растворитель – воду очищенную, являющуюся «плацебо», по вышеописанной методике. Во всех опытах отсутствовал скачок потенциала, характерный для титрования серебра раствором роданида аммония, что подтверждает специфичность методики.

Вывод: методика соответствует критерию приемлемости по показателю специфичность.

6.2 Линейность

Для установления линейной зависимости осуществляли статистическую обработку выборки, полученной в результате количественного определения навесок на девяти уровнях концентрации (в диапазоне 80-120 % от количества исследуемого вещества, принятого за 100 % – 0,05 г) с 3-кратным определением для каждой концентрации ($n = 27$). Изучаемые концентрации 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 105%, 110%, 115% и 120% (шаг 5%).

Полученные результаты представлены в таблицах 5 и 6.

Таблица 5 - Результаты установления линейной области методики

| № п/п | Уровень концентрации, % | Навеска субстанции "Аргамид", г | Объем 0,1 М NH ₄ SCN, мл | Найденное содержание серебра, % |
|-------|-------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| 1 | 80 | 0,0400 | 0,18 | 28,04 |
| | | | 0,18 | 28,04 |
| | | | 0,18 | 28,04 |

Продолжение таблицы 5

| | | | | |
|---|-----|--------|------|-------|
| 2 | 85 | 0,0421 | 0,19 | 28,16 |
| | | | 0,19 | 28,16 |
| | | | 0,19 | 28,16 |
| 3 | 90 | 0,0451 | 0,20 | 28,02 |
| | | | 0,20 | 28,02 |
| | | | 0,20 | 28,02 |
| 4 | 95 | 0,0475 | 0,21 | 27,97 |
| | | | 0,21 | 27,97 |
| | | | 0,21 | 27,97 |
| 5 | 100 | 0,0500 | 0,22 | 28,06 |
| | | | 0,22 | 28,06 |
| | | | 0,22 | 28,06 |
| 6 | 105 | 0,0525 | 0,23 | 28,00 |
| | | | 0,23 | 28,00 |
| | | | 0,23 | 28,00 |
| 7 | 110 | 0,0551 | 0,24 | 27,92 |
| | | | 0,24 | 27,92 |
| | | | 0,24 | 27,92 |
| 8 | 115 | 0,0575 | 0,25 | 28,00 |
| | | | 0,25 | 28,00 |
| | | | 0,25 | 28,00 |
| 9 | 120 | 0,0601 | 0,26 | 27,90 |
| | | | 0,26 | 27,90 |
| | | | 0,26 | 27,90 |

По данным таблицы 5 строили график зависимости объема титранта от количества исследуемого вещества (см. рисунок 8).

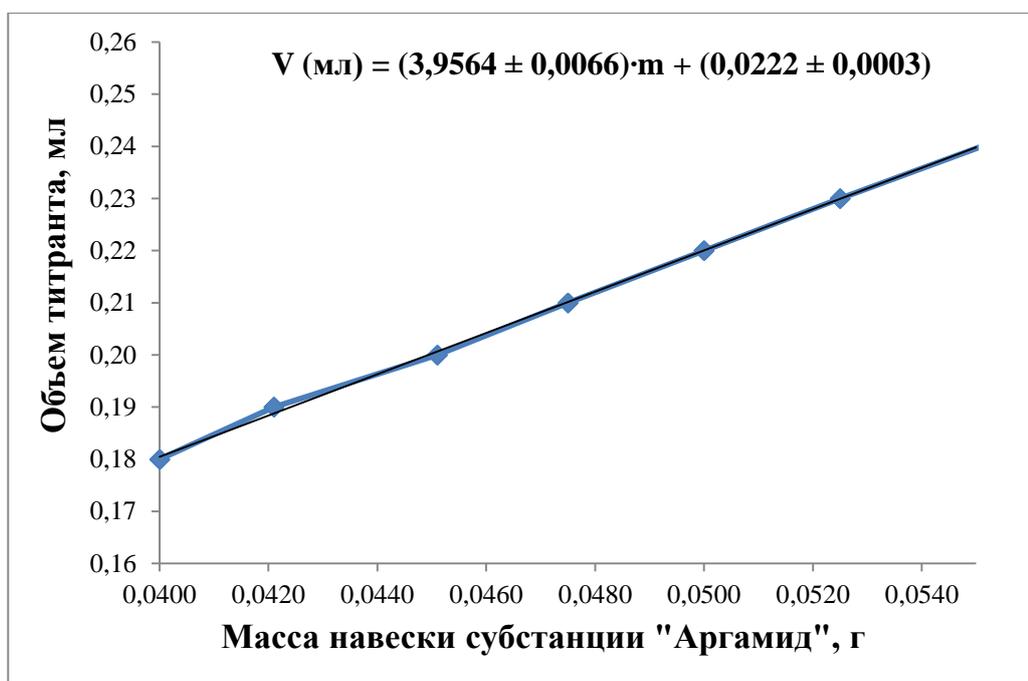


Рисунок 8 - Линейная регрессия
 объема 0,1 М раствора роданида аммония от массы субстанции «Аргамид»

Таблица 6 - Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении линейной зависимости $y = bx + a$

| <i>Статистические характеристики</i> | <i>Результаты</i> |
|--|------------------------|
| Уравнение прямой | $y = 3,9564x + 0,0222$ |
| Наклон a | 0,0222 |
| Отрезок на оси ординат b : 95% доверительный интервал | 3,9564 |
| Среднее значение массы навески \bar{x} , г | 0,0500 |
| Среднее значение объема титранта \bar{y} , мл | 0,22 |
| Табличное значение критерия Стьюдента ($P = 95\%$, $f = n-2 = 25$) | 2,06 |
| Доверительный интервал Δa | 0,0003 |
| Доверительный интервал Δb | 0,0066 |
| Дисперсия s_0^2 | 0,00000019 |
| Коэффициент корреляции (r) | 0,9997 |

Как следует из представленных результатов, график зависимости объема 0,1 М раствора роданида аммония, затрачиваемого на титрование серебра, имеет линейную зависимость и прямо пропорционально зависит от массы навески субстанции «Аргамид», используемой в опыте. Коэффициент корреляции более 0,99.

Вывод: методика соответствует критерию приемлемости по показателю линейность.

6.3. Правильность

При титровании правильность не доказывается путём сравнения методики, так как титриметрия является, так называемым, абсолютным методом. Правильность доказывалась путём определения отклика по методу добавок. В итоге исследовались 3 концентрации растворов (80, 100 и 120%) с 3-кратным определением для каждой концентрации ($n = 9$). Результаты представлены в таблице 7.

Оценка проводилась путем расчета процента восстановления, стандартного отклонения, коэффициента вариации (КВ) и доверительного интервала среднего значения ($P=95\%$) (таблица 8).

Таблица 7 - Результаты установления правильности методики

| Уровень концентрации, % | Навеска субстанции "Аргамид", г | Объем титранта, мл | Найденное содержание серебра, % | Процент восстановления (отклик), % |
|-------------------------|---------------------------------|--------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| 80 | 0,0401 | 0,17 | 27,90 | 99,64 |
| | 0,0401 | 0,17 | 27,91 | 99,68 |
| | 0,0402 | 0,18 | 28,06 | 100,22 |
| 100 | 0,0502 | 0,22 | 28,00 | 100,00 |
| | 0,0501 | 0,22 | 28,04 | 100,14 |
| | 0,0503 | 0,22 | 28,06 | 100,21 |
| 120 | 0,0602 | 0,26 | 27,89 | 99,61 |
| | 0,0603 | 0,26 | 27,92 | 99,70 |
| | 0,0604 | 0,26 | 27,93 | 99,75 |

Таблица 8 - Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении правильности

| <i>Статистические характеристики</i> | <i>Результаты</i> |
|--|-------------------|
| Среднее значение, % | 99,88 |
| Стандартное отклонение | 0,26 |
| Коэффициент вариации (относительное стандартное отклонение среднего результата), % | 0,09 |
| Нижняя граница доверительного интервала среднего результата (P = 95%) | 99,68 |
| Верхняя граница доверительного интервала среднего результата (P = 95%) | 100,08 |

Коэффициент вариации менее 2,0%. Среднее значение для процента восстановления составило 99,88% и находится внутри установленного диапазон 99 – 101 %. Доверительный интервал среднего результата анализа включает 100% значение.

Вывод: методика соответствует заявленным критериям приемлемости по показателю правильность.

6.4. Прецизионность

6.4.1 Повторяемость (сходимость)

Для оценки прецизионности проводили оценку 6 проб при 100% концентрации действующего вещества ($n = 6$). Полученные результаты представлены в таблицах 9 и 10.

Таблица 9 - Результаты установления повторяемости (сходимости) методики

| Обозначение пробы | Навеска субстанции "Аргамид", г | Объем 0,1 М NH₄SCN, мл | Найденное содержание серебра, % |
|--------------------------|--|--|--|
| Проба 1 | 0,0496 | 0,22 | 27,78 |
| Проба 2 | 0,0499 | 0,22 | 27,87 |
| Проба 3 | 0,0498 | 0,22 | 27,93 |
| Проба 4 | 0,0501 | 0,22 | 28,02 |
| Проба 5 | 0,0502 | 0,22 | 27,96 |
| Проба 6 | 0,0503 | 0,22 | 28,03 |

Таблица 10 - Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении повторяемости (сходимости)

| <i>Статистические характеристики</i> | <i>Результаты</i> |
|--|-------------------|
| Наименьшее значение, % | 27,78 |
| Наибольшее значение, % | 28,03 |
| Среднее значение \bar{x} , % | 27,93 |
| Стандартное отклонение | 0,094 |
| Коэффициент вариации (относительное стандартное отклонение среднего результата), % | 0,14 |
| Граничные значения доверительного интервала среднего результата ($\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$) | 27,93±0,10 |

Коэффициент вариации менее 1,5 % (при $n = 6$).

Вывод: методика соответствует заявленным критериям приемлемости по показателю повторяемость (сходимость).

6.4.2 Внутрилабораторная прецизионность

Для оценки внутрилабораторной прецизионности использовались данные выборки, полученные при оценке повторяемости (выборка 1) вместе с выборкой, полученной в другой день (выборка 2). Полученные результаты представлены в таблицах 11 и 12.

Таблица 11 - Результаты установления внутрилабораторной прецизионности

| № пробы | День 1 | | | День 2 | | |
|---------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| | Навеска субстанции "Аргамид", г | Объем 0,1 М NH ₄ SCN, мл | Найденное содержание серебра, % | Навеска субстанции "Аргамид", г | Объем 0,1 М NH ₄ SCN, мл | Найденное содержание серебра, % |
| Проба 1 | 0,0496 | 0,22 | 27,78 | 0,0504 | 0,22 | 27,85 |
| Проба 2 | 0,0499 | 0,22 | 27,87 | 0,0501 | 0,22 | 27,89 |
| Проба 3 | 0,0498 | 0,22 | 27,93 | 0,0498 | 0,22 | 28,06 |
| Проба 4 | 0,0501 | 0,22 | 28,02 | 0,0499 | 0,22 | 28,00 |
| Проба 5 | 0,0502 | 0,22 | 27,96 | 0,0500 | 0,22 | 27,94 |
| Проба 6 | 0,0503 | 0,22 | 28,03 | 0,0498 | 0,22 | 27,93 |

Таблица 12 - Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении внутрिलाбораторной прецизионности

| <i>Статистические характеристики</i> | <i>Результаты</i> | |
|---|----------------------|----------------------|
| | Выборка 1 | Выборка 2 |
| Наименьшее значение, % | 27,78 | 27,85 |
| Наибольшее значение, % | 28,03 | 28,06 |
| Среднее значение \bar{x} , % | 27,93 | 27,94 |
| Стандартное отклонение | 0,094 | 0,075 |
| Коэффициент вариации, % | 0,14 | 0,11 |
| Коэффициент вариации по двум сериям, % | 0,05 | |
| Граничные значения доверительного интервала среднего результата ($\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$) при $P = 95\%$, $n = 6$ | 27,93 \pm 0,10 | 27,94 \pm 0,08 |
| Вычисленное значение F-критерия (табличное значение F-критерия при $P = 95\%$, $f_1 = 5$; $f_2 = 5$ равно 5,05) | 1,57 | |
| Вычисленное значение t-критерия (табличное значение t-критерия при $P = 95\%$, $f = 10$ равно 2,228) | 0,26 | |

Коэффициент вариации для выборки 2, полученной в другой день менее 1,5 %. Коэффициент вариации для двух выборок менее 2,5 %. Вычисленные значения F- и t-критериев не превысили табличных (контрольных) значений.

Вывод: методика соответствует заявленным критериям приемлемости по показателю внутрिलाбораторная прецизионность.

6.5 Аналитическая область методики

В рамках выбранного диапазона концентраций (от 80 до 120 %) была доказана правильность, прецизионность и линейность.

7. Выводы

Валидационные испытания по показателю «Количественное определение серебра» в фармацевтической субстанции «Аргамид» проведены в соответствии с действующими нормативными документами и в соответствии с методикой, представленной в проекте ФСП, в полном объеме. Для каждого из выполненных тестов получены положительные результаты. Каких-либо несоответствий выявлено не было, поэтому валидируемую методику можно считать приемлемой для оценки качества анализируемой субстанции.

Глава 4. Определение серебра в готовой лекарственной форме (1% креме «Аргамид»)

4.1. Оценка возможности применения метода осадительного титрования с потенциометрической индикацией КТТ для анализа крема «Аргамид»

В процессе исследования научных источников, было установлено, что серебро в мягкой лекарственной форме, в которой действующее вещество сходно по строению с анализируемым веществом (2% крем «Аргосульфам»), определяют методом осадительной титриметрии (титрант - раствор иодида калия) с потенциометрической индикацией КТТ [22]. В частности, пробоподготовку автор данной статьи осуществлял, растворяя навеску крема в 6М азотной кислоте при нагревании. В дальнейшем навеску несколько раз разбавляли. Итоговая концентрация серебра в испытуемом растворе анализируемого автором вещества составила по нашим расчетам около 6×10^{-6} моль/л. Если полностью следовать указанной методике, то концентрация серебра в испытуемом растворе исследуемого нами соединения (1% крема «Аргамид») составит $2,6 \times 10^{-6}$ моль/л. Данная концентрация является недостаточной для обнаружения потенциометрическим методом, для которого, как известно, нижняя граница определяемых концентраций составляет не менее 10^{-5} моль/л [27].

Для проверки порога чувствительности вышеуказанной методики были приготовлены модельные растворы ионов серебра в концентрационном диапазоне 1×10^{-2} - 1×10^{-5} моль/л, который соответствует интервалу линейности метода титриметрии с потенциометрической индикацией КТТ. Растворы готовили путем последовательного разбавления исходного более концентрированного стандартного раствора AgNO_3 в день эксперимента. В качестве фонового электролита для поддержания постоянной ионной силы применяли 0,05 М раствор KNO_3 .

В качестве титранта использовали растворы иодида калия, а не роданида аммония. Данный выбор был обусловлен значением произведения растворимости образующегося осадка - $\text{PP}_{\text{AgI}} = 1,1 \cdot 10^{-16}$, тогда как $\text{PP}_{\text{AgSCN}} = 1,1 \cdot 10^{-12}$. Это позволяет повысить чувствительность анализа и обеспечить хорошую воспроизводимость его результатов. Кроме того, раствор KI нетоксичен.

В экспериментах использовались свежеприготовленные растворы иодида калия.

В качестве индикаторного применяли толстопленочный электрод на основе серебрясодержащей пасты. Технология изготовления данного электрода представлена в п.3.1.

В качестве электрода сравнения использовали двухключевой хлоридсеребряный электрод, заполненный раствором нитрата калия.

Из мерной колбы вместимостью 50 мл брали аликвоту модельного раствора серебра объемом 5 мл, помещали в стеклянный стаканчик и титровали раствором калия йодида при комнатной температуре. После каждой добавки титранта (объемом от 0,05 до 0,5 мл) при перемешивания раствора магнитной мешалкой ожидали стабилизации показаний рН-метра, после чего записывали величину достигнутого равновесного потенциала.

Кривые титрования регистрировали с использованием рН-метра "Эксперт-рН" (ООО «Эконикс-эксперт», Москва).

Изначально для определения содержания серебра в модельных растворах (МР) нитрата серебра готовили растворы йодида калия эквимольной концентрации, т.е. для титрования МР с концентрацией $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л, готовили раствор йодида калия такой же концентрации.

Однако в результате экспериментов было определено, что оптимальной для определения содержания серебра в модельных растворах с концентрацией от $1 \cdot 10^{-3}$ до $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л является избыток титранта, т.е. раствор йодида калия с концентрацией $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

Проверку правильности определения содержания серебра в модельном растворе проводили методом «введено-найденно». В табл. 13 приведены результаты титрования растворов, содержащих различные количества определяемого иона.

Таблица 13 - Результаты потенциометрического титрования МР серебра раствором йодида калия

| Введено Ag | | Найдено Ag | Относительная погрешность среднего результата ($P = 0,95; n = 3$) |
|-----------------------------------|----------------------|-------------------------------------|--|
| Объем титруемого раствора = 50 мл | | | |
| С, моль/л | m, г | ($m_{\text{сред}} \pm \Delta$), г | ξ, % |
| $1,1 \cdot 10^{-2}$ | $5,39 \cdot 10^{-2}$ | $(5,3797 \pm 0,0103) \cdot 10^{-2}$ | 0,19 |
| $1,5 \cdot 10^{-3}$ | $8,09 \cdot 10^{-3}$ | $(8,0840 \pm 0,0203) \cdot 10^{-3}$ | 0,25 |
| $2,5 \cdot 10^{-4}$ | $1,35 \cdot 10^{-3}$ | $(1,3423 \pm 0,0080) \cdot 10^{-3}$ | 0,59 |
| $3,0 \cdot 10^{-5}$ | $1,62 \cdot 10^{-4}$ | $(1,6130 \pm 0,0131) \cdot 10^{-4}$ | 0,81 |

Как видно из таблицы, между введенными и найденными содержаниями серебра не наблюдалось статистически значимых расхождений, относительная погрешность результатов анализа в серии 3 параллельных определений для каждой концентрации определяемого диапазона во всех случаях не превысила 1 %.

Также было подтверждено практически, что чувствительность данной методики не достаточна для обнаружения концентраций анализируемого вещества на уровне ниже $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

Ниже представлены произведенные расчеты и кривые титрования, полученные при определении чувствительности метода потенциометрического титрования на модельных растворах серебра.

1. Расчет титра раствора титранта – калия иодида по серебру:

- при концентрации KI = $1 \cdot 10^{-2}$

$$T_{(KI/Ag)} = \frac{C_{KI} \times M_{Ag}}{1000} = \frac{0,01 \times 107,8682}{1000} = 0,001079 \text{ (г/мл)}$$

- при концентрации KI = $1 \cdot 10^{-3}$

$$T_{(KI/Ag)} = \frac{C_{KI} \times M_{Ag}}{1000} = \frac{0,001 \times 107,8682}{1000} = 0,0001079 \text{ (г/мл)}$$

2. Предварительный расчет объема титранта, который будет затрачен на титрование аликвоты навески азотнокислого серебра, проводили по формуле:

$$V_{KY} = \frac{\alpha \times V_{ал}}{T_{KI/Ag} \times V_{колбы}},$$

где $V_{ал} = 5$ мл;

$V_{колбы} = 50$ мл.

3. Расчет массы серебра в г (α) проводили по формуле:

$$\alpha = \frac{V_{KI} \times T_{KI/Ag} \times V_{колбы}}{V_{ал}}$$

Результаты потенциометрического титрования модельных растворов серебра различной концентрации раствором калия иодида соответствующей концентрации в виде дифференциальных кривых в координатах $\Delta E / \Delta V \div V$ представлены ниже.

Как видно из представленных рисунков, даже при незначительном содержании серебра в модельном растворе дифференциальные кривые имеют выраженный скачок потенциала.

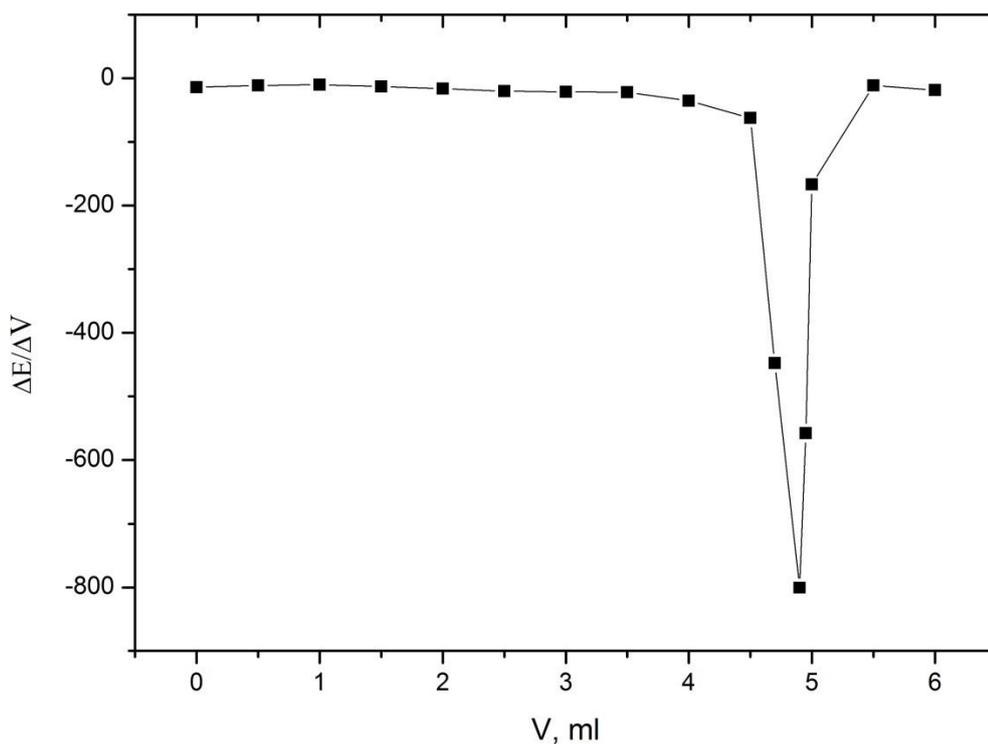


Рисунок 9 - Дифференциальная кривая потенциометрического титрования модельного раствора серебра с концентрацией 1×10^{-2} М раствором иодида калия с концентрацией 1×10^{-2} М

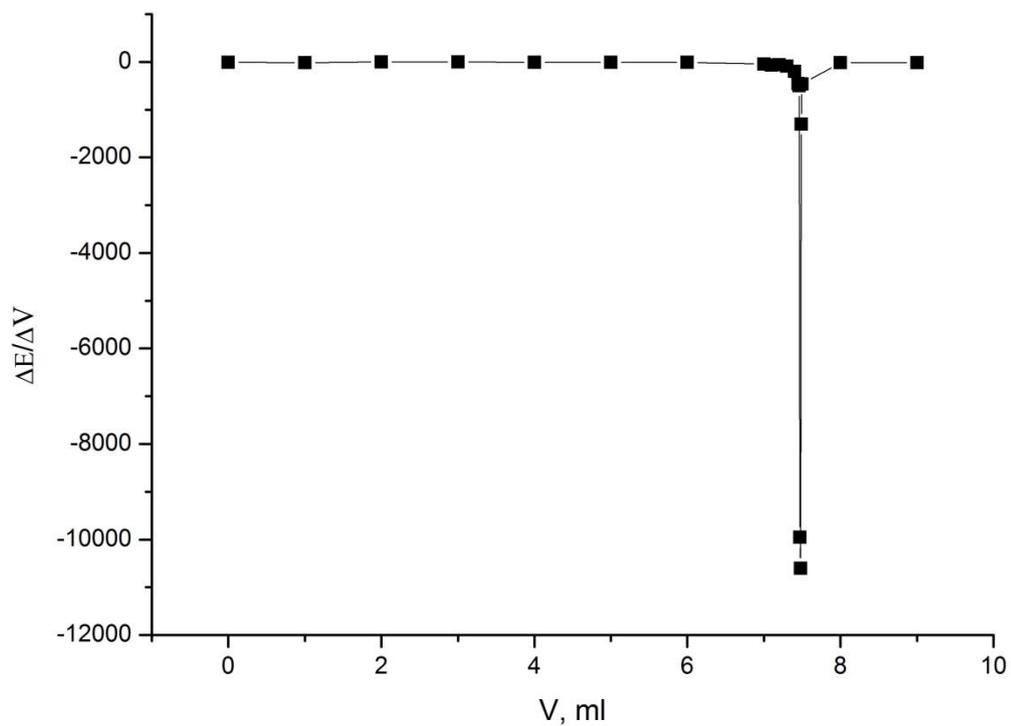


Рисунок 10 - Дифференциальная кривая потенциометрического титрования модельного раствора серебра с концентрацией 1×10^{-3} М раствором иодида калия с концентрацией 1×10^{-3} М

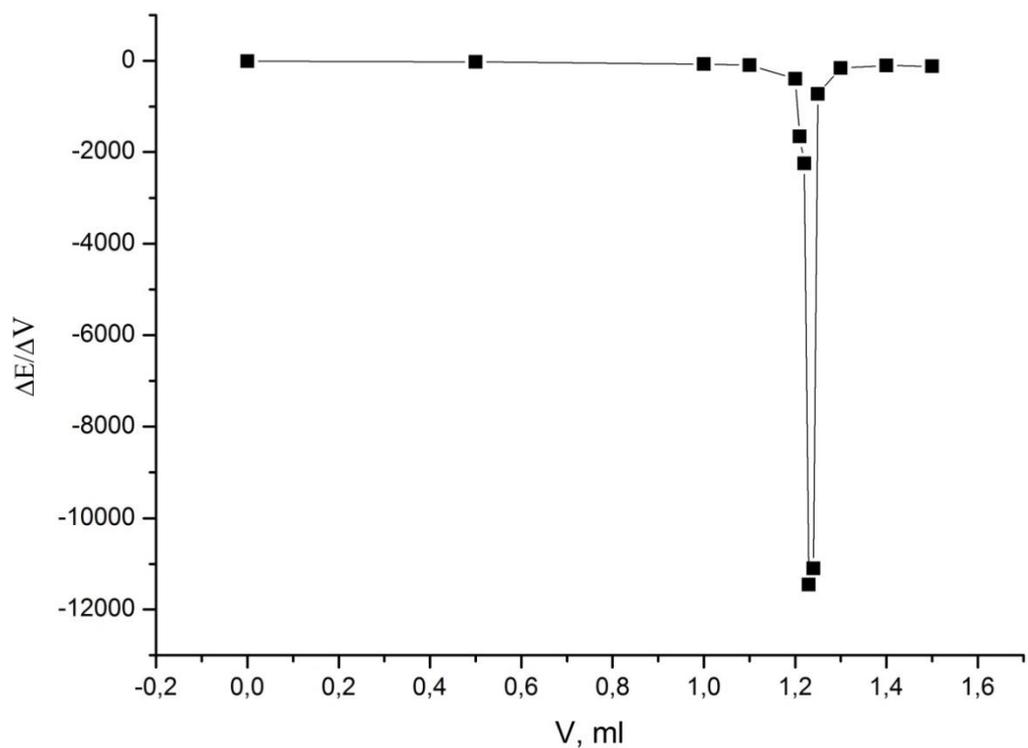


Рисунок 11 - Дифференциальная кривая потенциометрического титрования модельного раствора серебра с концентрацией 1×10^{-4} М раствором иодида калия с концентрацией 1×10^{-3} М

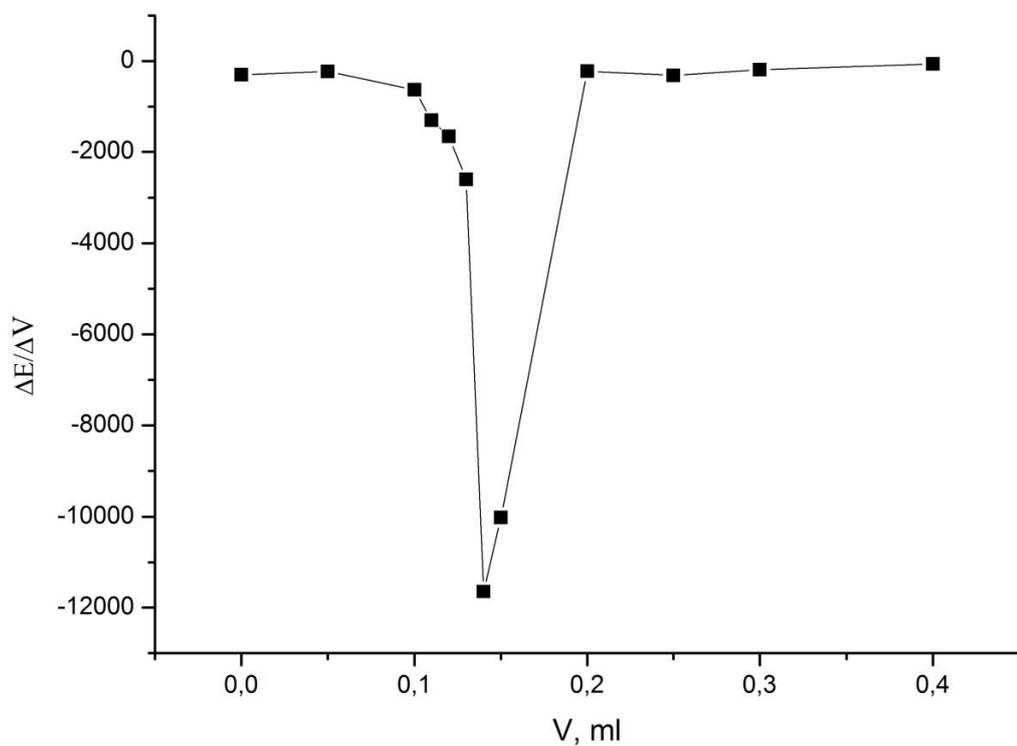


Рисунок 12 - Дифференциальная кривая потенциометрического титрования модельного раствора серебра с концентрацией 1×10^{-5} М раствором иодида калия с концентрацией 1×10^{-3} М

4.2 Разработка методики определения серебра в 1 % креме «Аргамид»

Определение чувствительности метода потенциометрического титрования на модельных растворах серебра, показало, что концентрация серебра в растворе на уровне 10^{-6} моль/л выходит за нижнюю определяемую границу. На основании полученных экспериментальных данных нами была изменена масса навески и степень разведения пробы по сравнению с взятой за основу методикой [22].

В результате проведенных исследований нами была разработана следующая методика определения содержания серебра в 1% креме «Аргамид»:

«Около 0,5 г (точная навеска) крема помещают в колбу плоскодонную, добавляют около 10 мл 1 М азотной кислоты и нагревают на кипящей водяной бане в течение 5-7 минут при перемешивании. После охлаждения пробу фильтруют через обеззолёный фильтр («Синяя лента») в колбу для титрования на 250 мл и трижды промывают фильтр водой очищенной (или деионизированной). После этого доводят объем водой до метки. Аликвоту объемом 25 мл титруют потенциометрически 0,001 М раствором иодида калия, применяя в качестве индикаторного толстоплёночные электроды на основе серебряносодержащей пасты, в качестве электрода сравнения - хлоридсеребряный электрод (Ag/AgCl/ 3,5 моль/л KCl) с двумя мембранами, заполненный раствором нитрата калия.

1 мл 0,001 М раствора иодида калия соответствует 0,1079 мг серебра.

В 100 г 1% креме «Аргамид» (серебряной соли сульфадимидина) должно быть найдено не менее 0,2772 г и не более 0,2828 г серебра».

Концентрация ионов серебра в ИР пробы по данной методике составляет $5,2 \times 10^{-5}$ моль/л и соответствует интервалу линейности метода потенциометрического титрования.

Расчеты по методике:

1. Расчет титра раствора титранта (калия иодида) по серебру:

$$T_{(KI/Ag)} = \frac{C_{KI} \times M_{Ag}}{1000} = \frac{0,001 \times 107,8682}{1000} = 0,0001079 \text{ (г/мл)}$$

Таким образом, 1 мл 0,001 М раствора иодида калия соответствует 0,1079 мг серебра.

2. Предварительный расчет объема титранта, который будет затрачен на титрование аликвоты навески серебряной соли сульфадимидина:

$$V = \frac{a \times b \times V_{ал}}{K \times T \times P \times V_{колбы}}$$

где b – содержание серебра в лекарственной форме, г.

Следовательно, на титрование навески крема серебряной соли массой 0,5 г, в 100 г которого должно быть найдено около 0,28 г серебра, должно пойти около:

$$V = \frac{0,5 \times 0,28 \times 25}{1 \times 0,0001079 \times 100 \times 250} = 1,30 \text{ (мл)}.$$

3. Расчет количественного содержания серебра в г (X) в креме «Аргамид» проводили по формуле:

$$X = \frac{V \times K \times T \times P \times V_{\text{колбы}}}{a \times V_{\text{ал}}},$$

где V – объем титранта, израсходованный на титрование, мл;

K - поправочный коэффициент титранта;

T- титр раствора калия иодида по определяемому веществу;

V_{ал} – объем аликвоты (количество мл, взятые на анализ из разведения), мл;

V_{колбы} – объем колбы для приготовления разведения, мл;

P – общая масса лекарственной формы по прописи, г;

a - масса определяемого лекарственного вещества, взятая на анализ (навеска), г;

Интегральная кривая потенциметрического титрования сульфадимидина серебра 0,001 М раствором иодида калия в координатах E ÷ V (см. рисунок 13) и дифференциальная кривая потенциметрического титрования сульфадимидина серебра 0,001 М раствором иодида калия в координатах ΔE/ΔV ÷ V (см. рисунок 14), построенные по результатам титрования, представлены ниже.

Результаты определения содержания серебра в креме «Аргамид» методом осадительного титрования (титрант – раствор иодида калия) с потенциметрической индикацией конечной точки титрования и метрологические характеристики методики представлены в разделе 4.3.

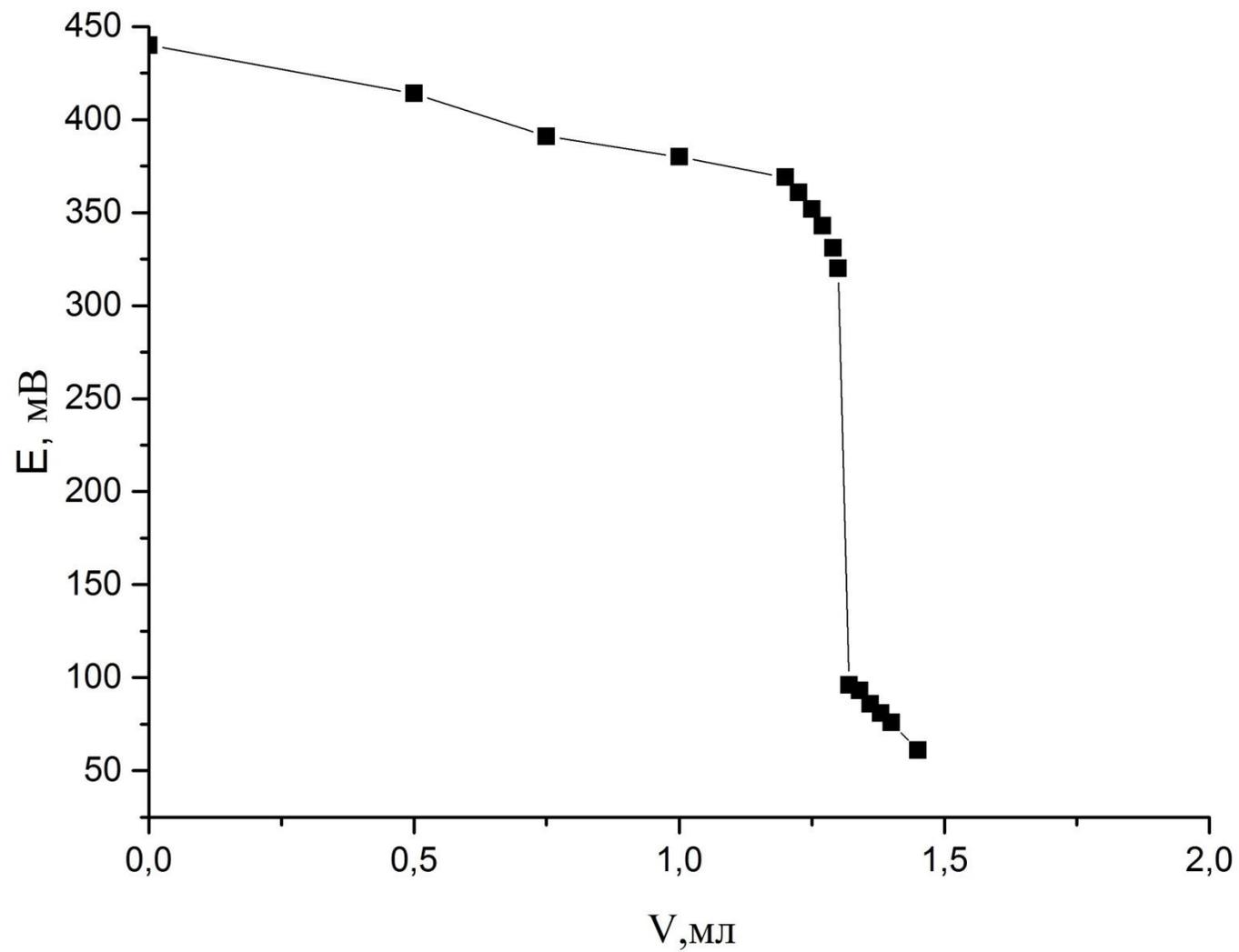


Рисунок 13 - Интегральная кривая титрования серебра, содержащегося в 1% креме «Аргамид»
0,001 М раствором иодида с потенциометрической индикацией КТГ

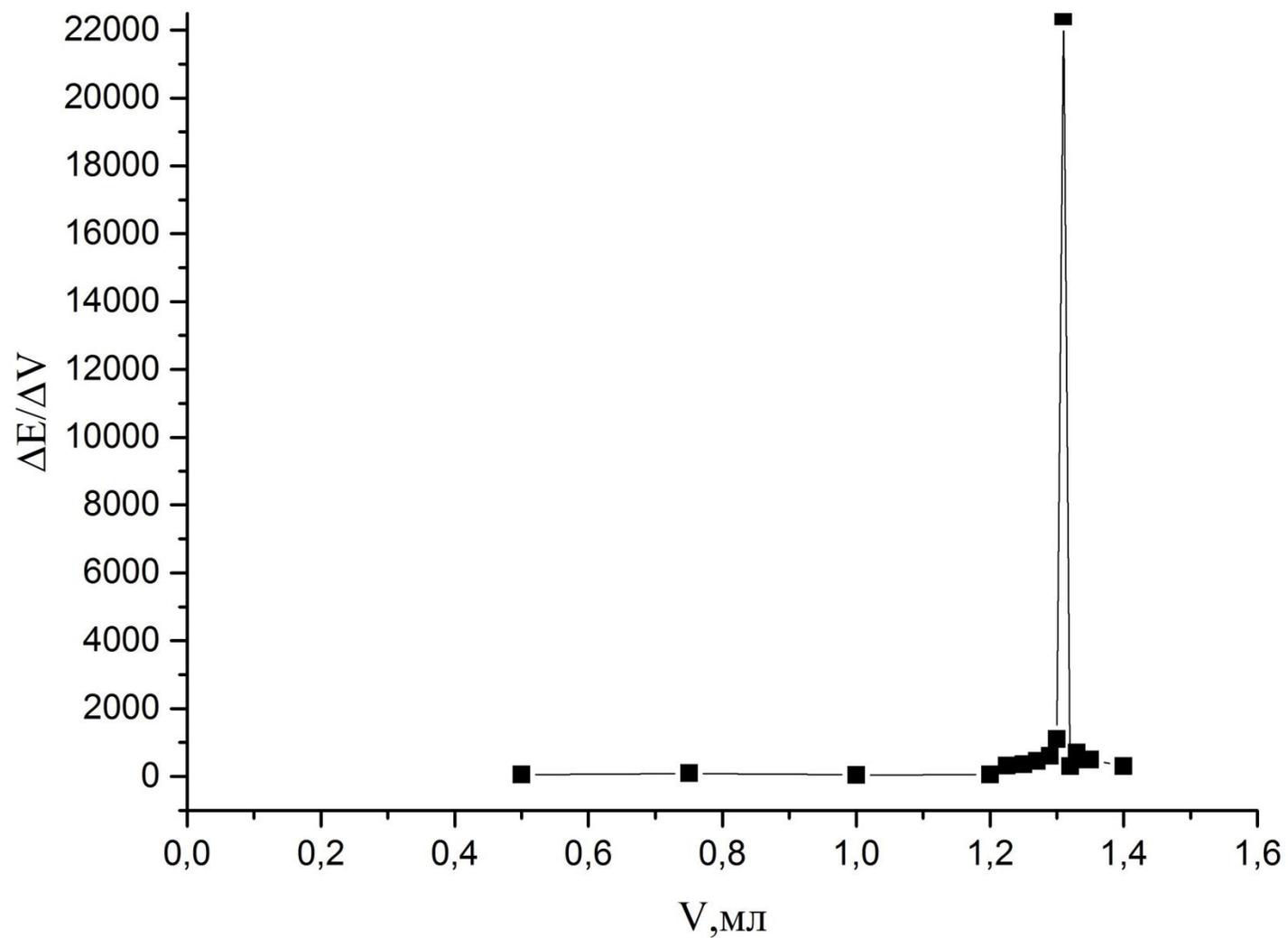


Рисунок 14 – Дифференциальная кривая титрования серебра, содержащегося в 1% креме «Аргамид»
0,001 М раствором иодида с потенциометрической индикацией КТТ

4.3 Валидация разработанной методики количественного определения серебра в 1% креме «Аргамид»

Валидация проводилась в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик». Статистическая обработка полученных результатов проводилась в соответствии с ОФС ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента». В результате валидации был составлен отчет следующего содержания.

Отчет по валидации методики роданометрического определения серебра с потенциометрической индикацией КТТ в 1% креме «Аргамид»

| | Вид валидации | Подвиды валидации |
|---|--|--|
| (+) новый продукт /метод | <input type="checkbox"/> перспективная | <input type="checkbox"/> брекетинг - валидация |
| <input type="checkbox"/> наладка, ремонт, изменения | <input type="checkbox"/> ретроспективная | <input type="checkbox"/> валидация переноса |
| <input type="checkbox"/> ревалидация | <input type="checkbox"/> сопутствующая | (+) частичная |
| <input type="checkbox"/> прочее | (+) периодическая | <input type="checkbox"/> полная |

Основание: Валидация методики

| | Должность | ФИО | Подпись | Дата |
|---------------------|---|----------------|---------|------|
| Разработано: | Магистрант кафедры аналитической химии ХТИ УрФУ | Скосырева Н.С. | | |
| Согласовано: | Старший преподаватель кафедры аналитической химии ХТИ УрФУ | Марина Н.В. | | |
| Утверждено: | Руководитель НИР к.х.н., доцент кафедры аналитической химии ХТИ УрФУ | Малахова Н.А. | | |

Содержание

1. Пояснительная записка
 - 1.1 Цель
 - 1.2 Класс методики
 - 1.3 Предмет
2. Организация работ
 - 2.1 Ответственность
 - 2.2 Перечень мероприятий
 - 2.3 Сроки проведения мероприятий
3. Выбор проверяемых параметров и критериев приемлемости. Термины и определения
 - 3.1 Выбор проверяемых параметров
 - 3.2 Термины и определения
 - 3.3 Критерии приемлемости
4. Условия проведения испытаний
 - 4.1 Приборы
 - 4.2 Посуда
 - 4.3 Реактивы
 - 4.4 Условия окружающей среды при проведении испытаний
5. Описание процедуры проведения валидируемой методики
 - 5.1 Подготовительные работы
 - 5.2 Методика анализа
6. Проведение тестов и статистическая обработка результатов валидации
 - 6.1 Специфичность
 - 6.2 Аналитическая область
 - 6.3 Линейность
 - 6.4 Правильность
 - 6.5 Прецизионность:
 - 6.5.1 Повторяемость (сходимость)
 - 6.5.2 Промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность
7. Выводы
8. Документация и литература

1. Пояснительная записка

1.1 Цель

Целью валидации методики количественного определения серебра в 1% креме «Аргамид» является документированное подтверждение того, что методика анализа позволяет получить ожидаемые, достоверные и воспроизводимые результаты, соответствующие поставленным задачам и удовлетворяющие всем установленным критериям приемлемости.

1.2 Класс методики

Валидируемая методика количественного определения серебра в 1% креме «Аргамид» относится к классу С (количественное определение содержания определяемого компонента в фармацевтической субстанции).

При валидации методики в другой лаборатории (например, на предприятии-производителе) методика будет классифицирована в соответствии со стандартной операционной процедурой (СОП) предприятия, описывающей процедуру валидации аналитических методик.

1.3 Предмет

Данный отчет распространяется на раздел «Количественное определение серебра» проекта ФСП на лекарственный препарата - 1% крем «Аргамид». При выполнении валидации методик были использованы соответствующие методические подходы [4, 84].

Разделы со **2 (2.1-2.3) по 4 (4.1-4.4)** включительно – соответствуют пунктам **2 (2.1-2.3) по 4 (4.1-4.4)** в Отчете по валидации методики роданометрического определения серебра с потенциометрической индикацией КТТ в субстанции «Аргамид» (глава 3, раздел 3.3).

5. Описание процедуры проведения валидируемой методики

5.1 Подготовительные работы

5.1.1 Приготовление 0,001 М раствора калия йодида.

0,1660 г йодистого калия растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 1 дм³ и доводят объем раствора водой до метки. Раствор хранят в склянке из темного стекла.

5.1.2 Приготовление 1 М раствор кислоты азотной.

344 мл кислоты азотной разведенной (плотность 1,095 г/см³) помещают в мерную колбу вместимостью 1 дм³, предварительно заполненную на 1/2 водой. Затем раствор

перемешивают, доводят объем раствора водой до метки и вновь тщательно перемешивают.

5.1.3 Приготовление буферных растворов для поверки рН-метра.

Соответствует пункту 5.1.3 в Отчете по валидации методики роданометрического определения серебра с потенциометрической индикацией КТТ в субстанции «Аргамид» (глава 3, раздел 3.3).

Буферные растворы готовились из стандарт-титров для поверки рН-метра. приготовления 1 дм³ буферного раствора с рН=4,01 использовался стандарт-титр, содержащий 10,120 г калия гидрофталата.

Для приготовления 1 дм³ буферного раствора с рН=9,18 использовался стандарт-титр, содержащий 19,012 г натрия тетрабората 10-водного.

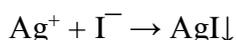
Методика приготовления буферных растворов из стандарт-титров:

- ✓ Стандарт-титр переносят в мерную колбу вместимостью 1 дм³.
- ✓ Извлекают флакон (ампулу) из упаковки.
- ✓ Промывают поверхность флакона (ампулы) водой и просушивают фильтровальной бумагой.
- ✓ Вставляют в колбу воронку, вскрывают флакон (ампулу) в соответствии с инструкцией изготовителя, дают содержимому полностью высыпаться в колбу, промывают флакон (ампулу) изнутри водой до полного удаления вещества с поверхностей, промывные воды сливают в колбу.
- ✓ Заполняют колбу водой примерно на две трети объема, взбалтывают до полного растворения содержимого.
- ✓ Заполняют колбу водой, не долив воды до метки 5-10 см³. В течение 30 мин термостатируют колбу в водяном термостате при температуре 20 °С.
- ✓ Доводят водой объем раствора в колбе до метки, закрывают пробкой и тщательно перемешивают содержимое.

5.2 Методика анализа

5.2.1 Принцип метода

Осадительное титрование (йодометрический метод):



5.2.2 Описание методики (согласно проекту ФСП).

Около 0,5 г (точная навеска) крема помещают в колбу плоскодонную, добавляют около 10 мл 1 М азотной кислоты и нагревают на кипящей водяной бане в течение 5-7 минут при перемешивании. После охлаждения пробу фильтруют через обеззоленный

фильтр («Синяя лента») в колбу для титрования на 250 мл и трижды промывают фильтр водой очищенной (или деионизированной). После этого доводят объем водой до метки. Аликвоту объемом 25 мл титруют потенциометрически 0,001 М раствором иодида калия, применяя в качестве индикаторного электрода - толсто пленочные электроды на основе серебросодержащей пасты, в качестве электрода сравнения - хлоридсеребряный электрод ($\text{Ag}/\text{AgCl}/ 3,5$ моль/л KCl) с двумя мембранами, заполненный раствором нитрата калия.

1 мл 0,001 М раствора иодида калия соответствует 0,1079 мг серебра.

В 1% креме «Аргамид» (серебряной соли сульфадимидина) должно быть найдено не менее 0,2772 г и не более 0,2828 г серебра.

5.2.3 Проведение анализа

Перед началом измерения, проводят поверку рН-метра по документу КТЖГ.414318.008МП «рН-метры ЭКСПЕРТ-рН. Методика поверки», утвержденному ФГУП «ВНИИФТРИ» 28.12.2006 г.

После поверки, в электрохимическую ячейку переносят аликвоту анализируемого раствора объемом 25 см³. стакан с титруемым раствором помещают на столик корпуса магнитной мешалки (эксперимент проводят при постоянном перемешивании), опускают в стакан магнитный якорь, серебряный индикаторный электрод и хлоридсеребряный электрод сравнения ($\text{Ag}/\text{AgCl}/ 3,5$ моль/л KCl) с двумя мембранами, заполненный раствором нитрата калия.

Микробюретку заполняют 0,001 М раствором иодида калия и закрепляют в штативе так, чтобы кончик бюретки был опущен в стакан, но не соприкасался с поверхностью титруемого раствора.

В начале проводят ориентировочное титрование, прибавляя из бюретки по 0,02 см³ раствора титранта и измеряя E после каждой его порции. Значение э.д.с. измеряют только после достижения постоянного ее значения (изменение э.д.с. не должно превышать 2-3 мВ в течение 1 мин). Титрование продолжают до тех пор, пока изменение э.д.с. (ΔE) или не достигнет своего максимального значения, а при дальнейшем прибавлении новых порций раствора титранта постепенно не уменьшится до малой величины.

Далее приступают к точному титрованию в области скачка E , для чего после тщательного промывания электрода сравнения и индикаторного электрода в чистый стакан для титрования вносят новую аликвоту анализируемого раствора и выполняют операции, указанные выше.

Записывают результаты титрования.

5.2.4 Обработка результатов определения

Расчет количественного содержания серебра в г (X) в 100 г 1% крема «Аргамид» (серебряной соли сульфадимидина) в *i*-м параллельном определении проводили по формуле:

$$X = \frac{V \times K \times T \times P \times V_{\text{колбы}}}{a \times V_{\text{ал}}},$$

где V – объем титранта, израсходованный на титрование, мл;

K - поправочный коэффициент титранта (K=1);

T- титр раствора иодида калия по серебру, равный 0,0001079 г/мл;

V_{ал} – объем аликвоты (количество мл, взятые на анализ из разведения), мл;

V_{колбы} – объем колбы для приготовления разведения, мл;

P – общая масса лекарственной формы по прописи, г;

a - масса определяемого лекарственного вещества, взятая на анализ (навеска), г.

6. Проведение тестов и статистическая обработка результатов

6.1 Специфичность

При валидации титриметрических методик для подтверждения специфичности должны приниматься во внимание химические свойства определяемых и сопутствующих веществ, а так же вещества, используемые для приготовления титрованного раствора. Специфичность аналитической методики считается доказанной, если ни растворитель, ни компоненты плацебо не искажают результат.

В данном случае для подтверждения специфичности титровали растворитель – воду очищенную, являющуюся «плацебо», по вышеописанной методике. Во всех опытах отсутствовал скачок потенциала, характерный для титрования серебра раствором иодида калия, что подтверждает специфичность методики.

Вывод: методика соответствует критерию приемлемости по показателю специфичность.

6.2 Линейность

Для установления линейной зависимости осуществляли статистическую обработку выборки, полученной в результате количественного определения навесок на девяти уровнях концентрации (в диапазоне 80-120 % от количества исследуемого вещества, принятого за 100 % – 0,5 г) с 3-кратным определением для каждой

концентрации ($n = 27$). Изучаемые концентрации 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 105%, 110%, 115% и 120% (шаг 5%).

Полученные результаты представлены в таблицах 14 и 15.

Таблица 14 - Результаты установления линейной области методики

| № п/п | Уровень концентрации, % | Навеска крема "Аргамид", г | Объем 0,001 М KI, мл | Найденное содержание серебра, г |
|--------------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|--|
| 1 | 80 | 0,4001 | 1,05 | 0,2818 |
| | | | 1,05 | 0,2818 |
| | | | 1,05 | 0,2818 |
| 2 | 85 | 0,4250 | 1,10 | 0,2810 |
| | | | 1,10 | 0,2810 |
| | | | 1,10 | 0,2810 |
| 3 | 90 | 0,4501 | 1,17 | 0,2807 |
| | | | 1,17 | 0,2807 |
| | | | 1,17 | 0,2807 |
| 4 | 95 | 0,4751 | 1,24 | 0,2816 |
| | | | 1,24 | 0,2816 |
| | | | 1,24 | 0,2816 |
| 5 | 100 | 0,5001 | 1,30 | 0,2805 |
| | | | 1,30 | 0,2805 |
| | | | 1,30 | 0,2805 |
| 6 | 105 | 0,5251 | 1,36 | 0,2801 |
| | | | 1,36 | 0,2801 |
| | | | 1,36 | 0,2801 |
| 7 | 110 | 0,5501 | 1,43 | 0,2805 |
| | | | 1,43 | 0,2805 |
| | | | 1,43 | 0,2805 |
| 8 | 115 | 0,5751 | 1,49 | 0,2796 |
| | | | 1,49 | 0,2796 |
| | | | 1,49 | 0,2796 |
| 9 | 120 | 0,6002 | 1,55 | 0,2795 |
| | | | 1,55 | 0,2795 |
| | | | 1,55 | 0,2795 |

По данным таблицы 14 строили график зависимости объема титранта от количества исследуемого вещества (см. рисунок 15).

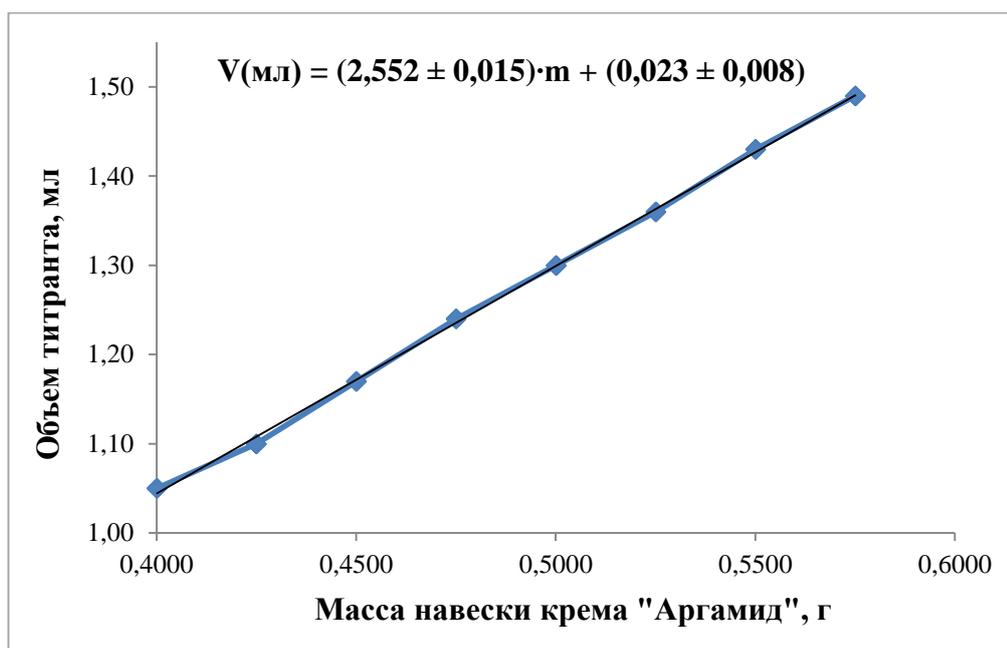


Рисунок 15 - Линейная регрессия
объема 0,001 М раствора иодида калия от массы крема «Аргамид»

Таблица 15 - Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении линейной зависимости $y = bx + a$

| <i>Статистические характеристики</i> | <i>Результаты</i> |
|--|----------------------|
| Уравнение прямой | $y = 2,552x + 0,023$ |
| Наклон a | 0,023 |
| Отрезок на оси ординат b : 95% доверительный интервал | 2,552 |
| Среднее значение массы навески \bar{x} , г | 0,5001 |
| Среднее значение объема титранта \bar{y} , мл | 1,30 |
| Табличное значение критерия Стьюдента ($P = 95\%$, $f = n-2 = 25$) | 2,06 |
| Доверительный интервал Δa | 0,008 |
| Доверительный интервал Δb | 0,015 |
| Дисперсия s_0^2 | 0,000003 |
| Коэффициент корреляции (r) | 0,9996 |

Как следует из представленных результатов, график зависимости объема 0,001 М раствора иодида калия, затрачиваемого на титрование серебра, имеет линейную зависимость и прямо пропорционально зависит от массы навески крема «Аргамид», используемой в опыте. Коэффициент корреляции более 0,99.

Вывод: методика соответствует критерию приемлемости по показателю линейность.

6.3. Правильность

При титровании правильность не доказывается путём сравнения методики, так как титриметрия является, так называемым, абсолютным методом. Правильность доказывалась путём определения отклика по методу добавок. В итоге исследовались 3 концентрации растворов (80, 100 и 120%) с 3-кратным определением для каждой концентрации ($n = 9$). Результаты представлены в таблице 16.

Оценка проводилась путем расчета процента восстановления, стандартного отклонения, коэффициента вариации (КВ) и доверительного интервала среднего значения ($P=95\%$) (таблица 17).

Таблица 16 - Результаты установления правильности методики

| Уровень концентрации, % | Навеска крема "Аргамид", г | Объем титранта, мл | Найденное содержание серебра, г | Процент восстановления (отклик), % |
|-------------------------|----------------------------|--------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| 80 | 0,4012 | 1,04 | 0,2797 | 99,89 |
| | 0,4011 | 1,04 | 0,2798 | 99,92 |
| | 0,4009 | 1,04 | 0,2799 | 99,97 |
| 100 | 0,5007 | 1,30 | 0,2801 | 100,05 |
| | 0,5009 | 1,30 | 0,2800 | 100,01 |
| | 0,5010 | 1,30 | 0,2800 | 99,99 |
| 120 | 0,6002 | 1,56 | 0,2804 | 100,16 |
| | 0,6007 | 1,56 | 0,2802 | 100,08 |
| | 0,6005 | 1,56 | 0,2803 | 100,11 |

Таблица 17 - Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении правильности

| <i>Статистические характеристики</i> | <i>Результаты</i> |
|--|-------------------|
| Среднее значение | 100,02 |
| Стандартное отклонение | 0,088 |
| Коэффициент вариации (относительное стандартное отклонение среднего результата), % | 0,029 |
| Нижняя граница доверительного интервала среднего результата (P = 95%) | 99,95 |
| Верхняя граница доверительного интервала среднего результата (P = 95%) | 100,09 |

Коэффициент вариации менее 2,0%. Среднее значение для процента восстановления составило 100,02 % и находится внутри установленного диапазон 99 – 101 %. Доверительный интервал среднего результата анализа включает 100 % значение.

Вывод: методика соответствует заявленным критериям приемлемости по показателю правильность.

6.4. Прецизионность

6.4.1 Повторяемость (сходимость)

Для оценки прецизионности проводили оценку 6 проб при 100% концентрации действующего вещества ($n = 6$). Полученные результаты представлены в таблицах 18 и 19.

Таблица 18 - Результаты установления повторяемости (сходимости) методики

| Обозначение пробы | Навеска крема "Аргамид", г | Объем 0,001 М KI, мл | Найденное содержание серебра, г |
|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|--|
| Проба 1 | 0,5003 | 1,30 | 0,2804 |
| Проба 2 | 0,5004 | 1,30 | 0,2803 |
| Проба 3 | 0,4999 | 1,29 | 0,2784 |
| Проба 4 | 0,4997 | 1,29 | 0,2785 |
| Проба 5 | 0,5007 | 1,30 | 0,2801 |
| Проба 6 | 0,5006 | 1,30 | 0,2802 |

Таблица 19 - Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении повторяемости (сходимости)

| <i>Статистические характеристики</i> | <i>Результаты</i> |
|--|-------------------|
| Наименьшее значение, г | 0,2784 |
| Наибольшее значение, г | 0,2804 |
| Среднее значение \bar{x} , г | 0,2797 |
| Стандартное отклонение | 0,00092 |
| Коэффициент вариации (относительное стандартное отклонение среднего результата), % | 0,13 |
| Граничные значения доверительного интервала среднего результата ($\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$) | 0,2797±0,0010 |

Коэффициент вариации менее 1,5 % (при $n = 6$).

Вывод: методика соответствует заявленным критериям приемлемости по показателю повторяемость (сходимость).

6.4.2 Внутрилабораторная прецизионность

Для оценки внутрилабораторной прецизионности использовались данные выборки, полученные при оценке повторяемости (выборка 1) вместе с выборкой, полученной в другой день (выборка 2). Полученные результаты представлены в таблицах 20 и 21.

Таблица 20 - Результаты установления внутрилабораторной прецизионности

| № пробы | День 1 | | | День 2 | | |
|---------|----------------------------|----------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------|---------------------------------|
| | Навеска крема "Аргамид", г | Объем 0,001 М КІ, мл | Найденное содержание серебра, г | Навеска крема "Аргамид", г | Объем 0,001 М КІ, мл | Найденное содержание серебра, г |
| Проба 1 | 0,5003 | 1,30 | 0,2804 | 0,4997 | 1,29 | 0,2785 |
| Проба 2 | 0,5004 | 1,30 | 0,2803 | 0,4998 | 1,29 | 0,2785 |
| Проба 3 | 0,4999 | 1,29 | 0,2784 | 0,5000 | 1,30 | 0,2805 |
| Проба 4 | 0,4997 | 1,29 | 0,2785 | 0,5001 | 1,30 | 0,2805 |
| Проба 5 | 0,5007 | 1,30 | 0,2801 | 0,4998 | 1,29 | 0,2785 |
| Проба 6 | 0,5006 | 1,30 | 0,2802 | 0,5002 | 1,30 | 0,2804 |

Таблица 21 - Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении внутрилабораторной прецизионности

| <i>Статистические характеристики</i> | <i>Результаты</i> | |
|--|-------------------|------------------|
| | Выборка 1 | Выборка 2 |
| Наименьшее значение, г | 0,2784 | 0,2785 |
| Наибольшее значение, г | 0,2804 | 0,2805 |
| Среднее значение \bar{x} , г | 0,2797 | 0,2795 |
| Стандартное отклонение | 0,00092 | 0,00108 |
| Коэффициент вариации, % | 0,134 | 0,158 |
| Коэффициент вариации по двум сериям, % | 0,00058 | |
| Граничные значения доверительного интервала среднего результата ($\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$) при P = 95%, n = 6 | 0,2799 ± 0,0004 | 0,2802 ± 0,0005 |
| Вычисленное значение F-критерия (табличное значение F-критерия при P = 95%.,; f ₁ = 5; f ₂ = 5 равно 5,05) | 0,72 | |
| Вычисленное значение t-критерия (табличное значение t-критерия при P = 95%.,; f = 10 равно 2,228) | 0,30 | |

Коэффициент вариации для выборки 2, полученной в другой день менее 1,5 %. Коэффициент вариации для двух выборок менее 2,5 %. Вычисленные значения F- и t-критериев не превысили табличных (контрольных) значений.

Вывод: методика соответствует заявленным критериям приемлемости по показателю внутрилабораторная прецизионность.

6.5 Аналитическая область методики

В рамках выбранного диапазона концентраций (от 80 до 120 %) была доказана правильность, прецизионность и линейность.

7. Выводы

Валидационные испытания по показателю «Количественное определение серебра» в 1% креме «Аргамид» проведены в соответствии с действующими нормативными документами и в соответствии с методикой, представленной в проекте ФСП, в полном объеме. Для каждого из выполненных тестов получены положительные результаты. Каких-либо несоответствий выявлено не было, поэтому валидируемую методику можно считать приемлемой для оценки качества анализируемой субстанции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам анализа данных научной литературы о методах определения содержания серебра в лекарственных средствах (фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах), был выбран метод осадительного титрования. Для более точного определения конечной точки титрования применили электрохимический (потенциометрический) способ индикации.

В результате были разработаны методики количественного определения серебра в фармацевтической субстанции и готовой лекарственной форме – 1% креме «Аргамид», на основе серебряной соли сульфадимидина.

В частности, для количественного определения серебра в фармацевтической субстанции «Аргамид» был выбран метод роданометрического титрования. Взяв за основу методику, регламентированную международными фармакопеями для серебряной соли другого сульфаниламидного препарата, были оптимизированы условия пробоподготовки:

- масса навески дорогостоящей субстанции снижена в 10 раз (0,05 г),
- концентрация растворителя уменьшена в 30 раз (0,1 моль/л HNO_3)
- вместо растирания навески вещества, проба была растворена при нагревании в определенном объеме растворителя. Это позволило не только сократить время пробоподготовки в 2,5 раза, но и добиться более полного вскрытия пробы.

Для количественного определения серебра в 1% креме «Аргамид» был выбран метод йодометрического титрования. Концентрация серебра в составе крема, уменьшенная в 100 раз по сравнению с субстанцией, обусловила данный выбор. Для определения порога чувствительности вышеуказанной методики были исследованы модельные растворы ионов серебра в концентрационном диапазоне 1×10^{-2} - 1×10^{-5} М и сделан вывод о возможности применения данного метода для определения серебра. Таким образом, йодометрический метод лег в основу определения серебра в составе готовой лекарственной формы.

В обеих методиках вместо дорогостоящего индикаторного серебряного дискового электрода были использованы отечественные толстопленочные электроды на основе серебросодержащей пасты ПСХП-1, изготовленные ООО НПП «ЭкоБиоТест» (Екатеринбург), которые сохраняют рабочие характеристики в течение 5 определений в подобранных условиях анализа.

В результате полной валидационной оценки разработанных методик по актуальным требованиям Государственной Фармакопеи РФ XIII издания, был сделан вывод о соответствии аналитических методик количественного определения серебра в

фармацевтической субстанции и креме «Аргамид» заявленным критериям приемлемости. Кроме того, выполнение контроля по разработанным методикам не требует дорогостоящего оборудования и привлечения высококвалифицированного персонала.

На основании полученных результатов был сделан вывод о том, что разработанные методики могут быть рекомендованы для включения в нормативно-техническую документацию на фармацевтическую субстанцию и готовую лекарственную форму (1% крем) на основе серебряной соли сульфадимидина для контроля качества указанных средств производителем, а также испытательными лабораториями и центрами контроля качества во время обращения препаратов на фармацевтическом рынке.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / Под ред. Н.В. Юргеля, А.Л. Младенцева, А.В. Бурдейна [и др.] Разработчики: В.Л. Багирова, А.И. Гризодуб, Т.Х. Чибиляев [и др.] – М., 2007. – 48 с.
2. Пятницкий, И.В. Аналитическая химия серебра / И.В. Пятницкий, В.В. Сухан. – М.: Наука, 1975. – 264 с.
3. Schiller, P. Kernenergie. - № 6. - 514. - 1963.
4. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издание. - М.: ФЭМБ, 2015. – Т. 1. – 1470 с.
5. Reith, J.F. Pharmac. Weckbl. / J.F. Reith, C.P. Van Dijk. – № 77. – 865. - 1940.
6. Лейтес, Е.А. Определение серебра вольтамперометрическим методом / Е.А. Лейтес, М.Ю. Быкова // Известия Алтайского государственного университета.- 2012. - № 3-1. – С. 177-179.
7. Ahmed, H.N. Anodic stripping voltammetric determination of silver in anti-infective creams using carbon paste electrode / H.N. Ahmed, A.A.B Farag., I.H. Habib [et al.] // Egyptian Journal of Chemistry. – 2007. – V. 50, Is. 3. - P. 303-312.
8. Государственная фармакопея СССР, 11-е изд. Вып. 1. Общие методы анализа. – М.: Медицина, 1987. – 334 с.
9. Государственная фармакопея Российской Федерации XII издание (1 часть). - М.: 2008 – 696 с.
10. Государственная Фармакопея Российской Федерации XII издание (2 часть). – М.: 2010. – 600 с.
11. Cooper, A.D. Heavy Metal Determinations in Pharmaceuticals by Means of Amperometric Titrations / A.D. Cooper, M.W. Green // Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.). – 1953. – V. 42, Is. 1. – P. 1-6.
12. Вольтамперометрия в фармацевтическом анализе / Н.А. Малахова, А.В. Иванова, А.Н. Козицина [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2014. - №2 (7). – С. 90-99.
13. Будников, Г.К. Фармацевтический анализ: Проблемы аналитической химии. / Г.К. Будников, С.Ю. Гармонов. - Т.16.- М.: АРГАМАК-МЕДИА, 2013. - 778 с.
14. Калюкова, Е.Н. Титриметрические методы анализа: Учебное пособие / Е.Н. Калюкова. – Ульяновск: УлГТУ, 2008. – 108 с.
15. Bonfilio, R. Recent applications of analytical techniques for quantitative pharmaceutical analysis: a review / R. Bonfilio, M.B. Araujo, H.R.N. Salgado // WSEAS Transactions on Biology and Biomedicine. - 2010. - V. 7, № 4. - P. 316–338.

16. Беликов, В.Г. Фармацевтическая химия: В 2 ч. Специальная фармацевтическая химия: Учебник для ВУЗов. / В.Г. Беликов. – Пятигорск, 1996. – 313 с.
17. Перельман, Я.М. Анализ лекарственных форм: практическое руководство. Практическое руководство. / Я.М. Перельман. — 3-е изд., перераб. и доп. — Л.: Медгиз, 1961. — 616 с.
18. Чудецкая, Ю.В. Разработка новых лекарственных препаратов на основе кристафона и его серебряной соли : дис... канд. хим. наук. / Ю.В. Чудецкая. – Нижний Новгород, 2009. - 158 с.
19. Кольтгоф, И. Потенциометрическое титрование. / И. Кольтгоф, Н. Фурман. - Л. Онти-Химтеорет, 1935. - 372 с.
20. Фармакопея США: USP 29; Национальный формуляр: NF 24: в 2 т.: [пер. с англ.]. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – Т. 1. – 1720 с.: ил.
21. Шумар, С.В. Потенциометрическое определение серебра с использованием математической модели процесса / С.В. Шумар // Известия Томского политехнического университета. - 2012. - Т. 320. № 3. – С. 116-119.
22. Никольский, Б.П. Ионоселективные электроды. / Б.П. Никольский, Е.А. Матерова. – Л.: Химия, 1980. – 240 с., ил.
23. Лопатин, Б.А. Теоретические основы электрохимических методов анализа. Учеб. пособие для ун-тов. / Б.А. Лопатин. – М.: Высш. школа, 1975. – 295 с., ил.
24. Пономарев В.Д. Аналитическая химия (в двух частях). Учебник для фармац. и фак. мед. ин-тов. / В.Д. Пономарев. – М.: Высш. школа, 1982. – Ч. 2. Количественный анализ. – 288 с., ил.
25. Иванова, М.А. Аналитическая химия и физико-химические методы анализа. / М.А. Иванова, М.В. Белоглазкина [и др.] - М.: Издательство РИОР, 2006. – 289 с.
26. Основы аналитической химии. В 2 кн. /под ред. Ю. А. Золотова. М.: Высш. школа, 2000.
27. Инверсионная вольтамперометрия: учебно-методическое пособие по курсу «Аналитическая химия и физико-химические методы анализа» / В.И. Кочеров, А.Н. Козицина, А.В. Иванова [и др.] - Екатеринбург: УрФУ, 2010. - 110 с.
28. Будников, Г.К. Основы современного электрохимического анализа / Г.К. Будников, В.Н. Майстренко, М.Р. Вяселев. – М.: Мир: Бином ЛЗ, 2003. – 592 с. ил. – (Методы в химии).
29. Электроды в электрохимических методах контроля: учебно-методическое пособие по курсу «Современные проблемы аналитического контроля и мониторинга» / Слепченко Г.Б., Захарова Э.А., Акенеев Ю.А. – Томск.: Изд-во ТПУ. – 2008. – 35 с.

- 30.** Электрохимические методы контроля в медицинской диагностике / Г.Б. Слепченко, Н.М. Дубова, И.А. Хлусов [и др.] // Сибирский медицинский журнал. – 2009. - Том 24, вып. 2. – С. 102-106.
- 31.** Технология тонкопленочных и толстопленочных ИС // URL: <http://stud.izhdv.ru/msch/43.htm> (дата обращения: 12.05.2015).
- 32.** Disposable paper-based electrochemical sensor utilizing inkjet-printed polyaniline modified screen-printed carbon electrode for ascorbic acid detection / W. Kit-Anan, A. Olanwanich, C. Sriprachuabwong [et al.] // J Electroanal Chem. – 2012. – Vol. 685. – P. 72–78.
- 33.** Renedo, O.D. Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications / O.D. Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J.A. Martinez // Talanta. – 2007. – Vol. 73. – P. 202–219.
- 34.** Nanotechnology: A tool for improved performance on electrochemical screen-printed (bio) sensors / E. Jubete, O.A. Loaiza, E. Ochoteco [et al.] // J Sensors. – 2009. – P. 1-13.
- 35.** Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays - A review / M. Li, Y. Li, D. Li [et al.] // Anal Chim Acta. – 2012. – 734. P. 31–44.
- 36.** Inexpensive and disposable copper mini-sensor modified with bismuth for lead and cadmium determination using square-wave anodic stripping voltammetry / S.L.C. Figueiredo-Filho, B.C. Janegitz, O. Fatibelilo-Filho [et al.] // Anal Methods. – 2013. – 5. – P. 202-207.
- 37.** Conductive silver inks and their applications in printed and flexible electronics / H. Grande, J. Rodriguez, K.R.R. Venkata [et al.] // RSC Adv. – 2015. – 5. - P. 77760-77790.
- 38.** Application of paper-supported printed gold electrodes for impedimetric immunosensor development / P. Ihalainen, H. Majumdar, T. Viitala [et al.] // Biosensor s. – 2013. – 3. – P. 1-17.
- 39.** Inkjet-printed gold electrodes on paper: characterization and functionalization / A. Määttänen, P. Ihalainen, P. Pulkkinen [et al.] // ACS Appl. Mater. – 2012. - Interfaces 4. – P. 955–964.
- 40.** Wang, J. Screen-printed stripping voltammetric potentiometric Electrodes for decentralized testing of trace lead / J. Wang, B.M. Tian // Anal Chem. – 1992. – 64. – P. 1706-1709.
- 41.** McCreery, R.L. Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry / R.L. McCreery // Chem. Rev. – 2008. – 108. – P. 2646–2687.

- 42.** Screen-printed anodic stripping voltammetric sensor containing HgO for heavy metal analysis / J.-Y. Choi, K. Seo, S.-R. Cho [et al.] // *Anal Chim. Acta.* – 2001. – 443. – P. 241-247.
- 43.** Direct fabrication of catalytic metal nanoparticles onto the surface of a screen-printed carbon electrode / M. Chikae, K. Idegami, K. Kerman [et al.] // *Electrochem. Commun.* – 2006. – 8. – P. 1375-1380.
- 44.** Thick film voltammetric sensors for trace copper based on a cation-exchanger-modified surface / C.G. Neuhold, J. Wang, V.B. Nascimento [et al.] // *Talanta.* - 1995. - 42. – P. 1791-1798.
- 45.** Alagarasi, A. Introduction to nanomaterials, Chapter: 1, pp.76, 2011.
- 46.** Pchelintsev, N.A. A novel procedure for rapid surface functionalisation and mediator loading of screen-printed carbon electrodes / N.A. Pchelintsev, P.A. Millner // *Anal Chim Acta.* – 2008. - 612(2). – P. 190-197.
- 47.** Asefa, T. Recent advances in nanostructured chemosensors and biosensors / T. Asefa, C.T. Duncan, K.K. Sharma // *Analyst.* – 2009. - 134(10). – P. 1980-1990.
- 48.** Screen-printed bienzymatic sensor based on sol-gel immobilized *Nippostrongylus brasiliensis* acetylcholinesterase and a cytochrome P450 BM-3 (CYP102-A1) mutant / M. Waibel, H. Schulze, N. Huber [et al.] // *Biosens. Bioelectron.* – 2006. – 21. – P. 1132-1140.
- 49.** Taleat, Z. Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013) / Z. Taleat, A. Khoshroo, M. Mazloum-Ardakani // *Microchim Acta.* 2014. – 181. – P. 865–891.
- 50.** Chemical sensors, biosensors and thickfilm technology / C.A. Galan-Vidal, J. Munoz, C. Dominguez [et al.] // *Trends in Analytical Chemistry.* – 1995. – 14. – P. 225.
- 51.** Hart, J.P. Recent developments in the design and application of screen-printed electrochemical sensors for biomedical, environmental and industrial analyses / J.P. Hart, S.A. Wring // *Trends in Analytical Chemistry.* – 1997. – 16. – P. 89.
- 52.** Some recent designs and developments of screen-printed carbon electrochemical sensors/biosensors for biomedical, environmental, and industrial analyses / J.P. Hart, A. Crew, E. Crouch [et al.] // *Analytical Letters.* – 2004. – Vol. 37. – P. 789.
- 53.** Disposable strip potentiometric electrodes with solvent-polymeric ion-selective membranes fabricated using screen-printing technology / R. Koncki, S. Głąb, J. Dziwulska [et al.] // *Analytica Chimica Acta.* – 1999. – Vol. 385. – P. 451.
- 54.** Potentiometric thick-film graphite electrodes with improved response to copper ions / Ł. Tymecki, M. Jakubowska, S. Achmatowicz [et al.] // *Analytical Letters.* – 2001. – Vol. 34. – P. 71-78.

- 55.** Strip thick-film silver ion-selective electrodes / Ł. Tymecki, E. Zwierkowska, S. Głąb [et al.] // *Sensors and Actuators B.* – 2003. - Vol. 96. – P. 482.
- 56.** Tymecki, Ł. Screen-printed reference electrodes for potentiometric measurements / Ł. Tymecki, E. Zwierkowska, R. Koncki // *Analytica Chimica Acta.* – 2004. - Vol. 526. – P. 3.
- 57.** Tymecki, Ł. Miniaturized Planar Ion-selective Electrodes Fabricated by Means of Thick-film Technology / Ł. Tymecki, , S. Glab, R. Koncki // *Sensors.* – 2006. – Vol. 6. – P. 390-396.
- 58.** Frag, E.Y. Potentiometric determination of antihistaminic diphenhydramine hydrochloride in pharmaceutical preparations and biological fluids using screen-printed electrode / E.Y. Frag, G.G. Mohamed, W.G. El-Sayed // *Bioelectrochemistry.* – 2011. - 82(2). – P. 79-86.
- 59.** Construction of modified screen-printed and carbon paste electrodes for electrochemical determination of antihistaminic diphenhydramine hydrochloride in pure and pharmaceutical preparations / M.A. Akl, E.Y. Frag, G.G. Mohamed [et al.] // *International Journal of Electrochemical Science.* - 2013. – Vol. 8. – P. 11546 – 11563.
- 60.** Construction and performance characterization of screen printed and carbon paste ion selective electrodes for potentiometric determination of naphazoline hydrochloride in pharmaceutical preparations / E.Y. Frag, G.G. Mohamed, F.A. El-Dien [et al.] // *Analyst.* - 2011. - 136(2). – P. 332-339.
- 61.** Frag, E.Y. Electroanalytical determination of sildenafil in Viagra tablets using screen-printed and conventional carbon paste electrodes / E.Y. Frag, G.G. Mohamed, H.M.S. Alelaiwi // *J Electroanal Chem.* – 2011. - №659. – P. 121–127.
- 62.** Modified screen printed and conventional carbon paste electrodes for determination of sildenafil citrate in tablets / G.G. Mohamed, F.A.F. Nour El-Dien, E.Y. Frag [et al.] // *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences.* – 2013. – Vol. 2, Is. 6. – P. 4329-4348.
- 63.** Towards disposable sensors for drug quality control: Dextromethorphan screen-printed electrodes / E. Khaled, H.N.A. Hassan, G.G. Mohamed [et al.] // *Drug Test. Anal.* - 2010. - № 2. – P. 424–429.
- 64.** Septonex–tetraphenylborate screen-printed ion selective electrode for the potentiometric determination of Septonex in pharmaceutical preparations / G.G. Mohamed, M.F. El-Shahat, A.M. Al-Sabagh [et al.] // *Analyst.* – 2011. - №136. – P. 1488-1495.
- 65.** A New Screen-printed Ion Selective Electrode for Determination of Citalopram Hydrobromide in Pharmaceutical Formulation / T.A. Ali, G.G. Mohamed, A.M. Al-Sabagh [et al.] // *Chin J Anal Chem.* – 2014. - 42(4). – P. 565–572.

- 66.** Potentiometric determination of cetylpyridinium chloride using a new type of screen-printed ion selective electrodes / G.G. Mohamed, T.A. Ali, M.F. El-Shahat [et al.] // *Anal Chim Acta.* - 2010. - 673(1). – P. 79-87.
- 67.** Alarfaj, N.A. Disposable screen-printed sensors for determination of duloxetine hydrochloride / N.A. Alarfaj, R.A. Ammar, M.F. El-Tohamy // *Chem Cent J.* – 2012. – 6. – P. 72-79.
- 68.** Novel pioglitazone nanomaterial based screen printed sensors / A.M. Abou Al-Alamein, M.S. Kamel, M.M. Abou El-Alamin [et al.] // *International Journal of Electrochemical Science.* - 2015. – Vol. 10. – P. 2400 – 2412.
- 69.** Novel screen printed potentiometric sensors for the determination of oxicams / E. Khaled, M.S. Kamel, H.N. Hassan [et al.] // *RSC Adv.* – 2015. – 5. – P. 12755-12762.
- 70.** Abbas, M.N. Gallamine-tetraphenylborate-modified carbon paste electrode for the potentiometric determination of gallamine triethiodide (flaxedil) / M.N. Abbas, G.A. Mostafa // *J Pharm Biomed Anal.* – 2003. - 31(4). – P. 819-826.
- 71.** Савадян, Э.Ш. Современные тенденции использования серебросодержащих антисептиков / Э.Ш. Савадян, В.М. Мельникова, Г.П. Беликов // *Антибиотики и химиотерапия.* - 1989. - т. 34. - №11. - С. 874-878.
- 72.** Копейкин, В.В. Лекарственные серебросодержащие препараты и их медико-биологические свойства / В.В. Копейкин. - Применение препаратов серебра в медицине.- 1993. - СО РАН ИКИ. - С. 36 - 40.
- 73.** Carr, H.S. Silver sulfadiazine: in vitro antibacterial activity / H.S. Carr, T.J. Wlodkowski, H.S. Rosenkranz // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* - 1973. - 4(5). – P. 585-587.
- 74.** Применение серебросодержащих кремов и раневого покрытия как пути улучшения системы местного лечения ран у пациентов с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы / Е.В. Зиновьев, Е.В. Барташевич, А.В. Прохоренко [и др.] // *Вестник Новгородского государственного университета.* – 2010. - №59. – С. 42-48.
- 75.** Клиническая оценка эффективности использования серебросодержащих раневых покрытий при лечении пострадавших с поверхностными ожогами / С.А. Еремеев, О.В. Чичков, А.В. Прохоренко [и др.] // *Вестн. Новгор. гос. ун-та.* – 2012. – № 66 – С. 41-45.
- 76.** Effect of Different Formulations of Silver Sulphadiazine Cream on experimentally Induced Burn Wound Healing / K.L. Bairy, K. Satish, C.G. Savin [et al.] // *RJPBCS.* – 2012. – Vol.3, Issue 2. – P. 884-889.

- 77.** De Gracia, C.G. An open study comparing topical silver sulfadiazine and topical silver sulfadiazine-cerium nitrate in the treatment of moderate and severe burns / C.G. De Gracia // *Burns*. - Feb. 2001. - 27(1). – P. 67-74.
- 78.** Effect of Aloe Cream versus Silver Sulfadiazine for Healing Burn Wounds in Rats / S.J. Hosseinimehr, G. Khorasani, M. Azadbakht [et al.] // *Acta Dermatovenerol Croat.* - 2010. -18(1). - P. 2-7.
- 79.** Momcilovic, D. Topical agents used in the treatment of burns / D. Momcilovic // *Med Pregl.* - 2002. - 55(3-4). –P. 109-113.
- 80.** Systematic review of antimicrobial agents used for chronic wounds / S.M. O'Meara, N.A. Cullum, M. Majid [et al.] // *Br J Surg.* – 2001. - 88(1). - P. 4-21.
- 81.** Burrell, R.E. A scientific perspective on the use of topical silver preparations / R.E. Burrell // *Ostomy Wound Manage.* – 2003. - 49 (5A Suppl). – P. 19-24.
- 82.** Парахонский, А.П. Роль антибиотиков и серебросодержащих антимикробных средств в лечении больных с венозными трофическими язвами / А.П. Парахонский, С.С. Цыганок // *Фундамент. исслед.* – 2008. – № 7. – С. 109-110.
- 83.** Kucan, J.O. Comparison of silver sulfadiazine, povidone-iodine and physiologic saline in the treatment of chronic pressure ulcers / J.O. Kucan [et al.] // *Journal of the American Geriatrics Society.* - 1981. - 29(5) - P. 232-235.
- 84.** Валидация аналитических методик для производителей лекарств: типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств / под ред. В. В. Береговых. - М.: «Литтерра», 2008. - 132 с.