

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Количественное определение	ОФС.1.7.2.0025.15
тиомерсала в иммунобиологических	
лекарственных препаратах	Взамен ГФ X, стр. 987

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для количественного определения тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах (ИЛП) колориметрическим, полярографическим методом и методом электротермической атомно-абсорбционной спектromетрии. Указанные методы предназначены для определения содержания тиомерсала в сорбированных и несорбированных ИЛП.

Колориметрический метод основан на выделении из тиомерсала ртути в виде свободных ионов и последующем колориметрическом определении ртути дитизоната.

Полярографический метод основан на полярографической активности тиомерсала.

Метод электротермической атомно-абсорбционной спектromетрии (ЭААС) для определения тиомерсала в ИЛП вводится впервые. Метод основан на измерении оптической плотности атомного пара ртути получаемого при электротермической атомизации исследуемого образца. Сигнал максимального поглощения резонансового излучения атомами ртути прямо пропорционален концентрации тиомерсала в исследуемом образце. Содержание тиомерсала в испытуемом образце определяется по калибровочному графику.

Содержание тиомерсала в ИЛП не должно превышать 20-120 мкг/мл.

Колориметрический метод

Испытуемый образец помещают в колбу с притертой пробкой вместимостью 100 мл, прибавляют 1,2 мл серной кислоты разведенной концентрированной (при наличии сорбента алюминия гидроксида смесь осторожно нагревают на водяной бане, постоянно помешивая до его полного растворения), добавляют 5 мл 5 % раствора калия перманганата, перемешивают и оставляют на 1 ч при комнатной температуре. После этого удаляют избыток калия перманганата, прибавляя 1,5 мл 20 % раствора гидроксиламина сульфата, 30 мл воды очищенной и 5 мл 6 М раствора уксусной кислоты. Полученный раствор перемешивают, прибавляют 10 мл 0,001 % раствора дитизона (точно отмеренный объем) и встряхивают в течение 30 с. Содержимое колбы переносят в делительную воронку и после разделения слоев фильтруют в кювету толщиной 10 мм нижний хлороформный слой через предварительно прокипяченную и высушенную вату. Затем измеряют оптическую плотность хлороформного раствора при 597 нм по сравнению с контрольным раствором, содержащим 0,2 мл воды очищенной и все вышеперечисленные реагенты.

Содержание тиомерсала (X_1) в растворе в мкг/мл вычисляют по формуле:

$$X_1 = \frac{a \cdot 100}{0,2 \cdot 49,55} = a \cdot 10,1$$

где: a – количество ртути, найденное по калибровочному графику, мкг;

100 – разведение испытуемого образца;

0,2 – объем испытуемого образца, мл;

49,55 – коэффициент пересчета ртути на тиомерсал.

Построение калибровочного графика. К 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 мл стандартного раствора № 2 прибавляют 1,2 мл серной кислоты разведенной, 30 мл воды очищенной, 5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, 5 мл 6 М раствора уксусной кислоты и перемешивают (содержание ртути: 4; 6; 8; 10;

12 мкг соответственно). Далее определение проводят по методике, указанной выше. Калибровочный график воспроизводят при каждом анализе.

Одновременно с испытуемым образцом для подтверждения правильности методики проводят анализ стандартного образца (СО) «Содержание тиомерсала в сорбированных препаратах». Анализ СО проводят при каждом определении.

Примечания.

1. Испытуемый раствор – 0,2 мл раствора испытуемого образца, приготовленного, как указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

2. Основной стандартный раствор ртути металлической 1 мг/мл (раствор № 1). Помещают 0,5 г ртути металлической (точная навеска) в мерную колбу вместимостью 500 мл, растворяют в 15 мл азотной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают.

Для определения содержания ртути отмеряют 10 мл стандартного раствора № 1, прибавляют 0,5 мл 10 % раствора квасцов железоаммонийных и медленно титруют 0,01 М раствором аммония роданида до оранжевого окрашивания раствора.

Содержание ртути (X_2) в мг/мл вычисляют по формуле:

$$X_2 = \frac{V \cdot 0,001003}{10}$$

где: V –раствор аммония роданида, мл;

0,001003 – количество ртути, соответствующее 1 мл 0,01 М раствора аммония роданида, в г;

10 – объем испытуемого образца, в мл.

Раствор хранят в течение 3 мес при комнатной температуре в вытяжном шкафу в специально отведенном месте.

3. Стандартный раствор ртути металлической 10 мкг/мл (раствор № 2). В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1 мл стандартного раствора № 1, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают.

Возможно использование государственного стандартного образца (ГСО) раствора ионов ртути (II).

4. Стандартные образцы (СО) «Содержание тиомерсала в сорбированных препаратах» с различным диапазоном содержания тиомерсала в пределах от 20 до 120 мкг/мл.

5. Приготовление 5 % раствора калия перманганата. Растворяют 50 г калия перманганата в 700 мл горячей воды очищенной, помещенной в коническую колбу, охлаждают и переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 3 мес.

6. Приготовление 0,001 % раствора дитизона. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 10 мг дитизона (точная навеска), растворяют в хлороформе, доводят объем раствора хлороформом до метки и перемешивают. Раствор хранят в темном месте при температуре 4 – 8 °С в течение 1 мес.

Перед использованием 10 мл раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора хлороформом до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 597 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм по сравнению с контрольным раствором (вода очищенная). Диапазон колебаний показаний оптической плотности от среднего значения не должен превышать $\pm 0,05$.

7. Приготовление 20 % раствора гидросиламина сульфата. В мерном цилиндре вместимостью 500 мл в воде очищенной растворяют 100 г гидросиламина сульфата, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной в течение 6 мес.

8. Приготовление 6 М раствора уксусной кислоты. Вносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл 340 мл уксусной кислоты ледяной, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 6 мес.

9. Приготовление 50 % серной кислоты разведенной по объему. В коническую колбу вместимостью 250 мл вносят 100 мл воды очищенной и осторожно при постоянном перемешивании прибавляют 100 мл серной кислоты концентрированной. Работу следует проводить в вытяжном шкафу, соблюдая технику безопасности. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 6 мес.

10. Приготовление 0,1 М раствора аммония роданида (раствор А). Раствор готовят из 0,1 Н стандарт-титра (фиксанала) в мерной колбе вместимостью 1000 мл согласно инструкции по приготовлению. Раствор хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 6 мес.

11. Приготовление 0,01 М раствора аммония роданида (раствор В). В мерную колбу вместимостью 50 мл вносят 5 мл раствора А и доводят объем водой очищенной до метки. Раствор готовят при каждом определении.

12. Приготовление раствора азотной кислоты разведенной. В коническую колбу вместимостью 250 мл вносят 100 мл воды очищенной и осторожно при постоянном перемешивании прибавляют 72 мл азотной кислоты концентрированной. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 6 мес.

13. Приготовление 10 % раствора квасцов железоммонийных. В 90 мл воды растворяют 10 г квасцов железоммонийных и прибавляют азотной кислоты разведенной до перехода коричневой окраски в желтовато-зеленую. В случае необходимости раствор фильтруют.

Поляррографический метод

Испытуемый раствор помещают в колбу вместимостью 50 мл с притертой пробкой, прибавляют 0,5 мл 2 М раствора калия хлорида и помещают в электролизер, термостатируемый при температуре 19 – 21 °С. Через испытуемый раствор пропускают газообразный азот в течение 10-15 мин. Ртутный капельный электрод опускают в электролизер и снимают поляррограмму на поляррографе с регистрирующим устройством в области потенциала от 0,2 до 1,0 В (внутренний анод).

Содержание тиомерсала (X_3) в мкг/мл рассчитывают по формуле:

$$X_3 = \frac{a \cdot 5,0}{4,5};$$

где: а – количество тиомерсала в испытуемом растворе, найденное по калибровочному графику, мкг/мл;

5,0 – общий объем пробы, мл;

4,5 – объем испытуемого раствора, взятого на анализ, мл.

Построение калибровочного графика. К 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 мл стандартного раствора тиомерсала № 2 (150 мкг/мл тиомерсала) прибавляют 0,5 мл 2 М раствора калия хлорида, доводят общий объем водой очищенной до 5 мл (концентрация тиомерсала: 30; 45; 60; 75; 90; 105; 120; 135 мкг/мл соответственно) и перемешивают. Определение проводят, как указано выше. На полученных поляррограммах строят калибровочный график, откладывая среднее значение высоты волны на оси ординат (ОУ), а на оси

абсцисс (ОХ) – соответствующее значение концентрации тиомерсала в мкг/мл.

Калибровочный график пригоден неограниченное время для данного капилляра при постоянных условиях определения (температура, время каплеобразования).

Тиомерсал, используемый для приготовления стандартного раствора № 1, должен соответствовать требованиям, указанным в разделе «Методы оценки качества тиомерсала».

Приложения.

1. Испытуемый раствор – 4,5 мл раствора испытуемого образца, приготовленного, как указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

2. Стандартный раствор тиомерсала 15 мкг/мл (раствор № 1). В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,50 г тиомерсала (точная навеска), растворяют в воде очищенной и доводят объем раствора тем же растворителем до метки. Раствор хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 3 мес.

3. Стандартный раствор тиомерсала 150 мкг/мл (раствор № 2). Перед определением 1 мл стандартного раствора тиомерсала №1 помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают.

4. Приготовление 2 М раствора калия хлорида. В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 149,1 г калия хлорида, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 6 мес.

Метод электротермической атомно-абсорбционной спектрометрии

Анализ проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора – электротермического атомно-абсорбционного спектрометра.

Испытуемый образец, приготовленный, как указано в фармакопейной статье или нормативной документации, вносят в отверстие графитовой трубки прибора и измеряют оптическую плотность образцов при длине волны 253,7 нм в следующей последовательности: вода очищенная (контрольный раствор), калибровочные растворы (в порядке увеличения измеряемой концентрации), стандартный образец «Содержание тиомерсала в

сорбированных препаратах» и испытуемый образец. Анализ испытуемых образцов проводят не менее трех раз.

Содержание тиомерсала в испытуемом образце в мкг/мл рассчитывают по калибровочному графику с помощью программного обеспечения к прибору с учетом разведения испытуемого образца.

Построение калибровочного графика. Отбирают 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 мл стандартного раствора тиомерсала № 2 (2 мкг/мл), доводят объем растворов водой очищенной до 1 мл и перемешивают (концентрация тиомерсала: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 мкг/мл соответственно). Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество тиомерсала в мкг/мл, а по оси ординат – среднее значение оптической плотности атомного пара ртути. Калибровочный график воспроизводят при каждом определении.

Метод электротермической атомно-абсорбционной спектроскопии применим для ИЛП с содержанием тиомерсала от 20 до 120 мкг/мл, а также для анализа остаточного содержания тиомерсала.

Приложения.

1. Испытуемый раствор. Испытуемый раствор разводят водой очищенной, как указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

2. Основной стандартный раствор тиомерсала 1 мг/мл (раствор № 1). В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 100 мг тиомерсала (точная навеска), растворяют в воде очищенной, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят в склянке из темного стекла с притертой пробкой при температуре 4 – 8 °С в течение 1 мес.

3. Стандартный раствор тиомерсала 2 мкг/мл (раствор № 2). К 20 мкл стандартного раствора № 1 прибавляют 9,98 мкл воды очищенной и перемешивают. Раствор хранят в склянке из темного стекла с притертой пробкой при температуре 4 – 8 °С в течение 3 дней.

4. Стандартные образцы (СО) «Содержание тиомерсала в сорбированных препаратах» с диапазоном содержания тиомерсала от 20 до 120 мкг/мл. Перед использованием СО разводят согласно инструкции по применению. Раствор СО готовят и используют в день проведения анализа.

Методы оценки качества тиомерсала

O-этилртуутьтиосалицилат натрия М.м. 404,8 $C_9H_9HgNaO_2S$

Описание. Белый порошок с легким кремовым оттенком со слабым характерным запахом.

Растворимость. 1 г реактива без остатка растворяется при температуре 18 – 22 °С в 1 мл воды, а также в 35 мл спирта. Раствор должен быть бесцветным или светло-желтым. Препарат почти не растворим в бензоле и эфире.

Значение рН 6,0-8,0. Используют 1% раствор на свежeproкипяченной воде очищенной. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Подлинность. 0,05 г реактива растворяют в 5 мл воды очищенной. К раствору прибавляют 1,0 мл 10 % раствора меди сульфата. Образуется осадок зеленого цвета.

Растворяют 0,5 г реактива в 10 мл воды очищенной и прибавляют 1 мл 2 М раствора хлористоводородной кислоты, выделившийся осадок отфильтровывают на воронке Бюхнера и промывают водой очищенной до исчезновения хлорид ионов. Осадок, высушенный до постоянной массы при комнатной температуре в присутствии фосфора (V) оксида при давлении не более 0,667 кПа (5,0 мм рт.ст.), имеет температуру плавления 110 °С.

Ртутные соли. Растворяют 0,1 г реактива в 5 мл воды очищенной. К раствору прибавляют 1 мл 5 % свежеприготовленного раствора натрия сульфида. Выпавший осадок не должен изменять цвета при выдерживании в темном месте в течение 30 мин.

Растворимые в эфире вещества. 0,5 г реактива (точная навеска) встряхивают с 20 мл эфира в течение 10 мин, фильтруют через плотный фильтр. После испарения эфира остаток, высушенный в течение 22-24 ч в присутствии фосфора (V) оксида при давлении не более 0,667 кПа (5,0 мм рт.ст.) и комнатной температуре, должен весить не более 4 мг.

Потеря в массе при высушивании. Высушивают 0,5 г реактива в течение 24 ч в присутствии фосфора (V) оксида до постоянной массы. Потеря в массе при высушивании не должна превышать 0,5 %. Определение проводят в соответствии ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Количественное определение. Растворяют 0,3 г реактива (точная навеска) в 10 мл воды очищенной в термостойкой колбе или химическом стакане вместимостью 50 мл, прибавляют 1,5 г растертого калия перманганата и хорошо перемешивают. Через 5 мин в колбу осторожно прибавляют при постоянном перемешивании по каплям 5 мл серной кислоты концентрированной. Через 5-10 мин образовавшийся осадок растворяют при постепенном прибавлении 4 - 8 мл 3 % раствора водорода пероксида. К обесцвеченному раствору прибавляют по каплям 5 % раствор калия перманганата до исчезающего розового окрашивания. Раствор вновь обесцвечивают добавлением по каплям 4 % раствора щавелевой кислоты. Полученный раствор после прибавления 5 мл 10 % раствора квасцов железоммонийных медленно титруют 0,1 М раствором аммония роданида до изменения окраски. 1 мл 0,1 М раствора аммония роданида соответствует 0,02024 г тиомерсала.

Высушенный в присутствии фосфора (V) оксида реактив должен содержать не менее 98 % и не более 101 % тиомерсала.

Хранение. ЯД! Хранят в банке с притертой пробкой, в защищенном от света сейфе. Реактив подвергают контролю 1 раз в 3 мес. Если тиомерсал не соответствует одному из перечисленных требований, его бракуют.