

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Методические рекомендации

«Разработка и валидация методик определения тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах спектральными методами с индуктивно связанной плазмой»

Методические рекомендации рассмотрены, одобрены и рекомендованы к утверждению на заседании секции № 2 Ученого совета ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (протокол № 5 от 9 ноября 2021 г.)

Методические рекомендации утверждены и введены в действие приказом ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 397 от 19 ноября 2021 г.

Москва 2021

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Ответственный исполнитель:

Ведущий эксперт лаборатории спектральных методов анализа Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Щукин В.М.

Исполнители:

Начальник Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. фарм. наук

А.И. Лутцева

Начальник лаборатории спектральных методов анализа Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, д-р хим. наук

Н.Е. Кузьмина

Ведущий эксперт лаборатории спектральных методов анализа Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Швецова Ю.Н.

Эксперт 1 категории лаборатории спектральных методов анализа Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Северинова Е.Ю.

Эксперт 1 категории лаборатории спектральных методов анализа Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Ерина А.А.

Эксперт 2 категории лаборатории спектральных методов анализа Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Жигилей Е.С.

Лаборант лаборатории спектральных методов анализа Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Блинкова Е.А.

СОДЕРЖАНИЕ

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	247
ВВЕДЕНИЕ.....	249
1 Общие положения.....	251
1.1 Пробоподготовка.....	251
1.2 Элементный анализ.....	252
1.2.1 Масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой.....	252
1.2.2 Атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой.....	253
1.3 Интерференции.....	253
2 Валидационные требования.....	255
2.1 Пределы обнаружения.....	255
2.2 Диапазон применения.....	256
2.3 Погрешность измерений.....	256
3 Оборудование, материалы и реактивы.....	256
3.1 Оборудование и вспомогательные устройства.....	256
3.2 Реактивы.....	257
3.3 Лабораторная посуда и расходные материалы.....	258
4 Требования к безопасности проведения работ.....	259
5 Требования к квалификации лиц, работающих на ИСП-АЭС и ИСП-МС..	259
6 Условия выполнения измерений.....	260
7 Подготовка к проведению измерений.....	260
8 Отбор, хранение и подготовка проб.....	260
9 Подготовка прибора.....	262
9.1 Атомно-эмиссионный спектрометр с индуктивно-связанной плазмой...	262
9.1.1 Выбор рабочих условий.....	262
9.1.2 Контроль работоспособности прибора.....	264
9.2 Масс-спектрометр с индуктивно-связанной плазмой.....	264

9.2.1 Выбор рабочих условий.....	264
9.2.2 Контроль работоспособности прибора.....	266
10 Приготовление стандартных градуировочных растворов и калибровка прибора.....	267
10.1 Метод калибровочной кривой.....	267
10.2 Метод стандартных добавок.....	268
11 Проведение измерений.....	268
11.1 Последовательность анализа.....	268
11.2 Использование внутренних стандартов.....	269
12 Обработка результатов измерений	271
13 Валидация методики.....	272
13.1 Аналитическая область методики.....	272
13.2 Специфичность.....	272
13.3 Правильность.....	273
13.4 Прецизионность.....	274
13.5 Линейность.....	275
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	276
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	277

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

автосамплер	– система автоматической подачи образцов
эффект матрицы	– изменение интенсивности определяемого элемента под влиянием других присутствующих в пробе элементов
время интегрирования	– установленное время для измерения интенсивности аналитического сигнала
ААС	– атомно-абсорбционный спектрометр
а.е.м.	– атомные единицы массы
ВС	– внутренний стандарт
ГФ РФ	– Государственная фармакопея Российской Федерации
ГСО	– Государственный стандартный образец в соответствии с классификаций категорий
ЕАЭС	– Евразийский экономический союз
ИО	– испытуемый образец
ИСП	– индуктивно-связанная плазма
ИСП-АЭС	– атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой
ИСП-МС	– масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой
ЛС	– лекарственные средства
ЛРС	– лекарственное растительное сырье
ЛРП	– лекарственные растительные препараты
НД	– нормативная документация/проект нормативной документации, регламентирующей качество лекарственных средств
ОФС	– общая фармакопейная статья Государственной фармакопеи Российской Федерации
СКО	– среднеквадратичное отклонение
СО	– стандартный образец: образец материала (вещества),

аттестованный по содержанию одного или нескольких элементов

- EDQM – European Directorate for the Quality of Medicines
- EurPh – European Pharmacopoeia (действующая версия Европейской Фармакопеи)
- USP – United States Pharmacopoeia (действующая версия Американской Фармакопеи)

ВВЕДЕНИЕ

Настоящие методические рекомендации разработаны в соответствии с требованиями нормативных документов:

- ОФС.2.4.27 Тяжелые металлы и мышьяк в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. Фармакопея Евразийского экономического союза;

- ОФС.2.4.57 Атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой. Фармакопея Евразийского экономического союза;

- ОФС.2.2.22 Атомно-эмиссионная спектрометрия. Фармакопея Евразийского экономического союза;

- ОФС.1.5.3.0009.15 Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд.;

- ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII изд. Т. 2. 2015;

- European Pharmacopeia 10.2, General Monograph 2427. «Heavy metals analysis in herbal drugs and herbal drug preparations»;

- European Pharmacopeia 10.2, General Monograph 2.2.57 «Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry»;

- European Pharmacopeia 10.2, General Monograph 2.2.58 «Inductively coupled plasma-mass spectrometry»;

- European Pharmacopeia 10.2, General Monograph 1433 «Herbal drugs»;

- United States Pharmacopeia 42 National Formulary 37, General Monograph <233> «Elemental impurities—procedures»;

- United States Pharmacopeia 42 National Formulary 37, General Monograph <232> «Elemental impurities—limits»;

- United States Pharmacopeia 42 National Formulary 37, General Monograph <730> «Plasma spectrochemistry»;

- United States Pharmacopeia 42 National Formulary 37, General Monograph <561> «Articles of Botanical Origin»;
- ГОСТ 31671-2012. «Продукты пищевые. Определение следовых элементов. Подготовка проб методом минерализации при повышенном давлении»;
- ГОСТ 26929-94. «Сырье и продукты пищевые. Подготовка проб. Минерализация для определения содержания токсичных элементов»;
- ГОСТ ISO/IEC 17025-2019 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий»;
- Руководство по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств ЕАЭС от 17.07.2018 N 113;
- ГОСТ Р ИСО 5725-1-6 -2002. «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений»;
- РМГ 61-2010 «ГСИ. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки»;
- МУК 4.1.1483-03 Определение содержания химических элементов в диагностируемых биосубстратах, препаратах и биологически активных добавках методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной аргоновой плазмой. Дата введения 2003-06-30 – Москва: Минздрав России, 2004. – 56

1 Общие положения

Настоящий документ предоставляет конкретные рекомендации производителям по разработке и валидации аналитических методик определения элементных токсикантов в ЛРС и ЛРП спектральными методами с ИСП. Данные рекомендации касаются выбора материалов и реактивов, способов минерализации органической матрицы, методов анализа, определения основных валидационных параметров и оценки их приемлемости, а также разработки и оформления проектов НД «Определения содержания тяжёлых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» для различных видов ЛРС и ЛРП.

Основными этапами анализа ЛРС и ЛРП являются: отбор проб, пробоподготовка, анализ испытуемых растворов, обработка результатов испытаний с оценкой их соответствия требованиям нормативной документации.

1.1 Пробоподготовка

ГФ РФ предусматривает три основных метода пробоподготовки:

- сухая минерализация в открытых сосудах,
- мокрая минерализация в открытых сосудах,
- минерализация в закрытых сосудах при нагреве в автоклавах или микроволновой печи.

Максимально полный перевод элементов из органической матрицы ЛРС и ЛРП в испытуемый раствор для анализа возможен только при минерализации в закрытых сосудах [1]. Разрушение органической матрицы достигается обработкой проб различными особо чистыми окислителями, так как существует риск внесения определяемых элементов вместе с используемыми реактивами.

1.2 Элементный анализ

В ГФ РФ XIV, а также в фармакопее ЕАЭС предусмотрено использование трех основных спектральных методов для проведения элементного анализа в ЛРС и ЛРП: ААС, ИСП-АЭС и ИСП-МС. Из предложенных методов только ИСП-МС и ИСП-АЭС обладают возможностью сочетать в себе многоэлементный анализ, высокую чувствительность, широкий рабочий динамический диапазон и высокую скорость анализа.

В качестве источника ионизации атомов в методах ИСП-МС и ИСП-АЭС используется индуктивно-связанная плазма, которая представляет собой сильно ионизированный инертный газ (обычно аргон) с равновесным количеством электронов и ионов, поддерживаемый радиочастотным полем. Наиболее распространенным способом введения испытуемых образцов в плазму является распыление раствора, поэтому твердые образцы должны быть растворены перед началом анализа. Жидкая проба в виде аэрозоля переносится в центр плазмы внутренним потоком аргона, где под воздействием высокой температуры последовательно десольватируется, превращается в пар, а затем соединения, содержащиеся в данном растворе, диссоциируют на атомы, которые впоследствии ионизируются.

1.2.1 Масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой

Масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой представляет собой масс-спектрометрический метод, основанный на прямом измерении отношений массы к заряду (m/z) элементарных положительно заряженных ионов, полученных из испытуемого вещества в газовой фазе. Образовавшиеся ионы проходят через систему конусов и направляются системой ионной оптики в квадрупольный анализатор, где происходит непосредственная фильтрация ионов по массе и детектирование интенсивности ионного потока. Полученный

сигнал записывается в виде зависимости интенсивности от концентрации растворенных элементов в испытуемом растворе.

1.2.2 Атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой

Метод атомно-эмиссионной спектрометрии основан на определении элементного состава вещества по оптически линейчатым спектрам излучения возбужденных атомов и ионов анализируемой пробы. Термически возбужденные атомы и однозарядные ионы, возвращаясь на более низкий энергетический уровень, испускают избыточную энергию в виде фотонов, совокупность которых образует эмиссионный спектр. Оптическая система, используемая в ИСП-АЭС, состоит из монохроматора, который выделяет определенные длины волн и фокусирует свет нужной длины волны на детектор. Интенсивность эмиссионных линий прямо пропорциональна концентрации элемента в испытуемом растворе.

1.3 Интерференции

Основными мешающими факторами, искажающими результаты измерения, являются матричные эффекты (неспектральные интерференции) и спектральные наложения (спектральные интерференции) [9].

Матричные эффекты проявляются в случаях:

- сильного отличия вязкости испытуемого образца от вязкости градуировочных растворов, следствием которого является различие в эффективности распыления и составе аэрозоля по размеру капель для градуировочного и анализируемого образца,
- высокой общей концентрации ионов различных элементов (в том числе не являющихся предметом анализа) в аэрозоле, что снижает эффективность

ионизации трудно ионизируемых элементов вследствие недостаточности энергии плазмы и увеличивает рассеивание ионного потока.

Матричные эффекты могут быть смягчены разбавлением образца, практикуется также экстракция матрицы. Хорошим способом нивелирования неспектральных помех является использование для приготовления градуировочных растворов матрицы, максимально совпадающей с составом испытуемых растворов [10].

Для учета изменения чувствительности, связанного с матричными влияниями, широко применяют методы ВС и стандартных добавок.

К спектральным интерференциям относится: изменение интенсивности спектральных линий определяемого элемента за счёт перекрывания со спектральными линиями других элементов (для метода ИСП-АЭС) и изменение интенсивности сигналов определяемых ионов за счет наложения на них сигналов других ионов, обладающих той же величиной m/z (для метода ИСП-МС).

Для устранения и коррекции спектральных наложений применяют несколько способов:

- исключение из процесса пробоподготовки реагентов, вызывающих спектральные наложения,
- выбор широко распространенных изотопов и аналитических длин волн определяемых элементов (информация по спектральным интерференциям обычно содержится в программном обеспечении к приборам, предоставляемом производителями),
- использование системы подавления интерференций (реакционно-столкновительные ячейки),
- использование программного обеспечения ИСП-МС и ИСП-АЭС, которое позволяет проводить математическую коррекцию интерференций непосредственно в процессе измерений.

2 Валидационные требования

В соответствии с ГФ РФ, ОФС.1.5.3.0009.15 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» методики определения тяжелых металлов и мышьяка в ЛРП должны быть валидированы. Выбор методики измерения аналитического сигнала (по градуировочной кривой или методом стандартных добавок) для конкретных объектов исследования определяется в ходе валидации методики. Общие требования к валидации аналитических методик количественного определения примесей приведены в Руководстве ЕАЭС, требованиях EDQM, а также в соответствующих статьях действующей версии ГФ РФ и Фармакопеи ЕАЭС.

Основными валидационными параметрами методик определения содержания тяжелых металлов и мышьяка в ЛРС и ЛРП спектральными методами являются: специфичность, предел количественного определения, аналитическая область, линейность, правильность (открываемость), прецизионность (повторяемость, промежуточная прецизионность). Конкретные критерии приемлемости валидационных параметров приведены в пункте 13 настоящих методических рекомендаций.

2.1 Пределы обнаружения

Пределы обнаружения, которые могут быть достигнуты для конкретных элементов, имеют существенное значение при определении эффективности того или иного метода, в зависимости от чего может потребоваться предварительное концентрирование анализируемой пробы. При этом спектральные методы с индуктивно-связанной плазмой обладают наилучшей чувствительностью при сохранении линейности отклика [2].

Теоретический предел обнаружения элементов в образцах ЛРС и ЛРП составляет:

- методом ИСП-АЭС: кадмий – $0,1 \text{ мкг/дм}^3$, свинец – $1,0 \text{ мкг/дм}^3$, ртуть – $1,0 \text{ мкг/дм}^3$ ($0,005 \text{ мкг/дм}^3$ для ртутного анализатора), мышьяк – $1,0 \text{ мкг/дм}^3$,
- методом ИСП-МС: кадмий – $0,00009 \text{ мкг/дм}^3$, свинец – $0,00004 \text{ мкг/дм}^3$, ртуть – $0,016 \text{ мкг/дм}^3$, мышьяк – $0,0006 \text{ мкг/дм}^3$ [3]. Все пределы обнаружения определялись в разбавленных водных растворах элементных стандартов. Расчеты основаны на 98%-ном доверительном интервале (3σ -критерий).

Реальные пределы обнаружения сильно зависят от матричного состава испытуемых растворов (особенно содержания углерода и нерастворенных частиц), аппаратного оснащения лаборатории и помещений, а также используемых реактивов, условий проведения испытаний [4-8].

2.2 Диапазон применения

Диапазон применения, приводимой в данных указаниях методики, составляет ориентировочно:

- методом ИСП-АЭС: кадмий – $0,001 \div 10,0 \text{ мг/дм}^3$, свинец – $0,01 \div 10,0 \text{ мг/дм}^3$, ртуть – $0,02 \text{ мг/дм}^3 \div 1,0 \text{ мг/дм}^3$ ($0,2 \div 20 \text{ мкг/дм}^3$ для ртутного анализатора), мышьяк – $0,01 \div 10 \text{ мг/дм}^3$,

- методом ИСП-МС: кадмий – $0,0001 \div 2 \text{ мг/дм}^3$, свинец – $0,0005 \div 5,0 \text{ мг/дм}^3$, ртуть – $0,0005 \div 0,5 \text{ мг/дм}^3$, мышьяк – $0,00005 \div 5,0 \text{ мг/дм}^3$.

2.3 Погрешность измерений

Методика проведения анализа должна обеспечивать получение результатов измерений с погрешностью 70-150% для всех элементов согласно требованиям фармакопеи ЕАЭС.

3 Оборудование, материалы и реактивы

3.1 Оборудование и вспомогательные устройства

- мельница лабораторная;

- сито лабораторное с размером отверстий 1 мм;
- весы аналитические электронные I класса точности с неопределенностью взвешивания $\pm 0,0005$ г;
- система для очистки кислот;
- система микроволновой или автоклавной подготовки образцов, укомплектованная сосудами для разложения проб и датчиками контроля температуры и давления;
- установка для получения очищенной воды с удельным сопротивлением 0,18 МОм·м;
- масс-спектрометр с индуктивно-связанной плазмой с диапазоном измерений от 2 до 260 а.е.м., укомплектованный компьютером с установленным программным обеспечением для управления масс-спектрометром, обработки результатов измерений и системой автоматической подачи образцов (автосамплером);
- атомно-эмиссионный спектрометр с индуктивно-связанной плазмой с рабочим диапазоном длин волн 165 - 800 нм, укомплектованный компьютером с установленным программным обеспечением для управления спектрометром и обработки результатов измерений;
- дозаторы жидкости ручные или электронные автоматические с одноразовыми наконечниками и с варьируемым объемом дозирования;
- ультразвуковая ванна.

3.2 Реактивы

- кислота азотная концентрированная, ОСЧ 27-5 по ГОСТ 11125-84 или аналогичная, обладающая техническими характеристиками не хуже указанных;
- кислота соляная концентрированная, ОСЧ 26-4 по ГОСТ 14261-77 или аналогичная, обладающая техническими характеристиками не хуже указанных;

- перекись водорода концентрированная, качеством не ниже ОСЧ 39-4 ТУ 2611-003-25665344-2008, обладающая техническими характеристиками не хуже указанных;

- вода деионизованная с удельным сопротивлением 0,18 МОм·м;

- стандартный образец ГСО ионов свинца 1г/дм³, (ГСО 7778-2000) или аналогичный;

- стандартный образец ГСО ионов кадмия 1г/дм³, (ГСО 7773-2000) или аналогичный;

- стандартный образец ГСО ионов ртути 1г/ дм³, (ГСО 7343-96) или аналогичный;

- стандартный образец ГСО ионов мышьяка 1г/дм³, (ГСО 7264-96) или аналогичный;

- аргон газообразный высокой чистоты по ТУ 6-21-2-94, чистотой 99,998% или аналогичный, обладающий техническими характеристиками, не хуже указанных;

- стандартные растворы для настройки чувствительности ИСП-МС («Agilent 5185-5959 Tuning Solution for ICP-MS») или аналогичный, в зависимости от используемого оборудования) и ИСП-АЭС (Mn - 1 г/дм³ ГСО 7266-96 или аналогичный).

3.3 Лабораторная посуда и расходные материалы

- колбы мерные по ГОСТ 1770;

- стаканы по ГОСТ 25336;

- цилиндры по ГОСТ 1770;

- пипетки стеклянные по ГОСТ 29227;

- воронки лабораторные по ГОСТ 25386-82;

- ступка фарфоровая с пестиком по ГОСТ 9147-80;

- фильтры с размером пор 0,45 микрон;

- фильтр обеззоленный класса «синяя лента» по ГОСТ 12026-76 или аналогичной пористости;

- шпатель по ГОСТ 9147-80.

4 Требования к безопасности проведения работ

Требования безопасности должны соответствовать правилам и рекомендациям, изложенным в техническом описании на приборы.

При выполнении анализов необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007-76.

Помещения, в которых проводят анализ и подготовку проб, должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией. Приготовление испытуемых и градуировочных растворов проводят в вытяжном шкафу.

При выполнении работ должны быть соблюдены меры требования пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.018-93 и электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019-2017. Безопасность при работе с баллонами с аргоном обеспечивается соблюдением "Правил промышленной безопасности при использовании оборудования, работающего под избыточным давлением", утвержденных Федеральной службой по экологическому, технологическому и атомному надзору от 15 декабря 2020 года N 536.

5 Требования к квалификации лиц, работающих на ИСП-АЭС и ИСП-МС

К выполнению измерений и обработке их результатов допускаются лица, владеющие методами ИСП-АЭС и ИСП-МС, знающие принцип действия, конструкцию и правила эксплуатации данного оборудования, прошедшие обучение, проверку знаний и имеющие практический опыт работы в химических лабораториях.

6 Условия выполнения измерений

Выполнение измерений проводят при нормальных климатических условиях испытаний, указанных в руководстве по эксплуатации атомно-эмиссионного спектрометра с ИСП и масс-спектрометра с ИСП.

7 Подготовка к проведению измерений

Все процедуры подготовки проб к анализу должны исключать возможность внесения в них загрязнений. Концентрация определяемых элементов в используемых реактивах и воде должна быть настолько мала, чтобы не оказывать влияния на результаты испытаний. Используемая вода должна быть деионизованной на ионообменных смолах и соответствовать требованиям, предъявляемым к воде очищенной.

Чистота реактивов должна быть не ниже марки «ос.ч» и указана при написании соответствующего раздела нормативной документации. Кислоты марок «ч.д.а» и «х.ч.» часто содержат элементные примеси в заметных количествах. Всю посуду, используемую при пробоподготовке, приготовления испытуемых и стандартных растворов, предварительно обрабатывают 2-3%-ным раствором азотной кислоты с последующей четырехкратной промывкой деионизованной водой. Используемая мерная посуда должна быть класса А или 1 класса точности (по возможности, пластиковая).

8 Отбор, хранение и подготовка проб

Попавшие в выборку транспортные единицы вскрывают, содержимое измельчают, просеивают сквозь сито с размером отверстий 1 мм и отбирают методом квартования объединенную пробу согласно ОФС.1.1.0005.15 «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Из объединенной пробы отбирают аналитическую пробу ЛРС или ЛРП и проводят минерализацию в микроволновой печи в закрытых сосудах с использованием сильных окислителей. Разложение в микроволновой системе возможно в различном аппаратурном исполнении.

Наиболее предпочтительным окислителем является концентрированная азотная кислота, так как она не является прекурсором, мало летуча, её легко очистить путём перегонки в лабораторных условиях, и она не образует в плазме соединений, вызывающих полиатомные наложения, мешающих определению целевых элементов [11]. В случае необходимости, могут использоваться другие реагенты, не содержащие определяемые элементы.

Для минерализации сложных биологических объектов используют смесь азотной и соляной кислот. Слабые растворы соляной кислоты (0,1-1%) заметно увеличивают сроки хранения ртути содержащих растворов [12], однако наличие хлорид-ионов, образующиеся в процессе анализа с использованием ИСП-МС, приводит к возникновению полиатомных спектральных наложений. Использование фосфорной и серной кислот увеличивает вязкость раствора и снижает эффективность распыления образца. Присутствие серы и фосфора дополнительно повышает количество полиатомных ионов, а также вызывает образование нерастворимых солей с некоторыми элементами. Допускается добавление в пробу небольшого количества плавиковой кислоты для стабилизации растворов некоторых элементов при использовании специального аппаратурного исполнения аналитического оборудования. Добавление к испытываемому образцу большого количества окислителей для минерализации пробы также увеличивает общую засоленность раствора, из за чего усиливается матричный эффект.

В сосуд для микроволнового разложения помещают 0,5 – 1,0 г (точная навеска) испытываемого образца, прибавляют 10 мл азотной кислоты концентрированной, осторожно перемешивают до полного смачивания,

накрывают часовым стеклом и выдерживают при комнатной температуре около 1 часа. Допускается использование альтернативных комбинаций окислителей (кислот и перекиси водорода), при этом рекомендуется не превышать общего объёма смеси в 10 мл.

Минерализацию пробы проводят, используя программу разложения, рекомендованную производителем печи. Оптимальная температура разложения пробы 180 ± 5 °С. Выбор мощности осуществляется автоматически в зависимости от модели микроволновой системы таким образом, чтобы скорость нагрева образца составляла ориентировочно 15 – 30 °С/мин. Скорость нагрева образца до 180 °С составляет 5 – 10 мин, время выдержки образца при 180 °С составляет 10 – 30 мин в зависимости от вида сырья. Для снижения давления внутри сосуда для минерализации его охлаждают в закрытом состоянии до температуры, близкой к комнатной.

После охлаждения полученный раствор фильтруют через беззольный фильтр и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 – 50 мл, объём раствора доводят до метки деионизованной водой.

Холостой раствор пробы готовят с выполнением всех указанных выше операций, за исключением добавления навески испытуемого образца.

В соответствии с ОФС «Определения содержания тяжёлых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» методику разложения ЛРС и ЛРП необходимо валидировать.

9 Подготовка прибора

9.1 Атомно-эмиссионный спектрометр с индуктивно-связанной плазмой

9.1.1 Выбор рабочих условий

Спектрометр готовят к работе в соответствии с руководством по эксплуатации фирмы-изготовителя. Рекомендуемые длины волн для анализа

содержания мышьяка, кадмия, ртути и свинца согласно действующей версии фармакопеи ЕАЭС приведены в таблице Б.1.

Таблица Б.1 – Характеристические длины волн

Длина волны	Мышьяк	Кадмий	Ртуть	Свинец
Основные	189,042 нм	228,802 нм	253,652 нм	220,351 нм
Вспомогательные	193,696 нм, 197,197 нм	214,438 нм 226,502 нм	189,950 нм 435,835 нм	283,306 нм 168,215 нм

Для выполнения анализа устанавливают следующие аналитические параметры:

- длина волны,
- скорость потока газа-носителя (внешняя, промежуточная и внутренняя трубка горелки),
- скорость подачи образца в распылительную камеру,
- мощность радиочастотного излучения,
- положение для наблюдения обзора эмиссии (радиальное или аксиальное),
- скорость насоса,
- время интегрирования,
- число повторов измерения эмиссии,
- условия для детектора.

Аксиальный способ наблюдения плазмы дает лучшие пределы обнаружения, чем радиальный, однако переход на радиальный обзор позволяет проводить измерение в случае превышения максимальной интенсивности излучения при исследовании концентрированных растворов без их разбавления;

Работа спектрометра управляется и контролируется программным обеспечением, которое позволяет осуществлять полную автоматизацию измерений и управление вспомогательными системами для ввода проб,

сохраняет результаты измерений, включая спектры, и даёт возможность повторной обработки информации без проведения дополнительных измерений.

Выбор конкретной длины волны зависит от конфигурации используемого оборудования и наличия в матрице элементов, имеющих перекрывающиеся характеристические длины волн.

9.1.2 Контроль работоспособности прибора

Для качественного проведения исследований оборудование должно быть поверено в аккредитованных организациях. Для оперативной проверки работоспособности проводится настройка его чувствительности в аксиальном (при необходимости в радиальном) режиме обзора плазмы по раствору с СО ионов марганца с концентрацией 1 ppm при длине волны 257,610 нм.

При необходимости более точного анализа, можно провести настройку по определяемому элементу, используя раствор данного элемента с концентрацией 1 ppm.

Предел обнаружения для выбранных элементов должен соответствовать определяемым концентрациям элементов в испытуемых и градуировочных растворах.

9.2 Масс-спектрометр с индуктивно-связанной плазмой

9.2.1 Выбор рабочих условий

Условия работы ИСП-МС устанавливаются в соответствии с инструкцией по эксплуатации используемого оборудования. Выбирают изотопы определяемых элементов. Рекомендуемые изотопы для анализа содержания мышьяка, кадмия, ртути и свинца согласно действующей версии фармакопеи ЕАЭС приведены в таблице Б.2.

Таблица Б.2. – Изотопы используемые для анализа

Изотоп	Мышьяк	Кадмий	Ртуть	Свинец
Основные	75	111	202	208
Вспомогательные	-	114,106, 108	-	206, 207

Для выполнения анализа устанавливают следующие аналитические параметры:

- расход плазмообразующего газа,
- расход распылительного газа,
- расход вспомогательного газа,
- вспомогательный газ и скорость потоков газа-носителя и вспомогательного газа,
- мощность радиочастотного излучения (1200-1600 Вт),
- скорость насоса подачи образца,
- температуру распылительной камеры,
- время интегрирования,
- режим измерения (импульсный или аналоговый),
- изотопы анализируемого элемента.

Настройку параметров в большинстве случаев проводят в автоматическом режиме, в качестве приоритета используя чувствительность по большим а.е.м.

Программное обеспечение ИСП-МС должно обеспечивать поддержку выполнения количественного, полуколичественного (обзорного) методов анализа, проведение автоматических измерений без участия оператора; автоматизацию процедур калибровки, настройки шкалы масс и рабочих параметров спектрометра; статистическую обработку и сохранение результатов в общепринятых форматах; возможность повторной обработки данных без проведения дополнительных измерений.

9.2.2 Контроль работоспособности прибора

В ходе проверки пригодности системы определяют следующие параметры: чувствительность прибора во всем диапазоне масс, точность измерения масс, проводят

контроль образования оксидов и двухзарядных ионов.

Точность измерения масс и чувствительность прибора проверяют с использованием настроечного раствора, содержащего несколько изотопов в широком диапазоне масс, например, ${}^7\text{Li}$, ${}^9\text{Be}$, ${}^{59}\text{Co}$, ${}^{89}\text{Y}$, ${}^{115}\text{In}$, ${}^{140}\text{Ce}$, ${}^{205}\text{Tl}$, ${}^{209}\text{Bi}$, измеряя интенсивность сигналов в размерности скорости счета.

Контроль образования оксидов проводят для оценки вклада полиатомных интерференций. Для этого используют настроечные растворы, измеряя соотношения CeO^+/Ce^+ и/или BaO^+/Ba^+ (уровень содержания оксидов не должен превышать 3 %).

Уровень образования двухзарядных ионов оценивают, измеряя соотношение $\text{Ce}^{2+}/\text{Ce}^+$ и/или $\text{Ba}^{2+}/\text{Ba}^+$ с использованием настроечных растворов этих элементов. Отношение сигнала для двухзарядных ионов к обозначенному элементу должно быть менее 2 %.

В ходе проверки пригодности системы необходимо оптимизировать параметры прибора (скорость подачи образца и потоков газов, энергию плазмы, напряжение на ионных линзах и т. д.) для получения наибольшей интенсивности сигнала. При проверке долговременной стабильности прибора проверяют относительное среднеквадратичное отклонение (СКО) выходного сигнала. Результат определения относительного СКО должен составлять не более 2-4% (в зависимости от типа прибора) для 10 последовательных измерений каждого изотопа (ИСП-МС) или длины волны (ИСП-АЭС).

10 Приготовление стандартных градуировочных растворов и калибровка прибора

Измерение содержания определяемого элемента проводят путем сравнения эмиссии (интенсивности сигнала) испытуемого раствора с эмиссией (интенсивностью сигнала) градуировочных растворов с использованием метода калибровочной кривой или метода стандартных добавок. Определение градуировочной зависимости, обработка и хранение результатов калибровки выполняются программным обеспечением спектрометра. Система считается пригодной для проведения анализа, если коэффициент корреляции Пирсона (r), определенный по калибровочным графикам градуировочных растворов, составляет не менее 0,99.

10.1 Метод калибровочной кривой

Для количественного определения готовят не менее трёх стандартных градуировочных растворов определяемого элемента таким образом, чтобы ожидаемое значение концентрации испытуемого раствора находилось внутри диапазона концентраций стандартных градуировочных растворов. Градуировочные растворы готовят, используя СО отдельных элементов и разбавляя их до требуемой концентрации 2-3 % раствором азотной кислоты. Градуировочные растворы используют свежеприготовленными. Рекомендуется готовить 3-5 градуировочных растворов в диапазоне 50-150% от номинального значения (определяемой концентрации вещества).

Калибровочный график представляет собой зависимость интенсивности сигнала элемента от концентрации и рассчитывается методом регрессии наименьших квадратов по всем измеренным данным калибровочного испытания. Измерение градуировочных растворов проводят в порядке возрастания их концентраций и выполняют перед началом измерений.

10.2 Метод стандартных добавок

Для реализации этого метода испытуемый раствор делят на несколько частей, минимум на три. Ко всем частям кроме одной прибавляют пропорционально увеличивающиеся объемы стандартного раствора с известной концентрацией определяемых элементов (стандартные добавки). Количество добавки должно соответствовать 0,5 - 2 кратному ожидаемому содержанию элементов в испытуемых растворах.

Полученную серию образцов измеряют и строят зависимость интенсивности сигнала каждого образца от количества добавки. Истинную концентрацию определяемого элемента в испытуемом образце находят как модуль величины в точке пересечения прямой с осью абсцисс.

11 Проведение измерений

11.1 Последовательность анализа

Для измерения содержания определяемых элементов с помощью ИСП-АЭС и ИСП-МС рекомендуется проводить анализ в виде серии измерений в следующей последовательности:

- холостой градуировочный раствор,
- градуировочные растворы,
- раствор для проверки пригодности системы (один или несколько),
- раствор холостой пробы,
- растворы проб (не менее трех параллельных определений),
- раствор для проверки пригодности системы (определение долговременной стабильности),
- раствор для промывки системы,
- деионизованная вода (для контроля качества очистки системы).

Измерение растворов холостой и анализируемых проб должно проводиться в тех же условиях, что и при построении градуировочной

характеристики, то есть должно представлять собой среднеарифметическое значение не менее чем двух повторных измерений одного раствора.

После каждых 10 измерений растворов анализируемых проб (либо по окончании серии испытаний, если анализируется менее 10 растворов) проверяют стабильность градуировочной характеристики при помощи одного из градуировочных растворов.

Для проверки стабильности работы прибора измеренная концентрация стандартного раствора элемента до и после испытаний всех образцов, находящаяся в пределах диапазона концентраций используемой калибровочной кривой, не должна отличаться от фактической концентрации более чем на 20% (при определении элементных примесей).

Для промывки системы не рекомендуется использовать концентрированные растворы кислот, так как это не увеличивает степень очистки, а приводит к преждевременной деградации подающих шлангов, конусов и системы подачи раствора в приборы. Рекомендуется использовать промывочные растворы с содержанием кислот не более 5%. После измерения растворов, содержащих ртуть, следует промывать систему, используя 0,005 М раствор KBrO_3 (или KBr) в 2% азотной кислоте для лучшего удаления следов ртути.

11.2 Использование внутренних стандартов

Для нивелирования матричного эффекта, дрейфа (уменьшения) чувствительности при элементном анализе в сложной матрице, а также для учета нестабильности работы спектрометров используется метод ВС. Данный элемент (или группа элементов) должен присутствовать в абсолютно одинаковых концентрациях во всех вводимых в систему растворах. Это достигается подачей раствора ВС с помощью смесительного узла системы, либо

добавлением необходимой концентрации ВС во все используемые растворы с помощью дозатора.

Основные требования к используемому ВС:

- отсутствие в испытуемых растворах данного элемента в детектируемых количествах,
- отсутствие спектральных наложений на сигнал целевого (определяемого) элемента,
- отсутствие спектральных наложений на элемент, используемый в качестве ВС,
- относительная близость ВС по физико-химическим характеристикам к определяемому элементу (по потенциалу ионизации и/или атомной массе).

Элементы, рекомендуемые для использования в качестве ВС при анализе содержания нормируемых элементных токсикантов (As, Cd, Hg, Pb), приведены в таблице Б.3.

Таблица Б.3 – Внутренние стандарты, используемые для спектрального анализа

Метод	Мышьяк	Кадмий	Ртуть	Свинец
ИСП-АЭС	Y - 371,029 нм, Bi - 190,171 нм Se - 196,026 нм	Sc -361,383 нм Y - 224,306 нм	Y - 224,306 нм In - 325,609 нм	Co -228,616 нм Bi - 190,171 нм
ИСП-МС	⁷⁴ Ge, ²⁰⁹ Bi	¹⁰³ Rh	¹⁹³ Ir	²⁰⁹ Bi

Концентрации элементов в градуировочных растворах и растворах проб корректируют соответственно сигналам внутренних стандартов по следующей формуле:

$$C_s = C_i \cdot \frac{S_{blank}}{S_i} \quad (Б.1)$$

где

C_i - измеренная массовая концентрация элемента, мкг/дм³;

S_{blank} - сигнал от внутреннего стандарта в растворе холостой пробы, импульс/с (с/с);

S_i - сигнал от внутреннего стандарта в испытуемом растворе от соответствующего элемента, импульс/с (с/с).

12 Обработка результатов измерений

Программное обеспечение автоматически рассчитывает концентрацию определяемых элементов в растворах проб, используя градуировочную зависимость. Результаты измерений сохраняют в виде файла на жестком диске компьютера.

По результатам измерений рассчитывают содержание свинца, мышьяка, ртути, кадмия в препарате (X) в ppm по формуле:

$$X = \frac{(C_{Sample} - C_{Blk}) \cdot V}{m} \quad (\text{Б.2})$$

где

C_{Sample} – содержание элемента в анализируемом растворе, найденное по калибровочному графику, мкг/мл;

C_{Blk} - содержание элемента в холостом растворе, найденное по калибровочному графику, мкг/мл;

V – объем раствора пробы, мл;

m – масса навески, г.

Если разность $C_{Sample} - C_{Blk}$ оказывается меньше нижней границы диапазона градуировки, то расчет содержания элемента не производят, а дают одностороннюю оценку массовой доли элемента с использованием предела измерения (нижней точки калибровочного графика).

Кратковременную стабильность оценивают по величине относительного стандартного отклонения (RSD) результатов пяти измерений интенсивности

сигналов определяемых изотопов одного анализируемого раствора. Критерий приемлемости кратковременной стабильности: $RSD \leq 5\%$ (для основного компонента), $RSD \leq 10\%$ (для примесей с концентрацией более 1 мг/кг), $RSD \leq 20\%$ (для примесей с концентрацией менее 1 мг/кг).

Долговременную стабильность проверяют проведением испытания для стандартного раствора в начале и конце последовательности измерений. Концентрацию стандартного раствора выбирают в пределах диапазона концентраций используемой калибровочной кривой. Измеренные концентрации не должны отличаться от фактических более чем на 10 % (моноэлементный стандартный раствор) и на 20 % (мультиэлементный стандартный раствор).

13 Валидация методики

Все методики количественного определения содержания тяжелых металлов и мышьяка в ЛРС и ЛРП спектральными методами, приведенные в частных ФС, должны быть валидированы.

13.1 Аналитическая область методики

В пределах диапазона применения методика должна обеспечивать требуемую линейность, правильность и прецизионность.

13.2 Специфичность

Методика должна быть способна однозначно определять и оценивать количество определяемого элемента в присутствии всех возможных влияющих компонентов, в том числе других тяжелых металлов, элементов матрицы и других источников помех. Специфичность спектральных методов определяется путём регистрации аналитического сигнала от стандартного образца определяемого элемента в испытуемом растворе. Специфичность

подтверждается соответствием требованию для правильности определения элемента(ов).

13.3 Правильность

Правильность выражают величиной открываемости. Открываемость (извлекаемость) – соотношение между полученным средним и истинным/опорным значениями с учетом соответствующих доверительных интервалов. Для подтверждения правильности методики и изучения степени открываемости (извлекаемости) исследуемых элементов используют стандартные образцы растительного сырья, аттестованные по содержанию тяжелых металлов и мышьяка. Открываемость доказывают на не менее чем трёх образцах в диапазоне 50–150 % от номинального содержания элемента, по формуле.

$$R = \frac{\text{найденно аналита}}{\text{взято аналита}} \times 100\% \quad (\text{Б.3})$$

В соответствии с требованиями EurPh и USP открываемость должна составлять 70÷150 % от истинного для среднего из трех измерений, среднеквадратичное отклонение при этом не должно превышать 20%. В ГФ РФ XVI издания требования к открываемости отсутствуют.

Самым простым способом определить открываемость (коэффициент извлечения) является внесение в свободное от нормируемых элементов ЛРС рассчитанного количества СО тяжелых металлов и мышьяка и сравнение этого количества с найденным в растворе после пробоподготовки. Однако данный способ не является полностью корректным, так как тяжелые металлы и мышьяк в стандартных растворах находятся в легко доступной форме и не связаны с

органическими соединениями, однако позволяет учесть матричный эффект от получаемого испытуемого раствора.

Более подходящим и правильным способом является использование стандартных образцов растительного сырья, аттестованных по содержанию тяжелых металлов и мышьяка.

13.4 Прецизионность

Прецизионность на различных уровнях (сходимость и внутрилабораторную прецизионность) характеризуют величиной RSD – параметром, характеризующим точность измерения.

Сходимость (повторяемость) методики оценивают двумя способами:

- по результатам определений содержания элементов в трех концентрациях (50 – 100 – 150 % от нормируемых значений) для трех параллельных опытов,

- по результатам определений содержания элементов в шести испытуемых пробах с добавлением подходящего стандартного образца в диапазоне концентраций 50 – 150 % от нормируемых значений.

Критерий приемлемости: коэффициент вариации не должен превышать 10% для концентраций определяемых элементов более 1 мг/кг и 20% для концентраций 0,01-1 мг/кг согласно требованиям фармакопеи ЕАЭС, а также EurPh и USP.

Для оценки внутрилабораторной прецизионности используются данные сходимости вместе с набором данных, полученных при выполнении методики вторым сотрудником. Критерий приемлемости внутрилабораторной прецизионности: коэффициент вариации не должен превышать 16% для концентраций определяемых элементов более 1 мг/кг и 32% для концентраций 0,01-1 мг/кг.

13.5 Линейность

При валидации аналитических методик одной из обязательных характеристик является «Линейность». Линейность методик подтверждают чаще всего визуально графиком зависимости измеряемого отклика (например, площади пика или количества сигналов) от концентрации определяемого вещества и приемлемым значением коэффициента корреляции R (обычно не менее 0,99) линейной регрессионной зависимости. Погрешности каждого калибровочного уровня должны быть распределены случайным образом на калибровочном графике. Линейность можно подтвердить напрямую на фармацевтическом препарате или стандартном образце растительного происхождения аттестованном по содержанию примесей и (или) на отдельных навесках искусственных (модельных) смесей компонентов лекарственного препарата с добавкой известного количества элементных токсикантов. Для подтверждения линейности должны быть определены и представлены коэффициент корреляции или коэффициент детерминации, свободный член линейной регрессии, тангенс угла наклона линии регрессии и остаточная сумма квадратов отклонений, а также приложен график со всеми экспериментальными данными. Для установления линейности рекомендуется использовать как минимум пять концентраций элементных токсикантов покрывающих всю область применения методики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря своим возможностям спектральные методы анализа с индуктивно-связанной плазмой могут применяться в фармакопейном анализе при решении широкого круга аналитических задач. Эти методы предназначены для качественного и количественного элементного анализа лекарственных средств и их примесей. Методы характеризуются хорошей селективностью и чувствительностью и находят широкое практическое применение в различных областях науки и техники.

Разработка и валидация методик определения тяжелых металлов и мышьяка в ЛРС и ЛРП имеют свою специфику, обусловленную сложностью извлечения элементов из органической матрицы и ее существенным влиянием на результат измерения. В связи с этим, при разработке и валидации таких методик рекомендуется использовать специфические стандартные образцы, специально подготовленную посуду и особо чистые реактивы.

Несмотря на то, что методики количественного определения содержания тяжелых металлов в ЛРС и ЛРП спектральными методами представлены в отечественной и зарубежных фармакопеях, обязательно требуется их валидация производителем с учетом используемого оборудования для проведения пробоподготовки и элементного анализа.

Для ряда валидационных параметров в ГФ РФ XIV отсутствуют критерии их приемлемости. В этом случае рекомендуется использовать критерии, приведенные в зарубежных фармакопеях (EurPh и USP).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Кингстон Г.М. Пробоподготовка в микроволновых печах: теория и практика / Г.М. Кингстон, Л.Б. Джесси. – Москва: Мир, 1991. – 336 с. – ISBN 5-03-002108-6.
2. Tyler G. ICP-OES, ICP-MS and AAS Techniques Compared / G.Tyler, S.Jobin Yvon //ICP Optical Emission Spectroscopy Technical Note. – 1995. – Т. 5. – С. 1-11.
3. Забокрицкий М. П. Критерии выбора спектрального метода применительно к анализу микроэлементов в биологических объектах / М. П. Забокрицкий, В. В. Сабуров //Микроэлементы в медицине. – 2014. – Т. 15. – №. 4. – С. 29-38.
4. Nölte J. ICP Emission Spectrometry: a practical guide / J. Nölte. – 2nd Edition. –Weinheim: John Wiley & Sons, 2021. – 288 p. – ISBN 978-3-527-82362-8.
5. Sample matrix and critical interference effects on the recovery and accuracy of concentration measurements of arsenic in ambient particulate samples using ICP-MS/ R. J. Brown, R. E. Yardley, A. S. Brown [et al.] // Journal of Analytical Atomic Spectrometry. – 2004. – Т. 19. – №. 5. – С. 703-705.
6. McCurdy E. Optimising ICP/MS for the determination of trace metals in high matrix samples / E. McCurdy, D. Potter // Spectroscopy Europe. – 2001. – Т. 13. – №. 3. – С. 14-21.
7. Varying matrix effects for elemental analysis identified from groundwater in the Barnett Shale / D. D. Carlton, B. E. Fontenot, Z. L. Hildenbrand [et al.] // International journal of environmental science and technology. – 2015. – Т. 12. – №. 11. – С. 3665-3674.
8. Carbon-related matrix effects in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry / G. Grindlay, L. Gras, J. Mora [et al.] // Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. – 2008. – Т. 63. – №. 2. – С. 234-243.
9. Paredes E. Use of stirred tanks for studying matrix effects caused by inorganic acids, easily ionized elements and organic solvents in inductively

coupled plasma atomic emission spectrometry / E. Paredes, S. E. Maestre, J. L. Todolí // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. – 2006. – Т. 61. – №. 3. – С. 326-339.

10. Осипов К. Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой в анализе биологических проб и фармацевтических препаратов / К. Осипов, И. Ф. Серегина, М. А. Большов // *Успехи химии*. – 2016. – Т. 85. – №. 4. – С. 335-355.

11. Анализ вод методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой / В. К. Карандашев, А. Ю. Лейкин, В. А. Хвостиков [и др.] // *Заводская лаборатория. Диагностика материалов*. – 2015. – Т. 81. – №. 5. – С. 5-18.

12. A study of techniques for the preservation of mercury and other trace elements in water for analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) / H. Louie, C. Wong, Y. J. Huang [et al.] // *Analytical Methods*. – 2012. – Т. 4. – №. 2. – С. 522-529.