
Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах **ОФС.1.5.3.0009.15**

Требования настоящей общей фармакопейной статьи распространяются на методы количественного определения тяжелых металлов: свинца, кадмия, ртути и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах.

Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах проводят с использованием одного из следующих методов:

- атомно-абсорбционной спектрометрии;
- атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой;
- масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой.

Результаты, полученные при определении содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье, распространяются на лекарственный растительный препарат, произведенный из данной партии лекарственного растительного сырья.

Лекарственные растительные препараты подвергаются выборочному контролю на содержание тяжелых металлов и мышьяка не реже одного раза в год (одна серия каждого наименования).

Процедура определения содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах состоит из следующих основных этапов:

1. Отбор пробы для определения остаточных пестицидов, тяжелых металлов и мышьяка. Отбор пробы проводится в соответствии с требованиями ОФС "Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов" в условиях, исключающих дополнительное загрязнение сырья.
2. Подготовка пробы.
3. Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в испытуемых пробах.
4. Определение соответствия сырья допустимым нормам.

Оборудование, реактивы, растворы

Для определения содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах используют оборудование, отвечающее требованиям ОФС на соответствующие методы анализа.

При выполнении исследований используют реактивы, предназначенные для спектральных методов анализа или марки "ос.ч".

Приготовление растворов осуществляют в мерной посуде класса А или 1 класса точности, а их хранение - в пластиковой посуде (PMP, PFA, PP).

Используемая вода должна быть деионизованной (деионизированной) на ионообменных смолах и соответствовать требованиям, предъявляемым к воде очищенной.

Определение содержания тяжелых

металлов и мышьяка методом атомно-абсорбционной спектрометрии

Аппаратура для метода атомно-абсорбционной спектрометрии

Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах проводят на атомно-абсорбционном спектрометре с различными атомизаторами пробы (пламенный, электротермический), а также методом "холодного пара" и генерации гидридов.

Подготовка лабораторной посуды включает следующие последовательные этапы: обычная мойка посуды с раствором моющего средства, тщательное ополаскивание проточной водой питьевой, затем замачивание в натрия гидроксида растворе 1% и водорода пероксиде, ополаскивание проточной водой питьевой с последующим замачиванием в течение 1 ч в хлористоводородной кислоты растворе 10%, либо обработка посуды азотной кислоты раствором 1%, ополаскивание водой для хроматографии 3-4 раза, сушка.

Приготовление стандартных растворов тяжелых металлов и мышьяка осуществляют в лабораторных условиях или используют готовые растворы стандартных образцов.

Подготовка проб к анализу

Пробоподготовка включает в себя предварительное измельчение пробы для определения остаточных пестицидов, тяжелых металлов и мышьяка с целью приготовления однородного образца и последующего взятия не менее двух параллельных навесок, деструкцию органической матрицы для перевода ионов металлов и мышьяка в раствор.

При отборе проб следует избегать контакта лекарственного растительного сырья и препаратов с предметами, содержащими определяемые металлы. Загрязнение лабораторной посуды железом, хромом и никелем может происходить при контакте с нержавеющей сталью, свинцом - с резиной, кадмием - с некоторыми видами пластмасс. Эти загрязнения контрольным опытом не учитываются и могут давать заметное завышение результатов.

Пробу сырья предварительно измельчают с помощью ножа или ножниц, затем в специальных лабораторных дробилках или мельницах-измельчителях и просеивают сквозь сито с размером отверстий 1 мм (ОФС "Оборудование"). Лекарственные растительные препараты, расфасованные в пачки, дополнительно измельчают и просеивают сквозь сито с размером отверстий 1 мм.

Лекарственные растительные препараты, расфасованные в фильтр-пакеты, дополнительно измельчают и просеивают сквозь сито с размером отверстий 1 мм.

Для дальнейшей подготовки к анализу рекомендуется использовать два метода подготовки пробы:

- сухая минерализация;
- мокрая минерализация.

Пробоподготовка сырья и препаратов к анализу заключается в деструкции органической основы пробы методами "сухой" (термической) минерализации, "мокрой" (кислотной) минерализации с последующим растворением остатка в водных растворах кислот или кислотной

экстракции (неполной минерализации). При недостаточной чувствительности проводят концентрирование токсичных элементов с последующим атомно-абсорбционным определением их в органических растворах.

Метод "сухой" минерализации основан на полном разложении органических веществ путем сжигания анализируемой пробы в муфельной печи при контролируемом температурном режиме.

Метод "мокрой" минерализации основан на полном разложении органических веществ пробы при нагревании в смеси концентрированных кислот. Проведение "мокрой" минерализации возможно в открытых системах (колбах Кьельдаля, стеклянных стаканах), либо в закрытых системах (например, автоклав, микроволновая система для пробоподготовки).

Метод пробоподготовки лекарственного растительного сырья и препаратов к анализу выбирают в соответствии с аппаратным оснащением аналитической лаборатории. Для арбитражного контроля используют метод "мокрой" минерализации (с использованием микроволновой системы для пробоподготовки). Параллельно проводят холостой опыт.

Метод 1а ("сухая" минерализация, Pb, Cd)

Около 2,5 г (точная навеска) лекарственного растительного сырья/препарата помещают в фарфоровый, стеклоглеродный, кварцевый или другой тигель и ставят в холодную муфельную печь. Озоление образцов проводят постепенно, поднимая температуру печи на 50°C каждые 30 мин (во избежание воспламенения) до 480°C, выдерживают в печи до полного озоления образца. После охлаждения пробу переносят во фторопластовый стакан, прибавляют 5 мл азотной кислоты концентрированной, свободной от свинца и кадмия, и оставляют на ночь. Затем нагревают пробу на электрической плитке и выпаривают до сухого остатка, после чего добавляют 1 мл фтористоводородной кислоты концентрированной и при сильном нагреве выпаривают досуха. Остаток охлаждают и обрабатывают 10 мл хлористоводородной кислоты разведенной (1:1) и упаривают до "влажных солей". Остаток доводят хлористоводородной кислоты раствором 2,5% до объема 10 мл.

Метод 1б ("сухая" минерализация, Pb, Cd)

Около 0,5-1,0 г (точная навеска) лекарственного растительного сырья/препарата помещают в тигель (из стеклоглерода марки С-200, разрешается использование кварцевых и платиновых тиглей, фарфоровых с неповрежденной внутренней поверхностью), смачивают 0,5-1,5 мл серной кислоты концентрированной и осторожно нагревают на пламени газовой горелки, электрической плитке и др. до полного обугливания. Затем тигель охлаждают до комнатной температуры и прибавляют к его содержимому 1 мл азотной кислоты концентрированной и 5 капель серной кислоты концентрированной. После этого осторожно нагревают на электрической плитке до исчезновения бурых паров, избегая разбрызгивания, потом усиливают нагрев до исчезновения плотных белых паров. Затем тигель помещают в муфельную печь и прокачивают при температуре около 500°C до получения зольного остатка. После чего тигель охлаждают до комнатной температуры и к его содержимому прибавляют 4 мл хлористоводородной кислоты раствора 6 М, закрывают крышкой и нагревают на кипящей водяной бане 15 мин. Затем крышку снимают и осторожно упаривают содержимое тигля до "влажных солей", после чего прибавляют 1 каплю хлористоводородной кислоты концентрированной и 5 мл горячей воды и нагревают в течение 2 мин. Полученный остаток количественно (трехкратно) переносят небольшими порциями при помощи воды для хроматографии в мерную колбу вместимостью 25 или 50 мл, фильтруя через беззольный фильтр, промытый хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М, и доводят водой для хроматографии до метки и перемешивают.

Метод 2а ("мокрая" минерализация, Pb, Cd)

Около 1,0 г (точная навеска) лекарственного растительного сырья/препарата помещают в колбу Кьельдаля вместимостью 100 мл, прибавляют 7 мл азотной кислоты концентрированной, перемешивают до полного смачивания пробы. После этого к содержимому прибавляют 4 мл хлорной кислоты концентрированной и перемешивают. Колбу закрепляют под углом 45° на песчаной бане, осторожно нагревают до появления бурых паров азота оксида и нагрев отключают. После полного прекращения выделения бурых паров температуру повышают до появления плотных белых паров и получения кислотного остатка 1-2 мл, колбу снимают с песчаной бани, охлаждают и количественно при помощи воды для хроматографии переносят ее содержимое в мерную колбу вместимостью 50 или 100 мл, фильтруя содержимое через беззольный фильтр (промытый хлористоводородной кислотой раствором 0,1 М), доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Метод 2б ("мокрая" минерализация, Hg)

Около 0,5 г (точная навеска) лекарственного растительного сырья/препарата помещают в стеклянный стакан вместимостью 50 мл, смачивают водой, приливают 6 мл серной кислоты концентрированной и 3 мл азотной кислоты концентрированной. Перемешивают, стакан накрывают крышкой из стеклоуглерода и оставляют в водяной бане на 1 сут при температуре около 10-20°C, затем переносят на водяную баню и нагревают при температуре 50-60°C в течение 2 ч. После этого стакан охлаждают до комнатной температуры, снимают крышки из стеклоуглерода и прибавляют 5 мл аммония персульфата раствора 5%. Смесь перемешивают и оставляют в стакане на ночь при комнатной температуре. На следующий день содержимое стакана переносят в мерную колбу вместимостью 200 или 250 мл и проводят дальнейшее определение.

Метод 2в ("мокрая" минерализация, Hg)

Около 1,0 г (точная навеска) лекарственного растительного сырья/препарата помещают во фторопластовый стакан металлического тубуса, смачивают 6 мл смеси серной кислоты концентрированной и азотной кислоты концентрированной в соотношении 1:5. Стакан, закрытый фторопластовой крышкой, помещают в металлический тубус. Металлический тубус закрывают, помещают в сушильный шкаф, нагревают до 100°C и выдерживают при этой температуре в течение 4% далее его вынимают, охлаждают, вскрывают и количественно переносят содержимое фторопластового стакана в мерную колбу вместимостью 200 или 250 мл, и проводят определение.

Метод 2г ("мокрая" минерализация, Pb, Cd, As)

Около 1,0 г (точная навеска) лекарственного растительного сырья/препарата помещают во фторопластовый стакан автоклава, смачивают 10 мл смеси хлористоводородной кислоты концентрированной и азотной кислоты концентрированной в соотношении 1:1. Стакан, закрытый фторопластовой крышкой, помещают в автоклав. Автоклав закрывают, помещают в сушильный

шкаф, нагревают до 200°C и выдерживают при этой температуре 2 ч. Далее автоклав вынимают, охлаждают, вскрывают и количественно переносят содержимое фторопластового стакана в мерную колбу вместимостью 50 мл, фильтруя содержимое через беззольный фильтр, промытый хлористоводородной кислотой раствором 0,1 М, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Метод 2д ("мокрая" минерализация, Pb, Cd, Hg, As)

Мокрую минерализацию проводят в системе микроволнового разложения. Разложение в микроволновой системе возможно в различном аппаратном исполнении при использовании различных кислот и реагентов. При использовании таких систем нужно придерживаться рекомендаций фирмы-изготовителя. Необходимо валидировать методику разложения лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов.

В качестве примера приводится следующая методика.

Около 0,5 г (точная навеска) измельченного лекарственного растительного сырья/препарата помещают в сосуд для микроволнового разложения, приливают 3 мл воды и 5 мл азотной кислоты концентрированной, осторожно перемешивают до полного смачивания и выдерживают в течение 5-10 мин. Сосуд герметично закрывают, помещают его в защитный кожух и затем в ротор микроволновой системы. Далее проводят обработку по программе, приведенной в табл. 1.

Таблица 1 - Программа обработки образцов лекарственного растительного сырья/препарата в системе микроволнового разложения

Этап	Время, мин	Температура, °С	Мощность излучения, Вт
1	5	80	до 350
2	3,5	160	до 800
3	4,5	190	до 1000
4	12	190	до 800

В конце цикла сосуды охлаждают на воздухе, открывают и полученный прозрачный или с небольшим осадком раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, фильтруя через беззольный фильтр, промытый хлористоводородной кислотой раствором 0,1 М, затем доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Допускается проведение пробоподготовки с использованием систем для минерализации проб (микроволновые, автоклавные и т.д.) с валидацией по образцам с известным содержанием элементов.

Проведение измерений

Измерения проводят различными вариантами метода атомно-абсорбционной спектроскопии с разными способами атомизации пробы. Чувствительность измерения в атомно-абсорбционном

анализе для пламенного метода составляет 0,01-10 мкг/мл, для непламенных - 0,0001-0,1 мкг/мл. Ртуть определяют методом атомно-абсорбционной спектроскопии с применением техники "холодных паров".

Анализ проб на содержание свинца и кадмия осуществляют пламенным вариантом (табл. 2), свинца, кадмия и мышьяка с использованием электротермического атомизатора (табл. 3); ртути - на ртутном анализаторе или с использованием ртутно-гидридной приставки к атомно-абсорбционному спектрометру, мышьяка - с использованием ртутно-гидридной приставки к атомно-абсорбционному спектрометру в соответствии с условиями анализа элементов (табл. 2).

Таблица 2 - Ориентировочные параметры определения тяжелых металлов и мышьяка методом атомно-абсорбционной спектроскопии (пламенный вариант)

Металл	Длина волны, нм	Ширина щели, нм	Тип пламени	Чувствительность, мкг/мл
Кадмий	228,8	0,3	В-А	0,025
Свинец	283,3	0,4	В-А	0,50
Ртуть	253,7	0,7	"холодный пар"	0,002
Мышьяк	193,7	0,5		0,002

Примечание: тип пламени: В - воздух, А - ацетилен в соответствии с требованиями инструкции по эксплуатации фирмы изготовителя.

Обработку полученного аналитического сигнала для ртути и мышьяка осуществляют по высоте пика.

Стадия высушивания зависит от кислотного, органического, минерального состава пробы и конструктивных особенностей прибора.

Обработку полученного аналитического сигнала для кадмия, свинца и мышьяка осуществляют по площади пика.

Параметры определения тяжелых металлов и мышьяка со стадиями высушивания, озоления (пиролиза), атомизации и отжига (очистки) исследуемых проб отрабатываются для конкретных приборов в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

Таблица 3 - Ориентировочные параметры определения тяжелых металлов и мышьяка методом атомно-абсорбционной спектроскопии (электротермический вариант)

Металл	Длина волны, нм	Ширина щели, нм	Стадия озоления (пиролиза)		Стадия атомизации		
			T, °C	t _{сек} , с	T, °C	t _{сек} , с	t _{инт} , с
Кадмий	228,8	0,20-0,5	300-600	8-25	1300-1700	3-5	3-5
Свинец	283,3	0,20-0,5	500-800	8-25	1600-2000	3-5	3-5
Мышьяк*	193,7	0,20-0,5	800-1400	8-15	2200-2600	3-5	3-5

Примечание: $T, ^\circ\text{C}$ - температура озоления, атомизации; $t_{\text{сек}}$, с - время озоления, атомизации; $t_{\text{инт}}$, с - время интегрирования;

* при использовании корректора Зеемана

Для уменьшения влияния минерального состава лекарственного растительного сырья или препарата на исследуемые элементы используют:

1. Кювету с пластиной (платформой).
2. Модификаторы матрицы.
3. Разбавление анализируемого раствора.

Подготовку атомно-абсорбционного спектрометра к работе осуществляют в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора с учетом особенности измерения низких концентраций элементов.

Результатом измерений является величина атомного поглощения элемента, полученная в абсорбционном режиме с доверительной вероятностью $P = 0,95$.

Обработка результатов измерений и определение соответствия тяжелых металлов в сырье допустимым нормам

Обработку результатов проводят с использованием компьютерных программ. При ручной обработке данных строят график зависимости абсорбции от концентрации. Допускается применять линейную, кусочно-линейную или сглаженную нелинейную аппроксимацию градуировочной функции с коэффициентом корреляции не менее 0,990. В расчетах используют среднее арифметическое значение 3 параллельных измерений.

Результаты определения содержания тяжелых металлов в испытуемом образце (С) следует считать как среднее арифметическое 3 параллельных определений с точностью до 0,001 мкг.

Содержание металла в испытуемом лекарственном растительном сырье/препарате (X) в мкг/г вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C_x \cdot V}{a} - C_k \cdot V_k$$

где C_x - концентрация металла в испытуемом растворе, мкг/мл;

V - разведение, мл;

C_k - концентрация металла в контрольном опыте, мкг/мл;

V_k - объем контрольной пробы, мл;

a - навеска сырья/препарата, г.

Методики определения тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах должны быть валидированы. Выбор методики измерения аналитического сигнала (по градуировочной кривой или методом "стандартных добавок") для конкретных объектов исследования определяется в ходе валидации методики.

Альтернативные способы пробоподготовки и проведения результатов измерений

При проведении определения содержания тяжелых металлов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах методами атомно-абсорбционной спектрометрии; атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой; масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой; рентгенофлуоресцентной спектрометрии могут быть использованы способы пробоподготовки и проведения результатов измерений, приведенные ниже.

Метод 1 (сухая минерализация)

Метод соответствует [методу 1б](#) ("сухая" минерализация, Pb, Cd), приведенному в разделе "Подготовка проб к анализу" для атомно-адсорбционной спектрометрии.

Метод 2 (мокрая минерализация)

Метод соответствует [методу 2д](#) ("мокрая" минерализация, Pb, Cd, Hg, As), приведенному в разделе "Подготовка проб к анализу" для атомно-адсорбционной спектрометрии.

Проведение измерений

Определение содержания кадмия, ртути, мышьяка, свинца проводят методом калибровочной кривой. Для этого из стандартных образцов элементов с концентрацией 1000 мг/дм^3 готовят серию градуировочных растворов, содержащих заявленные элементы в концентрациях:

Градуировочный раствор	Концентрация, мг/дм^3
N 1	0,003
N 2	0,01
N 3	0,03
N 4	1,0
N 5	4,0
N 6	10

Приготовление градуировочных растворов

Для приготовления градуировочных растворов используют готовые растворы стандартных образцов (ГСО) состава ионов металлов отечественного или зарубежного производства (CRM) с концентрацией элементов 1000 мг/дм^3 в азотной или хлористоводородной кислоте с массовой долей кислоты не менее 1%.

Измерения для каждого градуировочного раствора выполняют не менее 5 раз. С помощью программы обработки данных полученные результаты для каждого градуировочного раствора усредняют и строят линейную градуировочную характеристику (калибровочную кривую) зависимости выходного сигнала от концентрации определяемых элементов в градуировочном растворе (мг/дм^3) .

Градуировочная характеристика должна быть линейной во всем диапазоне измеряемых концентраций с коэффициентом корреляции не менее 0,990, который определяется автоматически, без вмешательства оператора.

По значению выходного сигнала испытуемого раствора с использованием градуировочной характеристики и программы обработки данных находят концентрацию определяемых элементов в анализируемом растворе (мг/дм^3) .

За результат измерений принимают среднее арифметическое 3 параллельных определений одной пробы.

Предельно допустимое содержание тяжелых металлов не должно превышать значений, приведенных в табл. 4.

Таблица 4 - Предельно допустимое содержание тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах

Металл	Предельно допустимое содержание, мг/кг
Свинец	6,0
Кадмий	1,0
Ртуть	0,1
Мышьяк	0,5

Примечание - В соответствии с требованиями безопасности, принятыми в Российской Федерации.