

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСЕЙ В МЕДИКАМЕНТАХ НА МАСС-СПЕКТРОМЕТРЕ С ИСП THERMO SCIENTIFIC iCAP Qc

Д.Виллс, Д.Катчер, Г.Лекорне, Thermo Fisher Scientific

Статья посвящена проверке соответствия характеристик масс-спектрометра с индуктивно связанной плазмой Thermo Scientific iCAP Qc требованиям фармакопеи США (USP) по определению примесей микроэлементов в лекарственных препаратах. Все манипуляции по подготовке образцов к анализу и расчету результатов измерений, представленные в статье, соответствуют требованиям и указаниям соответствующих глав: 232 "Примеси элементов - пределы" и 233 "Примеси элементов - процедуры", опубликованных в феврале 2013 года.

"Фармакопея США - Национальный формуляр" (USP-NF) - наиболее полный в мире сборник стандартов, регламентирующих качество субстанций рецептурных и безрецептурных лекарственных средств, готовых лекарственных форм, вспомогательных веществ, биологически активных пищевых добавок, растительных лекарственных препаратов, витаминов, минеральных веществ, медицинских устройств и товаров медицинского назначения. USP-NF издается с 1820 года и наряду с европейской, британской и японской фармакопеями относится к основным фармакопеям мира. Разработчик сборника стандартов USP-NF - Фармакопейная конвенция США, независимая некоммерческая общественная научная организация. Стандарты фармакопеи США признаны и используются более чем в 130 странах мира и на протяжении более чем 185 лет способствуют качественному лекарственному обеспечению населения всего мира. USP создает и постоянно пересматривает USP-NF-стандарты благодаря тесному сотрудничеству государственных и частных предприятий, в котором участвуют ученые из многих стран.

Информация о содержании примесей в лекарственных препаратах чрезвычайно важна не только из-за токсичности некоторых элементов для человека. Ряд примесей может оказать негативное действие на стабильность препарата, уменьшая его срок годности. Поэтому необходимо контролировать содержание органических и неорганических примесей в процессе производства лекарственных препаратов, начиная с исходных компонентов и заканчивая конечным продуктом. Глава 231 USP, принятая в 1905 году, предусматривает колориметрические реакции, включая сосаждение десяти сульфидобразующих элементов и визуальное цветовое сравнение со стандартом, содержащим 10 ppm свинца. Основные ограничения такого метода - низкая специфичность и невозможность получения информации о содержании отдельных элементов в образце. В феврале 2013 года были опубликованы две новые главы фармакопеи взамен устаревшей:

- глава 232 "Примеси элементов - Пределы". Глава определяет максимально допустимое

содержание пятнадцати элементов в лекарственных препаратах;

- глава 233 Примеси элементов – Процедуры. Глава описывает процедуры определения элементов.

Обязательное исполнение требований новых глав вступает в силу в мае 2014 года, а глава 231 утрачивает свою актуальность. Все методы определения примесей должны иметь пределы обнаружения, указанные в главе 232, с использованием методов, приведенных в главе 233.

В дополнение к требованиям, приведенным в документах USP, любая система, используемая при анализе лекарственных препаратов, должна соответствовать требованиям свода федеральных нормативных актов (21, часть 11) Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) в части электронных записей и проверки подлинности электронных подписей. Эти требования учитывают соблюдение целостности и подлинности любых электронных записей и электронных подписей, которые создаются и изменяются персоналом. Программное обеспечение приборов для контроля производства лекарственных средств должно включать инструменты по сохранению целостности аналитического метода и получаемых результатов. Прозрачность процедуры получения результатов требует от программного обеспечения функции отслеживания изменений и внедрения электронных подписей, при этом внесение изменений невозможно без регистрации сопутствующей информации о том, какие изменения были внесены, кем они были внесены и с какой целью.

В работе описано эффективное использование квадрупольного масс-спектрометра с индуктивно связанной плазмой Thermo Scientific iCAP Qc для количественного определения четырнадцати элементов, приведенных в главе 232 USP, в соответствии с процедурой анализа методом ИСП-МС согласно главе 233. Управление спектрометром, сбор данных и расчет результатов измерений проводили с помощью программного обеспечения Qtegra, отвечающего всем требованиям защиты информации.

Пробоподготовка. Проведенные ранее исследования показали, что прямое разбавление в водной среде подходит для дальнейшего анализа методом ИСП-МС в соответствии с требованиями главы 233. Однако, наиболее универсальный способ подготовки образцов для дальнейшего анализа методом ИСП-МС – это микроволновое разложение в закрытых автоклавах. Важное преимущество разложе-

ния в закрытой системе – отсутствие потерь летучих элементов, в особенности ртути.

Исследованы три лекарственных препарата: А – лекарство растительного происхождения; Б – сердечно-сосудистое средство; В – успокаивающее. Все три медикамента были переведены в раствор путем микроволнового разложения в закрытых сосудах. Навески по 0,5 г помещали в автоклавы, затем в автоклавы с препаратами А и Б добавляли 3 мл HNO_3 , а в автоклавы с препаратом В – 2 мл HNO_3 и 1 мл H_2SO_4 . Согласно требованиям главы 233, каждый образец готовили в шести повторях. Пробирки помещали в систему микроволновой пробоподготовки и подвергали разложению в атмосфере азота при давлении 40 бар и температуре 200°C в два этапа: на первом этапе 10 мин, а затем при тех же условиях – 15 мин. Высокое давление дает возможность снизить температуру и уменьшить потери летучих элементов.

После охлаждения прозрачный бесцветный раствор переносили в полипропиленовые пробирки с градуировкой и разбавляли особо чистой водой до объема 50 мл. Каждый раствор дополнительно разбавляли в пять раз 1,2 %-й HNO_3 с добавлением 0,5% HCl и 200 мкг/л золота. Таким образом, коэффициент разбавления исходного образца составлял 500. Состав, выбранный в качестве разбавителя, обеспечивает стабильность исследуемых элементов в растворе и эффективную отмывку системы ввода спектрометра при смене образцов. Анализ образцов проводили по методу внешней калибровки по стандартам, приготовленным на фоне того же разбавителя, который использовался для приготовления анализируемых образцов. В измерениях использовали метод внутреннего стандарта по Ga, In и Tl. Концентрация элементов, используемых в качестве внутренних стандартов, составляла 5, 10 и 10 мкг/л соответственно. Внутренний стандарт добавляли в анализируемый раствор непосредственно в процессе измерения через Т-образное соединение.

Подготовка калибровочных стандартов. Измерения образцов проводили в соответствии с требованиями главы 233, согласно которым определяемые элементы должны содержаться в калибровочных растворах в концентрациях 0,5J и 2,0J, где J – концентрация элемента, соответствующая целевому показателю содержания (ЦПС) элемента в образце, разбавленная с учетом рабочего диапазона спектрометра. ЦПС элементов, подлежащих контролю в соответствии с главой 232, были рассчитаны путем деления допустимой суточной дозы (ДСД) элемента

Таблица 1. Показатели содержания элементов в лекарственных препаратах в соответствии с требованиями USP

Элемент	ДСД ¹ , мкг/сутки	ЦПС, J, мкг/г
Cd	25	2,5
Pb	5	0,5
As	1,5	0,15
Hg	15	1,5
Ir	100	10
Os	100	10
Pd	100	10
Pt	100	10
Rh	100	10
Ru	100	10
Mo	100	10
Ni	500	50
V	100	10
Cu	1000	100

¹ ДСД рассчитывали на среднюю массу 50 кг.

на величину максимальной суточной дозы препарата (табл.1). Для трех исследуемых препаратов максимальная суточная доза составила 10 г.

С учетом ЦПС и коэффициента разбавления исходных образцов готовили два многоэлементных калибровочных раствора в 2%-й HNO₃. Концентрации элементов приведены в табл.2

Конфигурация спектрометра. Для измерений использовали масс-спектрометр с индуктивно связанной плазмой Thermo Scientific iCAP Qc с никелевыми пробоотборным конусом и скиммером, охлаждаемой кварцевой циклонной распылительной камерой, фторопластовым концентрическим распылителем (0,4 мл/мин) и разборной горелкой с инжектором 2,5 мм. Все измерения проводили с включенной реакционно-столкновительной ячейкой с использованием чистого гелия в режиме дискриминации по кинетическим энергиям. Расход гелия составлял 4,2 мл/мин; высота потенциального барьера – 3 эВ.

Калибровочные графики. Для всех определяемых элементов получены калибровочные графики с учетом значений эквивалентных фоновых концентраций (ФК) менее 1 ppb. На рис.1 приведены калибровочные зависимости для наиболее токсич-

Таблица 2. Концентрации элементов в калибровочных растворах в соответствии со значениями ЦПС элементов

Элемент	0,5J, мкг/л	2,0J, мкг/л
Cd	2,5	10
Pb	0,5	2
As	0,15	0,6
Hg	1,5	6
Ir	10	40
Os	10	40
Pd	10	40
Pt	10	40
Rh	10	40
Ru	10	40
Mo	10	40
Ni	50	200
V	10	40
Cu	100	400

Таблица 3. Инструментальные пределы обнаружения (ПО) и параметры калибровочной зависимости спектрометра по определяемым элементам

Элемент	Масса измеряемого изотопа, а.е.м.	ПО, нг/г	ФК, нг/г	R
V	51	0,0035	0,0629	0,99999
Ni	60	0,0012	0,0163	1,00000
Cu	63	0,0049	0,0910	0,99999
As	75	0,0009	0,0087	1,00000
Mo	95	0,0026	0,0013	0,99953
Ru	101	0,0003	0,00005	0,99981
Rh	103	0,0001	0,00005	0,99944
Pd	105	0,0036	0,0351	0,99991
Cd	111	0,0001	0,00009	0,99963
Os	189	0,0007	0,0003	0,99996
Ir	193	0,0005	0,0045	0,99997
Pt	195	0,0001	0,0002	1,00000
Hg	202	0,0099	0,0290	1,00000
Pb	208	0,0009	0,0035	0,99999

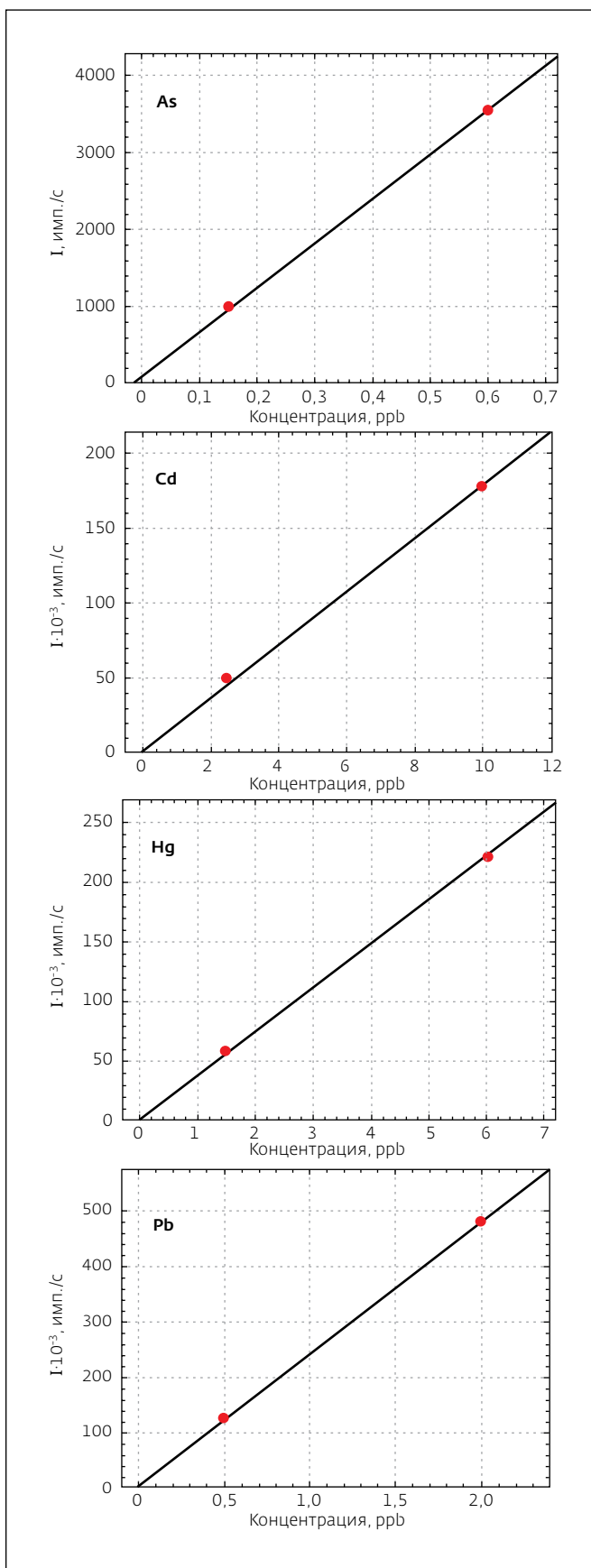


Рис.1. Калибровочные графики для некоторых элементов

ных элементов – As, Cd, Hg, Pb, а в табл.3 – инструментальные пределы обнаружения и калибровочные коэффициенты для определяемых элементов.

Как видно из таблицы, все элементы имеют низкие пределы обнаружения, составляющие единицы нг/г. Низкие значения ПО и эквивалентных фоновых концентраций (ФК) (см. также рис.1) свидетельствуют об исключительной чувствительности спектрометра в режиме работы с реакционно-столкновительной ячейкой наряду с эффективным подавлением полиатомных интерференций в режиме дискриминации по кинетическим энергиям.

Пределы обнаружения метода. В то время как инструментальные ПО определяются возможностями спектрометра, пределы обнаружения метода являются показателем минимально детектируемой концентрации аналитов, которые можно достичь при анализе с учетом процедуры пробоподготовки и сопутствующего этой процедуре загрязнения образцов. Пределы обнаружения метода рассчитывали как трехкратное СКО трех результатов измерения трех различных контрольных образцов, измеренных за три дня. Полученные значения пределов обнаружения метода по сравнению с ЦПС элементов приведены в табл.4.

Таблица 4. Сравнение достигнутых ПО с требуемыми ЦПС элементов.

Элемент	ПО, мкг/г	J, мкг/г	Фактор
V	0,014	10	722
Ni	0,100	50	498
Cu	0,186	100	538
As	0,0005	0,15	325
Mo	0,027	10	365
Ru	0,025	10	403
Rh	0,026	10	386
Pd	0,044	10	227
Cd	0,006	2,5	407
Os	0,043	10	232
Ir	0,023	10	443
Pt	0,024	10	412
Hg	0,018	1,5	83
Pb	0,009	0,5	54

Таблица 5. Содержание элементов в исследованных образцах и пределы обнаружения метода в сравнении с ЦПС

Элемент	Содержание в образце, мкг/г			ПО, мкг/г	J, мкг/г
	Препарат А	Препарат Б	Препарат В		
Cd	<ПО	<ПО	<ПО	0,006	2,5
Pb	0,134	0,171	0,017	0,009	0,5
As	0,056	0,091	0,065	0,001	0,15
Hg	0,032	<ПО	<ПО	0,018	1,5
Ir	<ПО	<ПО	<ПО	0,023	10
Os	<ПО	0,107	0,161	0,043	10
Pd	0,073	<ПО	<ПО	0,044	10
Pt	<ПО	<ПО	<ПО	0,024	10
Rh	<ПО	<ПО	<ПО	0,026	10
Ru	<ПО	<ПО	<ПО	0,025	10
Mo	0,121	0,647	0,073	0,027	10
Ni	0,780	1,92	12,8	0,100	50
V	0,224	0,402	0,509	0,014	10
Cu	29,2	5,53	0,965	0,186	100

Измеренные содержания элементов в образцах лекарственных препаратов приведены в табл.5. Для наглядности в таблице приведены пределы обнаружения метода (ПО) и ЦПС элементов.

Дрейф сигнала. Согласно требованиям главы 233, проведено сравнение результатов анализа одного из калибровочных растворов, полученных до и после измерения образцов лекарственных препаратов. Цель сравнения – проверка стабильности калибровочной зависимости в процессе измерений. Результат проверки признается положительным, если относительное отклонение результатов измерения калибровочного раствора, полученных до и после измерения образцов, не превышает 20%. Результаты измерений приведены в табл.6, величина отклонения результатов не превышает 4% за длительный период измерения образцов.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ

По требованиям USP методика определения микропримесей в лекарственных препаратах должна пройти ряд проверок на применимость (валидацию) перед началом использования. Для валидации спектрометра iCAP Qc были определены аналитические характеристики методики, такие как точность и воспроизводимость.

Таблица 6. Сравнение результатов измерений концентрации элементов в калибровочном растворе 2,0J, полученных до и после измерения образцов

Элемент	2,0J, мкг/л		Дрейф, %
	До измерения образцов	После измерения образцов	
Cd	9,79	10,0	3
Pb	1,97	1,97	0,1
As	0,60	0,60	1
Hg	5,97	6,02	1
Ir	39,9	40,0	0,3
Os	41,6	42,5	2
Pd	39,9	40,3	1
Pt	39,7	40,4	2
Rh	39,5	40,0	1
Ru	39,5	40,8	3
Mo	39,2	40,7	4
Ni	198	205	3
V	39,8	40,4	2
Cu	397	403	2

Таблица 7. Повторяемость шести независимых измерений с добавкой определяемых элементов в концентрации 1,0J

Элемент	Препарат А		Препарат Б		Препарат В	
	Среднее, мкг/л	ОСО, %	Среднее, мкг/л	ОСО, %	Среднее, мкг/л	ОСО, %
Cd	4,93	1,1	5,02	1,2	4,98	0,5
Pb	1,25	1,5	1,33	0,9	1,01	1,2
As	0,40	1,1	0,47	2,9	0,48	1,4
Hg	2,94	1,1	2,95	0,6	2,76	1,1
Ir	20,1	0,8	20,4	1,2	20,4	1,4
Os	22,7	0,9	23,4	1,2	23,6	1,5
Pd	19,6	0,9	19,6	0,8	19,8	1,7
Pt	18,9	1,6	19,5	0,9	19,5	1,2
Rh	20,2	1,2	20,2	1,0	20,8	1,2
Ru	20,0	0,9	20,1	0,5	19,9	0,9
Mo	22,0	1,2	23,3	0,6	22,8	1,0
Ni	99,0	1,2	98,5	1,0	124	1,8
V	21,3	0,7	21,5	1,0	23	1,6
Cu	251	1,2	198	0,6	196	1,8

Точность. Для проверки точности провели анализ образцов с добавками определяемых элементов с концентрациями 0,5J и 1,5J. Результаты анализов приведены на рис.2а и 2б. Требования главы 233 указывают, что отклик добавки должен находиться в пределах 70–150%

для среднего значения результатов трех повторов. Из рис.2а и 2б видно, что этот критерий выполняется при анализе методом ИСП-МС с использованием масс-спектрометра iCAP Qc с величинами отклика в интервале от 92 до 128% для обеих концентраций примесей.

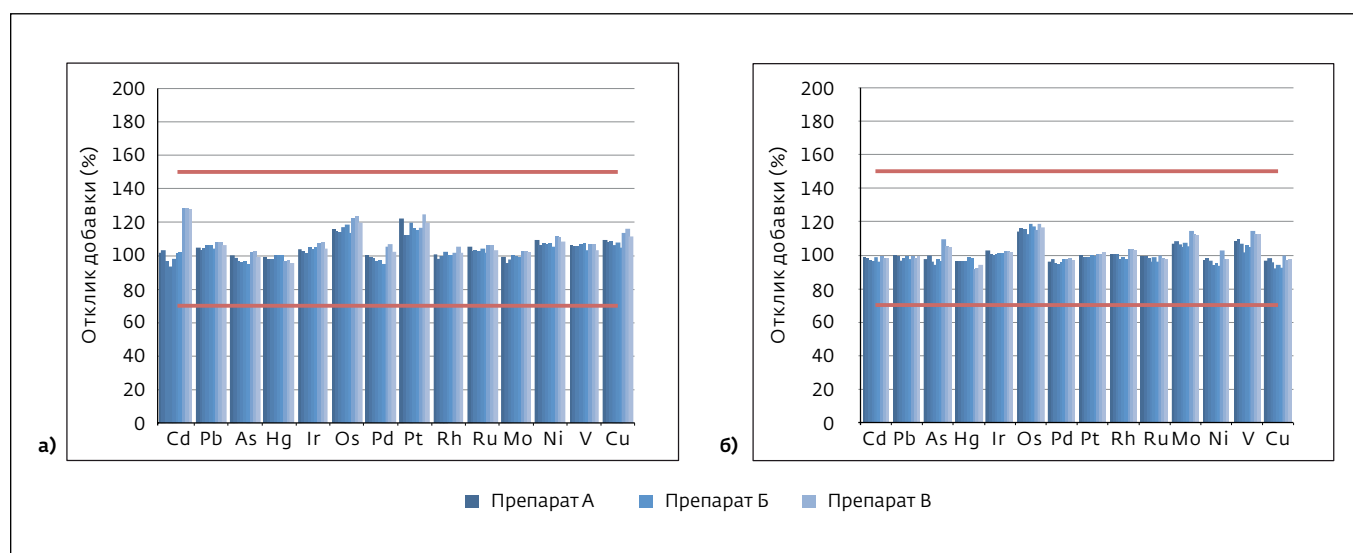


Рис.2. Отклик добавки определяемых элементов на уровне 0,5J (а) и 1,5J (б) в исследуемых препаратах А, Б и В, по три образца каждого. Красными линиями выделен допустимый интервал отклика

Таблица 8. Воспроизводимость в течение трех дней шести независимых измерений с добавкой определяемых элементов в концентрации 1,0J

Элемент	Препарат А		Препарат Б		Препарат В	
	Среднее, мкг/л	ОСО, %	Среднее, мкг/л	ОСО, %	Среднее, мкг/л	ОСО, %
Cd	2,44	0,6	2,46	0,5	2,43	1,3
Pb	0,61	1,2	0,65	1,2	0,49	1,7
As	0,20	1,0	0,23	0,9	0,24	0,9
Hg	1,45	0,6	1,44	0,9	1,36	1,0
Ir	10,0	0,8	10,1	0,9	10,1	1,5
Os	10,4	5,6	10,6	6,0	10,8	6,0
Pd	9,66	0,6	9,61	0,6	9,69	1,2
Pt	9,53	0,6	9,69	0,5	9,73	1,5
Rh	10,0	0,7	9,9	0,7	10,2	1,4
Ru	9,92	0,5	9,88	0,6	9,75	1,1
Mo	10,7	1,2	11,3	1,3	11,0	2,3
Ni	48,1	1,7	47,8	1,3	60,1	1,8
V	10,1	3,7	10,1	3,5	10,7	4,2
Cu	122	1,8	95,9	1,4	94,7	2,0

Повторяемость методики с использованием спектрометра iCAP Qc оценивали путем измерения шести независимых аликвот каждого из трех рассматриваемых препаратов с добавками определяемых элементов на уровне 1,0J. Результаты измерений и их статистической обработки приведены в табл.7.

В соответствии с требованиями главы 233, ОСО результатов измерений, полученных таким образом, не должны превышать 20%. Как следует из табл.8, значения ОСО результатов по процедуре проверки повторяемости не превышают 3%.

Воспроизводимость результатов измерений на масс-спектрометре iCAP Q оценивали путем измерения шести независимых аликвот трех исследованных препаратов с добавками определяемых элементов в количестве 1,0J в течение трех дней. Средние значения и ОСО результатов приведены в табл.8. В соответствии с главой 233, ОСО результатов, полученных таким способом, не должны превышать 25%. Как следует из таблицы, полученные ОСО в среднем составляют 1,6-2%. Отметим отличную стабильность измеренных концентраций ртути с ОСО меньше одного процента за три дня.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе показана применимость масс-спектрометра с индуктивно связанной плазмой Thermo Scientific iCAP Qc для определения микропримесей элементов в лекарственных препаратах. Использование спектрометра iCAP Qc позволяет получить пределы обнаружения элементов в 50 раз ниже значений, приведенных в требованиях главы 232 американской фармакопеи. Таким образом, спектрометр идеально подходит для количественного определения микропримесей элементов в соответствии с требованиями американской фармакопеи и не утратит своей актуальности при ужесточении этих требований в будущем. Программное обеспечение Qtegra, посредством которого производятся управление спектрометром, измерения и расчет результатов, предоставляет ряд функций защиты данных и отслеживания изменений, которые жестко регламентируются требованиями, действующими в фармацевтической индустрии США.

Перевод с английского А.Лейкин,
Московское представительство Intertech Corporation
ayl@intertech-corp.ru