

УДК 543.423.1

**ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ПРОБОПОДГОТОВКИ  
ПРИ КОЛИЧЕСТВЕННОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В  
ЦВЕТКАХ РОМАШКИ АПТЕЧНОЙ  
(MATRICARIA CHAMOMILLA) МЕТОДОМ ИСП-АЭС**

**Щукин В.М., Северинова Е.Ю., Кузьмина Н.Е., Яшкир В.А., Меркулов В.А.**  
*ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России,  
Москва, e-mail: Schukin@expmed.ru*

В работе описана процедура валидации методики микроволновой кислотной минерализации цветков ромашки аптечной. Данная методика пробоподготовки обеспечивает максимальный переход тяжелых металлов в раствор при неполном разложении органической матрицы с помощью концентрированной азотной кислоты. Детектирование и количественное определение тяжелых металлов осуществляли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой ИСП-АЭС. На основании полученных экспериментальных данных была проведена оценка линейности, предела количественного определения, правильности, сходимости и внутривлабораторной прецизионности валидируемой методики. На основе измеренных коэффициентов извлечения мышьяка, свинца, ртути и кадмия были рассчитаны стандартные отклонения, коэффициенты вариации, доверительные интервалы, систематические погрешности, F-критерии Фишера и t-критерии Стьюдента. Показано, что полученные статистические характеристики удовлетворяют критериям приемлемости валидационных параметров, представленным в отечественной и зарубежной нормативной документации.

**Ключевые слова:** ромашка аптечная, метод атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой, микроволновая минерализация, тяжелые металлы, валидация аналитической методики, линейность, правильность, сходимость, прецизионность, предел количественного определения

**SAMPLING PROCEDURES VALIDATION FOR THE QUANTITATIVE  
DETERMINATION OF HEAVY METALS IN THE FLOWERS  
OF CHAMOMILE (MATRICARIA CHAMOMILLA) BY ICP-AES**

**Schukin V.M., Severinova E.Yu., Kuzmina N.E., Yashkir V.A., Merkulov V.A.**  
*Federal State Budgetary Institution «Scientific Center for Expertise of Medical Application Products»  
of the Ministry of Health of the Russia, Moscow, e-mail: Schukin@expmed.ru*

The paper describes the validation of chamomile flowers acid microwave mineralization procedure. This procedure provides for the maximum transfer of heavy metals in solution under incomplete decomposition of the organic matrix with concentrated nitric acid. Detection and quantification of heavy metals were performed with inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES). Linearity, quantitation limit, accuracy, trueness, repeatability and intermediate precision validation techniques were evaluated on the basis of experimental data. Standard deviations, variation coefficients, confidence intervals, systematic errors, F-Fisher criteria and Student's t-criteria were calculated, based on the measured extraction factors of arsenic, lead, mercury and cadmium. It is shown that the obtained statistical characteristics satisfy the eligibility criteria for validation parameters, presented in the national and foreign normative documents.

**Keywords:** *matricaria chamomilla, ICP-AES, microwave mineralization, heavy metals, sampling procedures validation, linearity, accuracy, trueness, repeatability, precision, quantitation limit*

В настоящее время в России вступила в действие фармакопея XIII, которая предусматривает селективное определение содержания тяжелых металлов в лекарственном растительном сырье (ЛРС) одним из современных инструментальных методов: атомно-абсорбционной спектроскопией, атомно-эмиссионной спектроскопией с индуктивно связанной плазмой (ИСП-АЭС) или масс-спектрометрией с индуктивно связанной плазмой [6]. Эти методы характеризуются общим этапом подготовки, предусматривающим перевод образца в раствор с помощью различных смесей на основе концентрированной азотной кислоты и других сильнодействующих реагентов. Выбор методики пробоподготовки во многом зависит от определяемого элемента и его кон-

центрации, а также от природы органической матрицы ЛРС. Нами была разработана методика микроволновой минерализации цветков ромашки, которая характеризуется большей простотой и безопасностью по сравнению с методиками пробоподготовки, используемыми в элементном анализе [7]. По степени извлечения тяжелых металлов из растительного сырья в раствор она сопоставима с методикой EPA [10]. Цель данной работы – валидация разработанной методики пробоподготовки с целью ее применения в фармакопейном анализе при контроле качества цветков ромашки аптечной по показателю «содержание тяжелых металлов». Детектирование и количественное определение тяжелых металлов осуществляли методом ИСП-АЭС.

### Материалы и методы исследования

Валидацию методики проводили на цветках ромашки аптечной, в которые предварительно (за 1 месяц до минерализации пробы) добавляли известные количества стандартных образцов (СО) определяемых элементов производства фирмы Merck (CRM) с аттестованным значением СО 1000 мг/дм<sup>3</sup> (валидационные образцы). Для каждого уровня концентраций определяемых элементов готовили 3 параллельных пробы. Цветки ромашки без добавления СО тяжелых металлов использовали для приготовления холостого раствора. Минерализацию проб проводили концентрированной азотной кислотой аналитической степени чистоты (For Trace Metal Analysis), производства Acros Organics с помощью микроволновой системы Anton Paar Multiwave 3000. Содержание тяжелых металлов измеряли на атомно-эмиссионном спектрометре с индуктивно связанной плазмой Optima 8300 DV фирмы Perkin Elmer. Деионизованную воду, используемую при приготовлении испытуемых и стандартных растворов, получали на установке Milli-Q – Integral 3 фирмы Millipore, Франция.

#### Валидируемая методика

1,0 г (точная навеска) образца цветков ромашки, высушенных до постоянной массы при 105 °С в течение двух часов, растертых в однородный порошок и просеянных через сито с диаметром отверстий 1 мм, помещали в сосуд для микроволнового разложения и добавляли 8 см<sup>3</sup> концентрированной азотной кислоты. При минерализации пробы использовали следующий временно-температурный режим: 0–80° (3 мин) → 80° (2 мин) → 80–165° (10 мин) → 165° (30 мин). Полученные после микроволнового разложения растворы охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через фильтр «синяя лента» в мерные колбы объемом 25 см<sup>3</sup> и доводили до метки деионизованной водой. Измерение содержания определяемых элементов проводили методом стандартных добавок, путем сравнения эмиссии испытуемого раствора и эмиссии растворов с добавками элементов известной концентрации. Характеристические длины волн эмиссии ( $\lambda$ ) по выбранным элементам представлены в табл. 1. В случае As и Cd за результат принимали среднее значение концентраций, полученных по результатам двух длин волн. Статистические характеристики валидационных параметров рассчитывали, используя программное обеспечение MS Excel 2007.

### Результаты исследования и их обсуждение

Валидацию методики пробоподготовки при количественном определении тяжелых

металлов в цветках ромашки аптечной проводили согласно требованиям к валидации методик анализа [1, 5, 8]. В круг определяемых тяжелых металлов включили мышьяк, свинец, ртуть и кадмий, содержание которых в ЛРС нормируется многими национальными и международными нормативными документами [3]. Была проведена оценка линейности, предела количественного определения, правильности и прецизионности валидируемой методики. Специфичность и диапазон применения валидируемой методики пробоподготовки не оценивали, так как эти параметры лимитируются выбранным методом детектирования (для ИСП-АЭС они представлены в нормативной и научной литературе [2, 4, 9]).

#### Линейность

При определении линейности изучали зависимость измеряемой на атомно-эмиссионном спектрометре с индуктивно связанной плазмой интенсивности эмиссии элементов от содержания этих элементов в валидируемых образцах. Для оценки линейности проводили анализ серии из семи образцов цветков ромашки с прибавлением стандартных растворов тяжелых металлов с концентрациями 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,4; 0,8 и 1 мг/л (в рамках валидированной методики они соответствуют концентрациям 0,25; 0,5; 1; 2; 10; 20; 25 мг/кг элемента в образце). На основании полученных данных, представленных в табл. 1, были рассчитаны коэффициенты регрессионной прямой вида

$$y = bx + a,$$

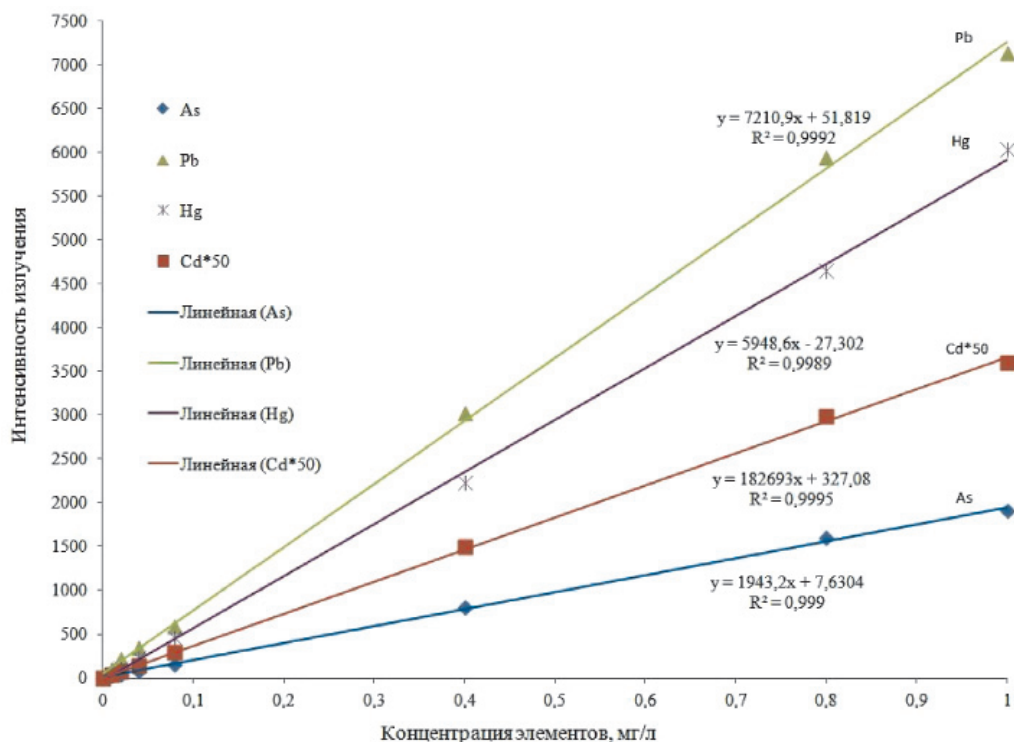
где  $y$  – среднее значение измеренной на атомно-эмиссионном спектрометре с индуктивно связанной плазмой интенсивности эмиссии определяемых элементов;  $x$  – значение содержания элемента в валидируемом образце.

Графики регрессионных прямых и статистические характеристики установленных линейных регрессий приведены на рисунке.

Таблица 1

Результаты оценки линейности валидируемой методики

Концентрация СО, мг/л	Средняя величина эмиссии			
	As (188,979 и 197,197 нм)	Cd (214,440 и 226,502 нм)	Pb (220,353 нм)	Hg (194,168 нм)
0,01	25,8	1847,7	108,1	–
0,02	39,3	3734,0	215,6	119,0
0,04	81,0	7333,4	349,6	231,3
0,08	158,7	14500,1	586,5	467,3
0,4	811,4	75110,9	3023,7	2229,7
0,8	1603,4	149206,3	5948,7	4643,1
1,0	1907,9	180213,9	7127,9	6038,1



Линейная зависимость интенсивности излучения (эмиссии) элементов от их концентрации в образце

В соответствии с требованиями [5] критерием приемлемости линейной зависимости является коэффициент корреляции  $r \geq 0,990$ . Из рисунка следует, что валидируемая методика характеризуется приемлемой линейностью по всем определяемым элементам.

#### Предел количественного определения (ПКО)

При проведении элементного анализа образцов ЛРС величины ПКО заметно возрастают из-за матричных эффектов, поэтому их необходимо оценивать в рамках конкретной методики. За ПКО принимали минимальную концентрацию элемента, для которой величина отношения сигнал/шум составила около 10:1 [1, 5, 8]. Значения ПКО As, Cd, Hg, Pb составляют 0,01; 0,001; 0,02; 0,01 мг/л соответственно.

#### Правильность

Для оценки правильности валидируемой методики использовали результаты, полученные в ходе установления линейности. Все данные были проверены на наличие выбросов по критерию Граббса. В соответствии с требованиями [1, 8] для всех образцов рассчитывали коэффициент извлечения – отно-

шение «найдено: введено»  $Z_i$  (табл. 2), стандартное отклонение, коэффициент вариации (или gsd), доверительный интервал и систематическую погрешность (табл. 3).

Правильность валидируемой методики оценивали по двум критериям приемлемости:

1) доверительный интервал должен включать 100% значение коэффициента извлечения [1];

2) систематическая погрешность не должна превышать свой доверительный интервал (критерий статистической незначимости) [8].

Как видно из данных табл. 3, оба требования для анализируемых элементов выполняются, следовательно, валидируемая методика характеризуется приемлемой правильностью.

#### Прецизионность

Прецизионность оценивали на уровнях сходимости и внутрिलाбораторной прецизионности по результатам трех определений для каждого из трех уровней концентраций элементов. Полученные в условиях сходимости и внутрिलाбораторной прецизионности результаты измерения отношения «найдено:внесено» ( $Z_i$ ) и их статистической обработки представлены в табл. 4 и 5 соответственно.

Таблица 2

Результаты оценки правильности валидируемой методики

№ п/п	Введено	Определяемый элемент							
		As		Cd		Pb		Hg	
		Найдено	Z, %	Найдено	Z, %	Найдено	Z, %	Найдено	Z, %
1	0,01	0,007	70,0	0,009	90,0	0,012	120,0	–	–
		0,013	130,0	0,010	100,0	0,011	110,0	–	–
		0,009	90,0	0,009	90,0	0,011	110,0	–	–
2	0,02	0,024	120,0	0,020	100,0	0,024	120,0	0,018	90,0
		0,020	100,0	0,021	105,0	0,022	110,0	0,016	80,0
		0,020	100,0	0,020	100,0	0,023	115,0	0,017	85,0
3	0,04	0,037	92,5	0,041	102,5	0,046	115,0	0,040	100,0
		0,042	105,0	0,040	100,0	0,047	117,5	0,037	92,5
		0,044	110,0	0,041	102,5	0,044	110,0	0,035	87,5
4	0,08	0,088	110,0	0,078	97,5	0,081	101,3	0,078	97,5
		0,084	105,0	0,080	100,0	0,085	106,3	0,079	98,8
		0,082	103,0	0,081	101,3	0,073	91,3	0,079	98,8
5	0,4	0,370	92,5	0,386	96,5	0,377	94,3	0,396	99,0
		0,354	88,5	0,399	99,8	0,375	93,8	0,378	94,5
		0,373	93,3	0,380	95,0	0,386	96,5	0,388	97,0
6	0,8	0,705	88,1	0,729	101,1	0,727	90,8	0,815	101,9
		0,734	91,8	0,790	98,8	0,793	99,1	0,816	102,0
		0,745	93,1	0,778	97,2	0,776	97,0	0,799	99,9
7	1,0	0,886	88,6	0,921	92,1	0,895	89,5	1,027	102,7
		0,897	89,7	0,938	103,8	0,942	94,2	1,041	104,1
		0,899	89,9	0,941	94,1	0,942	94,2	1,065	106,5

Таблица 3

Статистические характеристики правильности валидируемой методики

Статистическая характеристика	Определяемый элемент			
	As	Cd	Pb	Hg
Среднее значение Z, %	97,7	98,4	103,6	96,5
Систематическая погрешность $\delta = (Z - 100)$ , %	2,3	1,6	3,6	3,5
Стандартное отклонение, %	12,9	4,2	10,4	7,1
Коэффициент вариации, %	13,2	4,3	10,0	7,3
Доверительный интервал ( $P = 95\%$ ), %	$97,7 \pm 5,9$	$98,4 \pm 1,9$	$103,6 \pm 4,7$	$96,5 \pm 3,5$

Таблица 4

Результаты исследования сходимости и внутрилабораторной прецизионности методики

Внесено, мг/л			0,02			0,4			1,0		
Параллельные измерения			1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Оператор 1	As	найдено	0,024	0,020	0,021	0,370	0,354	0,373	0,886	0,897	0,899
		Z, %	120,0	100,0	105,0	92,5	88,5	93,3	88,6	89,7	89,9
	Cd	найдено	0,020	0,021	0,020	0,386	0,399	0,380	0,921	0,938	0,941
		Z, %	100,0	105,0	100,0	96,5	99,8	95,0	92,1	103,8	94,1
	Pb	найдено	0,024	0,022	0,023	0,377	0,375	0,386	0,895	0,942	0,942
		Z, %	120,0	110,0	115,0	94,3	93,8	96,5	89,5	94,2	94,2
	Hg	найдено	0,020	0,016	0,017	0,396	0,378	0,388	1,027	1,041	1,095
		Z, %	100,0	80,0	85,0	99,0	94,5	97,0	102,7	104,1	109,5

Окончание табл. 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Оператор 2	As	найдено	0,024	0,022	0,020	0,360	0,355	0,375	0,900	0,915	0,895
		Z <sub>p</sub> , %	120,0	110,0	100,0	90,0	88,8	93,8	90,0	91,5	89,5
	Cd	найдено	0,020	0,020	0,020	0,380	0,396	0,395	0,920	0,941	0,935
		Z <sub>p</sub> , %	100,0	100,0	100,0	95,0	99,0	98,8	92,0	94,1	93,5
	Pb	найдено	0,021	0,022	0,020	0,380	0,386	0,387	0,895	0,950	0,947
		Z <sub>p</sub> , %	105,0	110,0	100,0	95,0	96,5	96,8	89,5	95,0	94,7
	Hg	найдено	0,020	0,017	0,017	0,391	0,386	0,375	1,021	1,020	1,044
		Z <sub>p</sub> , %	100,0	85,0	85,0	97,8	96,5	93,8	102,1	102,0	104,4

Таблица 5

Статистические характеристики сходимости и внутрилабораторной прецизионности валидируемой методики

Показатель	Оператор 1				Оператор 2			
	As	Cd	Pb	Hg	As	Cd	Pb	Hg
Среднее Z <sub>p</sub> , %	96,4	98,5	100,8	96,9	97,1	96,9	98,1	96,3
Стандартное отклонение, %	10,5	4,4	11,1	9,3	11,0	3,2	6,1	7,2
Коэффициент вариации, %	10,9	4,4	11,0	9,6	11,3	3,3	6,3	7,4
Доверит. интервал (P = 95%), %	± 8,1	± 3,4	± 8,5	± 7,1	± 2,5	± 2,5	± 4,7	± 5,5
Объединенное среднее значение Z <sub>p</sub> , %	As 96,8		Cd 97,7		Pb 99,5		Hg 96,6	
Объединенное стандартное отклонение, % *	As 10,7		Cd 3,8		Pb 9,4		Hg 8,3	
Объединенный коэффициент вариации, %	As 11,1		Cd 3,9		Pb 9,4		Hg 8,6	
Объединенный доверительный интервал, %	As 7,6		Cd 2,7		Pb 7,4		Hg 5,9	
F-критерий Фишера	As F <sub>табл</sub> = 3,44; Pb F <sub>табл</sub> = 3,44;		F <sub>факт</sub> = 1,10 Cd F <sub>факт</sub> = 3,28 Hg F <sub>факт</sub> = 1,69		F <sub>табл</sub> = 3,44;		F <sub>факт</sub> = 1,83	
t-критерий Стьюдента	As t <sub>табл</sub> = 2,12; Pb t <sub>табл</sub> = 2,12;		t <sub>факт</sub> = 0,13 Hg t <sub>факт</sub> = 0,31		Cd t <sub>табл</sub> = 2,12;		t <sub>факт</sub> = 0,85	

Примечание. \*объединенные значения стандартного отклонения, коэффициента вариации и доверительного интервала с учетом данных двух операторов рассчитаны в соответствии с требованиями [8].

Статистические характеристики сходимости и внутрилабораторной прецизионности валидируемой методики представлены в табл. 5.

В случае оценки приемлемости внутрилабораторной прецизионности нормативные и методические документы в сфере GMP [1] рекомендуют рассчитывать статистические критерии Фишера (F) и Стьюдента (t) и сравнивать фактические значения t<sub>факт</sub> и F<sub>факт</sub> с табличными – максимальными значениями критериев под влиянием случайных факторов при текущих степенях свободы и при заданном уровне

значимости (t<sub>табл</sub> и F<sub>табл</sub>). Как следует из данных табл. 5, табличные значения F и t превосходят фактические значения для всех определяемых элементов, что свидетельствует о статистической незначимости различий между средними значениями и стандартными отклонениями результатов измерений двух операторов при уровне значимости 95%.

Таким образом, методика пробоподготовки при количественном определении тяжелых металлов в цветках ромашки аптечной методом ИСП-АЭС была оценена по основным валидационным параметрам,

что доказывает возможность ее применения в фармакопейном анализе при контроле качества цветков ромашки аптечной по показателю «содержание тяжелых металлов».

#### Список литературы

1. Береговых В.В. (ред.). Валидация аналитических методик для производителей лекарств // Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств. М.: Литерра, 2008. – С. 12–114.

2. Забокрицкий М.П., Сабуров В.В. Критерии выбора спектрального метода применительно к анализу микроэлементов в биологических объектах // Микроэлементы в медицине. – 2014. – Т. 15, № 4. – С. 29–38.

3. Кузьмина Н.Е., Шукин В.М., Северинова Е.Ю., Яшкир В.А., Меркулов В.А. Изменение подходов к нормированию содержания тяжелых металлов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах // Хим.-фарм. ж. – 2015. – Т. 49, № 7. – С. 52–56.

4. МУК 4.1.1.1482–03 от 29.06.2003 г. Методические указания. Определение содержания химических элементов в диагностируемых биосубстратах, поливитаминных препаратах с микроэлементами, в биологически активных добавках к пище и в сырье для их изготовления методом атомной эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной аргоновой плазмой. – URL: [http://](http://www.lawrussia.ru/texts/legal_490/doc490a997x620.htm)

[www.lawrussia.ru/texts/legal\\_490/doc490a997x620.htm](http://www.lawrussia.ru/texts/legal_490/doc490a997x620.htm) (дата обращения: 24.06.16).

5. ОФС 1.1.0012.15 Валидация аналитических методик // ГФ РФ XIII. – URL: <http://femb.ru/feml>. (дата обращения: 04.02.16).

6. ОФС 1.5.3.0009.15 Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах // ГФ РФ XIII. – URL: <http://femb.ru/feml>. (дата обращения: 04.02.16).

7. Шукин В.М., Северинова Е.Ю., Кузьмина Н.Е., Яшкир В.А., Меркулов В.А. Усовершенствование методики пробоподготовки при количественном определении тяжелых металлов в цветках ромашки аптечной (*matricaria chamomilla*) методом ИСП-АЭС // Успехи современного естествознания. – 2016. – № 6. – С. 53–58.

8. Юргель Н.В. (ред.). Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств (методические рекомендации). – М.: Спорт и культура – 2000, 2007. – С. 14–74.

9. NIST Atomic Spectra Database Lines Form. – URL: [http://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines\\_form.html](http://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines_form.html) (дата обращения: 04.08.16).

10. United States Environmental Protection Agency SW-846 Test Method 3052: Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. – URL: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3052.pdf> (дата обращения: 08.04.16).