

2.1.8.36. ИСПЫТАНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ НА ПРИСУТСТВИЕ АРИСТОЛОХИЕВЫХ КИСЛОТ

Аристолохиевые кислоты относятся к высокотоксичным веществам, обладающим канцерогенным действием. По возможности все манипуляции проводят в вытяжном шкафу. Вследствие электростатических свойств данных веществ в сухом виде и их склонности к распространению по всей рабочей поверхности, при работе с ними принимают особые меры предосторожности, например, используют закрытый бокс, оснащенный перчатками-манипуляторами.

Методики 1 и 2 предназначены для определения аристолохиевых кислот в лекарственном растительном сырье, которое по хемотаксономическими маркерам не должно содержать эти кислоты, но может быть фальсифицировано с использованием материала растительного происхождения, содержащего аристолохиевые кислоты. Методики 1 и 2 предназначены для скрининга лекарственного растительного сырья на присутствие аристолохиевых кислот в установленных пределах, как правило дополнительно проводят макроскопические и (или) микроскопические испытания с целью исключения наличия материала растительного происхождения, содержащего аристолохиевые кислоты.

Методика 3 используется для подтверждения присутствия аристолохиевой кислоты I в концентрации, равной или превышающей 2 ppm, в том числе в случае, если результаты хроматографического исследования указывают на присутствие аристолохиевой кислоты I.

Методики 1, 2 и 3 не предназначены для испытания лекарственного растительного сырья, в котором аристолохиевые кислоты образуются в качестве вторичных метаболитов. В этом случае необходимы иные валидированные методики.

МЕТОДИКА 1: ИСПЫТАНИЕ НА ПРИСУТСТВИЕ АРИСТОЛОХИЕВЫХ КИСЛОТ

Тонкослойная хроматография (2.1.2.26).

Смесь растворителей. Муравьиная кислота безводная P – вода P – метанол P (1:9:40 об/об/об).

Испытуемый раствор. К 1,0 г измельченного испытуемого образца (710) (2.1.9.30) прибавляют 10,0 мл смеси растворителей, обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин и центрифугируют.

Раствор сравнения (а). Количество СО ФЕАЭС аристолохии, соответствующее 0,10 мг аристолохиевой кислоты I, диспергируют в 20,0 мл смеси растворителей, обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин и центрифугируют.

Раствор сравнения (б). 1,0 мл раствора сравнения (а) доводят метанолом P до объема 25,0 мл.

Условия хроматографирования:

- ТСХ-пластинка со слоем силикагеля F₂₅₄ P (2–10 мкм);
- подвижная фаза: вода P – муравьиная кислота безводная P – этилацетат P – толуол P (3:3:30:60 об/об/об/об); используют верхний слой;
- наносимый объем пробы: 20 мкл в виде полос длиной 8 мм;
- пробег фронта подвижной фазы: более 6 см;
- высушивание: в потоке холодного воздуха в течение 5 мин;
- детектирование: опрыскивание раствором 100 г/л олова (II) хлорида P в хлороводородной кислоте разбавленной P до тех пор, пока пластинка не станет слегка влажной, нагревание при температуре 100 °C в течение 1 мин; просматривание в ультрафиолетовом свете при длине волны 365 нм.

Пригодность хроматографической системы:

– на хроматограмме раствора сравнения (а) между значениями $R_F=0,35$ и $R_F=0,55$, должны обнаруживаться две зеленовато-синих зоны, соответствующие аристолохиевым кислотам I и II, которые могут полностью не разделяться;

– на хроматограмме раствора сравнения (б) должна обнаруживаться, по крайней мере, одна из указанных зон, соответствующая концентрации 2 ppm аристолохиевой кислоты I.

Требование: на хроматограмме испытуемого раствора не должны обнаруживаться зоны, соответствующие по расположению и флуоресценции зонам аристолохиевых кислот на хроматограмме раствора сравнения (а).

Если на хроматограмме испытуемого раствора обнаруживаются зоны, соответствующие по расположению и флуоресценции любой из зон аристолохиевых кислот I и II на хроматограмме раствора сравнения (а), применяют методику 2.

МЕТОДИКА 2: ИСПЫТАНИЕ НА ПРЕДЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ АРИСТОЛОХИЕВОЙ КИСЛОТЫ I

Жидкостная хроматография (2.1.2.28).

Смесь растворителей. Ацетонитрил Р – вода Р (50:50 об/об).

Испытуемый раствор. 2,0 г измельченного испытуемого образца (710) (2.1.9.30) помещают во флакон вместимостью 250 мл из темного стекла с закручивающейся крышкой и прибавляют 100,0 мл смеси растворителей. Перемешивают в течение 30 мин со скоростью около 300 об/мин и фильтруют через мембранный фильтр с номинальным размером пор 0,45 мкм.

Раствор сравнения (а). Содержимое флакона с СО ФЕАЭС аристолохиевой кислоты I растворяют в смеси растворителей до получения раствора с концентрацией 0,04 мкг/мл.

Раствор сравнения (б). Содержимое флакона с СО ФЕАЭС аристолохиевой кислоты для пригодности системы (содержит аристолохиевые кислоты I и II) растворяют в смеси растворителей и доводят той же смесью растворителей до объема 20,0 мл.

Условия хроматографирования:

– колонка: длиной 0,15 м и внутренним диаметром 2,1 мм; заполненная силикагелем октадецилсилильным для хроматографии Р с размером частиц 3,5 мкм;

– температура колонки: 40 °С;

– подвижные фазы:

– подвижная фаза А: трифторуксусная кислота Р – вода Р (0,1:99,9 об/об);

– подвижная фаза Б: трифторуксусная кислота Р – ацетонитрил Р (0,1:99,9 об/об);

– режим градиентного элюирования:

Время (мин)	Подвижная фаза А (% об/об)	Подвижная фаза Б (% об/об)
0–25	85→35	15→65
25–30	35→0	65→100
30–31	0→85	100→15

– скорость подвижной фазы: 0,3 мл/мин;

– детектор: спектрофотометрический, длина волны 390 нм;

– объем вводимой пробы: по 25 мкл.

Пригодность хроматографической системы:

– разрешение: не менее 3,0 между пиками аристолохиевых кислот I и II на хроматограмме раствора сравнения (б);

– отношение «сигнал/шум»: не менее 10 для пика аристолохиевой кислоты I на хроматограмме раствора сравнения (а).

Пределы содержания примесей:

Требование: на хроматограмме испытуемого раствора не должны обнаруживаться пики, соответствующие по времени удерживания пику аристолохиевой кислоты I (2 ppm) на хроматограмме раствора сравнения (а).

МЕТОДИКА 3: ПОДТВЕРЖДАЮЩЕЕ ИСПЫТАНИЕ НА АРИСТОЛОХИЕВУЮ КИСЛОТУ I

Жидкостная хроматография (2.1.2.28) с использованием масс-спектрометрии (2.1.2.51).

Смесь растворителей. Ацетонитрил Р – вода Р (50:50 об/об).

Испытуемый раствор. 2,0 г измельченного испытуемого образца (710) (2.1.9.30) помещают во флакон вместимостью 250 мл из темного стекла с завинчивающейся крышкой и прибавляют 100,0 мл смеси растворителей. Обрабатывают ультразвуком в течение 30 мин и фильтруют через мембранный фильтр с номинальным размером пор 0,45 мкм.

Раствор сравнения (а). Содержимое контейнера с СО ФЕАЭС аристолохиевой кислоты I растворяют в смеси растворителей до получения раствора с концентрацией 0,04 мкг/мл.

Раствор сравнения (б). Готовят раствор с концентрацией 0,45 мкг на 10 мл испытуемого раствора как описано в сопроводительной документации, прилагаемой к СО ФЕАЭС аристолохиевой кислоты I.

Условия хроматографирования:

– колонка: длиной 0,15 м и внутренним диаметром 2,1 мм; заполненная силикагелем октадецилсилильным для хроматографии Р с размером частиц 3,5 мкм;

– температура: 40 °С;

– подвижные фазы:

– подвижная фаза А: муравьиная кислота безводная Р – раствор 1 г/л аммония ацетата Р в воде Р (0,1:99,9 об/об);

– подвижная фаза Б: муравьиная кислота безводная Р – раствор 1 г/л аммония ацетата Р в метаноле Р (0,1:99,9 об/об);

– режим градиентного элюирования:

Время (мин)	Подвижная фаза А (% об/об)	Подвижная фаза Б (% об/об)
0–15	70→0	30→100
15–16	0	100
16–17	0→70	100→30

– скорость подвижной фазы: 0,4 мл/мин;

– объем вводимой пробы: по 20 мкл; вводят раствор сравнения (а) дважды, испытуемый раствор дважды, раствор сравнения (а) дважды и затем раствор сравнения (б) дважды;

– детектор: масс-детектор как описано ниже (система А или система Б). Регулируют скорость подвижной фазы, температуру колонки и настройки детектора таким образом, чтобы выдерживались критерии пригодности хроматографической системы.

Система А.

Масс-спектрометр с ионной ловушкой и электрораспылительной ионизацией и анализатором MSⁿ режима.

Настраивают параметры масс-спектрометра для MS³-режима следующим образом:

Режим	Родительский ион (m/z)	Ширина выделения (m/z)	Относительная энергия столкновений (%)
MS ²	359 [M+NH ₄] ⁺	2,0	30
MS ³	298	2,0	35

- полный диапазон сканирования дочерних ионов: от m/z 80 до m/z 370;
- контролируемые дочерние ионы: m/z 252, m/z 268 и m/z 281.

Пригодность хроматографической системы:

– *отношение «сигнал/шум»*: не менее 100 для контролируемых дочерних ионов на хроматограмме раствора сравнения (а);

– *проверка влияния матрицы*: среднее значение двух величин отношений для раствора сравнения (б) должно находиться в интервале ± 40 % от среднего значения двух величин отношений для раствора сравнения (а); в противном случае необходимо изменить настройки детектора.

Требования: рассчитывают среднее значение величин отношений (252/268 и 281/268) относительной интенсивности для трех дочерних ионов аристолохиевой кислоты I в испытуемом растворе; рассчитывают среднее значение двух величин отношений сигналов при значении времени удерживания аристолохиевой кислоты I в растворе сравнения (а); если среднее значение двух величин отношений для испытуемого раствора находится в интервале ± 40 % от среднего значения двух величин отношений для раствора сравнения (а), то наличие аристолохиевой кислоты I в испытуемом растворе считается установленным.

Система Б.

Масс-спектрометр с тройным квадруполом и электрораспылительной ионизацией и анализатором MSⁿ режима.

Настраивают параметры масс-спектрометра для MS²-режима следующим образом:

- ион-предшественник: m/z 359 [M+NH₄]⁺;
- контролируемые дочерние ионы: m/z 265, m/z 281 и m/z 296.

Пригодность хроматографической системы:

– *отношение «сигнал/шум»*: не менее 100 для контролируемых дочерних ионов на хроматограмме раствора сравнения (а);

– *проверка влияния матрицы*: среднее значение двух величин отношений для раствора сравнения (б) должно находиться в интервале ± 40 % от среднего значения двух величин отношений для раствора сравнения (а); в противном случае необходимо изменить настройки детектора.

Требования: рассчитывают среднее значение величин отношений (265/281 и 296/281) относительной интенсивности для трех дочерних ионов аристолохиевой кислоты I в испытуемом растворе; рассчитывают среднее значение двух величин отношений сигналов при значении времени удерживания аристолохиевой кислоты I в растворе сравнения (а); если среднее значение двух величин отношений для испытуемого раствора находится в интервале ± 40 % от среднего значения двух величин отношений для раствора сравнения (а), то наличие аристолохиевой кислоты I в испытуемом растворе считается установленным.