

Ю. В. Олефир, Е. И. Саканян, Л. А. Ладыгина, В. М. Щукин

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПРОБОПОДГОТОВКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВИНЦА В САХАРАХ МЕТОДОМ АТОМНО-ЭМИССИОННОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ С ИНДУКТИВНО-СВЯЗАННОЙ ПЛАЗМОЙ (АЭС-ИСП)**

ФГБУ "Научный центр экспертизы средств медицинского применения" Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Россия, Москва, Петровский бульвар д. 8, стр. 2; e-mail: Liana\_alex@mail.ru

Подобрана и валидированна методика пробоподготовки определения свинца в сахарах методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой на примере глюкозы и сахарозы. Выбрана характеристическая длина волны, подобраны условия разложения сахаров. Осуществлена оценка пригодности с помощью процедуры валидации по показателям: специфичность; линейность; предел обнаружения и предел количественного определения; правильность; сходимость и внутрилабораторная прецизионность.

**Ключевые слова:** свинец; глюкоза; сахароза; метод атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой; валидация аналитических методик.

Для определения свинца в сахарах в соответствии с Европейской фармакопеей, статья "Свинец в сахарах" 2.4.10 [1], используют метод атомно-абсорбционной спектроскопии 2.2.23 [2], к недостаткам которого относятся многостадийный и времязатратный способ извлечения свинца экстракцией органическим растворителем, ведущий к увеличению погрешности методики; необходимость использования специальных приспособлений во избежание растворения соединительных трубок горелки; относительно низкая чувствительность.

Поэтому нами выполнены исследования по включению альтернативного метода — атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-АЭС) в ОФС "Определение свинца в глюкозе", позволяющие более оперативно и более точно проводить измерение содержания свинца в сахарах. Метод ИСП-АЭС характеризуется селективностью, универсальностью, высокой чувствительностью, хорошей воспроизводимостью [3].

*Экспериментальная часть*

В качестве объектов исследования были выбраны образцы субстанций декстрозы моногидрата (А) и сахарозы (Б).

Содержание свинца определяли на атомно-эмиссионном спектрометре с индуктивно связанной плазмой Optima 8300 DV фирмы Perkin Elmer (энергия плазмы 1500 Вт; расход плазмообразующего газа 15 л/мин; расход распылительного газа 0,5 л/мин; расход вспомогательного газа 0,2 л/мин; скорость потока образца 1,1 л/мин; направление регистрации сигнала — аксиальное; время интегрирования 5 с) с использованием стандартного образца свинца производства фирмы Merck (CRM) с аттестованным значением 1000 мг/дм<sup>3</sup>. Деионизованную воду, используемую при приготовлении испытуемых и стандартных растворов, получали на установке Milli-Q-Integral 3.

Наибольший вклад в погрешность методики вносит этап пробоподготовки. Приготовление проб заключается в растворении испытуемого образца и обеспечении концентрации испытуемого раствора, соответствующей рабочему диапазону прибора [4]. Были подобраны оптимальные условия растворения образцов глюкозы и сахарозы (табл. 1).

Для приготовления подкисленных растворов следует использовать кислоту азотную, что позволяет снизить риск загрязнения анализируемого раствора реактивами. Это является важным фактором при определении малых количеств элементов [5].

Для подтверждения чувствительности методики готовили модельные смеси, содержащие 0,4; 0,5; 0,75; 0,8; 1; 1,25 предельно допустимой концентрации (ПДК) свинца в образце.

Образцы массой 5 г (точная навеска) сахарозы/глюкозы переносили в мерные стаканы объемом 30 мл, добавляя соответственно по 0,1; 0,125; 0,188; 0,2; 0,25; 0,3125 мл раствора с концентрацией стандартного образца (СО) свинца 10 мг/л, полученного разбавлением СО свинца с аттестованным значением 1000 мг/дм<sup>3</sup>. Модельные образцы сушили при температуре 105 °С до постоянной массы.

Далее к образцам прибавляли по 10 мл 6 % азотной кислоты, проводя процедуру растворения образцов

Таблица 1  
Условия растворения глюкозы и сахарозы

Условия растворения	Время растворения, мин	
	глюкоза	сахароза
1 25 °С, ручное перемешивание	47	45
2 50 °С, ручное перемешивание	14	12
3 100 °С, ручное перемешивание	11	10
4 50 °С, магнитная мешалка 240 об/мин	4	4
5 100 °С, магнитная мешалка 240 об/мин	4	4

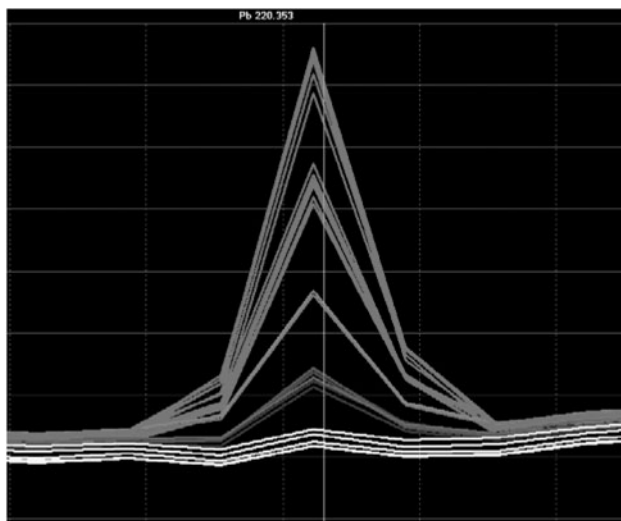


Рис. 1. Аналитический спектр свинца при характеристической длине волны 220, 353 нм во время испытаний.

при температуре 60 °С. Содержимое каждого мерного стакана помещали в мерные колбы объемом 25 мл и доводили до метки кислотой азотной 6 %. Для приготовления раствора кислоты азотной 6 % использовали концентрированную азотную кислоту с содержанием свинца < 0,002 ppm. Контрольный раствор готовили аналогично испытываемому раствору, но без добавления раствора СО свинца. Для каждого уровня концентраций свинца готовили по 3 параллельные пробы. Измерение содержания свинца в сахарозе/глюкозе проводили методом стандартных добавок [4], сравнивая эмиссию испытываемого раствора с эмиссией растворов с добавкой СО свинца. Значение эмиссии для свинца измеряли по характеристической длине волны (220, 353 нм), так как она самая интенсивная и свободна от наложений.

Статистические характеристики валидационных параметров рассчитывали, используя программное обеспечение MS Excel 2007.

Таблица 2  
Данные линейности валидируемой методики

Концентрация (С), мг/л	Средняя величина эмиссии	
	глюкоза	сахароза
0	0	0
0,04	365	464,9366667
0,05	470,26	636,3
0,075	639,16	877,1066667
0,08	683,1133	925,5266667
0,1	864,6967	1251,053333
0,125	1041,65	1287,87

Таблица 3  
Значения ПО и ПКО валидируемой методики

Образец	Длина волны, нм	ПО, мг/л	ПКО, мг/л
Сахароза	220,53	0,03	0,09
Глюкоза	220,53	0,01	0,04

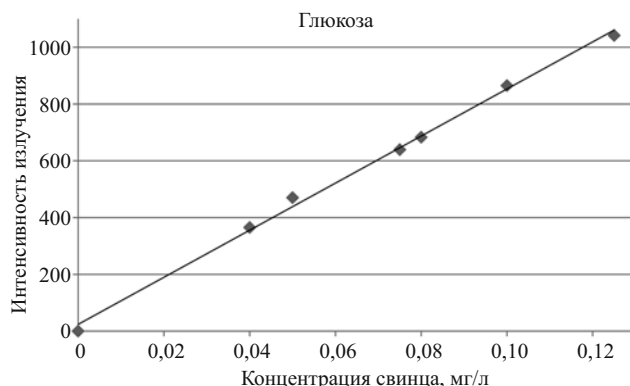


Рис. 2. Линейная зависимость интенсивности излучения (эмиссии, I) элементов от их концентрации (С) в водных растворах глюкозы (согласно валидируемой методике).

Валидацию методики пробоподготовки при количественном определении свинца в сахарах проводили согласно установленным требованиям [4, 6 – 12].

### Результаты и их обсуждение

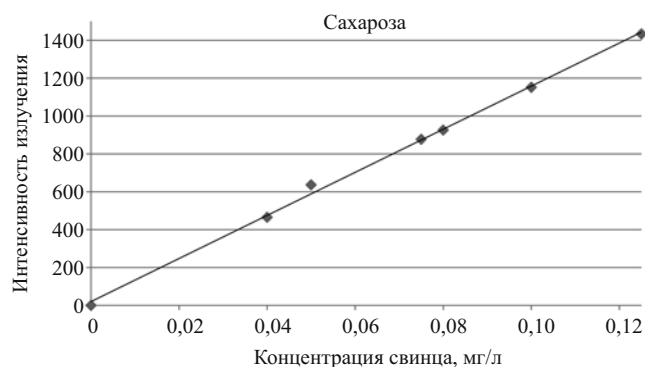
Разработана методика пробоподготовки количественного определения свинца в сахарах методом ИСП-АЭС и проведена валидация методики пробоподготовки по параметрам: линейность; правильность; прецизионность; предел количественного определения; специфичность; диапазон применения.

В результате испытаний определено, что при аналитической длине волны 220, 353 нм [13] максимум пика (разрешение прибора позволяет измерять максимум с

Таблица 4  
Результаты оценки правильности валидируемой методики определения свинца в сахарах методом ИСП-АЭС

Концентрация, мг/л, $Y_i$	Количественное определение свинца (Pb) в сахарах			
	сахароза		глюкоза	
	$X_i$ , мг/л	Z, %	$X_i$ , мг/л	Z, %
0,04	0,0351	87,8	0,031	77,5
	0,0353	88,3	0,035	87,5
	0,0355	88,8	0,038	95,0
0,05	0,052	104,0	0,044	88,0
	0,053	106,0	0,05	100,0
	0,055	110,0	0,051	102,0
0,075	0,072	96,0	0,068	90,6
	0,073	97,3	0,064	85,3
	0,075	100,0	0,069	92,0
0,08	0,074	92,5	0,073	91,3
	0,078	97,5	0,074	92,5
	0,08	100,0	0,078	97,5
0,1	0,1112	111,2	0,09	90,0
	0,1076	107,6	0,092	92,0
	0,1112	111,2	0,094	94,0
0,125	0,1132	90,6	0,125	100,0
	0,1134	90,7	0,122	97,6
	0,1136	90,8	0,12	96,0

Примечание:  $Y_i$  — измеренная концентрация (найдено), мг/л;  $X_i$  — опорное значение концентрации свинца (внесено), мг/л.



**Рис. 3.** Линейная зависимость интенсивности излучения (эmissions, I) элементов от их концентрации (C) в водных растворах сахарозы (согласно валидируемой методике).

такой точностью) аналитической линии элемента находится точно в центре, что доказывает специфичность методики. Интенсивность сигнала достаточна и находится между аналитическими линиями для калибровочных растворов (рис. 1).

Для подтверждения линейности проводили анализ 6 растворов глюкозы и сахарозы различных концентраций. На основании полученных данных (табл. 2) и графиков для глюкозы и сахарозы (рис. 2, 3) установлено, что значение эмиссии растворов со стандартными добавками находится в линейной области калибровочной кривой [4]. Получаем следующие значения рассчитанного коэффициента регрессии прямого вида ( $y = bx + a$ ) для глюкозы:

$$y = 8291,5x + 23,837,$$

для сахарозы:

$$y = 11383x + 19,82.$$

Коэффициент корреляции ( $r$ ) находится в диапазоне от 0,9968 до 0,9978, что свидетельствует о приемлемой линейности, отвечающей условию  $r \geq 0,99$  [14].

**Аналитическая область применения методики.** Методика применима в интервале от предела обнаружения до 125 % от допустимого содержания опреде-

**Таблица 5**  
**Статистические характеристики правильности валидируемой методики определения свинца в сахарах методом ИСП-АЭС**

Статистическая характеристика	Сахароза	Глюкоза
Среднее значение, Z %	98,4	97,7
Систематическая погрешность ( $\delta = Z - 100$ ), %	1,6	2,3
Стандартное отклонение, %	8,3	5,5
Коэффициент вариации, %	8,4	5,6
Доверительный интервал ( $p = 95\%$ ), %	4,1	2,7

ляемой примеси (свинец) [7]. Были вычислены предел обнаружения (ПО) и предел количественного определения (ПКО), основанный на стандартном отклонении контрольного опыта (табл. 3). Если учесть, что величина отношения сигнал — шум составляет 10:1, то значение ПКО [6–8] — минимальная концентрация свинца в глюкозе — составляет 0,04 мг/л, в сахарозе — 0,09 мг/л.

**Правильность методики.** Для сахарозы и глюкозы рассчитаны коэффициент извлечения Z (табл. 4); стандартное отклонение; стандартное относительное отклонение ( $RSD$ ); доверительный интервал и систематическая погрешность (табл. 5) [8]. При анализе полученных данных (табл. 5) и требований, предъявляемых при определении правильности методики, установлено:

1. Доверительный интервал [6, 9, 14] включает следующие значения коэффициента извлечения свинца —  $(97,7 \pm 2,7)$  в глюкозе,  $(98,4 \pm 4,1)$  в сахарозе.

2. Выполняется критерий статистической незначимости [7] (систематическая погрешность не должна превышать установленные доверительные интервалы), что свидетельствует о правильности валидируемой методики.

Данные статистической обработки сходимости и внутрилабораторной прецизионности по результатам 2 определений для каждого из 3 уровней концентраций элементов свидетельствуют об их прецизионности (табл. 6, 7).

**Таблица 6**  
**Результаты исследования сходимости и внутрилабораторной прецизионности методики определения свинца в сахарах методом ИСП-АЭС**

Внесено, мг/л	Глюкоза				Сахароза			
	оператор 1		оператор 2		оператор 1		оператор 2	
	найдено	Z, %	найдено	Z, %	найдено	Z, %	найдено	Z, %
0,04	0,037	92,5	0,036	90,0	0,036	90,0	0,035	87,5
	0,038	95,0	0,035	87,5	0,035	87,5	0,037	92,5
	0,039	88,8	0,038	97,5	0,038	95,0	0,039	97,5
0,08	0,074	92,5	0,075	93,75	0,073	91,25	0,074	92,5
	0,078	97,5	0,076	97,5	0,074	94,87	0,076	95,0
	0,08	100,0	0,079	100,0	0,078	97,5	0,078	97,5
0,125	0,120	90,6	0,113	90,5	0,125	100,0	0,124	99,2
	0,113	90,7	0,114	90,64	0,122	97,6	0,121	96,8
	0,116	90,8	0,117	90,80	0,12	96,0	0,124	99,2

## Статистические характеристики сходимости и внутривлабораторной прецизионности валидируемой методики определения свинца в сахарах методом ИСП-АЭС

Показатель	Глюкоза		Сахароза	
	оператор 1	оператор 2	оператор 1	оператор 2
Среднее $Z_p$ , %	96,31	97,95	97,15	97,5
Стандартное отклонение ( $S$ ), %	5,31	3,77	4,28	4,34
Коэффициент вариации, %	5,51	3,85	4,40	4,45
Доверительный интервал ( $p = 95\%$ ), %	4,08	2,90	3,29	3,34
Объединенное среднее значение	97,13		97,23	
Объединенное стандартное отклонение	6,51		6,10	
Общий коэффициент вариации	6,70		6,27	
Общий доверительный интервал	4,6		4,3	
Критерий Фишера	$F_{\text{табл}} 3,44, F_{\text{факт}} 1,98$		$F_{\text{табл}} 3,44, F_{\text{факт}} 1,03$	
Критерий Стьюдента	$t_{\text{табл}} 2,12, t_{\text{факт}} 0,75$		$t_{\text{табл}} 2,12, t_{\text{факт}} 0,18$	

При сравнении табличных значений критерия Фишера ( $F$ ) и критерия Стьюдента ( $t$ ) с эмпирическим (фактическими данными) установлено, что значение  $t_{\text{факт}}$  меньше  $t_{\text{табл}}$ :

для глюкозы  $F_{\text{факт}} 1,98 < F_{\text{табл}} 3,44; t_{\text{факт}} 0,75 < t_{\text{табл}} 2,12;$

для сахарозы  $F_{\text{факт}} 1,03 < F_{\text{табл}} 3,44; t_{\text{факт}} 0,18 < t_{\text{табл}} 2,12.$

Это свидетельствует о том, что средние значения и стандартные отклонения результатов 2 операторов при уровне значимости 95 % не отягощены грубой систематической ошибкой.

Таким образом, методика пробоподготовки, используемой при количественном определении свинца в глюкозе и сахарозе методом ИСП-АЭС, может быть рекомендована к применению в фармакопейном анализе при определении качества сахаров по показателю “Содержание свинца”.

## ЛИТЕРАТУРА

- Lead in sugars 2.4.10, *European Pharmacopoeia*, 9th ed. (2016); URL: <http://www.edm.eu>.
- Atomic absorption spectrometry 2.2.23, *European Pharmacopoeia*, 9th ed. (2016); URL: <http://www.edm.eu>.
- М. П. Забокрицкий, В. В. Сабуров, *Микроэлементы в медицине*, 15(4), 29 – 38 (2014).
- Общая фармакопейная статья 1.2.1.1.0004.15 “Атомно-эмиссионная спектроскопия”, *ГФ РФ XIII*; URL: <http://femb.ru/feml>.
- В. М. Щукин, Е. Ю. Северинова, Н. Е. Кузьмина и др., *Успехи совр. естествознания*, № 6, 53 – 58 (2016).
- Общая фармакопейная статья 1.1.001215 “Валидация аналитических методик”, *ГФ РФ XIII*; URL: <http://femb.ru/feml>.
- Н. В. Юргель, *Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств (методические рекомендации)*, Спорт и культура, Москва (2007), сс. 14 – 74.
- В. В. Береговых, *Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств*, Литерра, Москва (2008), сс. 12 – 114.
- ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 Государственный стандарт Российской Федерации. Точность (Правильность и Прецизионность) методов и результатов измерений.
- А. П. Арзамасцев, Н. П. Садчикова, Ю. Я. Харитонов, *Фармация*, № 4, 8 – 12 (2006).
- Государственная фармакопея СССР*, XI изд., Медицина, Москва (1987), вып. 1, сс. 29, 30, 95, 199.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline “Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology” Q2(R1) (2005); URL: <http://www.ich.org>
- NIST Atomic Spectra Database Lines Form; URL, *J. Opt. Soc. Am.*, 64, 1159 – 1161 (1974).
- Общая фармакопейная статья 1.1.001315 “Статистическая обработка результатов химического эксперимента”; [femb.ru/feml](http://femb.ru/feml).

Поступила 26.01.18

## DEVELOPMENT OF THE SAMPLE PREPARATION PROCEDURE FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF LEAD CONTENT IN SUGARS BY INDUCTIVELY COUPLED PLASMA-ATOMIC EMISSION SPECTROSCOPY

Yu. V. Olefir, E. I. Sakanyan, L. A. Ladygina, and V. M. Shchukin

Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Health of the Russian Federation, 127051 Moscow, Russia

A sample preparation procedure for the determination of lead content in sugars (in particular, glucose and sucrose) by inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy (ICP-AES) has been developed and validated. The characteristic detection wavelength and conditions of sugar decomposition were selected. The assessment of suitability was performed by means of validation of the following parameters: specificity, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), accuracy, repeatability, and intralaboratory precision.

**Keywords:** lead; glucose; sucrose; inductively coupled plasma; atomic emission spectroscopy; validation of analytical method.