

Проблеми контролю вмісту піролізидинових алкалоїдів в лікарській рослинній сировині

КОТОВА ЕЛІНА ЕДУАРДІВНА

Керівник напряму ДФУ “Лікарська рослинна сировина і
лікарські рослинні препарати”

Зав. сектором «Експериментальна підтримка розробки
монографій на ЛРС»,

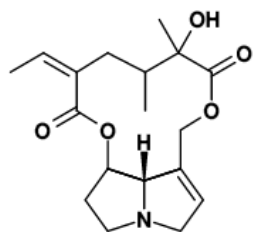
К.фарм.н., ст.н.с.



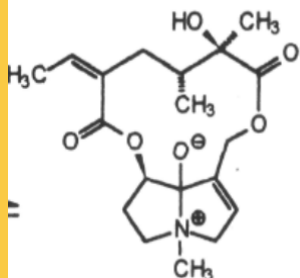
Державна Фармакопея України
європейська якість



Проблеми виявлені при розробці національної монографії “Мати й мачуха”



Senecionine



При розробці національної монографії на таку широко відому та використовувану в Україні ЛРС, як мати й мачуха, було з'ясовано, що вона може містити пірролізидинові алкалоїди (PAs) (в тому числі 1,2-ненасичені PA senecionine та senkirikine).

PAs представляють особливий інтерес в даний час, так як для деяких з них було показано, що вони викликають токсичні реакції в організмі людини при попаданні в організм з їжею або із лікарських засобів рослинного походження, в першу чергу захворювання печінки. Кілька PAs розглядалися як гепатотоксичні і канцерогенні. За останні десятиліття було проведено ряд моніторингових досліджень в Європі на продукти харчування, мед, корми, трав'яні чаї і сорти чаю, які показали наявність PAs в цих продуктах. У багатьох країнах використання рослин, що містять PAs, в рослинних продуктах заборонено або обмежено.

PAs токсини виключно синтезуються рослинами. Вони типові вторинні метаболіти рослин. PAs в основному зустрічаються в *Boraginaceae* (усі види), *Asteraceae* (види *Senecioneae* and *Eupatorieae*) та *Fabaceae* (*Crotalaria*).



Проблеми виявлені при розробці національної монографії “Мати й мачуха”



- У багатьох країнах використання рослин, що містять PAs, в рослинних продуктах заборонено або обмежено. В європейських країнах (Німеччині, Польщі, Болгарії, Австрії та ін.), а також в Китаї за останні 20-25 років проводилась величезна кількість системних досліджень стосовно визначення вмісту PAs в лікарській рослинній сировині (ЛРС) та лікарських рослинних засобах (ЛРЗ), у тому числі і в сировині мати й мачуха (*T.farfara*).



- В Україні, незважаючи на широке використання препаратів мати й мачухи як в народній, так і в офіційній медичинській практиці, особливо в педіатрії, відсутні будь-які дані про вміст PAs в вітчизняній ЛРС.



24 November 2014 EMA/HMPC/893108/2011 Committee on Herbal Medicinal Products

З огляду на те, що PAs є природними складовими цілого ряду рослин, використовуваних в лікувальних цілях і що PAs можуть бути частиною харчового ланцюга, Комітет з лікарських рослинних засобів (Committee on Herbal Medicinal Products, HMPC) підготував публічну заяву про використання рослинних препаратів, що містять PAs.

Міжнародне агентство з вивчення раку (IARC) зробило висновок, що у експерименті на тваринах існують "достатні або обмежені докази" для канцерогенності наступних PAs: *monocrotaline*, *retrorsine*, *isatidine*, *lasiocarpine*, *petasitenine*, *senkirikine* та для екстрактів рослин, що містять PA таких як *Petasites japonicum*, *Tussilago farfara*, *Symphytum officinale*, *Senecio longilobus*, *Senecio numorensis*, *Farfugium japonicum* та *Senecio cannabifolius*.

У деяких країнах і в деяких областях застосування, були встановлені межі споживання для токсичних, ненасичених PAs. Згідно опублікованої літератури, цілком можливо, що середнє споживання з їжею щодня може бути більше, ніж кількість токсичних, ненасичених PAs, яка розглядається як безпечна. Відповідно до деяких авторів добова кількість PAs за допомогою споживання меду можна легко дістатися до 10-100 мкг PAs/добу. Інші джерела токсичних, ненасичених PAs – це продукти харчування (наприклад, молоко, напівфабрикати, які можуть містити PAs -сліди, і м'ясо), так що фактичний вплив не може бути оцінений.



24 November 2014 EMA/HMPC/893108/2011 Committee on Herbal Medicinal Products

ТАБЛИЦЯ 1

Запропонований
прийнятний рівень
впливу ненасичених
піролізидинових алкалоїдів
та їх N-оксидів

Керівний орган	Добова доза ненасичених піролізидинових алкалоїдів та їх N-оксидів
Bundesanzeiger (1992)	1 мкг/добу (максимум 6 тиж на рік); 0,1 мкг/добу (без обмеження (тільки для лікарських засобів))
BfR (2011)	0,007 мкг/кг/добу
Food Standards Australia New Zealand (FSANZ) (2001)	1 мкг/кг маси тіла/добу (тимчасово)
Committee on Toxicity (COT) (2008)	0,1 мкг/кг маси тіла/добу (для швидше неканцерогенних); 0,007 мкг/кг маси тіла/добу (для швидше канцерогенних)



24 November 2014 EMA/HMPC/893108/2011 Committee on Herbal Medicinal Products

Рекомендації

■ Через їх відому причетність до отруєння людей та їх передбачувану канцерогенність, вплив токсичних, ненасичених PAs повинний бути настільки низьким, наскільки це практично досяжно. При оцінці ЛРЗ та готових ЛРЗ, що містять токсичні, ненасичені PA, держави-члени повинні прийняти заходи для забезпечення захисту громадськості від впливу PAs та повинні бути застосовані їх наступні граничні значення.

■ Оральне використання

Оцінка ризику використання різними науковими організаціями виявили дозволене добове споживання 0.007 мкг PA / кг ваги тіла. Припускаючи 50 кг за середню вагу людини, це означало б щоденне споживання 0.35 мкг в день (з усіх джерел: продуктів харчування і лікарських засобів рослинного походження) для дорослих.

Потенційне щоденне споживання токсичних, ненасичених PAs через їжу не можна ігнорувати, особливо, оскільки споживачі / пацієнти не в змозі їх уникнути. На підставі наявних кінетичних даних, представляється очевидним, що при ковтанні PAs буде поглинений і метаболізується. HMPC прийшов до висновку, що може бути прийнятним короточасний прийом (максимум 14 днів) при добовій дозі 0.35 мкг токсичних, ненасичених PAs / день з лікарських засобів рослинного походження.

■ *Чутливі групи Діти:* Якщо діти включені у використанні вказаних продуктів щоденна кількість токсичного, ненасиченого PA повинна бути відрегульована до ваги тіла вікової групи: наприклад, вага тіла 20 кг може привести до прийнятного короткого часу (максимум 14 днів) добової дози з ЛРЗ 0.14 мкг токсичних, ненасичених PA / день»



31 May 2016 EMA/HMPC/328782/2016 Committee on Herbal Medicinal Products

- «У публічній заяві (HMPC, 2014 р.) HMPC рекомендував, щоб споживання PAs з ЛРЗ обмежувався рівнем 0.35 мкг/день (максимум 14 днів), розрахований для людини з масою тіла 50 кг. Цей рівень був спочатку одержаний для продуктів харчування з використанням «межі безпеки» (МБ) відповідно до діючих керівних принципів оцінки ризику генотоксичних канцерогенів у продуктах харчування.
- На 1 березня 2016 року німецьке агентство з лікарських засобів (BfArM) зробило публічну заяву виклавши роботи, триваючі в Німеччині, для вирішення проблеми забруднення PAs рослинних лікарських засобів. BfArM повідомило, що з метою зменшення можливого забруднення PAs для відповідності пороговому значенню, визначеному в публічній заяві HMPC, необхідно, щоб були введені в дію розширені заходи, які виходять за звичайні межі GACP (Good Agricultural and Collection Practice for Starting Materials of Herbal Origin). BfArM заявило, що ця робота ведеться і буде створено скоординований підхід для розгляду різних аспектів вирощування, збору ЛРС, а також розробки стандартних методів для випробування PAs. На підставі наявних даних BfArM вводить максимальний поріг PAs **1.0 мкг** щодня як тимчасовий захід. Пізніше BfArM повідомило, що перехідний період не повинен перевищити 3 роки, після чого поріг буде встановлений на рівні 0.35 мкг / добу, відповідно до рекомендацій HMPC.



Висновки

За доцільне прийняти вже реалізоване (в Німеччині, Австрії, Великобританії) більш високе значення PAs 1,0 мкг/добу протягом 3-річного перехідного періоду. Вважається, що прийняття цієї межі протягом перехідного періоду не матиме ніякого негативного впливу на здоров'я населення. Можна відзначити, що 1.0 мкг/добу нижче порога токсикологічного занепокоєння для лікарських засобів (1.5 мкг /добу), як зазначено в директиві ІСН М7 для генотоксичних домішок.

Наступні норми для **1,2-ненасичених PAs** «щоденне споживання - **1 мкг в день** (з усіх джерел: продуктів харчування і лікарських засобів рослинного походження) для дорослих (протягом перехідного 3-річного періоду).

Протягом цього періоду виробникам рослинних лікарських засобів слід вжити заходів, спрямованих на зниження вмісту піролізидинових алкалоїдів до рівня, який забезпечує їх споживання, не більше ніж 0,35мкг/добу.



31 May 2016 EMA/HMPC/328782/2016 Committee on Herbal Medicinal Products

Аспекти якості: контроль піролізидинових алкалоїдів у рослинних лікарських засобах

З метою вирішення проблем, пов'язаних з якістю рослинних лікарських засобів, держави-члени повинні здійснити наступні заходи:

1. Забезпечити здійснення відповідних процедур тестування з метою досягнення рівня піролізидинових алкалоїдів відповідно до узгодженого обмеження.
2. Забезпечити здійснення заходів щодо запобігання або зменшення вмісту піролізидинових алкалоїдів у рослинних лікарських засобах.

Аналітичні методи

Кількісну оцінку щодо вмісту піролізидинових алкалоїдів у рослинних лікарських засобах можуть забезпечити високочутливі аналітичні методи. На даний час офіційні методи випробувань щодо контролю піролізидинових алкалоїдів у рослинних лікарських засобах відсутні. Тому HMPC запросив Європейську Фармакопею розглянути в першочерговому порядку питання щодо розробки аналітичного методу визначення піролізидинових алкалоїдів у рослинній лікарській сировині та рослинних лікарських засобах. Методи повинні дозволяти проводити кількісне визначення принаймні наведених у табл. токсичних піролізидинових алкалоїдів.

1. Echimidine	11. Jacobine	21. Senecionine
2. Echimidine-N-oxide	12. Jacobine-N-oxide	22. Senecionine-N-oxide
3. Erucifoline	13. Lasiocarpine	23. Seneciphylline
4. Erucifoline-N-oxide	14. Lasiocarpine-N-oxide	24. Seneciphylline-N-oxide
5. Europine	15. Lycopsamine	25. Senecivernine
6. Europine-N-oxide	16. Lycopsamine-N-oxide	26. Senecivernine-N-oxide
7. Heliotrine	17. Monocrotaline	27. Senkirkine
8. Heliotrine-N-oxide	18. Monocrotaline-N-oxide	28. Trichodesmine
9. Intermedine	19. Retrorsine	
10. Intermedine-N-oxide	20. Retrorsine-N-oxide	



31 May 2016 EMA/HMPC/328782/2016 Committee on Herbal Medicinal Products

- **Пріоритетність оцінювання лікарських рослин / ЛРЗ**
- Це потребує врахування специфіки продукту і ґрунтується на підході оцінки ризику на кожному конкретному випадку в залежності від конкретних лікарських рослин і дозировки ЛРЗ. У світлі міркувань безпеки стратегія повинна полягати в першу чергу зосередитися на лікарських рослинах з високим ризиком забруднення і також на забезпеченні доступності ЛРЗ з низьким ризиком зараження.
- Слід розглянути питання про необхідність проведення рутинних аналізів замість періодичного контролю у залежності від оцінки ризику та наявної доказової бази. Існуюча база даних, складена німецькою промисловістю (ВАН) може бути цінним ресурсом і забезпечує деякі попередні дані про лікарські рослини з найвищим ризиком зараження. Це може дозволити державам-членам виявити лікарські рослини найвищого пріоритету для регулюючих дій.
- Наприклад, десять лікарських рослин ідентифіковано як найбільш постраждалі із-за забруднення PAs і, ймовірно, потребують рутинного контролю; до них відносяться: **Hyperici Herba, Passiflorae Herba, Matricariae Flos, Alchemillae Herba, Liquiritiae radix, Melissa leaf, Menthae Piperitae leaf, Salviae leaf, Taraxaci Herba and radix і Thymi Herba.**



31 May 2016 EMA/HMPC/328782/2016 Committee on Herbal Medicinal Products

■ Здійснення заходів для уникнення або зменшення забруднення РА в ЛРЗ

Докладний документ Code of Practice (CoP) був розроблений Food and Agriculture Organization (FAO) і BOOЗ (Code of Practice for Weed Control to Prevent and Reduce Pyrrolizidine Alkaloid Contamination in Food).

CoP підкреслює, що PAs, ймовірно, найбільш широко поширені природні токсини і визнає, що повне викорінення рослин, що містять РА, не представляється можливим. CoP фокусується на боротьбі з бур'янами і забезпечує керівництво з належної виробничої практики заходами контролю для виробництва рослин, що містять РА з метою запобігання і зниження забруднення РА. Завдання GACP є значним, так як дуже невелика кількість рослин, що містять РА, може привезти к дуже значним наслідкам, наприклад **однієї рослини Senecio на гектар було б достатньо для урожаю звіробія (трави звіробою) , щоб перевищити рекомендований HMPC поріг вмісту PAs.**

Наявні сільськогосподарські заходи по скороченню РА-бур'янів шляхом селективного гербіциду, ручної прополки / сортування, очистки насіння, огляду полів до збирання і т.д., повинні ввести в дію в терміновому порядку, але потрібно кілька сільськогосподарських сезонів, щоб вони були ефективними.

Зважаючи на обсяг проблеми з якою доведеться зіткнутися і необхідність всеосяжного і спільного зусилля по скороченню забруднення PAs, HMPC визнає, що значно підвищується рівень GACP і позитивний результат не може бути досягнутий в короткостроковій перспективі.

HMPC вважає, що перехідний період, протягом якого вища доза обмеження PAs буде застосовуватися до деяких інгредієнтів, повинен бути як можна коротше і не повинен перевищувати строк 3 роки. Якщо посилені заходи GACP виявляються неефективними, буде розпочатий подальший перегляд позиції регулювання» .



Проблеми виявлені при розробці національної монографії “Мати й мачуха”



Проблеми контролю вмісту піролізидинових алкалоїдів у вітчизняній сировині листя мати-й-мачухи

Препарати мати-й-мачухи застосовують у комплексній терапії гострих та хронічних запальних захворювань дихальних шляхів, таких як бронхіт, коклюш, ларингіт, трахеїт, бронхіопневмонія, бронхіальна астма. Основними сполуками рослини є полісахариди з протизапальними й імунomodувальними властивостями (мукополісахариди, лектини, інурін), флавоноїди з протизапальною та спазмолітично дією (кверцетин, кемферол та їх глікозиди), терпени (tussilagogen, - l-amyrin, faradiol, bisabolene epoxide), стерени і фенольні кислоти. Піролізидинові алкалоїди, в тому числі senkirkine, senecionin, seneciophylline, integerrimine, tussillagine та isotussillagine, можуть бути наявними у різних кількостях, як правило, дуже незначних залежно від джерела. Літературні дані про вміст цих речовин в листях мати-й-мачухи (Tussilago farfara) свідчать, що нетоксичні насичені піролізидинові алкалоїди (tussillagine, isotussillagine, tussillagine та iso tussillagine) наявні в слідових кількостях, тоді як токсичні 1,2-ненасичені піролізидинові алкалоїди senecionin та senkirkine виявлені в Tussilago farfara в кількості 0,1-10 р.р.т. (parts per million, мільйонна частина) та 0,1-150 р.р.т. відповідно [1]. В інших джерелах вказано, що сумарний вміст піролізидинових алкалоїдів в сировині знаходиться в широкій межі 0,06-1,04 мкг/г сухої сировини [2].



На даній час піролізидинові алкалоїди пред- на тваринах існують, достатні або обмежені дока-

були наблизені до відомих як таких, що викликають пухлини у щурів. Чутливі групи – діти! Численна кількість токсичних ненасичених піролізидинових алкалоїдів має бути відкорегована відповідно до маси тіла та вікової групи. Наприклад, якщо маса тіла 20 кг, відповідно, добова доза токсичних ненасичених піролізидинових алкалоїдів у рослинних лікарських засобах має дорівнювати 0,14 мкг/добу протягом 14 днів. 31 May 2016 EMA/HMPC/328782 2016 Committee on Herbal Medicinal Products

- Нами в 2016 році була опублікована стаття щодо проблеми в **тижневику АПТЕКА №51 (1072) • www.apteka.ua**, де були освітлене дане питання та зроблений висновок:
- Беручи до уваги той факт, що в Україні імплементація вимог GACP знаходиться на початковому рівні, а також те що препарати мати й мачухи широко використовуються саме в педіатрії, необхідні термінові дослідження вітчизняної сировини для з'ясування фактичного рівня вмісту токсичних PAs в листях мати й мачухи.
- Ці дослідження є досить затратними оскільки стандарти PAs дуже коштовні (наприклад 5 мг senkirkine коштує щонайменше 800 €).
- Подальші дії стосовно стандартизації мати й мачухи листя, а саме розробка сучасної національної нормативної документації контролю якості ЛРС мати й мачухи листя, а також можлива необхідність перегляду дозування її препаратів, будуть залежати від отриманих результатів встановлення вмісту токсичних PAs в сировині.



Проблеми виявлені при розробці національної монографії “Мати й мачуха”



Нашою організацією був направлений лист Голові Державної служби України з лікарських засобів та контролю за наркотиками, в якому Фармакопейний центр запропонував :

- зобов'язати усіх вітчизняних виробників, які займаються виробництвом лікарських засобів на основі мати й мачухи листя надати інформацію про вміст токсичних піролізидинових алкалоїдів в сировині;
- призупинити використання засобів на основі мати й мачухи листя у педіатрії до отримання результатів вмісту токсичних піролізидинових алкалоїдів в вітчизняній ЛРС;
- дослідження з встановлення вмісту токсичних піролізидинових алкалоїдів бажано проводити централізовано на системній основі з залученням провідних вітчизняних наукових організацій у галузі створення та впровадження НТД на ЛРС.



Проблеми виявлені при розробці національної монографії “Мати й мачуха”

МАТИ-Й-МАЧУХИ ЛИСТЯ

■ Реєстраційне посвідчення: UA/5871/01/01

■ Термін державної реєстрації: **з 19.07.2016 по Необмежений**

ІНСТРУКЦІЯ

■ Показання. Захворювання дихальних шляхів (ларингіти, трахеїти, хронічні бронхіти, бронхопневмонії, бронхіальна астма, бронхоектатична хвороба) - у складі комплексної терапії.

■ Протипоказання. Гіперчутливість до біологічно активних речовин препарату.

■ **Діти. Препарат застосовувати дітям віком від 3 років за призначенням лікаря.**

МАТИ-Й-МАЧУХИ ЛИСТЯ

■ Реєстраційне посвідчення: UA/2359/01/01

■ Термін державної реєстрації: **з 25.05.2017 по Необмежений**

ІНСТРУКЦІЯ

■ Показання. Захворювання дихальних шляхів (ларингіти, трахеїти, хронічні бронхіти, бронхопневмонії, бронхіальна астма, бронхоектатична хвороба) у складі комплексної терапії.

■ Протипоказання. Гіперчутливість до біологічно активних речовин препарату.

■ **Діти. Препарат застосовувати дітям віком від 3 років (за призначенням лікаря).**



2.8.26. Contaminant pyrrolizidine alkaloids

■2.8.26. ДОМІШКИ ПІРОЛІЗИДИНОВИХ АЛКАЛОЇДІВ

ВСТУП

■В цій загальній статті розглянуто аналіз слідів ПА, що мають контролюватися в лікарській рослинній сировині, її препаратах і лікарських засобах. Вона не розповсюджується на визначення ПА, які зустрічаються в природі в незабруднених рослинних матеріалах.

■ПА, що мають контролюватися. Такими ПА є ехімідин, N-оксид ехімідину, еруцифолін, N-оксид еруцифоліну, европін, N-оксид европіну, геліотрин, N-оксид геліотрину, інтермедин, N-оксид інтермедину, яacobін, N-оксид яacobіну, лазіокарпін, N -оксид лазіокарпіну, лікопсамін, N-оксид лікопсаміну, монокроталін, N-оксид монокроталіну, ретрорсин, N-оксид ретрорсину, сенеціонин, N-оксид сенеціонину, сенеціфелін, N-оксид сенеціфеліну, сенецівернин, N-оксид сенеціверніну, сенкіркін і триходесмін.

■Межі. Вплив на пацієнта від ПА з лікарських засобів має бути якомога більш низьким і межа не повинна перевищувати максимальну добову дозу, узгоджену компетентним органом.*

*Pharmeuropa 32.1, January 2020

1.0 мкг або 0.35 мкг у відповідності з **ЕМА/НМРС/328782/2016** за умови їх перегляду



Ph.Eur 10.6

2.8.26. Contaminant pyrrolizidine alkaloids

- Ця загальна стаття дозволяє використання будь-якої процедури, що складається з хроматографії в поєднанні з МС або МС високої розділювальної здатності, яка задовольняє валідаційним вимогам, зазначеним в Таблиці 2.8.26.-2. Як приклад надається аналітична процедура, яка виявилася придатною для визначення ПАв ряді матриць.
- Ця процедура була валідована для наступних матриць: **ромашки квітки, меліси чай (що містить меліси листя, анісу плоди і м'яти перцевої листя), ройбуша чай (що містить ройбуша листя, ванілі плоди і ванілі екстракт) та інший комбінований рослинний чай (що містить ройбуша листя, ожини листя, вербени лимонної листя, м'яти перцевої листя, ромашки квітки, фенхеля плоди, солодки корінь і кориці кору).**
- Незалежно від обраної аналітичної процедури, включаючи процедуру, наведену в якості прикладу, аналітик повинен спочатку підтвердити, що ці валідаційні вимоги виконані, використовуючи принаймні одну репрезентативну матрицю з кожної аналізованої групи матриць. Група матриць включає ряд матриць, які розглядаються як єдине ціле через загальні характеристики, що є суттєвими для призначеного аналізу.
- Наприклад, аналітична процедура може бути припустимо придатною для будь-якого зразка «листя» після того, як було показано, що вона відповідає валідаційним вимогам для зразка «м'яти перцевої листя». Потім, щоб віднести нові зразки «листя», які, як очікується, не будуть містити заважаючих сполук (наприклад, поліфенолів), до валідованої матричної групи «листя», аналітику не потрібно підтверджувати (за умови затвердження компетентним органом) в ході рутинного аналізу, що ці зразки відповідають верифікаційним вимогам. І навпаки, щоб віднести зразки «Зеленого чаю листя» (які містять поліфеноли) і зразки «М'яти перцевої листя сухого екстракту» (які містять матрицю в більш високій концентрації, що викликає заважаючі матричні ефекти) в групу валідованої матриці «листя», аналітик повинен підтвердити в ході рутинного аналізу, що ці зразки відповідають верифікаційним вимогам.



Ph.Eur 10.6

2.8.26. Contaminant pyrrolizidine alkaloids

Параметр валідації			Вимоги
Ідентифікація	МС/МС	Положення піків, зумовлених щонайменше 2-ма дочірніми іонами, отриманими в режимі SRM або MRM зі матричним зразком з добавками ⁽¹⁾ , принаймні на межі кількісного визначення (LOQ)	Повне співпадання
		Різниця у відношенні іонів ⁽¹⁾ між матричним зразком з добавками ⁽¹⁾ та розчином порівняння, принаймні на LOQ	Не більше ± 30 %
	МС високої роздільовальної здатності	Положення піків завдяки щонайменше 2 іонам ⁽²⁾ , отриманим із матричним зразком з добавками ⁽¹⁾ принаймні на LOQ	Повне співпадання
		Точність мас ⁽¹⁾ кожного з щонайменше 2-х іонів ⁽²⁾ , отриманих із матричним зразком з добавками ⁽¹⁾ принаймні на LOQ	Не більше 5 ppm для іонів з масами ≥ 200 Da Не більше 1 mDa для іонів з масами < 200 Da
		Відношення сигнал/ шум для кожного з принаймні 2-х іонів ⁽²⁾ , отриманих із матричним зразком з добавками ⁽¹⁾ принаймні на LOQ	Не менше 3 ⁽³⁾
Матричний ефект	Різниця у відгуку між розчинами порівняння та стандартними розчинами з матрицею в робочому діапазоні ⁽¹⁾ в одній або кількох точках концентрації, обраних аналітиком		Не більше ± 20 %
Специфічність	Різниця в часі утримання між матричними зразками з добавками ⁽¹⁾ та розчинами порівняння в робочому діапазоні ⁽¹⁾ , в одній або кількох точках концентрації, обраних аналітиком		Не більше ± 0.1 хв
	Різниця у відгуку кожного заважаючого піка між матричним холостим розчином і бланком розчинника ⁽¹⁾		Не більше 30 % LOQ
Лінійність	Відхилення концентрації калібрувальних розчинів (розчинів порівняння або стандартних розчинів з матрицею), розрахованої за калібрувальною прямою, від справжньої концентрації принаймні для 5 концентрацій, що охоплюють робочий діапазон ⁽¹⁾		Не більше ± 20 %
Правильність	Відношення «знайдено/введено, отримане для матричних зразків з добавками ⁽¹⁾ для мінімум 3 концентрацій у робочому діапазоні ⁽¹⁾ (найнижча із них - LOQ) і принаймні із 3 визначень для кожної з цих концентрацій		70- 120 % ⁽⁴⁾
Збіжність	Відносне стандартне відхилення (RSD), отримане для матричних зразків із добавками ⁽¹⁾ , принаймні для 3 концентрацій у робочому діапазоні (1) (найнижча із них - LOQ) і принаймні із 3 визначень для кожної з цих концентрацій		Не більше ± 20 %
LOQ ⁽⁵⁾	Відношення сигнал/ шум, отримане для матричного зразка з добавками ⁽¹⁾ за найнижчої концентрації в робочому діапазоні ⁽¹⁾		Не менше 10



2.8.26. Contaminant pyrrolizidine alkaloids

ПРОЦЕДУРА

Рідинна хроматографія (2.2.29) у поєднанні з мас-спектрометрією (2.2.43).

Випробовуваний розчин. До 2.0 г зразка додають 20.0 мл розчину 0,28 % (об/об) сірчаної кислоти P. Зразок повинен бути повністю зволожений. Обробляють ультразвуком протягом 15 хв, центрифугують за прискорення 3800 g протягом 10 хв і декантують надосадову рідину. Повторюють екстракцію ще раз, використовуючи залишок, отриманий після центрифугування, об'єднують надосадові рідини, нейтралізують до рН 7.0, використовуючи розчин 20 % (об/об) аміаку концентрованого розчину P і фільтрують. В вакуумній камері кондиціонують колонку для твердофазної екстракції (ТФЕ) об'ємом 6 мл, що містить 0.5 г силікагелю для хроматографії октадецилсилільного ендкепованого P (20 мкм), використовуючи 5 мл метанолу P, а потім 5 мл води P. Переносять 10.0 мл фільтрату на ТФЕ колонку, промивають колонку двома порціями по 5 мл кожна води P і висушують картридж у вакуумній камері. Елюють 10 мл метанолу P, елюат випарюють насухо на водяній бані за температури $50 \pm 5^\circ \text{C}$ в потоці азоту P, залишок, струшуючи, розчиняють в 1.0 мл розчину 5% (об/об) метанолу P і фільтрують крізь мембранний фільтр (номінальний розмір пор – 0.20 мкм).

Вихідний розчин (а). 1.0 мг ехімідину P, 1.0 мг ехімідина N-оксиду P, 1.0 мг еруцифоліну P, 1.0 мг еруцифоліна N-оксиду P, 1.0 мг европіна гідрохлориду P, 1.0 мг европіна N-оксиду P, 1.0 мг геліотрину P, 1.0 мг геліотрина N-оксиду P, 1.0 мг інтермедина N-оксиду P, 1.0 мг яacobіну P, 1.0 мг яacobіна N-оксиду P, 1.0 мг лазіокарпіну P, 1.0 мг лазіокарпіна N-оксиду P, 1.0 мг лікопсаміна N-оксиду P, 1.0 мг монокроталіну P, 1.0 мг монокроталіна N-оксиду P, 1.0 мг ретрорсину P, 1.0 мг ретрорсина N-оксиду P, 1.0 мг сенеціоніна N-оксиду P, 1.0 мг сенеціфеліна N-оксиду P, 1.0 мг сенціверніну P, 1.0 мг сенціверніна N-оксиду P, 1.0 мг сенкіркіну P і 1.0 мг триходесміну P розчиняють в метанолі P і доводять до 10.0 мл тим самим розчинником.

Вихідний розчин (b). 1.0 мг сенеціоніну P і 1.0 мг сенеціфеліну P розчиняють приблизно в 8 мл метанолу P на водяній бані за температури приблизно 55°C , охолоджують і доводять до 10.0 мл тим самим розчинником.

Вихідний розчин (c). 1.0 мг інтермедіну P і 1.0 мг лікопсаміну P розчиняють в ацетонітрилі P і доводять до 10.0 мл тим самим розчинником.

Вихідний розчин (d). Змішують 1.0 мл вихідного розчину (а), 1.0 мл вихідного розчину (b) і 1.0 мл вихідного розчину (c) й і доводять до 10.0 мл метанолом P.

Матричний холостий розчин: див. Глосарій.



Ph.Eur 10.6

2.8.26. Contaminant pyrrolizidine alkaloids

Стандартний розчин (а). Змішують 340 мкл матричного холостого розчину і 60 мкл вихідного розчину (d).

Стандартний розчин (b). Змішують 175 мкл матричного холостого розчину і 25 мкл вихідного (d).

Стандартний розчин (c). Змішують 180 мкл матричного холостого розчину і 20 мкл вихідного розчину (d).

Стандартний розчин (d). Змішують 185 мкл матричного холостого розчину і 15 мкл вихідного розчину (d).

Стандартний розчин (e). Змішують 100 мкл матричного холостого розчину і 10 мкл вихідного розчину (d).

Стандартний розчин (f). Змішують 100 мкл матричного холостого розчину і 20 мкл стандартного розчину (a).

Стандартний розчин (g). Змішують 280 мкл матричного холостого розчину і 20 мкл стандартного розчину (a).

Стандартний розчин (h). Змішують 280 мкл матричного холостого розчину і 20 мкл стандартного розчину (d).

Колонка:

–розмір: 0.15 м x 2.1 мм;

–нерухома фаза: силікагель для хроматографії октадецилсилільний, ендкепований P (1.9 мкм);

–температура: 40 °С.

Рухома фаза:

–рухома фаза А: 315 мг амонію форміату P розчиняють в приблизно 5 мл води для хроматографії P, змішують з 1 мл мурашиною кислоти P і доводять об'єм до 1000 мл водою для хроматографії P;

–рухома фаза В: 315 мг амонію форміату P розчиняють в приблизно 5 мл води для хроматографії P, змішують з 1 мл мурашиною кислоти P і доводять об'єм до 1000 мл метанолом P;

Час (хв)	Рухома фаза А (%,об/об)	Рухома фаза В (%,об/об)
0–0.5	95	5
0.5–7	95 → 50	5 → 50
7–7.5	50 → 20	50 → 80
7.5–7.6	20 → 0	80 → 100
7.6–10.1	0	100



Ph.Eur 10.6

2.8.26. Contaminant pyrrolizidine alkaloids

Швидкість рухомої фази: 0.3 мл/хв.

Детектування: три-квадрупольний мас-спектрометр в режимі контролю обраної реакції (SRM). Для ідентифікації і кількісного визначення ПА необхідно щонайменше 2 специфічних переходу. Відповідні переходи, енергії зіткнення (CEs) і часи утримування, одержані в описаних умовах РХ-МС / МС, наведені в таблиці 2.8.26.-1 для усіх ПА, які мають контролюватися. Дані параметри вважаються придатними і наведені як приклади; якщо детектор має інші параметри настройки, необхідно їх отрегулювати так, щоб вони відповідали критерію придатності системи:

–іонізація: електророзпилення (ESI)-позитивна;

- напруга іонного розпилення: 3,5 кВ;

–температура капіляра : 270 °С;

–температура розпилювача: 300 °С;

–тиск захисного газу: 310 кПа;

- тиск продувочного (ion sweep) газу: 14 кПа;

–тиск допоміжного (auxiliary) газу: 69 кПа.

Ін'єкція: 10 мкл випробовуваного розчину і стандартних розчинів (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) і (h).

Придатність хроматографічної системи: стандартний розчин (h):

-відношення сигнал / шум: не менше 10 для кожного піка кожного цільового ПА, на відповідній хроматограмі виділених іонів (extracted ion chromatogram).

Параметри калібрувальної прямої: для кожного цільового ПА, визначають значення а і b, використовуючи метод найменших квадратів: $y=a \cdot x+b$

де у – площі піків відповідного цільового ПА на хроматограмах виділеного іону, стандартних розчинів (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) и (h);

а – кутовий коефіцієнт калібрувальної прямої;

x- концентрація відповідного цільового ПА в розчинах порівняння (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) и (h), в мікрограмах на літр;

b- відрізок, що відсікається калібрувальною прямою на осі ординат .

Суму цільових ПА в випробовуваному зразку, в мікрограмах на кілограм (ppb) обчислюють за формулою:

$$\left[\sum_{n=1}^{n=28} \left(\frac{A_n - b_n}{a_n} \right) \right] \times \frac{4}{m}$$

де A_n – площа піка n-ного цільового ПА на хроматограмі виділеного іону;

b_n - відрізок, що відсікається калібрувальною прямою на осі ординат;

a_n – кутовий коефіцієнт калібрувальної прямої;

m – маса наважки випробовуваного зразка, використаного для приготування випробовуваного розчину, в грамах.



2.8.26. Contaminant pyrrolizidine alkaloids

ГЛОСАРІЙ

- **МС високої розділювальної здатності.** Наприклад, Q-TOF (квадрупольно-часопротітний мас-спектрометр). Можна використовувати іонну фрагментацію (AIF), збір даних незалежно від змінних (vDIA/SWATH), переріз зіткнення (CCS / IMS) або відстеження високої енергії (MSE / HD-MRM).
- **Відношення іонів.** Відношення інтенсивності (або площі піку) вибраного менш інтенсивного іона до вибраного більш інтенсивного іона.
- **Точність маси.** Відхилення вимірюваної маси від теоретичної маси іона (справжнє значення). Її можна виразити:
 - – як абсолютне значення (у мДа): *виміряна маса - теоретична маса*; – як відносне значення (у ppm):
- **Матричний холостий розчин.** Відповідна репрезентативна матриця без ПА, яка була оброблена так само, як і випробовуваний зразок, напр. її екстрагують і розчиняють у тому самому розчиннику, що використано для приготування випробовуваного розчину.
- **Стандартний розчин із матрицею.** Відповідна репрезентативна матриця без ПА, яка була оброблена так само, як і випробовуваний зразок, з добавками стандартного розчину ПА.
- **МС/МС.** Наприклад, тандемний мас-спектрометр/потрійний квадрупольний, іонозахватний або Q-захватний. Тандемна мас-спектрометрія (МС/МС або МС2) у режимі обраного або багаторазового реакційного контролю. МС методика, в якій відокремлений родоначальний іон (у більшості випадків молекулярний іон) з процесу первинної іонізації виділяється, фрагментується, як правило, при зіткненні, і детектуються певні дочірні іони.
- **Матриця без ПА.** Матриця, де вміст кожного цільового ПА менший за відповідну межу виявлення.
- **Розчини порівняння.** Стандартний зразок ПА, розчинений у відповідному розчиннику.
- **Бланк розчинника.** Розчинник, який використовується для приготування стандартних розчинів і розчинів порівняння.
- **Матричний зразок з добавками.** До відповідної матриці без ПА додають розчин порівняння ПА, потім обробляють так само, як і випробовуваний зразок, напр. екстрагують і розчиняють у тому ж розчиннику, що використано для приготування випробовуваного розчину.
- **Зразок з добавками.** До відповідної матриці, що може містити ПА, додають розчин порівняння ПА, потім обробляють так само, як і випробовуваний зразок, напр. екстрагують і розчиняють у тому ж розчиннику, що використано для приготування випробовуваного розчину.
- **Робочий діапазон.** Інтервал між верхньою та нижньою концентраціями (включаючи обидві) ПА у зразку, для якого було продемонстровано, що аналітична методика має належний рівень збіжності, правильності та лінійності. Робочий діапазон повинен принаймні охоплювати діапазон від порогу інформування до 5 -кратного значення порогу інформування. Поріг інформування залежить від максимального добового споживання загальної кількості ПА, погодженого компетентним органом, та максимальної дози аналізованого матеріалу



Ph.Eur 10.6

2.8.26. Contaminant pyrrolizidine alkaloids

№	Назва реактиву	Прайс	№	Назва реактиву	Прайс
1	Echimidine	10 MG €758.0	15	Monocrotaline	500 MG €267.0
2	Echimidine N-oxide	5 MG €379.0	16	Monocrotaline N-oxide	10 MG €541.0
3	Erucifoline	5 MG €424.0	17	Retrorsine	10 MG €274.0
4	Erucifoline N-oxide	5 MG €455.0	18	Retrorsine N-oxide	10 MG €476.0
5	Europine hydrochloride	10 MG €628.0	19	Senecionine N-oxide	5 MG €347.0
6	Europine N-oxide	10 MG €628.0	20	Seneciphylline N-oxide	5 MG €390.0
7	Heliotrine	10 MG €368.0	21	Senecivernine	5 MG €379.0
8	Heliotrine N-oxide	10 MG €395.0	22	Senecivernine N-oxide	5 MG €409.0
9	Intermedine N-oxide	5 MG €530.0	23	Senkirkine	10 MG €641.0
10	Jacobine	5 MG €434.0	24	Trichodesmine	10 MG €758.0
11	Jacobine N-oxide	5 MG €455.0	25	Senecionine	10 MG €412.0
12	Lasiocarpine	10 MG €554.0	26	Seneciphylline	10 MG €464.0
13	Lasiocarpine N-oxide	10 MG €580.0	27	Intermedine	10 MG €758.0
14	Lycopsamine N-oxide	5 MG €530.0	28	Lycopsamine	10 MG €758.0

Σ - 13992 €



ВИСНОВКИ

Загальна монографія 2.8.26 “Домішки піролізидинових алкалоїдів” у найближчому майбутньому буде введено до ДФУ.

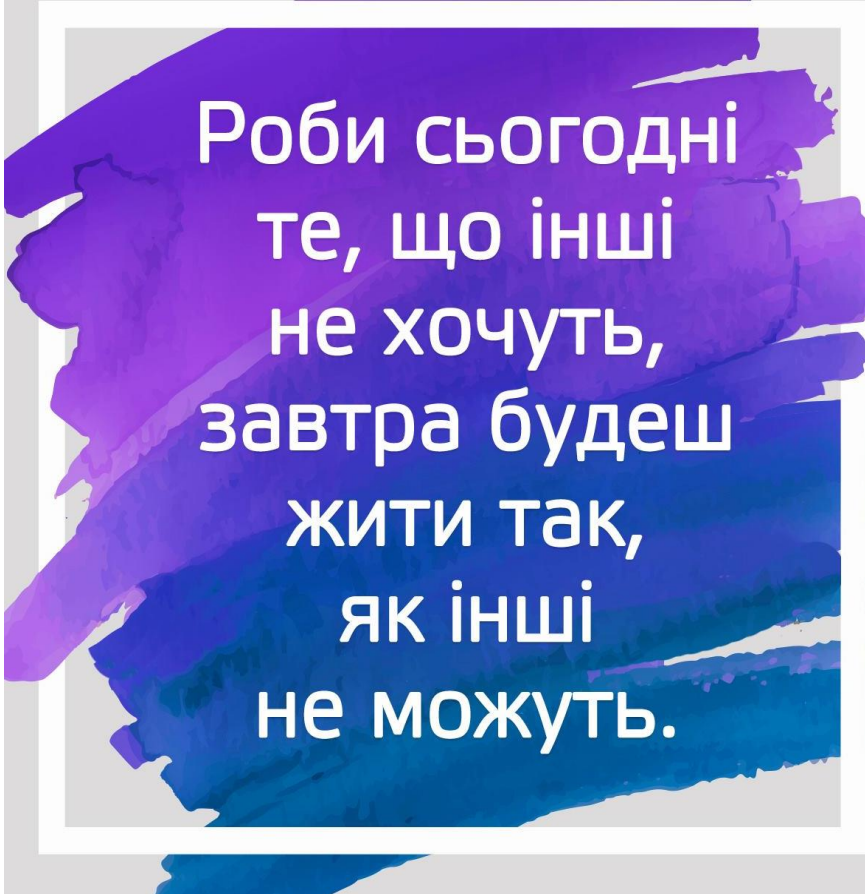
Але це не дає відповіді на цілий ряд питань:

- Компетентний орган в Україні хто має встановлювати регламентовані норми для піролізидинових алкалоїдів
- Хто в Україні повинен і хто зможе виконувати аналіз відповідно до цієї монографії.

Звичайно, на внутрішнє використання ЛРС можливо це поки що ніяк не вплине, хоча ми не рекомендуємо використання Череди трави для дітей з урахуванням усіх отриманих знань.

Однак у разі виходу на Європейський ринок наші виробники ЛРС обов'язково зіткнуться з вимогами до вмісту піролізидинових алкалоїдів у ЛРС.

- Тому не сьогодні, то завтра цю проблему доведеться вирішувати.



Роби сьогодні
те, що інші
не хочуть,
завтра будеш
жити так,
як інші
не можуть.



Дякую за увагу!



Державна Фармакопея України
європейська якість

