

MONITORING PROFILOV ŤAŽKÝCH KOVŮ V MATRICIACH LIEČIVÝCH RASTLÍN, LIEKOV A HOMEOPATICKÝCH PRÍPRAVKOV Z RADU ANTITUSÍK RÁDIONUKLIDOVOU RÖNTGENOFLOURESCENČNOU SPEKTROMETRIOU

OĽGA LUKAČOVIČOVÁ a PETER MIKUŠ

Katedra farmaceutickej analýzy a nukleárnej farmácie,
Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave,
Odbojárov 10, 832 32 Bratislava
lukacovicova@fpharm.uniba.sk

Došlo 24.7.17, prijaté 27.10.17.

Kľúčové slová: rádionuklidová röntgenofluorescenčná spektrometria, antitusiká, stopové prvky, ťažké kovy, farmaceutické matrice

Úvod

Niektoré kovové elementy vykazujú vysoký stupeň toxicity a po ich kumulácii môžu indukovať vážne poškodenia orgánov, dokonca už aj pri nízkom stupni expozície¹. Význam farmaceutickej kontroly liekov, liečiv a pomocných látok, ako aj hodnotenie kvality liečivých rastlín a extraktov z nich na prítomnosť ťažkých kovov je preto zrejmý. Úlohou orgánov zodpovedných za kvalitu liekov a liečivých prípravkov je zabezpečiť ich bezpečnosť a priaznivý účinok. Výsledky podliehajú normám príslušných farmaceutických kódexov a Európskeho liekopisu.

Prechladnutia, virózy alebo chrípky sú obvykle sprevádzané kašľom. Tento obranný mechanizmus podráždenia dýchacích ciest sa dá po cielej diferencijálnej diagnostike liečiť prípravkami na prírodnej báze (liečivé čaje) alebo syntetickými prípravkami s antitusickými účinkami a vo forme homeopatík². Vzhľadom na veľký podiel antitusík na báze rastlinných prípravkov v terapii a súčasne vysoký stupeň znečistenia životného prostredia s dopadom na kumuláciu ťažkých kovov v rastlinnom materiáli, sa kladie dôraz na spoľahlivú analytickú kontrolu obsahu ťažkých kovov v takýchto prípravkoch^{3,4}.

Ťažké kovy sú stanovované vo farmaceutikách a rastlinnom materiáli rôznymi inštrumentálnymi metódami, ako sú elektrochemické metódy^{5,6}, kapilárna elektroforéza^{7,8}, atómová absorpčná spektrometria⁹ či hmotnostná spektrometria s indukčne viazanou plazmou^{10,11}. Rádionuklidová röntgenofluorescenčná spektrometria (RRFS) patrí medzi nukleárne analytické metódy neaktívnej interakčnej analýzy. Experimentálne merania pomocou RRFS sú založené na interakcii rádioaktívneho žiarenia s analyzovanou vzorkou (dominantný je fotoelek-

trický jav). Pri interakcii dochádza k excitácii atómov a následnému uvoľneniu charakteristického fluorescenčného žiarenia. Energia tohto žiarenia je identifikátorom daného prvku a intenzita je kvantitatívnym hodnotením prvku v analyzovanej vzorke. Prednosťami RRFS sú schopnosť multikomponentnej analýzy a možnosť priamej analýzy pevných vzoriek, čo zjednodušuje celkový analytický postup a dovoľuje stanoviť viacero prvkov súčasne^{12–14}.

Cieľom tejto práce bolo demonštrovať analytický a aplikačný potenciál RRFS, ako jednej z liekopisných metód, na identifikáciu a stanovenie vybraných ťažkých kovov v rôznych farmaceuticky relevantných prípravkoch s antitusickým účinkom. Boli ukázané optimálne prístupy pre analýzu uvedených materiálov rôznej konzistencie a vlastností metódou RRFS.

Experimentálna časť

Analýze RRFS boli podrobené vzorky liečivých rastlín: slezový kvet – *Malvae flos* (Megafyt Pharma s.r.o., Vrané nad Vltavou, ČR); pľúcnik lekársky – *Folium pulmonariae* (Juvamed s.r.o., Rimavská Sobota, SR); podbeľ liečivý – *Farfarae folium* (REFKA s.r.o. Nitra, SR); vzorky syntetických prípravkov proti kašľu: Codein Slovofarma 15 mg (Zentiva a.s., Hlohovec, SR), ACC long (Sandoz Pharmaceuticals d.d., Lubľana, Slovinsko) a homeopatiká: Antimonium tartaricum 9CH (Boiron, Francúzsko); Ferrum phosphoricum 9CH (Boiron); Hepar sulfuris calacareum 9CH (Boiron). Všetky vzorky na účel analýzy RRFS boli sušené, homogenizované a lisované do tabliet definovaného tvaru (priemer 20 mm, hrúbka 1 mm) a hmotnosti (0,3000 g).

Na detekciu vzniknutého fluorescenčného žiarenia vybraných prvkov Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Pb vo vzorkách bol použitý polovodičový Si/Li detektor s pracovným napätím 500 V (ÚJV Řež u Prahy, ČR), ktorý umožňuje znížiť podiel nestanovovaných elementov v spektre na minimum. Za účelom dosiahnutia účinnej excitácie prvkov bolo použité geometrické usporiadanie vzorka-zdroj-detektor: axiálna geometria, so zdrojom žiarenia umiestneným na okraj detektora^{15,16}. Ako budiaci rádionuklidový zdroj žiarenia bol použitý ²³⁸Pu (polčas premeny 86,4 roka, aktivita 880 MBq, energia 12–22 keV; výrobca Amer-sham, Veľká Británia).

Kvalitatívne hodnotenie bolo založené na identifikácii energetických línií prislúchajúcich jednotlivým prvkom v nameranom spektre pomocou štandardov oxidov týchto prvkov (Lachema ČR, Slovenský metrologický ústav, SR). Na vyhodnotenie obsahu prvkov vo vzorkách bola použitá metóda štandardného prídavku s následným vysušením, homogenizáciou a lisovaním tabliet. Signály prvkov vo vzorkách boli korigované o neanalytický signál. V prípade materiálov, ktoré neumožňovali homogénne zavedenie štandardného prídavku priamo do pôvodnej matrice a/alebo prípravu tablety požadovaných parametrov (veľkosť, mechanická stabilita), boli študované a navrhnuté alternatívne matrice.

Výsledky a diskusia

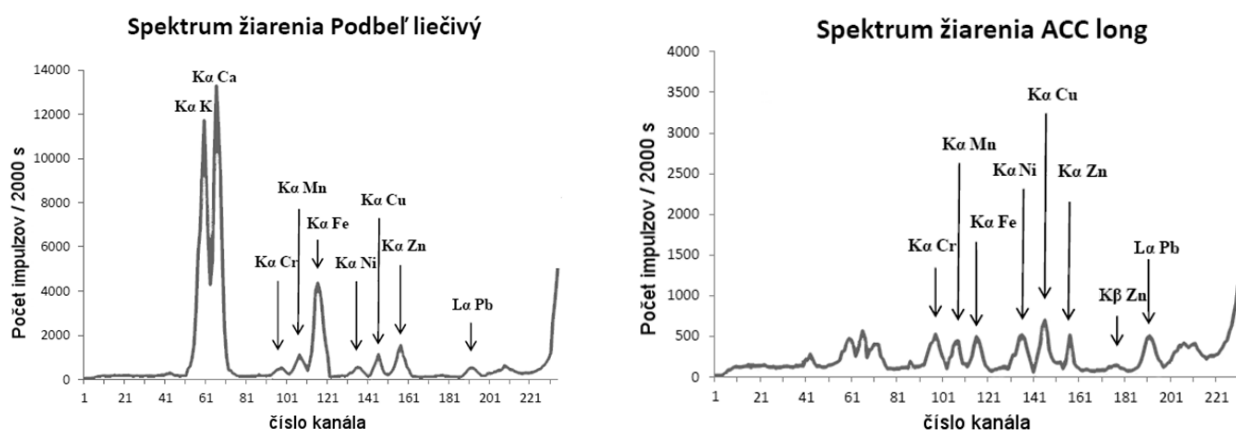
Komerčne dostupné a často používané prípravky s antitusickým účinkom zahŕňajú okrem syntetických farmaceutík aj bylinné čajové zmesi a homeopatiká. Vývoj analytického postupu pre analýzu vybraných ťažkých kovov ako kontaminantov zohľadňoval štruktúrnu rozmanitosť a rozdielne vlastnosti takýchto materiálov. Potreba multikomponentnej analýzy a minimalizácia prípravy vzorky favorizovali výber RRFS ako analytickej metódy. Tá umožnila priamu analýzu všetkých uvedených materiálov vo forme pevných štandardizovaných tabliet bez potreby izolácie ťažkých kovov a ich následného stanovenia v extrahovaných vzorkách. Ako príklad slúžia ilustratívne RRFS profily vybraných ťažkých kovov v syntetickom a rastlinnom prípravku na obr. 1.

Viacere analyzované materiály však boli problematické z hľadiska implementácie štandardov analyzovaných kovových iónov do príslušných tabliet. V takýchto prípadoch nebolo možné uplatniť metódu štandardného prídavku priamo na analyzovaný materiál a bolo potrebné nájsť vhodnú externú maticu, ktorá by bola s takýmito materiálmi konzistentná čo do prvkového zloženia a neanalytického signálu. V skupine rastlinných materiálov má podbeľ liečivý (*Farfarae folium*) vatovitú nepoddajnú konzistenciu. Syntetický ACC long je šumivý prípravok rozpadávajúci sa vo vodnom prostredí. Všetky vybrané vzorky homeopatiík sú vo forme tvrdých granúl, ťažko sa homogenizujú a pripravené tablety sú krehké a rýchlo sa rozštiepujú.

Vhodnými reálnymi maticami pre priamu analýzu, ktoré zároveň predstavovali preparáty s antitusickým účinkom zahrnuté do prezentovanej štúdie, boli *Malvae flos* a *Folium pulmonariae* (v skupine rastlinných materiálov), a Codein (v skupine syntetických farmaceutík). V prípade komplikovaných rastlinných materiálov (*Farfarae folium*), ktoré neumožňovali homogénne zavedenie štandardného prídavku priamo do pôvodnej matrice, bola na-

vrhnutá alternatíva v podobe matrice lucerny siatej – *Medicago sativa L.* (má porovnateľné reálne pozadie a podobné obsahové zastúpenie prvkov ako mali problematické rastlinné materiály). Pre komerčné farmaceutické tablety (ACC long) bola navrhnutá fyzikálno-chemicky stabilná a cenovo výhodná alternatíva matrice v podobe kyseliny benzoovej, ktorá vykazovala podobný neanalytický signál ako hodnotené komerčné liekové formy. V prípade homeopatiík sa ako vhodná alternatívna matrica pre bezproblémovú implementáciu štandardných prídavkov roztokov kovov zase ukázal dextrans.

Praktická použiteľnosť navrhnutých externých matric bola overená porovnaním výsledkov získaných analýzou štandardných prídavkov kovov vo vhodných reálnych maticiach a v týchto externých maticiach. Výsledky vykazovali akceptovateľné rozdiely v kalibračných parametroch, ako aj v stanovení obsahu vybraných ťažkých kovov, keď boli priamo analyzované pôvodné reálne matrice a keď bola uskutočnená analýza prostredníctvom vybraných externých matric. Správnosť metódy vyjadrená relatívnymi chybami (pomery obsahov ťažkých kovov nájdených v reálnej matrici jej priamou analýzou a analýzou cez externú maticu) bola akceptovateľná; relatívne chyby sa pohybovali v intervaloch 1–5 % (*Medicago sativa* vs. *Malvae flos*), 3–6 % (*Medicago sativa* vs. *Folium pulmonariae*), 0,5–7 % (Codein vs. kyselina benzoová) a 1–4 % (Codein vs. Dextrans). Detekčné limity ($\mu\text{g g}^{-1}$) pre jednotlivé prvky boli vypočítané z korigovaných nameraných signálov štandardov kovov, ktorých hodnota vzhľadom na šum detektora (σ) bola $3\sigma^{1/2}$. Hodnoty vypočítané pre biologickú maticu (použitím *Medicago sativa*): Cr: $2,77 \mu\text{g g}^{-1}$, Mn: $2,24 \mu\text{g g}^{-1}$, Fe: $3,62 \mu\text{g g}^{-1}$, Ni: $1,58 \mu\text{g g}^{-1}$, Cu: $2,31 \mu\text{g g}^{-1}$, Zn: $1,95 \mu\text{g g}^{-1}$ a Pb: $1,33 \mu\text{g g}^{-1}$, farmaceutickú maticu (použitím kyseliny benzoovej): Cr: $2,32 \mu\text{g g}^{-1}$, Mn: $2,16 \mu\text{g g}^{-1}$, Fe: $3,98 \mu\text{g g}^{-1}$, Ni: $1,52 \mu\text{g g}^{-1}$, Cu: $2,26 \mu\text{g g}^{-1}$, Zn: $1,78 \mu\text{g g}^{-1}$ a Pb: $1,36 \mu\text{g g}^{-1}$, maticu homeopatiík (použitím dextransu): Cr: $2,48 \mu\text{g g}^{-1}$,



Obr. 1. RRFS analýza syntetického a rastlinného prípravku zo skupiny antitusik. Spektrum žiarenia po interakcii rádionuklidového zdroja žiarenia ^{238}Pu so vzorkami ACC long a Podbeľ liečivý. Profily boli získané RRFS analýzou štandardizovaných tabliet pôvodných matric, zatiaľ čo pre kvantitatívne hodnotenie vybraných ťažkých kovov boli použité kalibračné parametre a hodnotenie štandardných prídavkov získané z vhodných externých matric (kyselina benzoová pre syntetický prípravok, *Medicago sativa L.* pre rastlinný materiál)

Tabuľka I

Aplikácia RRFs na hodnotenie ťažkých kovov v rôznych antitusických prípravkoch^{b, c}

Vzorka ^a	Obsah prvkov [$\mu\text{g g}^{-1}$]						
	Cr	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	Pb
1	<L _D	24,74	62,81	<L _D	14,51	23,05	<L _D
	–	1,54	1,48	–	1,37	0,85	4,55
2	<L _D	43,88	56,25	<L _D	18,88	23,05	<L _D
	3,94	1,65	1,77	–	2,71	2,15	–
3	<L _D	14,13	38,59	<L _D	11,68	9,35	<L _D
	4,55	3,41	1,67	–	2,31	2,33	3,94
4	<L _D	3,03	3,86	<L _D	<L _D	<L _D	<L _D
	–	1,85	2,51	–	1,74	–	–
5	2,74	2,26	6,25	<L _D	<L _D	<L _D	<L _D
	1,85	2,23	1,74	2,11	1,74	–	2,69
6	<L _D	3,09	3,63	<L _D	2,90	1,89	<L _D
	–	3,28	2,66	5,91	3,34	1,42	–
7	<L _D	7,99	15820	<L _D	3,04	2,09	<L _D
	3,48	2,54	2,33	4,92	3,19	1,93	–
8	<L _D	3,09	3,02	<L _D	<L _D	<L _D	<L _D
	–	3,28	3,19	–	5,37	4,22	–

^a 1 *Malvae flos*, 2 *Folium pulmonariae*, 3 *Farfarae folium*, 4 Codein, 5 ACC long, 6 Antimonium tartaricum 9CH, 7 Ferrum phosphoricum 9CH, 8 Hepar sulfuris calcareum 9CH, ^b <L_D – označuje prvky, u ktorých bol zaznamenaný analytický signál (s príslušnou hodnotou s_r pre plochu píku) pod hodnotou limitu detekcie, prípadne nebol zaznamenaný žiadny analytický signál (–). Obsahy kovov boli počítané na základe priamej analýzy pôvodných vzoriek s výnimkou *Farfarae folium*, ACC long a homeopatik (počítané jednotlivo na externej matrici *Medicago sativa L.*, kyseliny benzoovej a dextráne), ^c s_r [%], n=3

Mn: 2,19 $\mu\text{g g}^{-1}$, Fe: 3,19 $\mu\text{g g}^{-1}$, Ni: 1,47 $\mu\text{g g}^{-1}$, Cu: 2,29 $\mu\text{g g}^{-1}$, Zn: 1,84 $\mu\text{g g}^{-1}$ a Pb: 1,41 $\mu\text{g g}^{-1}$, boli pod úrovňami povolených limitov pre tieto kovy podľa príslušných vyhlášok a výnosov.

Metóda RRFs umožnila citlivé a reprodukovateľné stanovenie vybraných ťažkých kovov v komerčných antitusických prípravkoch (viď tab. I). Z hodnôt obsahov jednotlivých analyzovaných kovov je vidieť, že rozdielne antitusické prípravky obsahujú rôzne hladiny týchto kontaminantov, porovnaj napríklad ilustratívne profily vybraných ťažkých kovov v syntetickom a rastlinnom prípravku na obr. 1. Vo všetkých prípadoch však boli tieto hladiny pod prípustnými množstvami a teda splňajú požiadavky príslušných vyhlášok a výnosov. Prípustné množstvá kontaminantov v potravinách podľa Potravinového kódexu z Výnosu MP SR a MZ SR z 15. marca 2004 č. 608/3/2004-100 (prílohy č. 2 k X. hlave II. časti Potravinového kódexu; časť A – Chemické prvky) sú pre chróm 4,0 mg/kg pre ostatné potraviny, pre olovo 10 mg kg⁻¹ pre čaje na prípravu nápoja, pre meď 150,0 mg kg⁻¹ pre čaje na prípravu nápoja a 25,0 mg kg⁻¹ pre ostatné potraviny, pre nikel 6,0 mg kg⁻¹ pre výživové doplnky. Podľa Vyhlášky MZ SR 2/1994 sú prípustné množstvá kontaminantov pre

železo 15,0 mg kg⁻¹ pre nápoje a BOO pre ostatné požívatinu a pre zinok 80 mg kg⁻¹ pre ostatné požívatinu.

Záver

Záverom možno konštatovať, že RRFs metóda poskytuje jednoduché, rýchle a spoľahlivé riešenie pre analýzu zmesi ťažkých kovov v rôznorodých pevných materiáloch rastlinného aj syntetického pôvodu. Veľkou výhodou je priama analýza pevných vzoriek bez potreby extrakcie analyzovaných látok (tu ťažkých kovov) do kvapalnej fázy, čo má dopad nielen na minimalizáciu chýb vnášaných do analytického procesu, ale aj na priaznivú cenu takýchto rutinných analýz. Navrhnutý postup kombinujúci RRFs metódu s externými matricami na báze *Medicago sativa L.*, kyseliny benzoovej a dextránu našiel praktické uplatnenie pre analýzu širokého spektra antitusických prípravkov, a osvedčil sa najmä v prípadoch analýzy problematických materiálov rastlinného aj syntetického pôvodu, ktoré neumožňujú alebo majú komplikovanú homogénnu implementáciu štandardných prídavkov do ich štandardizovaných tabletových foriem. Navrhnuté externé matrice

boli konzistentné s pôvodnými z hľadiska matricového efektu, a umožnili jednoduchú a reprodukovateľnú prípravu tabliet so štandardnými prídavkami pre ich následnú RRFS analýzu. RRFS metóda aplikovaná na pôvodné alebo externé matrice tak umožnila efektívnu a ekonomicky výhodnú kontrolu antitusických prípravkov na obsahy vybraných ťažkých kovov podľa platných vyhlášok a noriem a je doporučená pre rutinné použitie v kontrolných laboratóriách.

Táto práca bola podporená projektami VEGA 1/0873/15, KEGA 022UK-4/2015 a APVV-15-0585.

LITERATÚRA

- Abdulla M., Chmielnicka J.: *Biol. Trace Elem. Res.* **23**, 25 (1989).
- Zacharias F., Guimarães J. E., Araújo R. R., Almeida M. A. O., Ayres M. C. C., Bavia M. E., Mendonça-Lima F. W.: *Homeopathy* **97**, 141 (2008).
- Nazir R., Khan M., Masab M., Rehman H. U., Rauf N. U., Shahab S., Ameer N., Sajed M., Ullah M., Rafeeq M., Shaheen Z.: *J. Pharm. Sci. Res.* **7**, 89 (2015).
- Desideri D., Cantaluppi C., Ceccotti F., Meli M. A., Roselli C., Feduzi L.: *J. Toxicol. Environ. Health, Part A* **79**, 391 (2016).
- Zaib M., Athar M. M., Saeed A., Farooq U.: *Biosens. Bioelectron.* **74**, 895 (2015).
- Rosolina S. M., Chambers J. Q., Lee C. W., Xue Z. L.: *Anal. Chim. Acta* **893**, 25 (2015).
- Kuśmierk K., Chwatko G., Głowack R., Kubalcyk P., Bład E.: *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **879**, 1290 (2011).
- Rovio S., Sirén K., Sirén H.: *Food Chem.* **124**, 1194 (2011).
- Špirić Z., Vučković I., Stafilov T., Frontasyeva M.: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **65**, 33 (2013).
- Barin J. S., Mello P. A., Mesko M. F., Duarte F. A., Flores E. M. M.: *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 4547 (2016).
- Rudovica V., Viksna A., Actins A.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **91**, 119 (2014).
- Tölgyessy J., Havránek E., Dejmková E.: *Rádionuklidová röntgenofluorescenčná analýza zložiek živočíšného prostredia*. Alfa, Bratislava 1983.
- Da-Col J. A., Bueno M. I. M. S., Melquiades F. L.: *J. Agric. Food Chem.* **63**, 2406 (2015).
- Dalipi R., Marguí E., Borgese L., Depero L. E.: *Food Chem.* **218**, 348 (2017).
- Sun Y., Gleber S. Ch., Jacobsen Ch., Kirz J., Vogt S.: *Ultramicroscopy* **152**, 44 (2015).
- Wrobel P., Czyzycki M.: *Talanta* **113**, 62 (2013).

O. Lukačovičová and P. Mikuš (*Department of Pharmaceutical Analysis and Nuclear Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Comenius University in Bratislava, Bratislava*): **Monitoring of Heavy Metal Profiles in Medicinal Plants, Drugs and Homeopathic Products from Group of Antitussives by Means of Radionuclide X-ray Fluorescence Spectrometry**

Reliable, fast, simple and low-cost analytical procedure based on radionuclide X-ray fluorescence spectrometry (RRFS) was proposed to identify and determine heavy metals in various antitussive preparations of synthetic and biological origin. Various materials (tablet dosage forms, granules, plants) can be analyzed directly without the need of isolation of the analyzed compounds from their matrices so that errors in the analytical process are minimized. External matrices, such as *Medicago sativa L.*, benzoic acid, and dextran were proposed to quantify heavy metals in some problematic materials (*Farfaraeae folium*, effervescent tablets of medicine ACC long, hard capsules of various homeopathics, respectively) that had not allowed homogeneous implementation of standard addition of analyzed elements into the standardized tablet forms used for the RRFS analysis. The appropriate external matrices were consistent with the original ones in terms of matrix effects (e.g., background noise produced and approximate levels of naturally occurring heavy metals studied), and they allowed to prepare well defined tablets including required amounts of the standard additions of heavy metals providing proper calibration parameters. The RRFS method applied for the original or external matrices enabled an effective and economic control of antitussive preparations for selected heavy metals contents evaluated according to the established directives and laws. Hence, it is recommended for a routine use in quality control laboratories.