

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALEŠ JUDEŽ

MAGISTRSKA NALOGA
MAGISTRSKI ŠTUDIJ INDUSTRIJSKE FARMACIJE

Ljubljana, 2012

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



ALEŠ JUDEŽ

**RAZVOJ IN VALIDACIJA ANALIZNEGA POSTOPKA ZA
DOLOČANJE KADMIJA, SVINCA IN NIKLJA V MAGNEZIJEVEM
STEARATU Z MASNO SPEKTROMETRIJO Z INDUKTIVNO
SKLOPLJENO PLAZMO (ICP-MS)**

**DETERMINATION OF CADMIUM, LEAD AND NICKEL IN
MAGNESIUM STEARATE BY INDUCTIVELY COUPLED PLASMA
MASS SPECTROMETRY (ICP-MS): ANALYTICAL METHOD
DEVELOPMENT AND VALIDATION**

Ljubljana, 2012

Diplomsko nalogo sem opravljal v podjetju Krka d.d., Novo mesto, v Razvoju in raziskavah – Razvoj analitike, pod mentorstvom doc. dr. Jožka Cesarja, mag. farm.

Zahvala

Za strokovne nasvete ter pomoč pri izdelavi magistrske naloge se iskreno zahvaljujem mentorju doc. dr. Jožku Cesarju, mag. farm.

Zahvaljujem se tudi sodelavki Draženki in Heleni za pomoč pri delu v laboratoriju.

Posebna zahvala pa gre moji družini, Maji, Oti in Tjašu, ki so mi v času študija stali ob strani.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelal samostojno pod mentorstvom doc. dr. Jožka Cesarja, mag. farm.

Aleš Judež

KAZALO

POVZETEK.....	1
ABSTRACT	3
SEZNAM OKRAJŠAV	4
1 UVOD	6
1.1 TEŽKE KOVINE	6
1.1.1 Težke kovine kot nečistote v farmaciji	7
1.2 REGULATORNE OSNOVE ZA DOLOČANJE KOVIN V SUBSTANCAH ZA FARMACEVTSKO UPORABO (SFU)	8
1.2.1 Farmakopejske metode za določanje kovin	8
1.2.2 Določanje kovin, ki izvirajo iz kovinskih katalizatorjev in reagentov	9
1.3 NIKELJ, KADMIJ IN SVINEC	10
1.3.1 Lastnosti in toksikološki podatki niklja	10
1.3.2 Lastnosti in toksikološki podatki kadmija	11
1.3.3 Lastnosti in toksikološki podatki svinca	12
1.4 MAGNEZIJEV STEARAT	15
1.5 MASNA SPEKTROMETRIJA Z INDUKTIVNO SKLOPLJENO PLAZMO (ICP-MS).....	16
1.5.1 Sistem za vnos vzorca.....	18
1.5.2 Induktivno sklopljena plazma (ICP)	19
1.5.3 Plazemsko vakuumski vmesnik	21
1.5.4 Sistem ionskih leč	22
1.5.5 Masni analizator.....	22
1.5.6 Masni detektor (elektronska pomnoževalka) in sistem za obdelavo podatkov.....	24
1.6 VALIDACIJA ANALIZNE METODE.....	25
2 NAMEN DELA.....	30
3 EKSPIREMENTALNI DEL	31
3.1 MATERIALI.....	31

3.1.1 Delovni standardi	31
3.1.2 Reagenti	31
3.1.3 Topila	31
3.1.4 Vzorci magnezijevega stearata	31
3.2 APARATURE	32
3.3 METODE	33
3.3.1 ICP-MS metoda z dodatkom internega standarda in direktno kalibracijo	33
3.3.1.1 Priprava standardnih raztopin	33
3.3.1.2 Priprava raztopin vzorcev (RV)	35
3.3.1.5 Pogoji merjenja z ICP-MS	38
3.3.2 AAS (ETAAS) metoda s standardnim dodatkom - Ph. Eur metoda (poglavje 2.2.23., metoda II)	39
3.3.2.1 Priprava raztopine vzorca (RV-AAS)	39
3.3.2.2 Priprava osnovnih in delovnih standardnih raztopin za validacijo metode	39
3.3.2.3 Pogoji merjenja z AAS (ETAAS)	44
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	46
4.1 VALIDACIJA ANALIZNEGA POSTOPKA ZA HKRATNO DOLOČANJE NIKLJA, KADMIJA IN SVINCA Z ICP-MS	46
4.1.1 Točnost metode	46
4.1.2 Natančnost (ponovljivost) ICP-MS metode in sistema	51
4.1.1 Linearnost ICP-MS metode	53
4.1.4 Stabilnost standardnih raztopin in raztopin vzorcev	56
4.1.5 Robustnost metode	57
4.1.6 Meja zaznavnosti (LOD) in meja določljivosti (LOQ)	59
4.2 FARMAKOPEJSKA METODA AAS (ETAAS) ZA DOLOČANJE NIKLJA, KADMIJA IN SVINCA	61
4.2.1 Meja zaznavnosti (LOD) in meja določljivosti (LOQ)	61
4.2.2 Natančnost (ponovljivost) AAS metode z metodo standardnih dodatkov	62
4.3 DOLOČANJE VSEBNOSTI NIKLJA, KADMIJA IN SVINCA V MAGNEZIJEVEM STEARATU	64
4.3.1 Določanje niklja, kadmija in svinca z ICP-MS metodo	64
4.3.2 Določanje vsebnosti niklja, kadmija in svinca v magnezijevem stearatu z AAS (ETAAS) metodo	65

5 SKLEP.....	67
6 LITERATURA.....	69

KAZALO TABEL

<i>Tabela 1: Škodljivi učinki različnih koncentracij svineca pri otrocih</i>	13
<i>Tabela 2: Priprava in koncentracije delovnih standardnih raztopin</i>	33
<i>Tabela 3: Temperaturni program za razkroj vzorcev v mikrovalovni peči</i>	35
<i>Tabela 4: Priprava mešanice standardnih raztopin niklja, kadmija in svineca za natančnost (ponovljivost metode in sistema)</i>	36
<i>Tabela 5: Priprava mešanice standardnih raztopin niklja, kadmija in svineca za točnost metode pri okoli 50 % limitni vrednosti</i>	37
<i>Tabela 6: Priprava mešanice standardnih raztopin niklja, kadmija in svineca za točnost metode pri 100 % limitni vrednosti</i>	37
<i>Tabela 7: Priprava mešanice standardnih raztopin niklja, kadmija in svineca za točnost metode pri okoli 150 % limitni vrednosti</i>	38
<i>Tabela 8: Temperaturni program za razkroj vzorcev v mikrovalovni peči</i>	39
<i>Tabela 9: Priprava in koncentracije delovnih standardnih raztopin niklja (DSR-Ni)</i>	40
<i>Tabela 10: Priprava delovnih standardnih raztopin niklja (DSRP-Ni)</i>	41
<i>Tabela 11: Priprava in koncentracije delovnih standardnih raztopin kadmija (DSR-Cd)</i>	42
<i>Tabela 12: Priprava delovnih standardnih raztopin kadmija (DSRP-Cd)</i>	42
<i>Tabela 13: Priprava in koncentracije delovnih standardnih raztopin svineca (DSR-Pb)</i>	43
<i>Tabela 14: Priprava delovnih standardnih raztopin svineca (DSRP-Pb)</i>	44
<i>Tabela 15: 50 %, 100 % in 150 % limitne vrednosti niklja, kadmija in svineca v vzorcu</i>	46
<i>Tabela 16: Točnost metode pri dodani okoli 50 % limitni vrednosti niklja (2,5 ppm), kadmija (1,25 ppm) in svineca (5 ppm) v vzorcu</i>	48
<i>Tabela 17: Točnost metode pri dodani 100 % limitni vrednosti niklja (5 ppm), kadmija (2,5 ppm) in svineca (10 ppm) v vzorcu</i>	49
<i>Tabela 18: Točnost metode metode pri dodani okoli 150 % limitni vrednosti niklja (7,5 ppm), kadmija (5 ppm) in svineca (15 ppm) v vzorcu</i>	50
<i>Tabela 19: Natančnost (ponovljivost) metode za vzorec, ki vsebuje 5 ppm niklja, 2,5 ppm kadmija in 10 ppm svineca</i>	52
<i>Tabela 20: Natančnost (ponovljivost) sistema za vzorec, ki vsebuje 5 ppm niklja, 2,5 ppm kadmija in 10 ppm svineca</i>	53
<i>Tabela 21: Povprečni odziv c/s v koncentracijskem območju od 1 do 50 µg/l in enačbe regresijskih premic</i>	54
<i>Tabela 22: Prikaz stabilnosti standardne raztopine, koncentracije 10 µg/l</i>	56

<i>Tabela 23: Prikaz stabilnosti raztopin vzorcev.</i>	56
<i>Tabela 24: Sprememba parametrov mikrovalovnega razkroja (znižanje temperature, daljši čas za doseganje končne temperature).</i>	57
<i>Tabela 25: Prikaz rezultatov pri spremenjenih parametrih mikrovalovnega razkroja.</i>	57
<i>Tabela 26: Sprememba parametrov mikrovalovnega razkroja (višja temperatura, krajši čas zadrževanja temperature).</i>	58
<i>Tabela 27: Prikaz rezultatov pri spremenjenih parametrih mikrovalovnega razkroja.</i>	58
<i>Tabela 28: Sprememba moči plazme (1,4 kW) in pretoka vzorca (3 rpm).</i>	58
<i>Tabela 29: Študija meje zaznavnosti (LOD) in meje določljivosti (LOQ).</i>	59
<i>Tabela 30: Prikaz meje zaznavnosti (LOD) in meje določljivosti (LOQ) za natehto 0,1 g in volumen 50 ml.</i>	60
<i>Tabela 31: Ocenjena koncentracija za določanje meje zaznavnosti (LOD) iz rezultatov meritev raztopin vzorca.</i>	60
<i>Tabela 32: Meja zaznavnosti (LOD) in meja določljivosti (LOQ).</i>	61
<i>Tabela 33: Primerjava LOD in LOQ metode ICP-MS in AAS (ETAAS).</i>	62
<i>Tabela 34: Natančnost (ponovljivost) metode z metodo standardnih dodatkov.</i>	63
<i>Tabela 35: Natančnost (ponovljivost) metode ICP-MS in AAS (ETAAS).</i>	63
<i>Tabela 36: Vsebnosti niklja, kadmija in svinca v različnih vzorcih magnezijevega stearata z metodo ICP-MS.</i>	64
<i>Tabela 37: Rezultati vsebnosti niklja, kadmija in svinca v različnih vzorcih magnezijevega stearata z metodo AAS (ETAAS).</i>	65

KAZALO SLIK

<i>Slika 1: Periodni sistem elementov. Med težke kovine uvrščamo prehodne kovine (vijolično obarvanje), nekatere metaloide (temno zeleno obarvanje), šibke kovine (temno modro obarvanje, razen alkalijskih in zemljoalkalijskih kovin), ter lantanoide in aktinoide (svetlo modro obarvanje).</i>	6
<i>Slika 2: Tvorba vodikovega sulfida iz tiocetamida v kislem</i>	8
<i>Slika 3: Prikaz delcev magnezijevega stearata z metodo vrstičnega elektronskega mikroskopa (SEM) pri 600 kratni povečavi</i>	15
<i>Slika 4: Osnovna shema ICP-MS sistema</i>	17
<i>Slika 5: Natančnejši prikaz komponent enega izmed modelov sistema ICP-MS</i>	18
<i>Slika 6: Skica razpršilne komore</i>	19
<i>Slika 7: Prikaz kvarčne cevi oziroma plamenice</i>	20
<i>Slika 8: Prikaz procesa v ICP-MS od vnosa vzorca do analize na masnem detektorju</i>	20
<i>Slika 9: Fotografija vzorčevalnega in posnemalnega stožca</i>	21
<i>Slika 10: Skica vmesnika (vzorčevalni in posnemalni stožec, med njima je vakuumška komora)</i>	21
<i>Slika 11: Skica elektronskih leč, skozi katere potuje snop ionov</i>	22
<i>Slika 12: Predstavitev trajektorije ionov v masnem analizatorju (kvadrupol)</i>	23
<i>Slika 13: Shematski prikaz delovanja masnega detektorja elektronske pomnoževalke</i>	24
<i>Slika 14: Graf linearnosti za nikelj v območju od 1 do 50 µg/l</i>	54
<i>Slika 15: Graf linearnosti za kadmij v območju od 1 do 50 µg/l</i>	55
<i>Slika 16: Graf linearnosti za svinec v območju od 1 do 50 µg/l</i>	55

POVZETEK

Sedaj uveljavljene metode za določanje vsebnosti težkih kovin kot nečistot v substancah za farmacevtsko uporabo in v gotovih zdravilih v precejšnji meri temeljijo na limitnem testu tvorbe obarvanih sulfidov ter nam kot take podajajo nespecifične in pogosto nezanesljive informacije, zato se v naslednjih letih na tem področju pripravljajo občutne spremembe. Sodobne inštrumentalne metode nam omogočajo znatno občutljivejšo in bolj zanesljivo analizo toksičnih elementov v farmacevtskih izdelkih ter tako izboljšano kontrolo kakovosti in večjo varnost pacientov.

Magnezijev stearat je ena od zelo pogosto uporabljenih pomožnih snovi v proizvodnji zdravil. Največkrat se uporablja kot drsljivec pri izdelavi kapsul in tablet v koncentracijah med 0,25 % do 5,0 %. Evropska farmakopeja v monografiji magnezijevega stearata med preizkusi predpisuje določanje kadmija, svinca in niklja z atomsko absorpcijsko spektroskopijo (AAS) z metodo standardnih dodatkov. Njihova vsebnost je zaradi toksičnosti omejena na 3.0 ppm (Cd), 10.0 ppm (Pb) in 5.0 ppm (Ni). Predpisana metoda je sicer specifična in dovolj občutljiva, vendar časovno zamudna, saj določamo vsak element posebej, hkrati pa je zaradi standardnih dodatkov k vzorcu potrebno veliko število raztopin in meritev.

Kot alternativno metodo smo razvili postopek določanja Cd, Pb in Ni z masno spektrometrijo z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS) z metodo zunanega standarda oz. direktno kalibracijo, ki nam omogoča hkratno določanje vseh treh elementov, kar bistveno skrajša čas analize. Analizni postopek smo validirali v skladu z ICH smernicami za validacijo analiznih metod in novim poglavjem ameriške farmakopeje za določanje elementnih nečistot (*233> Elemental Impurities – Procedure*) ter potrdili njegovo točnost, natančnost, linearnost in robustnost. Razviti ICP-MS postopek v primerjavi s farmakopejskim AAS postopkom dosega bistveno nižje meje določljivosti ter boljšo natančnost (ponovljivost). Njegovo primernost za določanje Ni, Cd in Pb v magnezijevem stearatu smo potrdili z analizo štirih različnih vzorcev magnezijevega stearata z obema metodama (ICP-MS in AAS), ki sta dali primerljive rezultate.

Ocenjujemo, da je ICP-MS postopek zaradi svoje specifičnosti in občutljivosti nadvse primeren za določanje številnih toksičnih elementov v substancah za farmacevtsko uporabo in v gotovih zdravilih.

ABSTRACT

Current well-established methods for the determination of the content of heavy metals as impurities in substances for pharmaceutical use and in finished medicinal products are largely based on the limit test of formation of coloured sulfides. As such, they provide unspecific and often unreliable information. Therefore, significant changes are expected in this area in the next years. Modern instrumental methods enable significantly more sensitive and more reliable analysis of toxic elements in pharmaceutical products and consequently improved quality control and greater safety for the patients.

Magnesium stearate is one of the most commonly used excipients in the manufacture of medicines. Usually it is used as a lubricant in the preparation of capsules and tablets at concentrations between 0.25% and 5.0%. The Tests chapter of the Magnesium stearate monograph in the European Pharmacopoeia prescribes the cadmium, lead and nickel determination by atomic absorption spectroscopy (AAS) using the standard additions method. Due to toxicity, their content is limited to 3.0 ppm (Cd), 10.0 ppm (Pb) and 5.0 ppm (Ni). The prescribed method is specific and sensitive, but on the other hand it is also time-consuming since each element is determined individually and at the same time, a large number of solutions and measurements are required because of standard additions to the sample.

As an alternative method, we have developed a procedure for the determination of Cd, Pb and Ni by mass spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-MS) using the external standard method (the direct calibration). It allows the simultaneous determination of all three elements, which significantly reduces the time of analysis. The analytical procedure was validated according to ICH guidelines for validation of analytical methods and a new chapter of American Pharmacopoeia (USP) for the determination of elemental impurities (233> *Elemental Impurities - Procedure*). Its accuracy, precision, linearity and robustness were confirmed. When compared to pharmacopoeial AAS method the ICP-MS procedure shows much lower limit of quantitation and better precision (repeatability). Its suitability for the determination of Ni, Cd and Pb in Magnesium stearate was confirmed by the analysis of four different samples of Magnesium stearate with both methods (ICP-MS and AAS) which gave comparable results.

We estimate that because of its specificity and sensitivity, the ICP-MS procedure is highly appropriate for determining the number of toxic elements in substances for pharmaceutical use and finished pharmaceutical products.

SEZNAM OKRAJŠAV

AAS - Atomska absorpcijska spektrometrija

BU - Biološka uporabnost

BP - Britanska farmakopeja (*British Pharmacopoeia*)

c/s - Zadetek iona v eni sekundi

DNA - Deoksiribonukleinska kislina

EMA - Evropska agencija za zdravila (*European Medicines Agency*)

ETAAS - Elektrotermična atomska absorpcijska spektrometrija

FDA - Ameriški urad za hrano in zdravila (*Food and Drug Administration*)

ICP-MS - Masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*)

ICR - Ionsko ciklotronsko resonančni analizator (*Ion Cyclotron Resonance*)

IUPAC - Mednarodna unija za čisto in uporabno kemijo (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

JP - Japonska farmakopeja (*Japan Pharmacopoeia*)

LD₅₀ - Srednja letalna koncentracija

LOD - Meja zaznavnosti (*Limit of Detection*)

LOQ - Meja določljivosti (*Limit of Quantitation*)

m/z - Razmerje med maso in nabojem

NOEL - Najvišja koncentracija, pri kateri še ne zaznamo učinka (*No Observed Effect Level*)

PDE - Dovoljena dnevna izpostavljenost (*Permitted Daily Exposure*)

RNA - Ribonukleinska kislina

Ph. Eur - Evropska farmakopeja (*European Pharmacopoeia*)

RSD - Relativna standardna deviacija

SD - Standardna deviacija

SFU - Substanca za farmacevtsko uporabo

TOF - Analizator na čas preleta ionov (*Time of Flight*)

USP - Ameriška farmakopeja (*United States Pharmacopoeia*)

WHO - Svetovna zdravstvena organizacija (*World Health Organization*)

ZU - Zdravilna učinkovina

1 UVOD

1.1 TEŽKE KOVINE

Kovine so skupina elementov, ki imajo posebne fizikalne lastnosti: dobro prevajajo elektriko in toploto, imajo značilen kovinski sijaj in večina med njimi lahko poljubno oblikujemo, saj so raztegljive in kovne. Od 111-ih poznanih elementov periodnega sistema predstavljajo kovine večino, to je 67 elementov (1).

Med težke kovine spadajo po definiciji po Bjerrumu tiste, katerih relativna gostota je vsaj sedem-krat večja, kot je gostota vode ($> 7 \text{ g/cm}^3$). Mednje spadajo prehodne kovine, nekateri metaloidi, pogosto so to arzen, telur in antimon, ter lantanoidi in aktinoidi (2).

Glavne skupine	I	II	Stranske skupine										III	IV	V	VI	VII	VIII
Perioda																		
1	1 H																	2 He
2	3 Li	4 Be											5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne
3	11 Na	12 Mg	III	IV	V	VI	VII	VIII			I	II	13* Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar
4	19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr
5	37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe
6	55 Cs	56 Ba	*	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
7	87 Fr	88 Ra	**	104 Ku	105 Ha	106 Rf	107 Uns	108 Uno	109 Une	110 Uun	111 Uuu	112 Uub	113 Uut	114 Uuq	115 Uup	116 Uuh	117 Uus	118 Uuo
*	Lantanoidi																	
	57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu			
**	Aktinoidi																	
	89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr			

Slika 1: Periodni sistem elementov. Med težke kovine uvrščamo prehodne kovine (vijolično obarvanje), nekatere metaloide (temno zeleno obarvanje), šibke kovine (temno modro obarvanje, razen alkalijskih in zemljoalkalijskih kovin), ter lantanoide in aktinoide (svetlo modro obarvanje).

Obstajajo pa še druge definicije. Izraz težke kovine se večkrat uporablja nepravilno, saj z njim pogosto označujemo vse kovine in polkovine (metaloide), ki se pojavljajo kot onesnaževalci

okolja. Prav tako jih pogosto povezujemo tudi s potencialno toksičnostjo. Tak primer je aluminij, ki ne spada med težke kovine (relativna gostota je $1,5 \text{ g/cm}^3$), je pa pomemben onesnaževalec okolja, ter se kopiči v možganih in ga povezujejo z nastankom Alzheimerjeve bolezni. Obenem izraz težke kovine ne upošteva, da imajo kovine in njihove spojine zelo različne fizikalno-kemijske, biološke in toksikološke lastnosti. Ista kovina se tako lahko nahaja v različnih oblikah, kar imenujemo speciacija (1, 3). Zaradi vsega naštetega novejša toksikološka literatura uporablja samo izraz kovine, izraz težke kovine pa se opušča. Tudi mednarodna unija za čisto in uporabno kemijo (IUPAC) zaradi protislovnih opredelitev in neenotne znanstvene podlage izraz težke kovine označuje kot zavajajoč (4).

1.1.1 Težke kovine kot nečistote v farmaciji

Poznamo tri kategorije nečistot in sicer organske nečistote (sorodne snovi), anorganske nečistote in ostanke topil. Nečistotam se ne moremo popolnoma izogniti. Njihova prisotnost ne doprinese k terapevtskemu učinku zdravil, lahko pa imajo škodljiv vpliv na zdravje uporabnika in na kakovost samega zdravila. Težke kovine spadajo v kategorijo anorganskih nečistot (5). Varnost, prav tako škodljive posledice, ki jih povzročajo nečistote (kovine in nekovine) sta določena z farmakološko-toksikološkim profilom. Nečistotam v farmaciji posvečamo vedno večjo pozornost (6). Te snovi namreč lahko predstavljajo veliko tveganje za uporabnike farmacevtskih izdelkov, zato jih je potrebno obvladovati skozi vse faze razvoja posameznega zdravila.

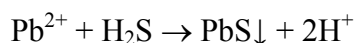
Težke kovine, kot so svinec, nikelj in kadmij, v farmacevtskih izdelkih že v zelo nizkih koncentracijah predstavljajo resno nevarnost za zdravje (7). Dnevni vnos $0,06 \text{ mg}$ svineca v obdobju enega meseca zadošča za kronično zastrupitev, ki povzroči okvaro ledvic, osteomalacijo in obstruktivno pljučno bolezen (8). Kadmij je rakotvorna snov, ki zaradi kopičenja v človeškem telesu in dolge razpolovne dobe 30 let, predstavlja zelo resno nevarnost za zdravje (9). Toksikologi še vedno preučujejo učinke različnih elementov na ljudi in na podlagi podatkov o varnosti spreminjajo dovoljene mejne vrednosti. Posledično moramo farmacevtske izdelke testirati na različne elemente. Nečistote oziroma ostanki kovin se lahko v farmacevtskih izdelkih znajdejo iz različnih vzrokov, vključno z vnosom preko kovinskih katalizatorjev in reagentov, ki se uporabljajo pri sintezi zdravilnih učinkovin (ZU) in pomožnih snovi ali ob prehajanju iz opreme. Ravno zato se že v teku razvoja farmacevtskega izdelka izvaja nadzor nad vsebnostjo kovin, ki morajo biti v koncentracijah, ki so varne za uporabnika. Hkrati pa morajo biti prizadevanja za omejitev le teh sorazmerna s tveganjem, ki

je ocenjeno v vsaki fazi razvoja. Pri tem je nujno potrebno upoštevati obseg nevarnosti, indikacije bolezni, velikost in značilnost izpostavljene populacije, ter trajanje izpostavljenosti (10).

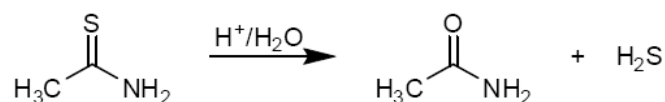
1.2 REGULATORNE OSNOVE ZA DOLOČANJE KOVIN V SUBSTANCAH ZA FARMACEVTSKO UPORABO (SFU)

1.2.1 Farmakopejske metode za določanje kovin

V Evropski farmakopeji (Ph. Eur) in Ameriški farmakopeji (USP) je za spremljanje koncentracij težkih kovin v substancah za farmacevtsko uporabo (SFU) predpisan limitni test, ki temelji na barvni reakciji in tvorbi obarvanih sulfidov med kovinami in vodikovim sulfidom (11).



Zaradi toksičnosti vodikovega sulfida se uporablja tioacetamidni reagent (11), iz katerega v kislem vodnem mediju nastaja vodikov sulfid in je njegov prekurzor.



Slika 2: Tvorba vodikovega sulfida iz tioacetamida v kislem (11).

S testom lahko določimo samo tiste kovine, ki s sulfidnimi ioni pri predpisanih pogojih tvorijo obarvane spojine. To so arzen, selen, kadmij, indij, kositer, antimon, svinec, bizmut, srebro, paladij, platina, živo srebro, molibden in rutenij. Ostale kovine kot so železo, krom in nikelj niso vključene v ta test (11).

V USP so v poglavju, ki obravnava določanje težkih kovin, opisane tri metode (12). Podobno je tudi v Ph. Eur (13), Britanski (BP) in Japonski (JP) farmakopeji. Metoda I se nanaša na SFU, ki v topilu, predpisanem za raztapljanje, tvorijo pred dodatkom tioacetamida brezbarvne

raztopine, zato je predvideno samo raztapljanje in redčenje vzorca. Metodi II in III se nanašata na SFU, ki tvorijo obarvane raztopine, zato je potreben dodaten razkroj vzorca, pri čemer pa lahko lažje hlapne kovine izhlapijo.

Pomanjkljivost te metode je v tem, da je nespecifična, saj je rezultat ki ga podamo, vsota različnih kovin. Določamo lahko le kovine, ki dajejo obarvane kovinske sulfide, poleg tega je v primeru uporabe metod II in III možna velika napaka pri določanju lahkih hlapnih kovin (živo srebro, arzen, svinec, kadmij, selen, kositer, antimon). Ker barvo vzorca vizualno primerjamo z barvo standardne raztopine svinca, rezultatov ne podajamo numerično, ampak opisno glede na barvo standardne raztopine (14).

USP je nedavno sprejela končni različici dveh novih poglavij, ki se nanašata na težke kovine, oziroma širše na elementne nečistote:

- Splošno poglavje <232> *Elemental Impurities – Limits*, ki omejuje vsebnosti posameznih elementov v zdravilih glede na njihovo toksičnost in način aplikacije zdravila (nižje meje za parenteralna in inhalacijska zdravila v primerjavi s peroralnimi)
- Splošno poglavje <233> *Elemental Impurities – Procedure*, ki za določanje elementnih nečistot navaja dve instrumentalni metodi: Atomska emisijska spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-AES) in masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS). Ostale (alternativne) analizne metode so dopustne v primeru, da dosegajo predpisane kriterije.

Splošni poglavji bosta objavljeni v drugemu dodatku k USP 35–NF 30, ki bo vstopil v veljavo s 1. decembrom 2012. Od 1. maja 2014 bo skladnost z novima poglavjema zahtevana za vsa zdravila. Hkrati z novimi zahtevami bodo vse reference na obstoječe splošno poglavje <231> *Heavy metals* izbrisane iz monografij (15).

1.2.2 Določanje kovin, ki izvirajo iz kovinskih katalizatorjev in reagentov

Evropska agencija za zdravila (EMA) je leta 2008 izdala smernico za spremljanje koncentracij kovin, katerih izvor je v uporabi kovinskih katalizatorjev pri sintezi SFU ali so posledica uporabe spojin s kovinami v fazi sinteze (14). V končnih farmacevtskih oblikah koncentracij ni treba spremljati, če v vseh SFU dosegamo specifikacijske meje, predpisane z

omenjeno smernico. Kovine v skladu z omejenim predpisom glede toksičnosti razdelimo na tri skupine (10):

- **I. skupina:** uvrščamo kovine z veliko nevarnostjo za zdravje (platina, paladij, iridij, rodij, rutenij, osmij, molibden, nikelj, krom, vanadij).
- **II. skupina:** uvrščamo kovine z nizko nevarnostjo za zdravje (baker in mangan) in so lahko esencialne ter prisotne v različnih vrstah hrane ali prehrabnenih dodatkih.
- **III. skupina:** uvrščamo kovine z minimalno nevarnostjo za zdravje (železo, cink), ki so toksične šele v višjih odmerkih in je njihovo toksično delovanje poznano.

Dovoljen dnevni vnos (PDE – Permitted Daily Exposure), izražen v $\mu\text{g}/\text{dan}$, je definiran kot tista sprejemljiva količina, ki tudi ob kronični izpostavljenosti kovinam ne povzroča škodljivih učinkov za zdravje. PDE je definiran za posamezne skupine kovin in se razlikuje glede na vrsto aplikacije (npr. peroralna, parenteralna ter inhalacija). PDE se giblje med 100 (I. skupina) in 13000 $\mu\text{g}/\text{dan}$ (III. skupina) za peroralno aplikacijo in med 10 in 1300 $\mu\text{g}/\text{dan}$ za parenteralno aplikacijo (10, 14).

V določenih primerih, ko dokažemo, da SFU vsebujejo manj kot 30 % dovoljene koncentracije kovine, predpisane v omenjeni smernici, lahko testiranje opustimo.

Smernica kot primerne metode za določanje koncentracij kovin priporoča tiste, ki so specifične in jih je možno validirati. Uporaba nespecifičnih metod ni dovoljena, razen v izjemnih primerih, ko so v SFU prisotne samo kovine II. ali III. skupine (14).

1.3 NIKELJ, KADMIJ IN SVINEC

1.3.1 Lastnosti in toksikološki podatki niklja

Nikelj je v VIII. stranski skupini periodnega sistema, v tako imenovani železo-kobalt-nikljevi skupini. Po svojih kemijskih in biokemijskih lastnosti je podoben kobaltu. V elementarni obliki je nikelj v naravi redek, najpogosteje je v spojinah z žveplom, arzenom in antimonom, redkeje je zastopan v silikatnih mineralih. V naravi je poznanih pet nikljevih izotopov: ^{58}Ni (67,9 %), ^{60}Ni (26,2 %), ^{61}Ni (1,19 %), ^{62}Ni (3,66 %) in ^{64}Ni (1,08 %) (14). Znane so spojine niklja z oksidacijskimi stanji od 0 do +4, v bioloških sistemih pa je najpogostejše oksidacijsko

stanje +2 (14). Nikelj se uporablja v elektroindustriji pri izdelavi nikelj-kadmijevih baterij, električnih vezij, pomembno vlogo ima tudi pri zaščiti materialov in izdelavi različnih zlitin. Nikelj in njegove zlitine se zelo pogosto uporabljajo kot katalizator pri reakcijah hidrogeniranja v kemijski, prehrabeni in farmacevtski industriji.

Najbolj znan je Raney-nikelj, ki je fino porazdeljena nikelj-aluminijeva zlitina (16).

Nikelj je v manjših količinah za živali esencialen element, saj uravnava mikrofloro v črevesju, pri ljudeh pa se predvideva, da je tudi esencialen, vendar je njegova funkcija nepoznana. Na splošno se vodotopne nikeljeve spojine, kot je nikeljev nitrat, bolje absorbirajo kot netopne. Na tešče je absorpcija iz gastrointestinalnega trakta okoli 50 %, vendar se lahko dramatično zmanjša ob zaužitju nekaterih hranilnih sestavin kot so askorbinska kislina, tanini in fosfati. Iz hrane se tako v povprečju absorbira okoli 10 % zaužitega nikelja, iz pitne vode pa okoli 25 %. Srednja letalna koncentracija (LD₅₀) za nikeljev sulfat znaša 300 ppm, medtem ko je za skoraj netopen nikeljev oksid več kot 5000 ppm. Osnova za regulativne ocene, oziroma presoje je dvoletna študija aplikacije nikeljevega sulfata skupaj s hrano na podganah. Najvišja koncentracija, pri kateri ne zaznamo učinka (NOEL) iz te študije je 5 ppm nikelja na dan (10). Prav tako je bil določen NOEL z 90-dnevno študijo na podganah za nikeljev klorid. Pri tej študiji je bilo moč opaziti zmanjšanje parametrov rdečih krvnih telesc in spremembe v aktivnosti encimov v serumu (10). Za nikeljev sulfat je bila narejena tudi dvoletna študija na psih, ki je pokazala poškodbe kostnega mozga in pljuč pri najvišjem odmerku. NOEL je bil ocenjen na 29 ppm nikelja na dan (10). Čeprav so poročali o majhni "in vitro" genotoksičnosti nikeljevih spojin, ni dokazov, ki bi kazali, da so nikeljeve spojine rakotvorne, zlasti pri peroralni aplikaciji. Kromosomske aberacije so opazili pri "in vivo" študijah pri ljudeh in laboratorijskih živalih z inhaliranjem. Po tej poti aplikacije pa je izpostavljenost nikelju in nikeljevim spojinam rakotvorna oziroma kancerogena in povzroča pljučnega raka in raka nosu. Zelo dobro je poznan alergijski kontaktni dermatitis kot posledica izpostavljenosti nikelju in nikeljevim spojinam, še posebej pri ženskah (verjetno zaradi nošenja nikeljevih uhanov) (10).

1.3.2 Lastnosti in toksikološki podatki kadmija

Kadmij je kemijsko podoben cinku in živemu srebru in je v II. skupini periodnega sistema. V naravi je poznanih osem kadmijevih izotopov. Dva izmed njih sta naravno radioaktivna, to sta ¹¹³Cd (12,22 %) in ¹¹⁶Cd (7,49 %), za tri se pričakuje da razpadejo, vendar ta razpad ni eksperimentalno dokazan. To so ¹⁰⁶Cd (1,25 %), ¹⁰⁸Cd (0,89 %), ¹¹⁴Cd (28,73 %). Vsaj trije

izotopi ^{110}Cd (12,49 %), ^{111}Cd (12,8 %) in ^{112}Cd (24,13 %) so stabilni. Kadmij je najpogosteje v oksidacijskem stanju +2, obstaja pa tudi oksidacijsko stanje +1 (17).

Ljudje smo dnevno izpostavljeni nizkim koncentracijam kadmija preko hrane, vode in zraka. Glavni del dnevnega vnosa kadmija predstavlja hrana, vnos z vodo predstavlja le manjši del, preko kože pa ne vstopa. Visoke koncentracije kadmija najdemo predvsem v jetrih in ledvicah odraslih živali. Poglavitni vir kadmija predstavlja kajenje, saj vnos le tega podvoji. Ljudje vsak dan zaužijemo od 20 do 40 μg kadmija z vdihavanjem in s hrano, vendar se ga od tega absorbira samo od 5 do 10 %. Absorpcija v telo je odvisna od topnosti snovi, pa tudi od vsebnosti kalcija, železa in beljakovin v hrani (18). Kadmij se v krvi veže na beljakovine metalotionein, katere se v manjših količinah izločajo v kri. Sinteza teh beljakovin verjetno predstavlja telesu obrambni mehanizem proti strupenemu ionu kadmija (Cd^{2+}). Izločanje kadmija iz telesa se odvija preko ledvic, kjer se prosto filtrira, reabsorbira in ostane v tubularnih celicah. Nalaganje v skorji vodi v okvaro ledvic z izločanjem beljakovin. Tako je koncentracija kadmija v ledvicah deset tisočkrat višja kot v krvi (19).

Raven kadmija v telesu se povečuje s starostjo do petdesetega leta, nato začne upadati. Biološki razpolovni čas je dolg in znaša 10-35 let. Kadmij in njegove spojine v človeškem telesu nimajo nobene vloge, so pa toksične že v zelo majhnih koncentracijah. Eden od mehanizmov njegove toksičnosti je motenje delovanja encimov, ki vsebujejo cink. Akutna izpostavljenost kadmijevim spojinam draži želodec in lahko povzroči bruhanje in drisko, ter gripi podobne simptome, vključno z mrzlico, povišano telesno temperaturo in bolečinami v mišicah. Moten je tudi metabolizem kalcija in vitamina D s posledično osteomalacijo in osteoporozo, kar povečuje tveganje za zlome. Povzroča tudi težave pri reprodukciji, kardiovaskularne bolezni ter hipertenzijo.

Mednarodna agencija za raziskavo raka (IARC) je kadmij in kadmijeve spojine uvrstila med rakotvorne snovi prve kategorije (20). Študije so pokazale in potrdile, da z inhaliranjem povečamo tveganje za nastanek raka pljuč in prostate, lahko pa povzročajo tudi raka ledvic, trebušne slinavke in mod (21).

1.3.3 Lastnosti in toksikološki podatki svinca

Svinec se nahaja v IV. skupini periodnega sistema. V naravi so poznani štirje izotopi: ^{204}Pb (1,4 %), ki je rahlo radioaktiven, ^{206}Pb (24,1 %), ^{207}Pb (22,1 %) in ^{208}Pb (52,4 %). Izotopi ^{206}Pb , ^{207}Pb in ^{208}Pb so stabilni in so verjetno nastali iz radioaktivnega razpada dveh izotopov

urana (^{235}U in ^{238}U) in enega izotopa torija (^{232}Th) (22). Svinec je neesencialen toksični element, ki se kopiči v organizmu. Glavni vir pri nekadilcih sta voda in hrana (23). V anorganski obliki vstopa v telo preko gastrointestinalnega trakta, nekaj pa tudi preko pljuč, medtem ko v organski obliki lahko prehaja tudi preko nepoškodovane kože (24). Svinec je poznan kot nevrotoksin, akumulira se v kosteh in se iz njih mobilizira med nosečnostjo in laktacijo ter tako povzroča izpostavitve ploda in dojenčkov, pri tem pa je pomembna izpostavljenost matere svincu do nosečnosti (25). Absorpcija vdihanega anorganskega svinca je okoli 95 %, gastrointestinalna absorpcija pa je odvisna od fiziološkega stanja izpostavljene osebe in pa od vrste svinčeve spojine. Po podatkih svetovne zdravstvene organizacije (WHO) je nevarna in toksična doza če zaužijemo več kot 500 $\mu\text{g}/\text{dan}$ svinca. Danes je nivo svinca v krvi, pri katerem je potrebno ukrepanje, 100 $\mu\text{g}/\text{l}$ (26).

Posebno ogrožena skupina so otroci, ki zaužijejo okoli 50 % svinca direktno iz onesnaženih tal, od tega ga 40-50 % zadržijo v telesu. Odrasli zadržijo v telesu le 3-10 % zaužitega svinca. Razlogi za večjo ogroženost otrok so odvisni od nekaterih bioloških dejavnikov kot so nezrel metabolizem, večja izpostavljenost. Spodaj navedena tabela prikazuje količino svinca v krvi in škodljive učinke na organizem pri otrocih. Te vrednosti so približne, ker nanje vplivajo različni faktorji izpostavljenosti (doza, starost osebe ob izpostavi, trajanje izpostavljenosti, zdravje in življenjski stil izpostavljene osebe, prehranjevanje, kemijske oblike svinca).

Tabela 1: Škodljivi učinki različnih koncentracij svinca pri otrocih (26).

Količina svinca v krvi ($\mu\text{g}/\text{l}$)	Učinek
100	zmanjšana rast, manjši inteligenčni kvocient, slabši sluh
200	spremembe živčnih funkcij
400	zmanjšano nastajanje hemoglobina
600	trebušni krči
700	slabokrvnost
800	poškodbe ledvic
850	poškodbe možganov
1300	smrt

Toksično delovanje na kardiovaskularni sistem povzroči predvsem povečan krvni pritisk, na živčni sistem pa najpogosteje povzroči svinčevo encefalopatijo in periferno motorično nevropatijo. Prav tako je ugotovljeno, da izpostavljenost svincu povzroči anemijo, ki je glaven znak zastrupitve s svincem, ter svinčevo nefropatijo.

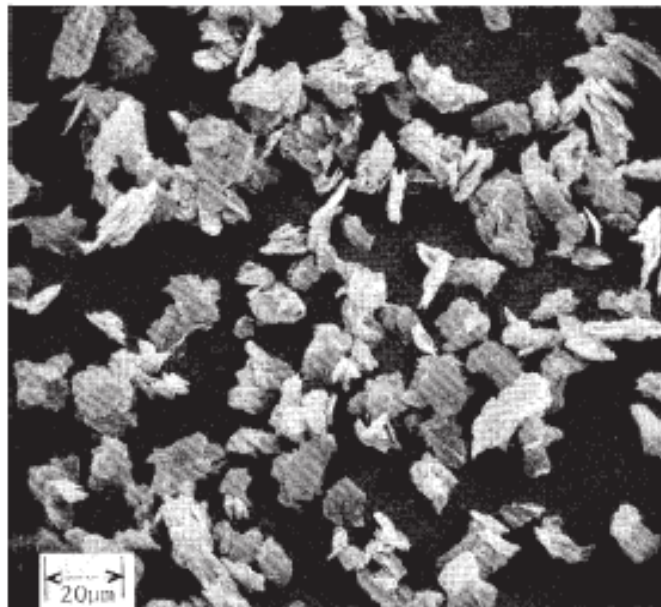
Izpostavljenost svincu in svinčnim zmesem poveča tveganje za nastanek pljučnega raka in raka na želodcu in mehurju. Povzroča tudi kromosomske odklone (strukturne in številčne spremembe kromosomov), poškodbe DNA in fragmentacijo, inhibira aktivnost DNA in RNA polimeraze (27).

1.4 MAGNEZIJEV STEARAT

Magnezijev stearat je zmes magnezijevih soli višjih maščobnih kislin. Glavnino tvorita magnezijeva sol stearinske kisline in magnezijeva sol palmitinske kisline v različnih razmerjih. Delež stearinske kisline v kislinski frakciji je vsaj 40,0 %, vsota deležev stearinske in palmitinske kisline v kislinski frakciji pa je vsaj 90,0 % (13). Je lahek, fino mlet ali precipitiran prašek z nizko gostoto, značilnega vonja po stearinski kislini. Prašek je masten na otip in se prilepi na kožo. Je netopen v vodi in brezvodnem etanolu (13). Uporablja se v kozmetični, prehrambeni in farmacevtski industriji. V farmacevtski industriji se uporablja kot ekscipient oziroma pomožna snov v proizvodnji kapsul in tablet v koncentracijah med 0,25 % do 5,0 % (28).

Uporaba v farmacevtski industriji (29):

- drsljivec oziroma lubrikant (mazivo) - zmanjša trenje med delci in steno tabletirke med stiskanjem in izmetom tablete
- pravo drsilo (glidant) - izboljša pretočne lastnosti prahov
- antiadheziv - zmanjša adhezijo med praškom in pečati tabletirke in tako preprečijo lepljenje



Slika 3: Prikaz delcev magnezijevega stearata z metodo vrstičnega elektronskega mikroskopa (SEM) pri 600 kratni povečavi (28).

Magnezijev stearat se pripravlja po dveh postopkih. Z reakcijo vodnih raztopin magnezijevega klorida in natrijevega stearata, in z reakcijo magnezijevega oksida ali magnezijevega karbonata s stearinsko kislino pri povišani temperaturi. Ni kompatibilen z močnimi kislinami, alkalijskimi in železovimi solmi, ter močnimi oksidanti (28).

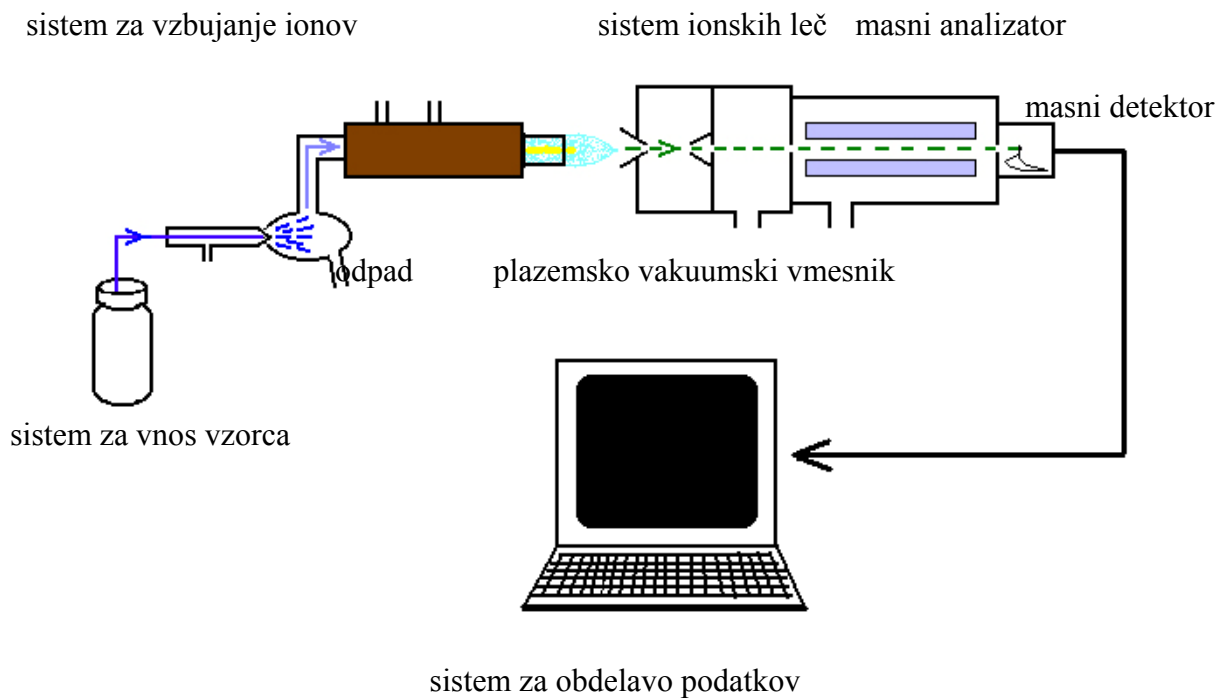
Magnezijev stearat je na splošno netoksična spojina po peroralni aplikaciji. Pri zaužitju velikih količin lahko povzroči odvajalni učinek in draženje mukusa. Toksičnostne ocene na podganah so pokazale, da ne draži kože in je netoksičen po peroralni aplikaciji in z inhaliranjem. Magnezijev stearat ni rakotvoren. LD₅₀ z inhaliranjem pri podganah znaša več kot 2 mg/l, peroralno pa več kot 10 mg/l (28).

1.5 MASNA SPEKTROMETRIJA Z INDUKTIVNO SKLOPLJENO PLAZMO (ICP-MS)

V farmacevtski industriji je določanje kovin v reagentih, intermediatih, ZU in gotovih izdelkih nujno za zagotavljanje kakovosti farmacevtskih izdelkov. Regulatorne oblasti glede vsebnosti kovin, vse več pozornosti namenjajo sodobnim elementno specifičnim kvantitativnim informacijam in analiznim metodam, ki dosegajo izredno nizke meje detekcije (LOD) in meje določljivosti (LOQ). Pričakujemo lahko, da bodo te analizne metode v bližnji prihodnosti popolnoma nadomestile nespecifične limitne metode. Specifične kvantitativne metode so poleg ICP-MS metode tudi atomska absorpcijska spektrometrija (AAS), atomska emisijska spektroskopija z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-AES), masna spektrometrija z vzorčevanjem z lasersko ablacijo (LA-ICP-MS).

ICP-MS je metoda za kvantitativno določanje posameznih elementov oziroma izotopov v vzorcih. Je kombinacija induktivno sklopljene plazme, ki je izvor vzbujenih ionov posameznih elementov, in masnega spektrometra, katerega funkcija je merjenje razmerja mase atomov oziroma izotopov elementov in njihovega naboja (m/z).

Prvi komercialni inštrumenti so se pojavili leta 1980 (30). Danes je ICP-MS ena izmed vodilnih analiznih metod za določanje kovin in nekovin, ter razmerja njihovih izotopov.

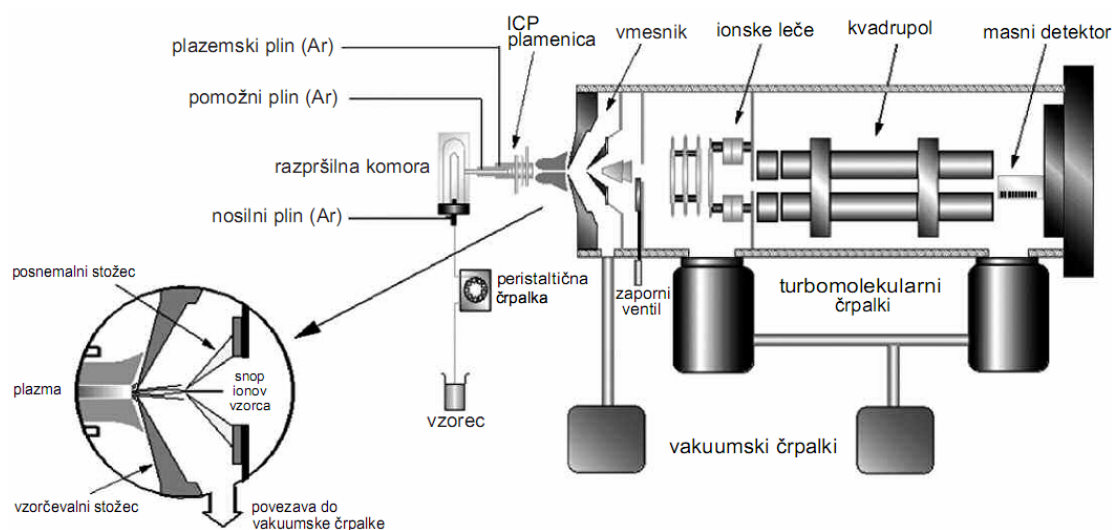


Slika 4: Osnovna shema ICP-MS sistema (31).

Osnovni deli ICP-MS sistema so:

- Sistem za vnos vzorca
- Induktivno sklopljena plazma, ki je sistem za vzbujanje ionov
- Plazemsko vakuumski vmesnik
- Sistem ionskih leč
- Masni analizator
- Detektor
- Sistem za obdelavo podatkov

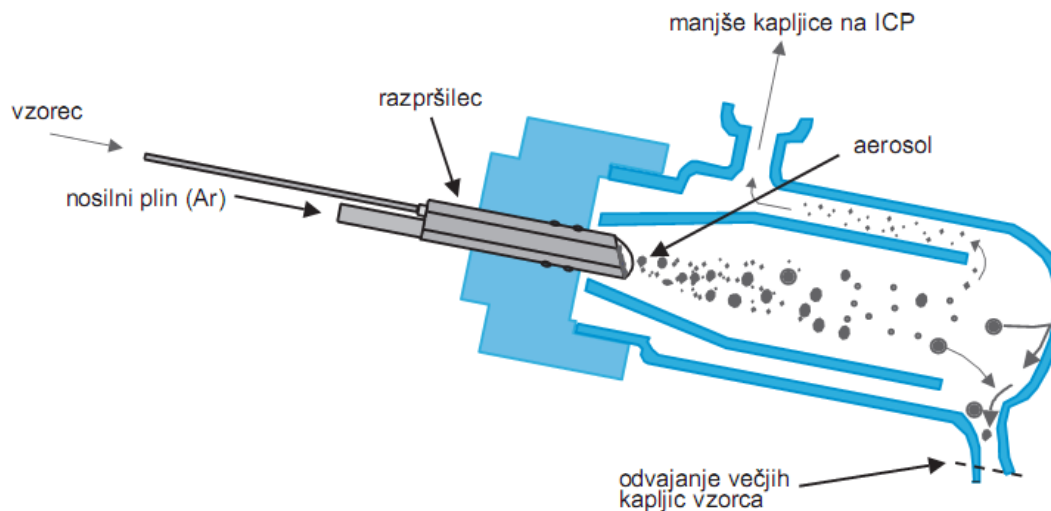
Natančnejši prikaz komponent enega izmed modelov sistema ICP-MS je prikazan na sliki 5.



Slika 5: Natančnejši prikaz komponent enega izmed modelov sistema ICP-MS (30, 32).

1.5.1 Sistem za vnos vzorca

Sistem za vnos vzorca je eden izmed najpomembnejših komponent ICP-MS sistema. Glavni namen je pretvorba tekočega vzorca v aerosol in nato učinkovit prenos manjših kapljic aerosola v središče plazme, medtem ko se večje kapljice iz sistema odstranijo (30). Aerosol nastane, ko tekoč vzorec potuje preko peristaltične črpalke skozi pnevmatski razpršilec v razpršilno komoro, katere funkcija je ločitev večjih kapljic od manjših in odstranitev pulzirajočih nihanj tekočega vzorca, ki nastanejo zaradi vnosa le tega preko peristaltične črpalke (33). V pnevmatskem razpršilcu pride do mešanja tekočega vzorca in nosilnega plina argona in tako do tvorbe finega aerosola. Konstantna temperatura v razpršilni komori zagotavlja enakomeren vnos vzorca v plazmo (30).



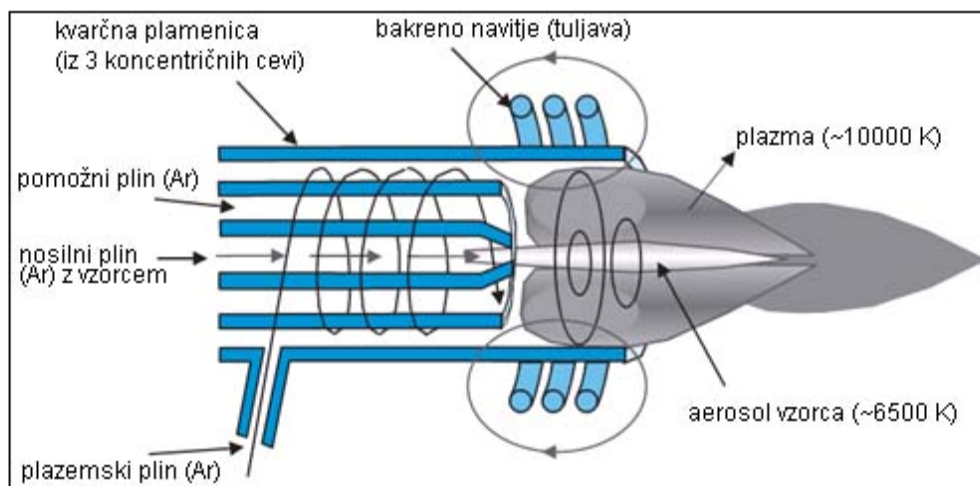
Slika 6: Skica razpršilne komore (30, 32).

1.5.2 Induktivno sklopljena plazma (ICP)

Induktivno sklopljena plazma (ICP) je najpogosteje uporabljen plazemski izvor v masni spektrometriji (33). Plazma je visokotemperaturni plamen v toku inertne atmosfere argona. Njena vloga je ustvarjanje vzbujenih ionov iz aerosola (30). Nastaja v toku argona v kvarčni cevi ali plamenici. Plamenica je sestavljena iz treh koncentričnih kvarčnih cevi, skozi katere teče tok argona, katerega skupni pretok znaša 5 l/min do 20 l/min (8). Argon se uporablja za generiranje plazme (vstopa skozi zunanjo cev), kot izolator (vstopa skozi zunanjo cev) in kot nosilec vzorca (vstopa skozi osrednjo cev). Kvarčna cev oziroma plamenica je obdana z bakrenim navitjem, skozi katerega teče radiofrekvenčni tok, ki ustvari močno magnetno polje.

Teslina tuljava ob plamenici povzroči iskro, ki preleti tok argona. Tako se nekaj atomov ionizira, kar privede do nastanka kationov in elektronov. Prelet nabitih delcev skozi magnetno polje povzroči njihovo nihanje in s tem trke med elektroni in Ar^+ ioni z nevtralnimi Ar atomi, kar privede do nastanka novih ionov in elektronov. Nastane plazma z visoko temperaturo,

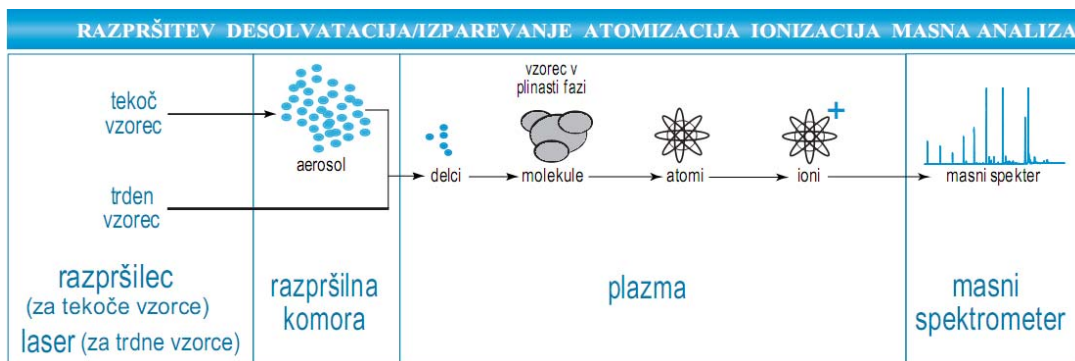
6500 K (15-20 mm nad bakrenim navitjem) - 10000 K (jedro plazme)



(32).

Slika 7: Prikaz kvarčne cevi oziroma plamenice (30, 32).

Aerosol vzorca se v plazmi, ki potuje skozi osrednjo cev plamenice, pri visoki temperaturi takoj razkroji, izpari, atomizira in ionizira (slika 8). Proces se imenuje ionizacija (30, 32).



Slika 8: Prikaz procesa v ICP-MS od vnosa vzorca do analize na masnem detektorju (30, 32).

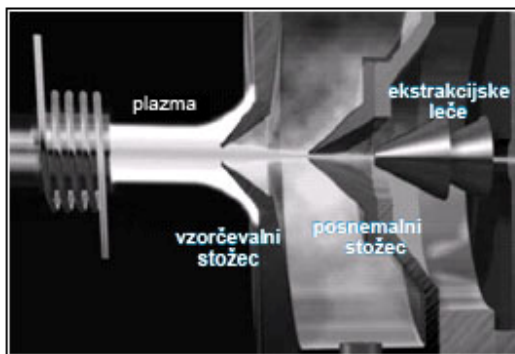
Energija, ki je potrebna, da atomu ali molekuli v osnovnem stanju odvzamemo elektron, se imenuje ionizacijska energija oziroma ionizacijski potencial in je specifičen za posamezen element (32, 34).

1.5.3 Plazemsko vakuumski vmesnik

Vloga plazemsko vakuumskega vmesnika je učinkovit prenos ionov iz plazme, kjer je atmosferski tlak (760 mbar), v masni detektor, kjer je visok podtlak (10^{-6} mbar) (33). Ioni, nastali v plazmi potujejo proti nizu vmesnih kovinskih ploskev s stožci. Najprej potujejo skozi vzorčevalni stožec premera 0,8-1,2 mm, nato skozi posnemalni stožec premera 0,4-0,8 mm. Med njima je omejen prostor imenovan vakuumška komora (30, 32, 33).



Slika 9: Fotografija vzorčevalnega in posnemalnega stožca (30, 32).



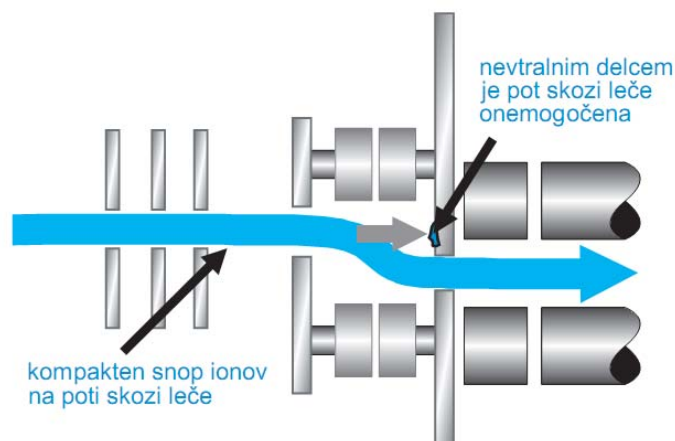
Slika 10: Skica vmesnika (vzorčevalni in posnemalni stožec, med njima je vakuumška komora) (30, 32).

Ob prehodu ionov skozi vzorčevalni stožec se zaradi občutnega znižanja tlaka (iz 1 bara v 1 mbar), ionski snop močno pospeši, kar privede do učinkovitega prenosa snopa skozi posnemalni stožec v območje, kjer se nahajajo ionske leče, nato kvadrupol in masni detektor. Velikost in oblika odprtih stožcev sta zelo pomembni in vplivata na občutljivost inštrumenta, masno odzivnost, tvorbo oksidov in dvojno nabitih ionov, ter vrednost tlakov v vakuumu (30).

Visok podtlak (10^{-6}) mbar dosežamo poleg vakuumske črpalke še z dvema turbomolekularnima črpalkama.

1.5.4 Sistem ionskih leč

Vloga elektrostatičnih leč je, da ohranjajo ione v kompaktnem ionskem snopu, ko ti potujejo v območje, kjer se nahaja masni spektrometer. Prva skupina leč skrbi za zadostno ionsko občutljivost vseh mas ionov na analizatorju. Druga skupina leč pa skrbi za fokusiranje ionskega snopa, s čimer izboljšamo občutljivost inštrumenta. Zadnji sistem leč loči ione od fotonov in ostalih nevtralnih delcev, ki bi povečali ozadje in šum, ter s tem motili detekcijo. Po teh lečah teče nizka napetost, katero lahko spreminjamo in s tem vplivamo na ozadje in občutljivost inštrumenta. Med seboj so zamaknjene, kar povzroča odklon ionskega snopa s čimer je nevtralnimi delcem onemogočen prehod, saj se ti zaradi nevtralnosti ne odklonijo (30, 32).



Slika 11: Skica elektronskih leč, skozi katere potuje snop ionov (30, 32).

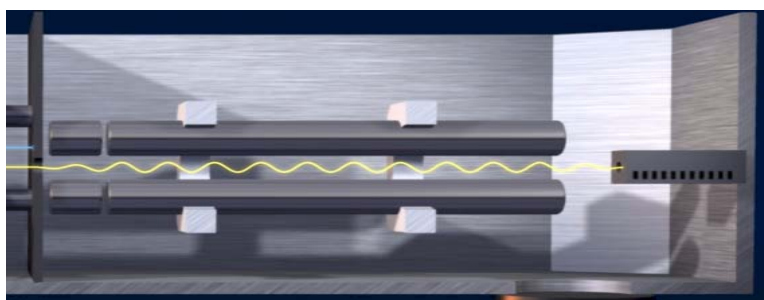
1.5.5 Masni analizator

Po prehodu skozi ionske leče ioni vstopajo v območje, kjer se nahajata analizator in detektor. Masna separacija temelji na razmerju med maso in nabojem iona (m/z) določenega elementa (30).

Poznamo pet vrst masnih analizatorjev:

- Kvadrupolni
- Analizator na čas preleta ionov (*ang. Time of Flight oz. TOF*)
- Magnetni sektorski
- Z ionsko pastjo (*ang. Ion Traps*)
- Ionsko ciklotronsko resonančni analizator (*ang. Ion Cyclotron Resonance oz. ICR*)

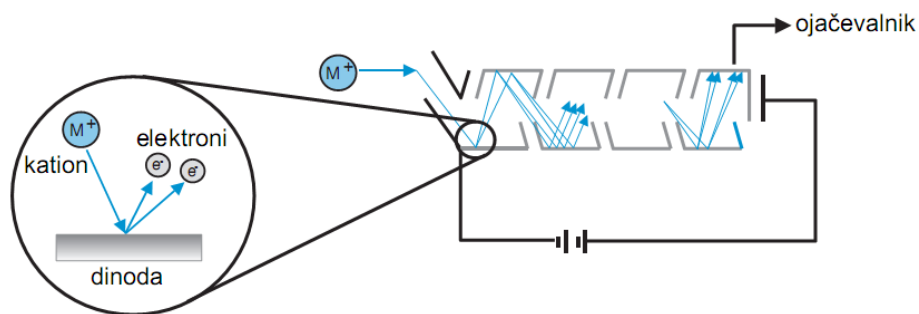
Glavni parametri, ki označujejo masne analizatorje, so njihova občutljivost, ločljivost in območje delovanja. Najbolj pogost je kvadrupolni analizator. Odklon delcev pri tej vrsti analizatorja je zasnovan na vplivu magnetnega polja na potovanje ionov. Analizator sestavljata dva para vzporednih cilindričnih elektrod, ki delujejo kot ionski filter. Obe diagonalni elektrodi sta med seboj električno sklopljeni, kar v prostoru med elektrodami ustvarja dinamično električno polje. Ioni priletijo med elektrode po daljši smeri elektrod. Med seboj jih ločimo glede na stabilnost potovanja iona skozi električno polje elektrod. Trajektorijo ionov lahko nadzorujemo z vrsto časovno-odvisnih sil, ustvarjenih s konstantno istosmerno napetostjo (U), ki ji je prištet radio-frekvenčno oscilirajoči potencial na elektrodah. Pri nastavljeni vrednosti napetosti elektrod lahko skozi na masni detektor prileti le ion z določenim razmerjem m/z . Ostali ioni, ki pri nastavljeni vrednosti napetosti elektrod nimajo stabilne trajektorije, končajo izven ionskega snopa (26, 30, 32).



Slika 12: Predstavitev trajektorije ionov v masnem analizatorju (kvadrupol) (30)

1.5.6 Masni detektor (elektronska pomnoževalka) in sistem za obdelavo podatkov

Ko ion zapusti kvadrupol, prileti na masni detektor, ki izmeri ionski tok pri posamezni vrednosti m/z . Tako dobimo masni spekter za vse mase atomov oziroma v primeru večih izotopov elementa, porazdelitev števila izotopov po masi. Detektor je zelo občutljiva elektronska pomnoževalka, ki šteje vsak ion posebej in shrani skupni signal za vsako razmerje m/z ter preko računalniške obdelave podatkov prikaže masni spekter. Ko kation prileti v ustje elektronske pomnoževalke, se odkloni k prvi dinodi, ki je pod visoko negativno napetostjo. Udarec kationa ob dinodo sprosti nekaj prostih elektronov iz njene površine in le-ti se zaradi močne negativnosti odbijejo od površine dinode in zadenejo drugo dinodo. Vsak elektron, ki zadane naslednjo dinodo, sprosti nekaj novih elektronov iz njene površine. Od tu ime elektronska pomnoževalka (30, 32, 33).



Slika 13: Shematski prikaz delovanja masnega detektorja elektronske pomnoževalke (30, 32).

Medtem, ko elektroni dosegaajo zadnjo dinodo, ojačevalnik ustvari dovolj močan pulz za zanesljiv rezultat določitve iona (32).

Masni detektor šteje vsak ion posebej in shrani skupni signal za vsako razmerje m/z . Ojačen signal pošlje na rekorder ali računalnik. Rezultat tega je masni spekter, v katerem je višina posameznega vrha sorazmerna koncentraciji elementa v vzorcu.

1.6 VALIDACIJA ANALIZNE METODE

Validacija je dokumentiran postopek preizkušanja in potrjevanja, da metoda z veliko gotovostjo zagotavlja rezultate, ki točno odražajo lastnosti preiskovanega vzorca (10). Najnovejša zakonodaja v evropskem in severnoameriškem prostoru (EMA in FDA) zahteva validacijo vseh kritičnih parametrov, procesov, sistemov in osebja (35).

Osnovni parametri validacije analiznih metod so:

1. Točnost (*Accuracy*)
2. Natančnost (*Precision*)
3. Linearnost (*Linearity*)
4. Območje (*Range*)
5. Specifičnost/selektivnost (*Specificity/Selectivity*)
6. Meja zaznavnosti (*Limit of Detection*)
7. Meja določljivosti (*Limit of Quantitation*)
8. Robustnost (*Robustness*)

Točnost

Točnost analizne metode označuje, kako blizu je rezultat meritve njegovi resnični, oziroma pravi vrednosti. Je merilo stopnje ujemanja rezultatov, ki jih izmerimo z našo metodo, s pravo vrednostjo. Razlike v rezultatih so lahko posledica stalnih in/ali proporcionalnih sistematičnih napak. Pravo vrednost dobimo na tri načine:

- Uporaba analiznega postopka za analit znane čistote
- Primerjava rezultatov metode z rezultati validirane metode z definirano točnostjo
- V primeru, da so dokazane natančnost, linearnost in specifičnost lahko točnost predpostavimo

Za določanje točnosti izvedemo vsaj devet določitev v vsaj treh koncentracijah, ki pokrivajo celotno območje metode, na primer 50 %, 100 % in 150 % tarčne koncentracije v treh ponovitvah. Običajno jo izražamo kot izkoristek, ki je merilo za točnost na osnovi analiz znane dodane količine merjene komponente.

Izkoristek % = (enačba 1)

Natančnost

Natančnost metode izraža stopnjo ujemanja (stopnjo razpršenosti) rezultatov med serijo analiz istega homogenega vzorca pod predpisanimi pogoji. Običajno jo izražamo kot standardno deviacijo (SD) ali relativna standardno deviacijo (RSD). Čim manjša je standardna deviacija, bolj natančna je metoda. Natančnost metode po ICH smernicah določamo tako, da izvedemo po tri analize v treh koncentracijah, ki pokrivajo območje metode, ali šest analiz pri 100 % tarčni koncentraciji. Ovrednotimo jo lahko na treh nivojih:

- ponovljivost (natančnost dobljena iz rezultatov meritev v kratkem času pri ponovljivih pogojih, kot so isti reagenti, isti analitik, isti dan, isti laboratorij itd.)
- rigidnost (natančnost dobljena iz rezultatov meritev pri obnovljivih pogojih, kot so različni analitiki, različni dnevi, različni laboratoriji, druga oprema itd.)
- reproducibilnost (natančnost dobljena iz rezultatov meritev različnih laboratorijev (farmakopejski postopki, kolaborativne študije itd.))

a) Standardna deviacija (SD)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{enačba 2})$$

SD.....standardna deviacija

x_i vrednosti posameznih meritev

\bar{x} povprečna vrednost vseh meritev

n.....število meritev

b) Relativna standardna deviacija (RSD)

$$\text{RSD (\%)} = \frac{\text{SD} \times 100}{\bar{x}} \quad (\text{enačba 3})$$

RSD... relativna standardna deviacija (%)

\bar{x} povprečna vrednost vseh meritev

SD.....standardna deviacija

Linearnost

Linearnost analize metode je lastnost, ki nam pove ali so merjeni signali v določenem koncentracijskem območju sorazmerni koncentraciji analizirane snovi v vzorcih. Sorazmernost je lahko direktna ali po definirani matematični transformaciji. Izrazimo jo z enačbo premice, ter korelacijskim koeficientom.

a) Enačba premice: $y = k \cdot x + b$ (enačba 4)

b) Naklon regresijske premice:
$$k = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$
 (enačba 5)

c) Odsek na ordinatni osi: $b = \bar{y} - k \cdot \bar{x}$ (enačba 6)

d) Korelacijski faktor:
$$r = \frac{\left[\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y}) \right]}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$
 (enačba 7)

\bar{x} ...aritmetična sredina meritev

x_i ...posamezna meritev

\bar{y} ...povprečna vrednost signala instrumenta

y_i ...posamezna vrednost signala instrumenta

Določamo jo skozi celotno območje analiznega postopka v najmanj petih različnih koncentracijah. Cilj je dobiti model, ki čimbolje opisuje razmerje med koncentracijo in odzivom.

Območje

Območje analizne metode je interval med najvišjo in najnižjo koncentracijo analita v vzorcu, za katerega so bile dokazane točnost, linearnost in natančnost. Običajno ga določimo iz območja linearnosti in je odvisno od namena metode. Izražamo ga v enakih enotah kot rezultate analizne metode (% , ppm, itd).

Specifičnost/selektivnost

Selektivnost je sposobnost, da pravilno določimo lastnost preiskovane snovi v vzorcu ob prisotnosti drugih (podobnih) snovi, ki so lahko prisotne. Ugotavljamo jo tako, da analiziramo različne vzorce in opazujemo merjeno lastnost elementa, ki ga določujemo. Metoda je selektivna, če na določeno lastnost ene komponente v mešanici ne vpliva nobena druga komponenta iz mešanice. Metodo, ki je popolnoma selektivna imenujemo specifična metoda.

Meja zaznavnosti

Meja zaznavnosti je najnižja koncentracija analita v vzorcu, ki jo z določeno analizno metodo še zaznamo, ni pa nujno, da jo lahko tudi kvantitativno določimo. Določimo jo na več načinov:

- a) Na podlagi razmerja signal/šum (3:1 ali 2:1), kjer primerjamo signal nizke koncentracija analita s signalom in šumom na bazni liniji
- b) Po naslednji enačbi s pomočjo standardne deviacije odziva detektorja in naklona linearne regresijske premice

$$LOD = \frac{3 \times SD}{k}$$

(enačba

8)

LOD.....meja zaznavnosti

SD.....standardna deviacija odziva detektorja

k.....naklon linearne regresijske premice

Meja določljivosti

Meja določljivosti je najnižja koncentracija analita v vzorcu, ki jo z določeno analizno metodo določimo s sprejemljivo natančnostjo in točnostjo. Določimo jo na več načinov:

a) Na podlagi razmerja signal/šum, ki mora biti vsaj 10:1

b) Po naslednji enačbi s pomočjo standardne deviacije odziva detektorja in naklona linearne regresijske premice

$$LOQ = \frac{10 \times SD}{k}$$

(enačba

9)

LOQ.....meja določljivosti

SD.....standardna deviacija odziva detektorja

k.....naklon linearne regresijske premice

Robustnost

Robustnost metode je njena sposobnost, da ostane neprizadeta zaradi majhnih vendar namernih razlik v parametrih metode. Predstavlja merilo zanesljivosti med normalno uporabo. Običajno jo določimo med razvojem analizne metode. Izražamo jo s primerjavo relativne standardne deviacije ali izkoristka pri spremenjenih pogojih s tistimi pri običajnih pogojih.

2 NAMEN DELA

Magnezijev stearat je v proizvodnji zdravil ena najpogosteje uporabljenih pomožnih snovi (največkrat kot drsljivec). Evropska farmakopeja za magnezijev stearat predpisuje določanje kadmija (3 ppm), svinca (10 ppm) in niklja (5 ppm); vse tri z atomsko absorpcijsko spektrometrijo (AAS) z metodo standardnih dodatkov (poglavje 2.2.23., metoda II). ICP-MS metoda spada med novejšje analizne metode, ki omogoča hkratno določanje kovin. Metoda je hitra in občutljiva.

V okviru magistrskega dela želimo razviti alternativni analizni postopek za hkratno določanje niklja, kadmija in svinca v magnezijevem stearatu z metodo ICP-MS in sicer z dodatkom internega standarda in direktno kalibracijo. Ocenjujemo, da bi bila takšna metoda (z manjšimi modifikacijami) primerna za njihovo določanje tudi v drugih substancah za farmacevtsko uporabo. Najprej bomo optimizirali postopek priprave vzorca v mikrovalovni peči in pogoje merjenja kovinskih ionov z ICP-MS. Analizni postopek bomo validirali v skladu z ICH smernicami. Pri preverjanju ustreznosti metode bomo preverili točnost, natančnost (ponovljivost metode in sistema), linearnost, stabilnost standardnih raztopin in vzorcev, robustnost, ter določili mejo zaznavnosti (LOD) in mejo določljivosti (LOQ). Ker so zahteve čedalje strožje bomo poskusili doseči čim višjo občutljivost te metode in s tem čim nižjo mejo določljivosti oziroma kvantifikacije. Prav tako bomo ovrednotili natančnost (ponovljivost metode) in mejo določljivosti farmakopejske metode AAS z metodo standardnih dodatkov ter lastnosti obeh metod medsebojno primerjali. Medsebojno bomo primerjali tudi rezultate vsebnosti niklja, kadmija in svinca v različnih vzorcih magnezijevega stearata z metodo ICP-MS in AAS.

3 EKSPIREMENTALNI DEL

3.1 MATERIALI

3.1.1 Delovni standardi

- Multielementna standardna raztopina (c=10 mg/l, matriks 5 % HNO₃): Ag, Al, As, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Tl, U, V, Zn; Agilent Technologies (ZDA); LOT 1-94YP
- Raztopina internih standardov (c=100.00 µg/ml, matriks 7 % HNO₃): Bi, In, Li⁶, Sc, Tb, Y; Inorganic Ventures (Španija); LOT E2-MEB380068
- Standardna raztopina niklja (c=1000 µg/ml, matriks 5 % HNO₃): Ni; Specpure Alfa Aesar (Nemčija); LOT HC802075
- Standardna raztopina kadmija (c=1000 µg/ml, matriks 5 % HNO₃): Cd; Specpure Alfa Aesar (Nemčija); LOT 61000985
- Standardna raztopina svinca (c=1000 µg/ml, matriks 5 % HNO₃): Pb; Specpure Alfa Aesar (Nemčija); LOT 61100414

3.1.2 Reagenti

- Magnezijev nitrat heksahidrat (Mr=256,41, vsebnost 98,0-102 %), Mg(NO₃)₂ · 6H₂O; Sigma-Aldrich (Nemčija)
- Amonijev dihidrogenfosfat (Mr=115,03), NH₄H₂PO₄; Sigma-Aldrich (Nemčija)

3.1.3 Topila

- Dušikova kislina (65 %), HNO₃; Merck (Nemčija)
- Vodikov peroksid (30 %), H₂O₂; Merck (Nemčija)
- Deionizirana voda (Mili-Q Advantage A10, Millipore ZDA)

3.1.4 Vzorci magnezijevega stearata

- UF2791, magnezijev stearat
- Vzorec 1 (K-514708831), magnezijev stearat

- Vzorec 2 (DN 649, 650 (574/72A)), magnezijev stearat
- Vzorec 3 (FT1), magnezijev stearat
- Vzorec 4 (Mariborske lekarne), magnezijev stearat

3.2 APARATURE

- Masni spektrometer z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS) 820 MS (Varian, Avstralija)
- Atomski absorpcijski spektrometer ETAAS 4100 (Perkin Elmer, ZDA)
- Atomski absorpcijski spektrometer ETAAS 240Z AA (Agilent Technologies, ZDA)
- Mikrovalovna peč ETHOS1 (Milestone, Nemčija)
- Analitska tehtnica AT 261 Delta Range® (Mettler Toledo, Švica)
- Aparatura za ultra čisto vodo Mili-Q Advantage A10 (Millipore ZDA)
- Avtomatske pipete: Brand (100-1000 μ l, 0,5-10 μ l, 0,5-5ml, 25 μ l, 50 μ l)
- Steklovina: steklene merilne bučke (10,0 ml, 50,0 ml, razred A), steklene polnilne pipete (1,0 ml, 0,5 ml, 10,0 ml), čaše (50 ml)
- Polipropilenske vialne (15 ml, 2 ml)
- Software ICP-MS Expert v2.2 b126
- Program Excel (Microsoft Office 2007)

3.3 METODE

3.3.1 ICP-MS metoda z dodatkom internega standarda in direktno kalibracijo

Pred uporabo smo vso steklovino čez noč namakali v 10 % HNO₃, ter jo nato sprali z deionizirano vodo.

3.3.1.1 Priprava standardnih raztopin

Priprava osnovne standardne raztopine (SR)

V 50,0 ml merilno bučko, ki je že vsebovala približno 20 ml deionizirane vode, smo odpipetirali 5,0 ml koncentrirane HNO₃ in 5,0 ml Multielementne standardne raztopine (10 mg/l). Nato smo raztopino dopolnili z deionizirano vodo do oznake (SR1).

Koncentracija osnovne standardne raztopine – SR1: 1 mg/l

Priprava delovne standardne raztopine (DSR)

DSR smo pripravili tako, da smo v 50,0 ml merilno bučko, ki je že vsebovala 20 ml deionizirane vode, odpipetirali 8,0 ml koncentrirane HNO₃ in ustrezní volumen SR1, ter raztopino dopolnili z deionizirano vodo do oznake (tabela 2).

Tabela 2: Priprava in koncentracije delovnih standardnih raztopin.

Raztopina	Volumen osnovne standardne raztopine (SR1)	Koncentracije delovne standardne raztopine (DSR)
DSR1	50 µl	1 µg/l
DSR2	250 µl	5 µg/l
DSR3	500 µl	10 µg/l
DSR4	1250 µl	25 µg/l
DSR5	2500 µl	50 µg/l

Priprava slepe raztopine standarda (SRS)

V 50,0 ml merilno bučko, ki je že vsebovala približno 20 ml deionizirane vode, smo odpipetirali 8,0 ml koncentrirane HNO₃. Nato smo raztopino dopolnili z deionizirano vodo do oznake (SRS).

Priprava raztopine internih standardov (IS)

V 50,0 ml merilno bučko, ki je že vsebovala približno 20 ml deionizirane vode, smo odpipetirali 8,0 ml koncentrirane HNO₃ in 25,0 µl raztopine internega standarda (100 µg/l). Nato smo raztopino dopolnili z deionizirano vodo do oznake.

Koncentracija raztopine internih standardov- IS: 50 µg/l

Priprava raztopine kontrolnih standardov (KS)

V 50,0 ml merilno bučko, ki je že vsebovala približno 20 ml deionizirane vode, smo odpipetirali 8,0 ml koncentrirane HNO₃ in 50,0 µl standardne raztopine niklja (1000 mg/l), 50,0 µl standardne raztopine kadmija (1000 mg/l) in 50,0 µl standardne raztopine svinca (1000 mg/l). Nato smo raztopino dopolnili z deionizirano vodo do oznake (KS1). Raztopino kontrolnih standardov KS2 smo pripravili tako, da smo v 50,0 ml merilno bučko, ki je že vsebovala 20 ml deionizirane vode, odpipetirali 8,0 ml koncentrirane HNO₃ in 1,0 ml KS1 ter raztopino dopolnili z deionizirano vodo do oznake.

Koncentracije raztopin kontrolnih standardov so:

KS1: 1 mg/l

KS2: 20 µg/l

3.3.1.2 Priprava raztopin vzorcev (RV)

V 100 ml politetrafluoroetilenske (PTFE) posodice smo točno zatehtali 100,0 mg posameznega vzorca, dodali 8,0 ml koncentrirane HNO₃ in 1,0 ml H₂O₂. Posodice smo zaprli in postavili v notranjost mikrovalovne peči. Mikrovalovni razkroj vzorca je potekal, kot je prikazano v tabeli 3:

Tabela 3: Temperaturni program za razkroj vzorcev v mikrovalovni peči.

Korak	Temperatura (°C)	Čas za doseganje temperature (min)	Čas zadrževanja temperature (min)	Največja moč (W)
1	200	10	20	1000
2	ohlajanje			

Posodice smo nato ohladili na sobno temperaturo, raztopine kvantitativno prenesli v 50,0 ml merilne bučke in dopolnili z deionizirano vodo do oznake.

3.3.1.3 Priprava raztopin vzorcev za natančnost (ponovljivost metode in sistema)

Raztopine vzorcev za natančnost smo pripravili po postopku, ki je opisan v poglavju 3.3.1.2 z razliko, da smo pred mikrovalovnim razkrojem v PTFE posodice odpipetirali 25,0 µl mešanice standardnih raztopin niklja, kadmija in svinca, kar je predstavljalo 5,0 ppm niklja, 2,5 ppm kadmija in 10,0 ppm svinca v vzorcu.

Mešanico standardnih raztopin niklja, kadmija in svinca smo pripravili tako, da smo v 50,0 ml merilno bučko odpipetirali ustrezne volumne posameznih standardnih raztopin niklja (1000 mg/l), kadmija (1000 mg/l) in svinca (1000 mg/l) in dopolnili z deionizirano vodo do oznake (tabela 4).

Tabela 4: Priprava mešanice standardnih raztopin niklja, kadmija in svinca za natančnost (ponovljivost metode in sistema).

	Standardna raztopina Ni (1000 mg/l)	Standardna raztopina Cd (1000 mg/l)	Standardna raztopina Pb (1000 mg/l)
Dodan volumen posamezne standardne raztopine(ml)	1,0	0,5	2,0
Redčitev (ml)	50,0		
Končna koncentracija (µg/l)	20,0	10,0	40,0

3.3.1.4 Priprava raztopin vzorcev za točnost metode

- 50 % limitne vrednosti

Raztopine vzorcev smo pripravili po postopku, ki je opisan v poglavju 3.3.1.2 z razliko, da smo pred mikrovalovnim razkrojem v PTFE posodice odpipetirali 25,0 µl mešanice standardnih raztopin niklja, kadmija in svinca, kar je predstavljalo 2,5 ppm niklja, 1,25 ppm kadmija in 5,0 ppm svinca v vzorcu.

Mešanico standardnih raztopin niklja, kadmija in svinca smo pripravili tako, da smo v 50,0 ml merilno bučko odpipetirali ustrezne volumne posameznih standardnih raztopin niklja (1000 mg/l), kadmija (1000 mg/l) in svinca (1000 mg/l) in dopolnili z deionizirano vodo do oznake (tabela 5).

Tabela 5: Priprava mešanice standardnih raztopin niklja, kadmija in svinca za točnost metode pri okoli 50 % limitni vrednosti.

	Standardna raztopina Ni (1000 mg/l)	Standardna raztopina Cd (1000 mg/l)	Standardna raztopina Pb (1000 mg/l)
Dodan volumen posamezne standardne raztopine(ml)	0,5	0,25	1,0
Redčitev (ml)	50,0		
Končna koncentracija (µg/l)	10,0	5,0	20,0

- 100 % limitne vrednosti

Raztopine vzorcev smo pripravili po postopku, ki je opisan v poglavju 3.3.1.2 z razliko, da smo pred mikrovalovnim razkrojem v PTFE posodice odpipetirali 25,0 µl mešanice standardnih raztopin niklja, kadmija in svinca, kar je predstavljalo 5,0 ppm niklja, 2,5 ppm kadmija in 10,0 ppm svinca v vzorcu.

Mešanico standardnih raztopin niklja, kadmija in svinca smo pripravili tako, da smo v 50,0 ml merilno bučko odpipetirali ustrezne volumne posameznih standardnih raztopin niklja (1000 mg/l), kadmija (1000 mg/l) in svinca (1000 mg/l) in dopolnili z deionizirano vodo do oznake (tabela 6).

Tabela 6: Priprava mešanice standardnih raztopin niklja, kadmija in svinca za točnost metode pri 100 % limitni vrednosti.

	Standardna raztopina Ni (1000 mg/l)	Standardna raztopina Cd (1000 mg/l)	Standardna raztopina Pb (1000 mg/l)
Dodan volumen posamezne standardne raztopine(ml)	1,0	0,5	2,0
Redčitev (ml)	50,0		
Končna koncentracija (µg/l)	20,0	10,0	40,0

- 150 % limitne vrednosti

Raztopine vzorcev smo pripravili po postopku, ki je opisan v poglavju 3.3.1.2 z razliko, da smo pred mikrovalovnim razkrojem v PTFE posodice odpipetirali 25,0 µl mešanice standardnih raztopin niklja, kadmija in svinca, kar je predstavljalo 7,5 ppm niklja, 5,0 ppm kadmija in 15,0 ppm svinca v vzorcu.

Mešanico standardnih raztopin niklja, kadmija in svinca smo pripravili tako, da smo v 50,0 ml merilno bučko odpipetirali ustrezne volumne posameznih standardnih raztopin niklja (1000 mg/l), kadmija (1000 mg/l) in svinca (1000 mg/l) in dopolnili z deionizirano vodo do oznake (tabela 7).

Tabela 7: Priprava mešanice standardnih raztopin niklja, kadmija in svinca za točnost metode pri okoli 150 % limitni vrednosti.

	Standardna raztopina Ni (1000 mg/l)	Standardna raztopina Cd (1000 mg/l)	Standardna raztopina Pb (1000 mg/l)
Dodan volumen posamezne standardne raztopine(ml)	1,5	1,0	3,0
Redčitev (ml)	50,0		
Končna koncentracija (µg/l)	30,0	20,0	60,0

3.3.1.5 Pogoji merjenja z ICP-MS

- Pretok nosilnega plina (Ar): 0,94 l/min
- Pretok plazemskega plina (Ar): 18,00 l/min
- Pretok pomožnega plina (Ar): 1,80 l/min
- Globina plamenice: 6,50 mm
- Moč plazme: 1.50 kW
- Pretok peristaltične črpalke: 4 rpm
- Čas stabilizacije: 120 sekund

3.3.2 AAS (ETAAS) metoda s standardnim dodatkom - Ph. Eur metoda (poglavje 2.2.23., metoda II)

Vso steklovino smo pred uporabo namakali 30 minut v vroči 8 M HNO₃ ter jo nato sprali z deionizirano vodo.

3.3.2.1 Priprava raztopine vzorca (RV-AAS)

V 100 ml politetrafluoroetilenske (PTFE) posodice smo točno zatehtali približno 0,100 g vzorca in dodali 2,5 ml koncentrirane HNO₃. Posodice smo zaprli in postavili v notranjost mikrovalovne peči. Mikrovalovni razkroj vzorca je potekal, kot je prikazano v tabeli 8.

Tabela 8: Temperaturni program za razkroj vzorcev v mikrovalovni peči.

Korak	Temperatura (°C)	Čas za doseganje temperature (min)	Čas zadrževanja temperature (min)	Največja moč (W)
1	170	10	180	1000
2	ohlajanje			

Posodice smo nato ohladili na sobno temperaturo ter raztopino kvantitativno prenesli v 10,0 ml merilno bučko in dopolnili z deionizirano vodo do oznake.

3.3.2.2 Priprava osnovnih in delovnih standardnih raztopin za validacijo metode

Priprava slepe raztopine standarda (SRS-AAS)

V 100,0 ml merilno bučko, ki je predhodno že vsebovala 25 ml deionizirane vode smo odpipetirali 25,0 ml koncentrirane HNO₃ ter dopolnili z deionizirano vodo do oznake.

Priprava matrične raztopine modifikatorja (MRM)

V 100,0 ml merilno bučko smo točno zatehtali približno 20 g amonijevega dihidrogenfosfata in 1 g magnezijevega nitrata, raztopili v deionizirani vodi ter z istim topilom dopolnili do oznake.

Priprava osnovnih standardnih raztopin niklja (SR-Ni)

V 50,0 ml merilno bučko smo odpipetirali 5,0 ml standardne raztopine niklja (1000 mg/l) in s SRS-AAS dopolnili do oznake (SR1-Ni). SR2-Ni smo pripravili tako, da smo v 100,0 ml merilno bučko odpipetirali 1,0 ml SR1-Ni in s SRS-AAS dopolnili do oznake. SR3-Ni smo pripravili tako, da smo v 100,0 ml merilno bučko odpipetirali 10,0 ml SR2-Ni in s SRS-AAS dopolnili do oznake. SR4-Ni pa smo pripravili tako, da smo v 100,0 ml merilno bučko odpipetirali 5,0 ml SR2-Ni in s SRS-AAS dopolnili do oznake.

Koncentracije osnovnih standardnih raztopin niklja so:

SR1-Ni: 100 mg/l

SR2-Ni: 1 mg/l

SR3-Ni: 100 µg/l

SR4-Ni: 50 µg/l

Priprava delovnih standardnih raztopin niklja za določitev LOD in LOQ (DSR-Ni)

Delovne standardne raztopine niklja smo pripravili tako, da smo v 100,0 ml merilno bučko odpipetirali ustreznemu volumen SR2-Ni in s SRS-AAS dopolnili do oznake (tabela 9).

Tabela 9: Priprava in koncentracije delovnih standardnih raztopin niklja (DSR-Ni).

Raztopina	Volumen osnovne standardne raztopine (SR2-Ni)	Koncentracije delovne standardne raztopine (DSR-Ni)
DSR1-Ni	1,25 ml	12,5 µg/l
DSR2-Ni	2,5 ml	25 µg/l
DSR3-Ni	5,0 ml	50 µg/l
DSR4-Ni	7,5 ml	75 µg/l

Priprava delovnih standardnih raztopin niklja za določitev ponovljivosti metode (DSRP-Ni)

Delovne standardne raztopine smo pripravili tako, da smo v 10,0 ml merilno bučko odpipetirali 1,0 ml raztopine vzorca (RV-AAS), ustrezne volumne osnovne standardne raztopine niklja (SR-Ni) in slepe raztopine standarda (SRS-AAS) (tabela 10). V vsako delovno standardno raztopino smo dodali 50,0 µl matrične raztopine modifikatorja (MRM).

Tabela 10: Priprava delovnih standardnih raztopin niklja (DSRP-Ni).

Raztopina	Volumen osnovne standardne raztopine (SR-Ni)	Volumen slepe raztopine standarda (SRS-AAS)	Koncentracije delovne standardne raztopine niklja (DSRP-Ni)
DSRP1-Ni	-	1,0 ml	0 µg/l
DSRP2-Ni	0,5 ml (SR4-Ni)	0,5 ml	12,5 µg/l
DSRP3-Ni	1,0 ml (SR4-Ni)	-	25 µg/l
DSRP4-Ni	1,0 ml (SR3-Ni)	-	50 µg/l

Priprava osnovnih standardnih raztopin kadmija (SR-Cd)

V 50,0 ml merilno bučko smo odpipetirali 5,0 ml standardne raztopine kadmija (1000 mg/l) in s SRS-AAS dopolnili do oznake (SR1-Cd). SR2-Cd smo pripravili tako, da smo v 100,0 ml merilno bučko odpipetirali 1,0 ml SR1-Cd in s SRS-AAS dopolnili do oznake. SR3-Cd smo pripravili tako, da smo v 100,0 ml merilno bučko odpipetirali 0,1 ml SR1-Cd in s SRS-AAS dopolnili do oznake. SR4-Cd smo pripravili tako, da smo v 100,0 ml merilno bučko odpipetirali 0,6 ml SR2-Cd in s SRS dopolnili do oznake. SR5-Cd pa smo pripravili tako, da smo v 100,0 ml merilno bučko odpipetirali 0,3 ml SR2-Cd in s SRS dopolnili do oznake.

Koncentracije osnovnih standardnih raztopin kadmija so:

SR1-Cd: 100 mg/l

SR2-Cd: 1,0 mg/l

SR3-Cd: 100 µg/l

SR4-Cd: 6,0 µg/l

SR5-Cd: 3,0 µg/l

Priprava delovnih standardnih raztopin kadmija za določitev LOD in LOQ (DSR-Cd)

Delovne standardne raztopine kadmija smo pripravili tako, da smo v 50,0 ml merilno bučko odpipetirali ustrežni volumen SR3-Cd in s SRS-AAS dopolnili do oznake (tabela 11).

Tabela 11: Priprava in koncentracije delovnih standardnih raztopin kadmija (DSR-Cd).

Raztopina	Volumen osnovne standardne raztopine (SR3-Cd)	Koncentracije delovne standardne raztopine (DSR-Cd)
DSR1-Cd	375 µl	0,75 µg/l
DSR2-Cd	750 µl	1,5 µg/l
DSR3-Cd	1,0 ml	2,0 µg/l
DSR4-Cd	1,5 ml	3,0 µg/l

Priprava delovnih standardnih raztopin kadmija za določitev ponovljivosti metode (DSRP-Cd)

Delovne standardne raztopine kadmija smo pripravili tako, da smo v 10,0 ml merilno bučko odpipetirali 1,0 ml raztopine vzorca (RV-AAS), ustrezne volumne osnovne standardne raztopine kadmija (SR-Cd) in slepe raztopine standarda (SRS-AAS) (tabela 12). V vsako delovno standardno raztopino smo dodali 50,0 µl matrične raztopine modifikatorja (MRM).

Tabela 12: Priprava delovnih standardnih raztopin kadmija (DSRP-Cd).

Raztopina	Volumen osnovne standardne raztopine (SR-Cd)	Volumen slepe raztopine standarda (SRS-AAS)	Koncentracije delovne standardne raztopine kadmija (DSRP-Cd)
DSRP1-Cd	-	1,0 ml	0 µg/l
DSRP2-Cd	0,5 ml (SR5-Cd)	0,5 ml	0,75 µg/l
DSRP3-Cd	1,0 ml (SR5-Cd)	-	1,5 µg/l
DSRP4-Cd	1,0 ml (SR4-Cd)	-	3,0 µg/l

Priprava osnovnih standardnih raztopin svınca (SR-Pb)

V 50,0 ml merilno bučko smo odpipetirali 5,0 ml standardne raztopine svınca (1000 mg/l) in s SRS-AAS dopolnili do oznake (SR1-Pb). SR2-Pb smo pripravili tako, da smo v 100,0 ml merilno bučko odpipetirali 1,0 ml SR1-Pb in s SRS-AAS dopolnili do oznake. SR3-Pb smo pripravili tako, da smo v 100,0 ml merilno bučko odpipetirali 20,0 ml SR2-Pb in s SRS-AAS dopolnili do oznake. SR4-Pb pa smo pripravili tako, da smo v 100,0 ml merilno bučko odpipetirali 10,0 ml SR2-Pb in s SRS dopolnili do oznake.

Koncentracije osnovnih standardnih raztopin svinca so:

SR1-Pb: 100 mg/l

SR2-Pb: 1,0 mg/l

SR3-Pb: 200 µg/l

SR4-Pb: 100 µg/l

Priprava delovnih standardnih raztopin svinca za določitev LOD in LOO (DSR-Pb)

Delovne standardne raztopine svinca smo pripravili tako, da smo v 100,0 ml merilno bučko odpipetirali ustrežni volumen SR2-Pb in s SRS-AAS dopolnili do oznake (tabela 13).

Tabela 13: Priprava in koncentracije delovnih standardnih raztopin svinca (DSR-Pb).

Raztopina	Volumen osnovne standardne raztopine (SR2-Pb)	Koncentracije delovne standardne raztopine (DSR-Pb)
DSR1-Pb	2,5 ml	25 µg/l
DSR2-Pb	5,0 ml	50 µg/l
DSR3-Pb	7,5 ml	75 µg/l
DSR4-Pb	10,0 ml	100 µg/l

Priprava delovnih standardnih raztopin svinca za določitev ponovljivosti metode (DSRP-Pb)

Delovne standardne raztopine svinca smo pripravili tako, da smo v 10,0 ml merilno bučko odpipetirali 1,0 ml raztopine vzorca (RV-AAS), ustrezne volumne osnovne standardne raztopine svinca (SR-Pb) in slepe raztopine standarda (SRS-AAS) (tabela 14). V vsako delovno standardno raztopino smo dodali 50,0 µl matrične raztopine modifikatorja (MRM).

Tabela 14: Priprava delovnih standardnih raztopin svinca (DSRP-Pb).

Raztopina	Volumen osnovne standardne raztopine (SR-Pb)	Volumen slepe raztopine standarda (SRS-AAS)	Koncentracije delovne standardne raztopine kadmija (DSRP-Pb)
DSRP1-Pb	-	1,0 ml	0 µg/l
DSRP2-Pb	0,5 ml (SR4-Pb)	0,5 ml	25 µg/l
DSRP3-Pb	1,0 ml (SR4-Pb)	-	50 µg/l
DSRP4-Pb	1,0 ml (SR3-Pb)	-	75 µg/l

3.3.2.3 Pogoji merjenja z AAS (ETAAS)

Pogoji merjenja z AAS (ETAAS) za nikelj:

Valovna dolžina (λ) = 232,0 nm

Temperaturi program za grafitno kiveto:

- Temperatura pred atomizacijo = 1000 °C (čas za doseg temperature = 20 s, čas zadrževanja = 30 s)
- Temperatura atomizacije = 2300 °C (čas za doseg temperature = 0 s, čas zadrževanja = 5 s)

Pogoji merjenja z AAS (ETAAS) za kadmij:

Valovna dolžina (λ) = 228,8 nm

Temperaturi program za grafitno kiveto:

- Temperatura pred atomizacijo = 600 °C (čas za doseg temperature = 10 s, čas zadrževanja = 30 s)
- Temperatura atomizacije = 1800 °C (čas za doseg temperature = 0 s, čas zadrževanja = 5 s)

Pogoji merjenja z AAS (ETAAS) za svinec:

Valovna dolžina (λ) = 283,3 nm

Temperaturi program za grafitno kiveto:

- Temperatura pred atomizacijo = 450 °C (čas za dosego temperature = 10 s, čas zadrževanja = 30 s)
- Temperatura atomizacije = 2000 °C (čas za dosego temperature = 0 s, čas zadrževanja = 5 s)

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 VALIDACIJA ANALIZNEGA POSTOPKA ZA HKRATNO DOLOČANJE NIKLJA, KADMIJA IN SVINCA Z ICP-MS

Metodo smo validirali v skladu z ICH smernicami. Parametre, ki smo jih validirali smo izbrali na osnovi priporočil Ameriške farmakopeje, ki obravnava validacijo alternativne metode ICP-MS in sicer: točnost, natančnost (ponovljivost sistema in metode), linearnost, stabilnost standardnih raztopin in vzorcev, robustnost, mejo zaznavnosti (LOD) in mejo določljivosti (LOQ) (15). Zaradi selektivnosti metode ICP-MS parametra specifičnost nismo validirali.

4.1.1 Točnost metode

Točnost metode smo določili tako, da smo vzorcu pred mikrovalovnim razkrojem hkrati dodali standardne raztopine niklja, kadmija in svinca in sicer v treh različnih koncentracijah, ki so predstavljale okoli 50 %, 100 % in 150 % limitne vrednosti (tabela 15). Raztopine smo pripravili tako, kot je opisano v poglavju 3.3.1.4. Limitne vrednosti so definirane v Evropski farmakopeji (monografija magnezijevega stearata 01/2008-1474).

Tabela 15: 50 %, 100 % in 150 % limitne vrednosti niklja, kadmija in svinca v vzorcu.

Limitne vrednosti	Vsebnost Ni (ppm)	Vsebnost Cd (ppm)	Vsebnost Pb (ppm)
50 %	2,5	1,25	5,0
100 %	5,0	3,0	10,0
150 %	7,5	5,0	15,0

Vsako koncentracijo smo pripravili v treh paralelah. Točnost smo podali kot izkoristek (recovery), izražen v odstotkih prekrivanja med izmerjeno koncentracijo in dodano koncentracijo. Vsebnost niklja, kadmija in svinca smo izračunali po enačbi 10, izkoristek pa po enačbi 1.

$$\text{ppm (kovine)} = \frac{(C_v - sl_v) \times 50}{1000 \times N_v} \quad (\text{enačba 10})$$

C_vkoncentracija dodane kovine v $\mu\text{g/L}$

N_vnatehta vzorca v g

50..... volumen raztopine vzorca v ml

1/1000..... pretvorba enot

sl_v koncentracija kovine v slepi raztopini vzorca

Tabela 16: Točnost metode pri dodani okoli 50 % limitni vrednosti niklja (2,5 ppm), kadmija (1,25 ppm) in svinca (5 ppm) v vzorcu.

Vzorec	Ni		
	Dodano (ppm)	Izmerjeno (ppm)	Izkoristek (%)
Vzorec 1	2,500	2,537	101,5
Vzorec 2	2,500	2,632	105,3
Vzorec 3	2,500	2,540	101,6
Povprečni izkoristek			102,8
SD			2,2
RSD (%)			2,1
Vzorec	Cd		
	Dodano (ppm)	Izmerjeno (ppm)	Izkoristek (%)
Vzorec 1	1,250	1,264	101,1
Vzorec 2	1,250	1,250	100,0
Vzorec 3	1,250	1,253	100,2
Povprečni izkoristek			100,4
SD			0,58
RSD (%)			0,6
Vzorec	Pb		
	Dodano (ppm)	Izmerjeno (ppm)	Izkoristek (%)
Vzorec 1	5,000	4,958	99,2
Vzorec 2	5,000	4,661	93,2
Vzorec 3	5,000	5,049	101,0
Povprečni izkoristek			97,8
SD			4,1
RSD (%)			4,1

Tabela 17: Točnost metode pri dodani 100 % limitni vrednosti niklja (5 ppm), kadmija (2,5 ppm) in svinca (10 ppm) v vzorcu.

Vzorec	Ni		
	Dodano (ppm)	Izmerjeno (ppm)	Izkoristek (%)
Vzorec 1	5,000	4,953	99,1
Vzorec 2	5,000	4,868	97,4
Vzorec 3	5,000	4,797	95,9
Povprečni izkoristek			97,5
SD			1,6
RSD (%)			1,6
Vzorec	Cd		
	Dodano (ppm)	Izmerjeno (ppm)	Izkoristek (%)
Vzorec 1	2,500	2,428	97,1
Vzorec 2	2,500	2,491	99,6
Vzorec 3	2,500	2,439	97,6
Povprečni izkoristek			98,1
SD			1,3
RSD (%)			1,4
Vzorec	Pb		
	Dodano (ppm)	Izmerjeno (ppm)	Izkoristek (%)
Vzorec 1	10,000	9,907	99,1
Vzorec 2	10,000	10,075	100,8
Vzorec 3	10,000	10,222	102,2
Povprečni izkoristek			100,7
SD			1,6
RSD (%)			1,6

Tabela 18: Točnost metode metode pri dodani okoli 150 % limitni vrednosti niklja (7,5 ppm), kadmija (5 ppm) in svinca (15 ppm) v vzorcu.

Vzorec	Ni		
	Dodano (ppm)	Izmerjeno (ppm)	Izkoristek (%)
Vzorec 1	7,500	7,751	103,3
Vzorec 2	7,500	7,904	105,4
Vzorec 3	7,500	7,745	103,3
Povprečni izkoristek			104,0
SD			1,2
RSD (%)			1,2
Vzorec	Cd		
	Dodano (ppm)	Izmerjeno (ppm)	Izkoristek (%)
Vzorec 1	5,000	5,086	101,7
Vzorec 2	5,000	5,200	104,0
Vzorec 3	5,000	4,842	96,8
Povprečni izkoristek			100,9
SD			3,7
RSD (%)			3,6
Vzorec	Pb		
	Dodano (ppm)	Izmerjeno (ppm)	Izkoristek (%)
Vzorec 1	15,000	14,471	96,5
Vzorec 2	15,000	14,978	99,9
Vzorec 3	15,000	15,722	104,8
Povprečni izkoristek			100,4
SD			4,2
RSD (%)			4,2

Iz Tabel 16, 17, 18 je razvidno, da se izkoristki gibajo od 93,2 do 105,4 %. Glede na zahtevo, ki je med 70 % in 150 %, je metoda točna in primerna za rutinsko uporabo.

4.1.2 Natančnost (ponovljivost) ICP-MS metode in sistema

Natančnost (ponovljivost) metode smo določili s standardnim odmikom (SD) in relativnim standardnim odmikom (RSD) odzivov šestih vzorcev. Vzorcem smo pred mikrovalovnim razkrojem hkrati dodali standardne količine niklja, kadmija in svinca, kar je predstavljalo 5 ppm niklja, 2,5 ppm kadmija in 10 ppm svinca v vzorcu (poglavje 3.3.1.3). Rezultati so prikazani v tabeli 19.

Natančnost (ponovljivost) sistema smo prikazali z standardnim odmikom (SD) in relativnim standardnim odmikom (RSD) odzivov večkratnega injiciranja istega vzorca. Vzorcem smo pred mikrovalovnim razkrojem hkrati dodali standardne količine niklja, kadmija in svinca, kar je predstavljalo 5 ppm niklja, 2,5 ppm kadmija in 10 ppm svinca v vzorcu (poglavje 3.3.1.3). Rezultati so prikazani v tabeli 20.

Koncentracije niklja, kadmija in svinca smo določili šestkrat in vsebnost izračunali po enačbi 10. Standardno deviacijo in relativno standardno deviacijo smo izračunali po enačbah 2 in 3.

Tabela 19: Natančnost (ponovljivost) metode za vzorec, ki vsebuje 5 ppm niklja, 2,5 ppm kadmija in 10 ppm svinca.

Število vzorcev	Izmerjene vsebnosti Ni (ppm)	Dodane vsebnosti Ni (ppm)	Izmerjene vsebnosti Cd (ppm)	Dodane vsebnosti Cd (ppm)	Izmerjene vsebnosti Pb (ppm)	Dodane vsebnosti Pb (ppm)
Vzorec 1	4,953	5,000	2,428	2,500	9,907	10,000
Vzorec 2	4,868	5,000	2,491	2,500	10,075	10,000
Vzorec 3	4,797	5,000	2,439	2,500	10,222	10,000
Vzorec 4	4,970	5,000	2,500	2,500	10,129	10,000
Vzorec 5	4,956	5,000	2,533	2,500	10,358	10,000
Vzorec 6	4,778	5,000	2,382	2,500	9,545	10,000
Povprečje meritev	4,9		2,5		10,0	
SD	0,09		0,06		0,29	
RSD(%)	1,7		2,3		2,8	

Tabela 20: Natančnost (ponovljivost) sistema za vzorec, ki vsebuje 5 ppm niklja, 2,5 ppm kadmija in 10 ppm svinca.

Število vzorcev	Izmerjene vsebnosti Ni (ppm)	Dodane vsebnosti Ni (ppm)	Izmerjene vsebnosti Cd (ppm)	Dodane vsebnosti Cd (ppm)	Izmerjene vsebnosti Pb (ppm)	Dodane vsebnosti Pb (ppm)
Vzorec 1	4,775	5,000	2,488	2,500	10,762	10,000
Vzorec 2	4,928	5,000	2,496	2,500	10,446	10,000
Vzorec 3	4,879	5,000	2,511	2,500	10,804	10,000
Vzorec 4	4,806	5,000	2,468	2,500	10,111	10,000
Vzorec 5	4,837	5,000	2,419	2,500	10,249	10,000
Vzorec 6	4,825	5,000	2,459	2,500	10,231	10,000
Povprečje meritev	4,8		2,5		10,4	
SD	0,05		0,03		0,29	
RSD(%)	1,1		1,3		2,8	

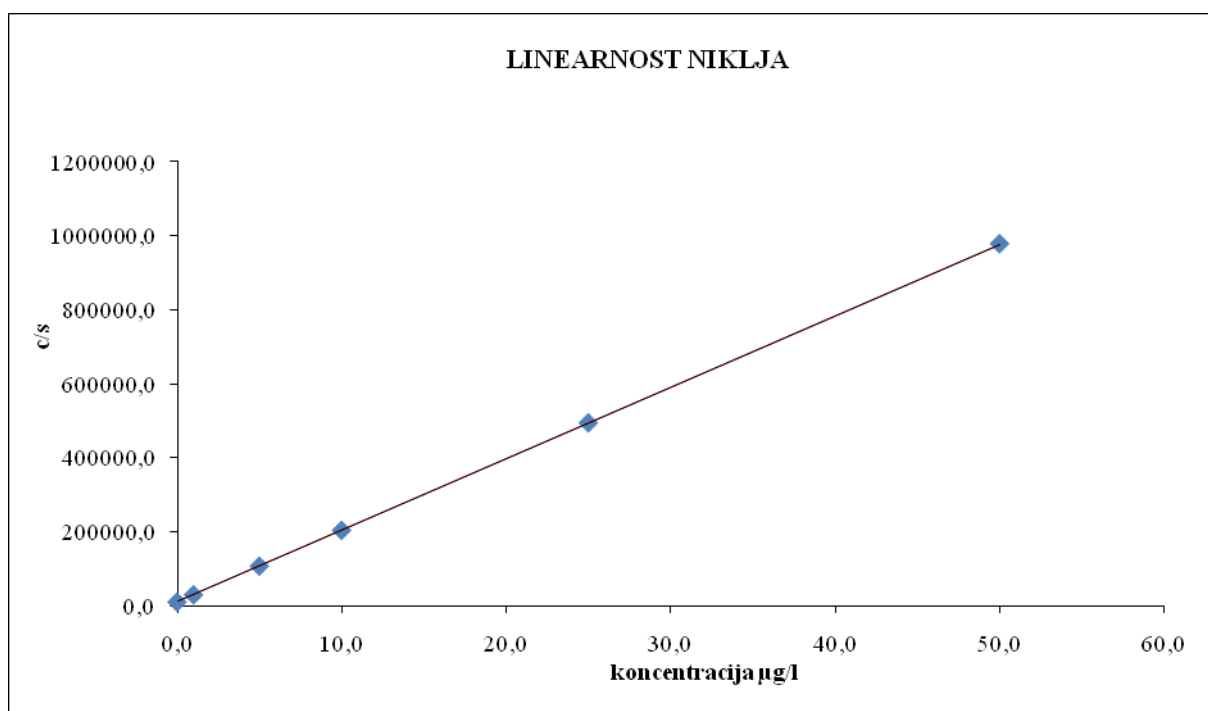
Rezultati potrjujejo, da sta metoda in sistem natančna z relativnim standardnim odklikom (RSD) pod 3 %, kar ustreza našim zahtevam (RSD < 20 %).

4.1.1 Linearnost ICP-MS metode

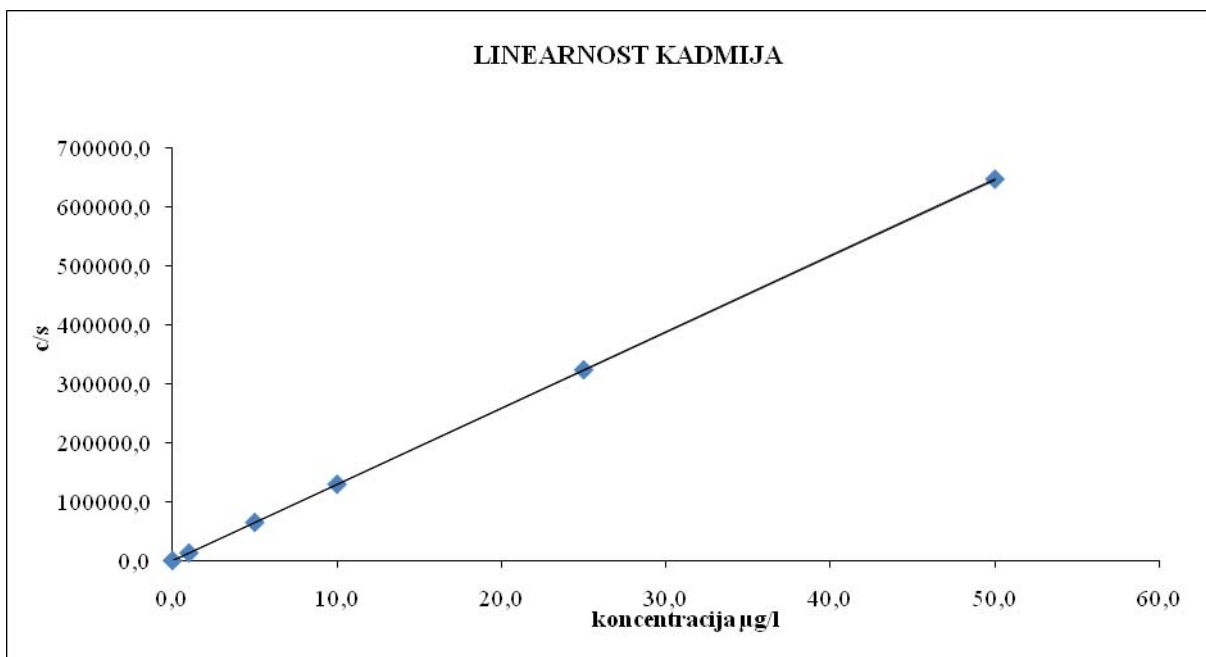
Za določitev linearnosti smo pripravili pet standardnih raztopin (DSR1-DSR5, poglavje 3.3.1.1), ki so vsebovale nikelj, kadmij in svinec v koncentracijah: 1, 5, 10, 25, 50 µg/l, kar ustreza vsebnostim v vzorcu 0,5, 2,5, 5, 12,5 in 25 ppm za natehto vzorca 0,1 g in redčenje na 50,0 ml. Vsaki standardni raztopini smo hkrati izmerili nikelj, kadmij in svinec v treh paralelah. Enačbo regresijske premice smo izračunali s pomočjo programa Excel, korelacijske koeficiente pa s pomočjo software ICP-MS Expert v2.2. Rezultati so prikazani v tabeli 21 in na slikah 14, 15 in 16.

Tabela 21: Povprečni odziv c/s v koncentracijskem območju od 1 do 50 µg/l in enačbe regresijskih premic.

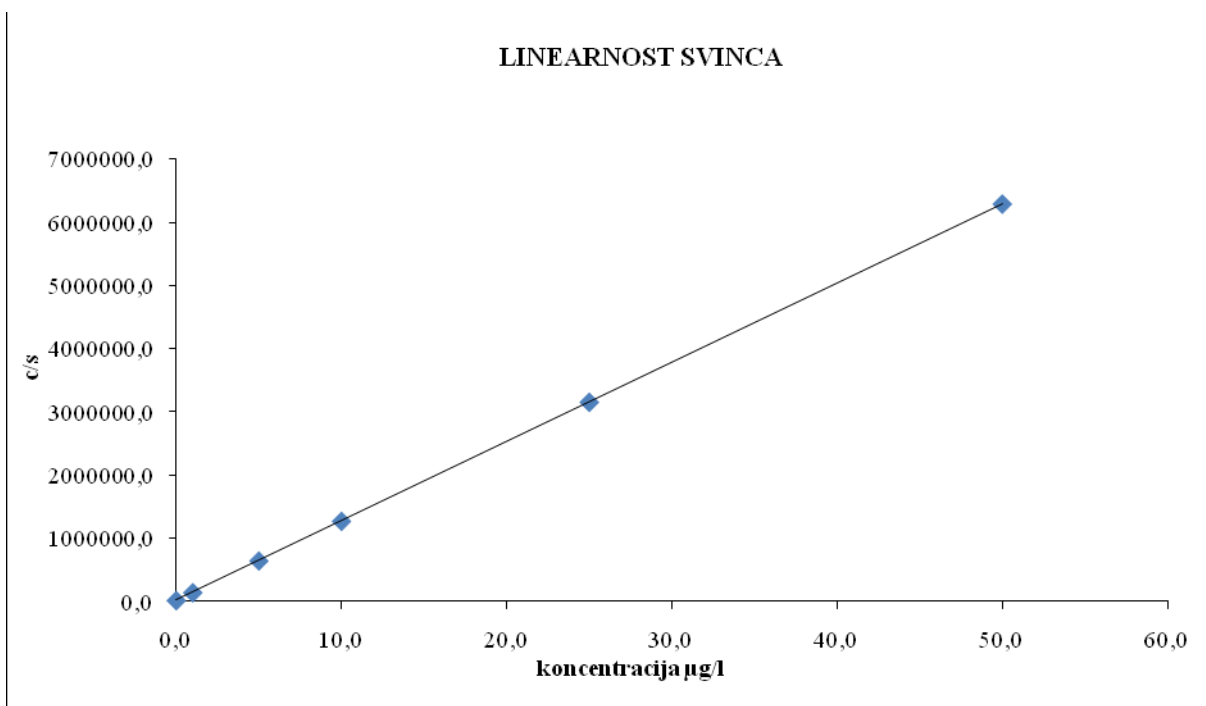
Standardne raztopine	Ni (c/s)	Cd (c/s)	Pb (c/s)
1 µg/l	31155,6	12998,8	147162,3
5 µg/l	108712,8	64520,4	645084,8
10 µg/l	202839,8	128700,4	1259257,0
25 µg/l	501149,4	325525,2	3193063,0
50 µg/l	981967,1	646810,1	6244353,0
R	0,9999	0,9999	0,9999
Enačba regresijske premice	$y = 19366,7x + 11616,2$	$y = 12967,8x + 84,2$	$y = 125269,1x + 22025,8$



Slika 14: Graf linearnosti za nikelj v območju od 1 do 50 µg/l



Slika 15: Graf linearnosti za kadmij v območju od 1 do 50 µg/l



Slika 16: Graf linearnosti za svinec v območju od 1 do 50 µg/l

Dobljeni rezultati potrjujejo, da je metoda v območju od 1 do 50 µg/l oziroma od 0,5 do 25 ppm v vzorcu linearna, saj so vsi korelacijski koeficienti večji od 0,99, kar ustreza našim zahtevam ($R = > 0,99$).

4.1.4 Stabilnost standardnih raztopin in raztopin vzorcev

Stabilnost standardnih raztopin

Stabilnost standardnih raztopin smo preverili tako, da smo pripravili standardno raztopino s koncentracijo 10 µg/l in jo izmerili v času 0, po 6 urah, 12 urah in 24 urah. Rezultate smo prikazali kot izkoristek v odstotkih glede na čas 0 (tabela 22).

Tabela 22: Prikaz stabilnosti standardne raztopine, koncentracije 10 µg/l.

Čas (h)	Izkoristek Ni v %	Izkoristek Cd v %	Izkoristek Pb v %
0	100,0	100,0	100,0
6	96,9	100,4	100,2
12	96,8	99,1	99,1
24	99,0	98,1	98,2

Izkoristki se gibajo od 96,8 % do 100,4 % kar ustreza našim zahtevam (med 70 % in 150%). Standardne raztopine so stabilne vsaj 24 ur.

Stabilnost raztopin vzorcev

Stabilnost raztopin vzorcev smo preverili tako, da smo šest vzorcev razkrojili z mikrovalovi skladno z vsebino poglavja 3.3.1.3. Pred mikrovalovnim razkrojem smo jim dodali standardne raztopine niklja (5 ppm), kadmija (2,5 ppm) in svinca (10 ppm). Vsebnost v vzorcih smo izmerili v času 0, po 24 urah in 48 urah. Rezultate smo prikazali kot izkoristek v odstotkih glede na čas 0 (tabela 23).

Tabela 23: Prikaz stabilnosti raztopin vzorcev.

Čas (h)	Izkoristek Ni v %	Izkoristek Cd v %	Izkoristek Pb v %
0	100,0	100,0	100,0
12	104,5	104,0	103,4
48	100,3	101,3	102,6

Izkoristki se gibajo od 100,3 % do 104,5 %, kar ustreza našim zahtevam (med 70 % in 150%). Raztopine vzorcev so stabilne vsaj 48 ur.

4.1.5 Robustnost metode

Robustnost metode smo preverili s spreminjanjem različnih parametrov mikrovalovnega razkroja (temperatura razkroja, čas razkroja, moč razkroja), ter s spreminjanjem parametrov merjenja z ICP-MS (moč plazme, pretok vzorca). Rezultate smo prikazali kot izkoristek v odstotkih (enačba 1) glede na dodano količino standardnih raztopin niklja (5 ppm), kadmija (2,5 ppm) in svinca (10 ppm), ki smo jih dodali vzorcem pred mikrovalovnim razkrojem. Za vsako spremembo smo pripravili tri paralele.

Sprememba parametrov mikrovalovnega razkroja

Najprej smo spremenili mikrovalovni program za razkroj vzorcev in sicer smo znižali temperaturo mikrovalovnega razkroja, podaljšali čas za doseganje končne temperature in skrajšali čas zadrževanja maksimalne temperature (tabela 24). Rezultati so prikazani v tabeli 25.

Tabela 24: Sprememba parametrov mikrovalovnega razkroja (znižanje temperature, daljši čas za doseganje končne temperature)

Korak	Temperatura (°C)	Čas za doseganje temperature (min)	Čas zadrževanja temperature (min)	Največja moč (W)
1	150	15	15	800
2	ohlajanje			

Tabela 25: Prikaz rezultatov pri spremenjenih parametrih mikrovalovnega razkroja.

Število meritev	Izkoristek Ni v %	Izkoristek Cd v %	Izkoristek Pb v %
Vzorec 1	99,2	102,4	104,6
Vzorec 2	99,3	102,4	103,8
Vzorec 3	90,4	95,3	94,4

Nato smo povečali temperaturo mikrovalovnega razkroja in zmanjšali čas zadrževanja temperature (tabela 26). Rezultati so prikazani v tabeli 27.

Tabela 26: Sprememba parametrov mikrovalovnega razkroja (višja temperatura, krajši čas zadrževanja temperature).

Korak	Temperatura (°C)	Čas za doseganje temperature (min)	Čas zadrževanja temperature (min)	Največja moč (W)
1	220	10	10	1000
2	ohlajanje			

Tabela 27: Prikaz rezultatov pri spremenjenih parametrih mikrovalovnega razkroja.

Število meritev	Izkoristek Ni v %	Izkoristek Cd v %	Izkoristek Pb v %
Vzorec 1	103,5	101,4	100,3
Vzorec 2	97,8	99,9	103,8
Vzorec 3	95,3	97,3	101,6

Sprememba parametrov pri merjenju z instrumentom ICP-MS

Vzorci smo pripravili v skladu z vsebino podpoglavja 3.3.1.3. Pred mikrovalovnim razkrojem smo jim dodali standardne raztopine niklja (5 ppm), kadmija (2,5 ppm) in svinca (10 ppm). Zmanjšali smo moč plazme in pretoka. Rezultati so prikazani kot izkoristki v odstotkih (tabela 28). Izkoristek smo izračunali po enačbi 1.

Tabela 28: Sprememba moči plazme (1,4 kW) in pretoka vzorca (3 rpm).

Število meritev	Izkoristek Ni v %	Izkoristek Cd v %	Izkoristek Pb v %
Vzorec 1	102,0	105,2	100,0
Vzorec 2	100,0	99,4	96,6
Vzorec 3	102,4	103,2	99,3

Iz rezultatov je razvidno, da je metoda izredno robustna, saj ni občutljiva na spremembe tako parametrov mikrovalovnega razkroja, kot parametrov merjenja z ICP-MS. Izkoristki se gibajo od 90,4 do 105,2 %, kar je v ustreznih mejah (med 70 % in 150%).

4.1.6 Meja zaznavnosti (LOD) in meja določljivosti (LOQ)

Mejo zaznavnosti in mejo določljivosti smo določili tako, da smo dodali devetim slepim raztopinam pred mikrovalovnim razkrojem standardno raztopino niklja (končna koncentracija 1 µg/l), kadmija (končna koncentracija 0,1 µg/l) in svinca (končna koncentracija 1 µg/l). Rezultati so prikazani v tabeli 29 in tabeli 30. Slednja prikazuje rezultate LOD in LOQ za natehto 0,1 g in redčenje na 50 ml. Končne koncentracije smo ocenili tako, da smo predhodno analizirali šest raztopin vzorca pripravljenega v skladu z vsebino podpoglavja 3.3.1.2. Nato smo izračunali standardno deviacijo (SD) in mejo zaznavnosti (LOD), ter ocenjeno LOD pomnožili s faktorjem dva za svinec in pet za nikelj in kadmij. Rezultati so prikazani v tabeli 31.

Tabela 29: Študija meje zaznavnosti (LOD) in meje določljivosti (LOQ).

Število vzorcev	Koncentracija Ni (µg/l)	Koncentracija Cd (µg/l)	Koncentracija Pb (µg/l)
Vzorec 1	1,01	0,10	0,93
Vzorec 2	1,02	0,097	0,93
Vzorec 3	1,13	0,097	0,86
Vzorec 4	0,92	0,096	1,01
Vzorec 5	0,96	0,11	1,01
Vzorec 6	0,98	0,099	0,97
Vzorec 7	0,98	0,10	0,92
Vzorec 8	1,01	0,099	1,02
Vzorec 9	0,90	0,097	1,01
Povprečje meritev	0,96	0,10	0,99
Standardna deviacija (SD)	0,038	0,006	0,038
LOD (3×SD)	0,1	0,02	0,1
LOQ (10×SD)	0,4	0,06	0,4

Tabela 30: Prikaz meje zaznavnosti (LOD) in meje določljivosti (LOQ) za natehto 0,1 g in volumen 50 ml.

	Koncentracija Ni	Koncentracija Cd	Koncentracija Pb
LOD (ppm)	0,06	0,009	0,06
LOQ (ppm)	0,2	0,03	0,2

Tabela 31: Ocenjena koncentracija za določanje meje zaznavnosti (LOD) iz rezultatov meritev raztopin vzorca.

Število vzorcev	Koncentracija Ni ($\mu\text{g/l}$)	Koncentracija Cd ($\mu\text{g/l}$)	Koncentracija Pb ($\mu\text{g/l}$)
Vzorec 1	1,64	0,029	0,58
Vzorec 2	1,46	0,010	0,43
Vzorec 3	1,63	0,030	0,79
Vzorec 4	1,64	0,020	0,59
Vzorec 5	1,51	0,019	0,40
Vzorec 6	1,53	0,017	0,40
Povprečje meritev	1,57	0,021	0,53
Standardna deviacija (SD)	0,077	0,007	0,15
LOD ($3 \times \text{SD}$)	0,2	0,02	0,5
Ocenjena koncentracija ($\mu\text{g/l}$)	1,0	0,1	1,0

Določili smo mejo zaznavnosti, ki znaša v raztopini za nikelj 0,1 $\mu\text{g/l}$, kadmij 0,02 $\mu\text{g/l}$ in svinec 0,1 $\mu\text{g/l}$, v trdnem vzorcu pa za nikelj 0,06 ppm, kadmij 0,009 ppm in svinec 0,06 ppm (natehta vzorca 0,1 g in redčenje na 50 ml). Določili smo tudi mejo določljivosti ki znaša v raztopini za nikelj 0,4 $\mu\text{g/l}$, kadmij 0,06 $\mu\text{g/l}$ in svinec 0,4 $\mu\text{g/l}$, v trdnem vzorcu pa za nikelj 0,2 ppm, kadmij 0,03 ppm in svinec 0,2 ppm (natehta vzorca 0,1 g in redčenje na 50 ml). Glede na mejne dovoljene koncentracije niklja (5 ppm), kadmija (3 ppm) in svinca (10 ppm) v magnezijevem stearatu, ki so predpisane v Evropski farmakopeji so eksperimentalno določene meje določljivosti metode primerne za njihovo določanje.

4.2 FARMAKOPEJSKA METODA AAS (ETAAS) ZA DOLOČANJE NIKLJA, KADMIJA IN SVINCA

4.2.1 Meja zaznavnosti (LOD) in meja določljivosti (LOQ)

Mejo zaznavnosti in mejo določljivosti smo določili s standardnim odmikom slepega vzorca standarda in naklonom umeritvene premice. Izračunali smo jih po enačbah 8 in 9. Standardni odmik odziva slepega vzorca smo določili z merjenjem petih slepih vzorcev standarda, izračunali pa po enačbi 2. Rezultati so podani v tabeli 32.

Tabela 32: Meja zaznavnosti (LOD) in meja določljivosti (LOQ).

Število slepih raztopin	Absorbanca Ni	Absorbanca Cd	Absorbanca Pb
1	0,0231	0,0168	-0,0128
2	0,0257	0,0126	-0,0009
3	0,0180	0,0141	0,0017
4	0,0225	0,0164	0,0052
5	0,0206	0,0203	0,0055
SD	0,0029	0,0029	0,0075
LOD (µg/l)	1,8	0,07	4,1
LOQ (µg/l)	6,1	0,2	13,7
Če upoštevamo natehto 0,1 g in redčitev za Ni in Pb na 20 ml in Cd na 200 ml			
LOD (ppm)	0,4	0,1	0,8
LOQ (ppm)	1,2	0,5	2,7

Določili smo mejo zaznavnosti, ki znaša v raztopini za nikelj 1,8 µg/l, kadmij 0,07 µg/l in svinec 4,1 µg/l, v trdnem vzorcu pa za nikelj 0,4 ppm, kadmij 0,1 ppm in svinec 0,8 ppm (natehta vzorca 0,1 g in redčenje na 20 ml za nikelj in svinec in 200 ml za kadmij). Določili smo tudi mejo določljivosti, ki znaša v raztopini za nikelj 6,1 µg/l, kadmij 0,2 µg/l in svinec 13,7 µg/l, v trdnem vzorcu pa za nikelj 1,2 ppm, kadmij 0,5 ppm in svinec 2,7 ppm (natehta vzorca 0,1 g in redčenje na 20 ml za nikelj in svinec in 200 ml za kadmij). Glede na dovoljeno

koncentracijo niklja (5 ppm), kadmija (3 ppm) in svinca (10 ppm) v magnezijevem stearatu, so eksperimentalno določene meje določljivosti primerne tudi za metodo AAS (ETAAS). Če primerjamo eksperimentalno določene meje določljivosti (LOQ) metode ICP-MS in metode AAS (ETAAS) lahko ugotovimo, da z metodo ICP-MS dosegamo bistveno nižje meje določljivosti, kar smo tudi pričakovali glede na zmožnost te metode (tabela 33).

Tabela 33: Primerjava LOD in LOQ metode ICP-MS in AAS (ETAAS).

Metoda	ICP-MS	AAS (ETAAS)
LOD (Ni) ppm	0,06	0,4
LOQ (Ni) ppm	0,2	1,2
LOD (Cd) ppm	0,009	0,1
LOQ (Cd) ppm	0,03	0,5
LOD (Pb) ppm	0,06	0,8
LOQ (Pb) ppm	0,2	2,7

4.2.2 Natančnost (ponovljivost) AAS metode z metodo standardnih dodatkov

Natančnost metode smo prikazali s standardnim odmikom (SD) oziroma relativnim standardnim odmikom (RSD) šestih vzorcev, pripravljenih v skladu z farmakopejsko metodo (poglavje 2.2.23., metoda II). SD in RSD smo izračunali po enačbah 2 in 3. Rezultati so prikazani v tabeli 34.

Tabela 34: Natančnost (ponovljivost) metode z metodo standardnih dodatkov

Število vzorcev	Ni ppm	Cd ppm	Pb ppm
Vzorec 1	5,111	3,110	9,898
Vzorec 2	4,588	2,985	10,014
Vzorec 3	4,662	2,302	9,797
Vzorec 4	4,747	4,210	10,014
Vzorec 5	4,981	5,752	10,354
Vzorec 6	4,632	2,953	10,222
Povprečje meritev	4,8	3,6	10,0
SD	0,2	1,2	0,2
RSD(%)	4,4	35,0	2,0

Relativna standardna deviacija (RSD) za nikelj je 4,4 %, za kadmij 35,0 % in svinec 2,0 %.

Tabela 35: Natančnost (ponovljivost) metode ICP-MS in AAS (ETAAS).

Metoda	RSD (%) Ni	RSD (%) Cd	RSD (%) Pb
ICP-MS	1,7	2,3	2,8
AAS (ETAAS)	4,4	35,0	2,0

Če primerjamo rezultate, ki smo jih dobili z metodo ICP-MS in metodo AAS (ETAAS) lahko vidimo, da je metoda ICP-MS bolj natančna (ponovljiva), zlasti pri niklju in kadmiju (tabela 35). Z metodo AAS (ETAAS) dosegamo slabšo natančnost (ponovljivost) pri kadmiju, ker je koncentracija za določanje kadmija že zelo nizka in jo s to metodo že težko dosegamo.

4.3 DOLOČANJE VSEBNOSTI NIKLJA, KADMIJA IN SVINCA V MAGNEZIJEVEM STEARATU

4.3.1 Določanje niklja, kadmija in svinca z ICP-MS metodo

Z našim analiznim postopkom smo analizirali štiri različne vzorce različnih dobaviteljev v dveh paralelah in dobili naslednje rezultate (tabela 36). Vsebnost niklja, kadmija in svinca smo izračunali po enačbi 10.

Tabela 36: Vsebnosti niklja, kadmija in svinca v različnih vzorcih magnezijevega stearata z metodo ICP-MS.

Vzorec	Koncentracija Ni (ppm)		
	Paralela 1	Paralela 2	povprečje
K-514708831	159,15	156,39	157,77
DN 649,650 (574/72A)	3,16	3,27	3,21
FT1	1,25	1,26	1,25
Mariborske lekarne	0,31	0,27	0,29
Vzorec	Koncentracija Cd (ppm)		
	Paralela 1	Paralela 2	povprečje
K-514708831	<LOQ		
DN 649,650 (574/72A)	0,038	0,032	0,035
FT1	<LOQ		
Mariborske lekarne	<LOQ		
Vzorec	Koncentracija Pb (ppm)		
	Paralela 1	Paralela 2	povprečje
K-514708831	1,40	1,22	1,31
DN 649,650 (574/72A)	0,42	0,57	0,49
FT1	<LOQ		
Mariborske lekarne	<LOQ		

4.3.2 Določanje vsebnosti niklja, kadmija in svinca v magnezijevega stearatu z AAS (ETAAS) metodo

Iste vzorce magnezijevega stearata smo nato analizirali po postopku, kot je opisan v Evropski farmakopeji. Pripravili smo jih v mikrovalovni peči skladno z točko 3.3.2.1 v dveh paralelah. Rezultati so prikazani v tabeli 37.

Tabela 37: Rezultati vsebnosti niklja, kadmija in svinca v različnih vzorcih magnezijevega stearata z metodo AAS (ETAAS).

Vzorec	Koncentracija Ni (ppm)		
	Paralela 1	Paralela 2	povprečje
K-514708831	147,30	150,65	148,97
DN 649,650 (574/72A)	3,03	3,23	3,13
FT1	1,68	1,83	1,76
Mariborske lekarne	<LOQ		
Vzorec	Koncentracija Cd (ppm)		
	Paralela 1	Paralela 2	povprečje
K-514708831	<LOQ		
DN 649,650 (574/72A)	<LOQ		
FT1	<LOQ		
Mariborske lekarne	<LOQ		
Vzorec	Koncentracija Pb (ppm)		
	Paralela 1	Paralela 2	povprečje
K-514708831	<LOQ		
DN 649,650 (574/72A)	<LOQ		
FT1	<LOQ		
Mariborske lekarne	<LOQ		

Primerjava rezultatov obeh metod ICP-MS in AAS (ETAAS) potrjuje, da so ti medsebojno primerljivi, zlasti pri višjih koncentracijah. Pri vzorcu 3 je vsebnost niklja v območju meje določljivosti (LOQ) za metodo AAS, zato nam ta daje nekoliko višje rezultate (okoli 28 %).

Lahko zaključimo, da je metoda ICP-MS primerljiva (oziroma boljša) s farmakopejsko AAS metodo za določanje niklja, kadmija in svinca v magnezijevem stearatu in kot taka primerna za uporabo v kontroli kakovosti magnezijevega stearata.

5 SKLEP

Masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS) je sodobna metoda določanja posameznih elementov oz. izotopov z izredno visoko občutljivostjo in specifičnostjo ter ima kot taka čedalje pomembnejšo vlogo v farmacevtski analizi. V okviru magistrske naloge smo preverili njeno primernost za določanje Cd, Pb in Ni v magnezijev stearatu, v katerem je njihova vsebnost zaradi toksičnosti omejena na zelo nizke koncentracije: 3.0 ppm (Cd), 10.0 ppm (Pb) in 5.0 ppm (Ni). Evropska farmakopeja za njihovo določanje predpisuje atomsko absorpcijsko spektroskopijo z metodo standardnih dodatkov. Slednja je sicer specifična in dovolj občutljiva, vendar pa je zaradi določanja vsakega elementa posebej ter velikega števila raztopin in meritev izvedbeno zahtevna in časovno zamudna.

Kot alternativo metodo smo razvili postopek določanja z ICP-MS z metodo zunanjega standarda oz. direktno kalibracijo, ki nam omogoča hkratno določanje vseh treh elementov. Analizni postopek smo validirali v skladu z ICH smernicami za validacijo analiznih metod in novim poglavjem ameriške farmakopeje za določanje elementnih nečistot (*233> Elemental Impurities – Procedure*).

Točnost ICP-MS smo potrdili z dodatki standardnih raztopin k vzorcu Mg stearata. Dodane standardne raztopine so vsebovale cca. 50 %, 100 % in 150 % mejnih koncentracij Cd, Pb in Ni. Povprečni izkoristki so bili med 93,2 in 105,4 % (zahteva med 70 % in 150 %).

Natančnost (ponovljivost) metode smo dokazali z analizo šestih vzorcev, katerim so bili dodani Cd, Pb in Ni v cca. 100 % mejne vrednosti. Relativni standardni odmiki (RSD) za posamezne elemente so bili manjši od 3% (zahteva < 20 %).

Linearnost odziva za vsakega izmed elementov smo potrdili v koncentracijskem območju v območju od 1 do 50 µg/l oziroma od 0,5 do 25 ppm vsebnosti v vzorcu. Vsi korelacijski koeficienti so bili večji od 0,9999 (zahteva > 0,99).

V okviru preizkušanja robustnosti metode smo preverili stabilnost standardnih raztopin in raztopin vzorcev. Standardne raztopine so stabilne vsaj 24 ur (izkoristki med 96,8 % in 104,5 % glede na začetno vrednost), raztopine vzorcev pa 48 ur (izkoristki med 100,3 % in 104,5 % glede na začetno vrednost). Potrdili smo, da variacije parametrov mikrovalovnega razkroja, kot so temperatura razkroja, čas razkroja in moč razkroja, ne vplivajo na rezultate analize.

Prav tako na rezultate ne vplivajo variacije parametrov merjenja z ICP-MS, kot so moč plazme in pretok vzorca, kar nam potrjuje, da je ICP-MS metoda robustna.

Meje zaznavnosti in določljivosti smo najprej ocenili s pomočjo relativnega standardnega odmika odziva raztopine vzorca ter jih nato določili iz relativnega standardnega odmika odziva za posamezne elemente. Meje določljivosti znašajo 0,2 ppm za Ni, 0,03 ppm za Cd in 0,2 ppm za Pb, kar je precej pod dovoljeno vsebnostjo posameznih elementov.

Primerjava našega postopka s farmakopejskim AAS postopkom je pokazala, da ima ICP-MS nižje meje zaznavnosti in ponovljivosti ter boljšo natančnost (ponovljivost) in je kot tak primeren za določanje Ni, Cd in Pb v magnezijevem stearatu. To smo potrdili tudi z analizo štirih različnih vzorcev magnezijevega stearata z obema metodama, ki sta dali primerljive rezultate.

Na osnovi rezultatov lahko zaključimo, da je razviti ICP-MS postopek za hkratno določanje niklja, kadmija in svinca primeren za uporabo v kontroli kakovosti magnezijevega stearata. Glede na samo naravo priprave vzorca (mikrovalovni razkroj v dušikovi kislini ob prisotnosti H_2O_2) ocenjujemo, da je postopek (z morebitnimi manjšimi modifikacijami) primeren za njihovo določanje tudi v ostalih substancah za farmacevtsko uporabo kakor tudi v gotovih zdravilih. To je zlasti pomembno z vidika vse ostrejših zahtev za kvantitativno določanje posameznih toksičnih elementov s strani regulatornih organov, saj lahko pričakujemo, da bodo instrumentalne metode zelo kmalu v celoti nadomestile sedanje nespecifične metode določanja težkih kovin ter tako doprinesle k večji varnosti zdravil za zdravje njihovih uporabnikov.

6 LITERATURA

1. Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M: Handbook on the toxicology of metals, 3rd Edition, Burlington, San Diego, London, 2007: 11.
2. [http://en.wikipedia.org/wiki/Heavy_metal_\(chemistry\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Heavy_metal_(chemistry)), dostopano 21.4.2012.
3. Walker CH, Hopkin SP, Silby RM, Peakall DB. Major Classes of Pollutant. In: Principles of Ecotoxicology, 2nd Edition, Boca Raton, London, Taylor & Francis Group, 2001: 3-22.
4. Duffus JH: "Heavy metals" a meaningless term ? (IUPAC Technical Report)" Pure and Applied Chemistry, 2002; 74: 793-807.
5. Richardson RF. Compendial Testing. v: Ahuja S, Scypinski S. Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis, Volume 3, Academic Press, San Diego, 2001: 325-344.
6. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG. Good and Gilman's: The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, 9th Edition, McGraw – Hill, New York, 1999: 3-63.
7. Guzman MM, Garcian-FernandezAJ, Gomenz-ZapataM, LunaA, RomeroD, Sanchez-GarciaJA. Effects of Dietary Chronic Cadmium and Lead Exposure: Structural and Ultrastructural changes, Toxicol. Lett. (88); 1996: 60.
8. Rajh E (2011): Uporaba atomske spektrometrije v farmacevtski industriji. Seminar. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.
9. Uredba Evropskega parlamenta in Sveta o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH), 2011, Uradni list Evropske unije, 2011; 134:2.
10. European Medicines Agency. Guideline on the specification limits for residues of metal catalysts or metal reagents. Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/4446/2000, London, 21 February 2008.

-
11. Pederson O. Pharmaceutical Chemical Analysis: Methods for Identification and Limit Tests, Taylor and Francis Group, New York, 2006: 126-132.
 12. U.S. Pharmacopoeia. Twinbrook Parkway, Rockville, U.S.P Pharmacopoeia USP 34 NF29, 2011, Volume 1: 135-136.
 13. European Pharmacopoeia, 7.0th Edition, Council of Europe, Strasbourg, 2011: 114-117, 2418-2421.
 14. Bubnič Z. (2011): Razvoj in validacija metod atomske absorpcijske spektrometrije in njihova uporaba v kontrolnih laboratorijih v proizvodnji zdravilnih učinkovin. Doktorsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.
 15. U.S. Pharmacopoeial Convention Hot Topics: Elemental Impurities: <http://www.usp.org/usp-nf/hot-topics/elemental-impurities>
 16. <http://en.wikipedia.org/wiki/Nickel#Production>, dostopano 17.3.2012.
 17. <http://en.wikipedia.org/wiki/Cadmium>, dostopano 17.3.2012.
 18. Biomonitoring kovin: <http://www.medenosrce.net/pogled.asp?ID=199>, dostopano 21.4.2012.
 19. Barborič S (2010): Vpliv življenjskega okolja na koncentracijo kadmija v krvi pri otrocih. Diplomaska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.
 20. International Agency for the Research on Cancer (IARC). Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, Lyon, Volume 58: 119.
 21. Kent C: Basic of Toxicology, John Wiley & Sons, New York, 1998: 942.
 22. <http://en.wikipedia.org/wiki/Lead>, dostopano 17.3.2012.

-
23. WHO 1995. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 165: Inorganic Lead.
24. Štiglic France A (2011). Biokemični označevalci pri spektru avtističnih motenj. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.
25. Joint WHO/Convention Task Force on the Health Aspects of Air Pollution: Health of heavy metals from long – range transboundary air pollution. WHO 2007.
26. Timbrell J: Paradoks strupa, Kemikalije kot prijatelji in sovražniki, Inštitut za varovanje zdravja RS, Ljubljana, 2008, 113 – 121.
27. Lead and Lead Compounds: <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/profiles/Lead.pdf>, dostopano 17.3.2012.
28. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME: Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6th Edition, Great Britain 2009, 433 – 435.
29. Singh SK, Naini V. Dosage Forms: Non – Parenterals. v: Swarbrick J. Encyclopedia of Pharmaceutical Tehnology 3rd Edition, Informa Healthcare, New York, 2007: 988-992.
30. ICP-MS Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, A Primer, Agilent Tehnologies 2005.
31. More Information on the ICP-MS: www.seaes.manchester.ac.uk/.../ICP_MS/moreinfo/, dostopano 19.3.2012.
32. Tomašič T (2009). Določanje kovin v površinskih in podzemnih vodah z ICP-MS. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.
33. Thomas R: Practical Guide to ICP-MS, Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, 2004: 3.
34. http://en.wikipedia.org/wiki/Ionization_energy, dostopano 19.3.2012.

35. Guideline ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Metodology Q2 (R1), 2005.