Određivanje elementarnih onečišćenja u fosamprenavir kalciju ICP tehnikom

Halužan, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:977848

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-24**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Maja Halužan

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Maja Halužan

ODREĐIVANJE ELEMENTARNIH ONEČIŠĆENJA U FOSAMPRENAVIR KALCIJU ICP TEHNIKOM

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Tomislav Bolanča

Zagreb, srpanj 2019.

Ovaj rad izrađen je u Plivi, TAPI Analitika istraživanja i razvoja, ICP laboratorij, pod stručnim vodstvom mag. chem. ing. Irene Radić
i na Zavodu za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Tomislava Bolanče.

Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Tomislavu Bolanči na stručnom vodstvu, korisnim savjetima, pristupačnosti i strpljenju tijekom izrade ovog rada koje mi je ukazao zajedno s izv. prof. dr. sc. Šimom Ukićem.

Posebno se zahvaljujem mag. chem. ing. Ireni Radić, na motivaciji i stručnom vodstvu te na pruženoj pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela, kao i na iznimnoj volji, strpljenju, susretljivosti, mnogobrojnim savjetima i konstantnoj potpori prilikom čitave izrade ovog rada.

Zahvaljujem se i kolegama mag. chem. Siniši Tarani i mag. chem Antoniji Rimac iz Plive na susretljivosti i razumijevanju prilikom rada u laboratoriju.

Velike zahvale dugujem i svojoj obitelji te Valentinu, koji su mi uvijek pružali nezamjenjivu podršku, strpljenje i razumijevanje te koji su vjerovali u mene tijekom čitavog studija.

SAŽETAK

Diplomski rad opisuje razvoj analitičke metode za određivanje elementnih onečišćenja u djelatnoj farmaceutskoj supstanciji fosamprenavir kalciju. Onečišćenja u lijekovima mogu biti organskog ili anorganskog porijekla i potjecati od različitih izvora, te potencijalno mogu ugroziti djelotvornost lijekova ili utjecati na sigurnost primjene.

U radu je dan detaljan pregled važnosti kontrole anorganskih onečišćenja, te su opisane prednosti primjene ICP-MS tehnike u usklađivanju sa sve strožim farmakopejskim zahtjevima.

ICP-MS je zbog jednostavnosti masenih spektara brza tehnika za automatsku kvalitativnu, polukvantitativnu ili kvantitativnu elementarnu analizu u različitim uzorcima. Spektrogrami su jednostavni jer pikovi nastaju od jednostruko nabijenih iona bez obzira na složenost matrice. U ICP-MS spojevi se atomiziraju i ioniziraju bez obzira na kemijsku strukturu u kojoj je inkorporiran element od interesa. Interferencije obično nastaju zbog formiranja višestruko nabijenih iona, oksida ili poliatomskih izobaričnih interferencija formiranih u plazmi, te je u radu dan osvrt na utjecaj poliatomnih interferencija kao i način njihovog uklanjanja (upotreba kolizijskog plina, odabir odgovarajućih izotopa analita).

Validacija metode neophodna je da bi se potvrdilo da je ona prikladna za namijenjenu svrhu. U radu je dan opis i način ispitivanja izvedbenih značajki kojima se metoda validira.

Tijekom elementarne analize dobiven je lažno pozitivan odziv osmija (problem nastajanja toksičnog osmijevog tetraoksida u oksidirajućem mediju pri povišenoj temperaturi). Opisan je način stabilizacije osmija nužan za razvoj dobre metode za njegovo određivanje.

Razvijene su metode za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V te za određivanje osmija u fosamprenavir kalciju. Ispitane su glavne izvedbene značajke za svaku metodu (linearnost, granica kvantifikacije, selektivnost, točnost i preciznost te otpornost) uz predložene kriterije prihvatljivosti. Pokazalo se da svaka od razvijenih metoda zadovoljava sve kriterije za sve ispitane izvedbene značajke, te su obje metode validirane.

Ključne riječi: *Fosamprenavir*, *ICH*, *elementarna onečišćenja*, *induktivno spregnuta plazma*, *ICP-MS*, *validacija metode*

SUMMARY

The thesis describes the development of an analytical method for determination of elemental impurities in the active pharmaceutical ingredient fosamprenavir calcium. Elemental impurities in drug products may be of organic or inorganic origin and come from different sources, and may potentially endanger drug efficacy or affect the safety of use.

This paper gives a detailed overview of the importance of controlling the presence of inorganic impurities and describes the benefits of using ICP-MS techniques in aligning with increasingly stringent pharmacopoeia requirements.

For ease of mass spectrum, ICP-MS is a fast technique for automatic qualitative, semi-quantitative or quantitative elemental analysis in various samples. The mass specrta obtained are simple because the peaks are made of single-charged ions, regardless of the complexity of the matrix. In ICP-MS compounds are atomized and ionized regardless of the chemical structure in which an element of interest is incorporated. The interferences are usually due to the formation of multiple charged ions, oxides or polyatomic isobaric interferences formed in the plasma, and an overview of the effects of polyatomic interference as well as the method of their removal (collagen gas utilization, selection of appropriate isotopes of the analyte) is given.

Validation of the method is necessary to confirm that it is suitable for the intended purpose. This paper presents a description of the performance tests that are necessary to validate the method.

During the multielement analysis, a false positive osmium response was obtained (the problem of formation of toxic osmium tetroxide in the oxidising medium at elevated temperature). The method for stabilization of osmium necessary for the development of a good method for its determination is described.

The method for the determination of Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl V in fosamprenavir calcium and the ethod for determination of osmium in fosamprenavir calcium were developed. The main performance features for each (linearity, quantification limit, selectivity, accuracy, precision and robustness) were tested with the proposed eligibility criteria. It has been shown that each of the developed methods meets all the criteria for all tested performance features and the methods were validated.

Keywords: *Fosamprenavir*, *ICH*, *elemental impurities*, *Inductively Coupled plasma*, *ICP-MS*, *Method validation*

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1. Fosamprenavir kalcij 3

2.2. Onečišćenja u farmaceutskim proizvodima 4

2.2.1. Regulatorni zahtjevi za elementarna onečišćenja 5

2.3. INDUKTIVNO SPREGNUTA PLAZMA (ICP) 8

2.3.1. Induktivno spregnuta plazma – masena spektrometrija (ICP-MS) 11

2.4. VALIDACIJA 13

2.4.1 Specifičnost 13

2.4.2 Radno područje 14

2.4.3 Linearnost 14

2.4.4 Granica detekcije i granica kvantifikacije 14

2.4.5 Točnost i istinitost 14

2.4.6 Preciznost 14

2.4.7 Otpornost 15

3. EKSPERIMENTALNI DIO 16

3.1. Reagensi i otopine 16

3.2. Uređaji 17

3.3. ICP-MS sustav 17

3.4. Metode rada 18

3.4.1. Priprema uzoraka 18

3.4.2. Priprema temeljnih standardnih otopina (TSO) 19

3.4.3. Priprema radnih standardnih otopina (RS) 21

3.4.4. Instrumentalni uvjeti 23

3.5. Radni postupci 25

3.5.1. Ispitivanje linearnosti 25

3.5.2. Ispitivanje granice kvantifikacije 26
3.5.3. Ispitivanje točnosti i selektivnosti 26
3.5.4. Ispitivanje preciznosti 26
3.5.5. Ispitivanje otpornosti 27
4. REZULTATI I RASPRAVA 28
4.1. Razvoj ICP-MS metode 28
4.1.1. Ispitivanje otapanja 28
4.1.2. Optimizacija sustava za uklanjanje interferencija 29
4.1.3. Optimizacija sustava za bolji odziv osmija 30
4.2. Validacija ICP-MS metode za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V u fosamprenavir kalciju 31
4.2.1. Linearnost 31
4.2.2. Granica kvantifikacije 33
4.2.3. Točnost i specifičnost 36
4.2.4. Preciznost 40
4.2.5. Otpornost 45
4.3. Validacija ICP-MS metode za određivanje osmija u fosamprenavir kalciju 47
4.3.1. Linearnost 47
4.3.2. Granica kvantifikacije 48
4.3.3. Točnost i specifičnost 49
4.3.4. Preciznost 50
4.3.5. Otpornost 51
5. ZAKLJUČCI 53
6. LITERATURA 55
ŽIVOTOPIS 58

1. UVOD

Elementarna onečišćenja u lijekovima mogu nastati iz nekoliko izvora; oni mogu biti rezidualni katalizatori koji su dodani namjerno u sintezi ili se mogu pojaviti kao kontaminanti (npr. interakcijama s opremom za sintezu i obradu, iz materijala ambalaže ili postojanjem u sastavnicama lijeka). Budući da elementarna onečišćenja ne daju pacijentu nikakvu terapijsku korist, njihove razine u lijeku treba kontrolirati u prihvatljivim granicama. [1]

Za potrebe ovog rada korištene su smjernice propisane od strane Internacionalne konferencije za harmonizaciju (*International Conference on Harmonisation,* ICH) i koje se tiču kontrole elementarnih onečišćenja u farmaceutskim proizvodima (*Guideline for elemental impurities Q3D*). [2]

Postoje tri dijela ove smjernice: procjena podataka o toksičnosti za potencijalna elementarna onečišćenja; uspostavljanje dopuštenog dnevnog izlaganja (*Permitted Daily Exposure*, PDE) za svaki element od toksikološkog značaja; i primjena pristupa temeljenog na riziku za kontrolu elementarnih onečišćenja u lijekovima. Od podnositelja se ne zahtjeva da postroži granice na temelju sposobnosti procesa, pod uvjetom da elementarna onečišćenja u lijekovima ne prelaze PDE. PDE-ovi utvrđeni u ovim smjernicama smatraju se zaštitnim za javno zdravlje za sve vrste pacijenata. U nekim slučajevima, prisutnost elementarnih onečišćenja na razini ispod propisanih pragova toksičnosti mogu biti opravdane ako se pokaže da utječu na druge kvalitete lijeka (npr. element koji katalizira razgradnju ljekovite tvari). Navedene smjernice predstavljaju postupak za procjenu i kontrolu elementarnih onečišćenja u lijeku primjenom načela upravljanja rizikom kao što je opisano u ICH Q3D. Ovaj proces osigurava platformu za razvoj strategije kontrole temeljene na riziku za ograničavanje sadržaja elementarnih onečišćenja u lijeku. [2]

Fosamprenavir kalcij je lijek koji se koristi u terapiji osoba zaraženih od humanog imunodeficijentnog virusa tipa-1 [3], a njegova se kvaliteta, kao i za bilo koji drugi farmaceutski proizvod, mora strogo kontrolirati, naročito jer se on primjenjuje učestalo i u velikoj količini. U te se kontrole uvrštava i kontrola elementarnih onečišćenja. Stoga je svrha ovog rada bila razviti odgovarajuću metodu za određivanje elemenata propisanih ICH Q3D smjernicama. [4, 5]

Induktivno spregnuta plazma s masenom spektrometrijom predložena je pogodna tehnika za određivanje elementarnih onečišćenja u farmaceutskim proizvodima zbog svojih pogodnih

karakteristika koje uključuju niske granice kvantifikacije i dobivanje rezultata s pogodnim razinama točnosti i preciznosti.[6, 7]

Razvijajući metode posebna se pažnja posvetila pripremi uzoraka koja se pokazala kao kritičan parametar kod određivanja elemenata u tragovima. Ispitale su se različite kisele matrice za otapanje, u kombinaciji s mikrovalnom razgradnjom, te je odabrana pogodna s smislu što manjeg utroška reagensa, energije i vremena, kao i kvalitete dobivenih rezultata.

Prilikom razvoja metode, nakon odabira pogodne kisele matrice i temperaturnog programa mikrovalne digestije, analizirani su elementi od interesa pri različitim operativnim značajkama instrumenta (sa ili bez kolizije, veći broj izotopa za pojedini element), i odabrane su optimalne operativne značajke, među kojima je u radu naglasak stavljen na značajke kojima su se uklanjale interferencije.

Analizom osmija pri uvjetima razvijenim za metodu za određivanje metode za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V u fosamprenavir kalciju, dobiveni su rezultati koji nikako nisu odgovarali kriterijima prihvatljivosti. Istražila se literatura i nađeno je kako u kombinaciji sa nitratnom kiselinom dolazi do oksidacije osmija u osmijev tetraoksid koji je iznimno hlapiv, a i vrlo otrovan. Tiourea u otopini klorovodične kiseline se pokazala optimalnom za rješavanje tog problema te je za osmij validirana nova metoda koja koristi takvu otopinu za nadopunjavanje. [8, 9]

Kako bi se potvrdio da su razvijene metode dobre za predviđenu namjenu, nužno je bilo provesti validaciju. Razvijene metode za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V i za određivanje osmija u fosamprenavir kalciju validirane su ispitivanjem linearnosti, granice kvantifikacije, selektivnosti i točnosti, preciznosti i otpornosti za svaku pojedinu metodu.

2. TEORIJSKI DIO

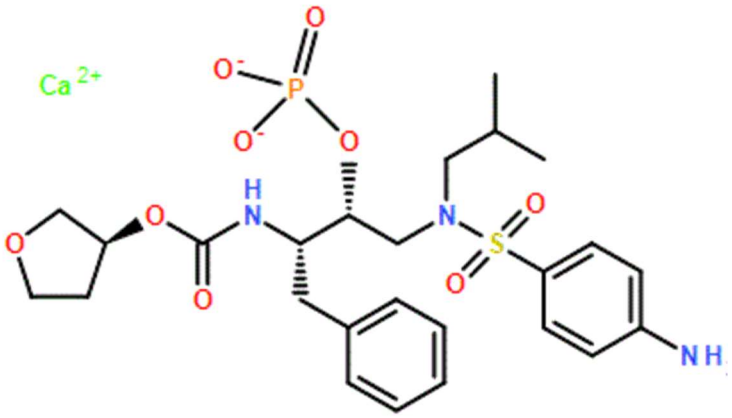
2.1. Fosamprenavir kalcij

Fosamprenavir je fosfatni esterski prolijek amprenavira, inhibitora HIV proteaze. U finalnom je proizvodu prisutan u obliku kalcijeve soli (slika 1), radi poboljšane topljivosti. Koristi se u kombinaciji s drugim antiretroviroticima za liječenje odraslih oboljelih od humanog imunodeficijentnog virusa tipa-1 (HIV-1).

Aktivna farmaceutska tvar fosamprenavira je bijela do krem krutina, vrlo slabo topiva u vodi i njegova je topljivost ovisna o pH (maksimum se postiže pri pH vrijednostima između 3 i 4). Fosamprenavir sadrži tri kiralna centra, ali se sintetizira kao jedan enantiomer *3S*, *1S*, *2R*. Identificirana je samo jedna kristalna forma molekule koja sadrži oko 5 molekula vode, ali se unatoč tome ne može smatrati striktnim pentahidratom.

Fosamprenavir, kao prolijek amprenavira, djeluje kao nepeptidni kompetitivni inhibitor HIV-1 proteaze. Sam po sebi nema svojstva antivirotika već zahtjeva *in-vivo* metabolizam da bi se otpustio aktivni amprenavir.

Razvoj fosamprenavira u najvećoj je mjeri potaknula slaba topljivost amprenavira radi koje je bilo potrebno unositi velike doze u obliku velikih kapsula uz velik broj takvih kapsula dnevno. Također, metabolizam fosamprenavira do amprenavira osigurava njegovo polagano otpuštanje pa i to pridonosi smanjenoj potrebi za čestim unosom. [3]



Slika 1. Struktura molekule fosamprenavira u obliku kalcijeve soli.

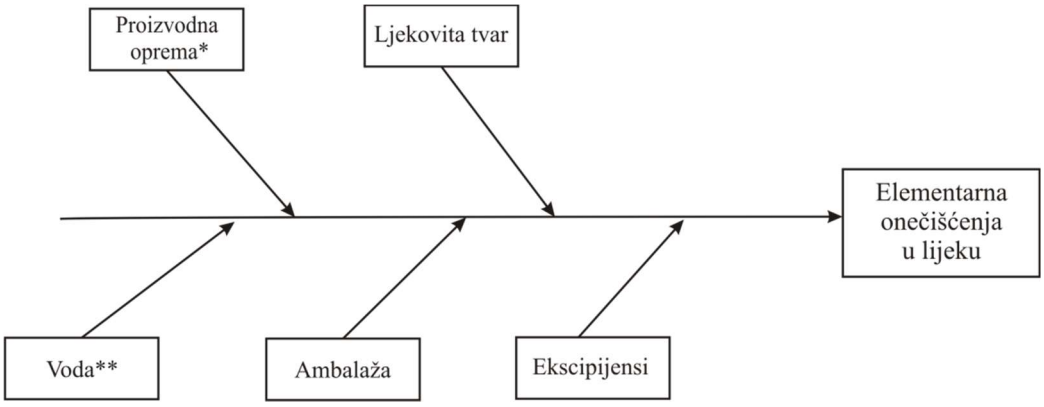
2.2. Onečišćenja u farmaceutskim proizvodima

Onečišćenja u aktivnim farmaceutskim tvarima (*Active Pharmaceutical Ingredient, API*) su tvari koje nemaju ljekovit učinak, a potencijalno mogu izazvati neželjene učinke. Neophodno ih je u potpunosti identificirati i kvantificirati. Farmaceutska onečišćenja su neizbježna jer niti jedna kemijska reakcija nije u potpunosti selektivna i niti jedan kemijski spoj nije potpuno stabilan.[1] Ponekad onečišćenja mogu imati teratogene, mutagene ili karcinogene efekte. [4] Kod većine lijekova nepoželjne su primjese malih molekula poput vode (može hidrolizirati neke lijekove ili utjecati na djelotvornost), malih elektrofila (na primjer, aldehidi i derivati karboksilnih kiselina), peroksida (mogu oksidirati neke lijekove) i metala (mogu katalizirati oksidaciju i druge razgradne puteve lijekova). [5]

Elementarna onečišćenja u lijeku se pojavljuju iz mnogih izvora, a svi se oni moraju prilikom procjene rizika pojavljivanja uzeti u obzir [2, 10]. Ključni su izvori prikazani na slici 2, a uključuju sljedeće:

1. Preostala onečišćenja koja su rezultat namjerno dodanih elemenata (npr. katalizatori) za sintezu ljekovite tvari, pomoćnih tvari ili drugih komponenti lijeka. Procjena rizika lijeka trebala bi se baviti mogućnošću uključivanja elementarnih onečišćenja u lijek.
2. Elementarna onečišćenja koja nisu namjerno dodana, a koja su potencijalno prisutne u ljekovitoj tvari, vodi ili pomoćnim tvarima koje se koriste u pripremi lijeka.
3. Elementarna onečišćenja koja se potencijalno uvode u ljekovitu tvar i / ili lijek iz proizvodne opreme.
4. Elementarna onečišćenja koja se mogu izlučiti u ljekovitu tvar i lijek iz ambalaže.

Slika 2 prikazuje primjer tipičnih materijala, opreme i komponenti korištenih u proizvodnji lijeka. Svaki od ovih izvora može doprinijeti pojavi elementarnih onečišćenja u lijeku, bilo kojim pojedinim ili bilo kojom kombinacijom gore navedenih potencijalnih izvora. Tijekom procjene rizika, treba uzeti u obzir potencijalni doprinos svakog od tih izvora kako bi se odredio ukupni doprinos elementarnih onečišćenja lijeku.



Slika 2. Potencijalni izvori elementarnih onečišćenja u lijeku. [2]
* Rizik može biti smanjen razumijevanjem procesa, pravilnim odabirom opreme, kvalifikacijom opreme i korištenjem dobre proizvođačke prakse (GMP)
**Rizik za unos elementarnih onečišćenja iz vode može se smanjiti usklađivanjem sa propisanim zahtjevima za kvalitetu vode (npr. europska farmakopeja, japanska farmakopeja...) ako se pročišćena voda ili voda za injekcije koriti u proizvodnim procesima.

2.2.1. Regulatorni zahtjevi za elementarna onečišćenja

Kontrola elementarnih onečišćenja jedan je od dijelova cjelokupne strategije kontrole lijeka koji osigurava da elementarna onečišćenja ne prelaze propisane maksimalne granice dnevnog unosa putem lijeka. Trenutno su najznačajniji regulatorni zahtjevi koje se tiču kontrole elementarnih onečišćenja u farmaceutskom proizvodu *Guideline for elemental impurities Q3D* koju je izdala Internacionalna konferencija za harmonizaciju (*International Conference on Harmonisation – ICH*) te poglavlja 232 i 233 iz američke farmakopeje (*The United States Pharmacopeia USP*). [2, 6, 11]

Do izdavanja spomenutih smjernica koristila su se i poglavlja iz europske farmakopeje te američke i britanske farmakopeje, prema kojima se za ispitivanje ukupnog sadržaja metala u farmaceutskim proizvodima koriste reakcije između metala u uzorku i tioacetamidnog reagensa kojim se talože metali u obliku obojenih sulfida. Boja nastalog taloga uspoređuje se s paralelno tretiranom standardnom otopinom olova poznate koncentracije. Boja sulfida različitih teških metala varira od bijele do žute, narančaste, smeđe i crne što otežava vizualnu usporedbu sa tamno smeđom bojom otopine olovnog sulfida. Ukupni sadržaj teških metala izražava se u odnosu na standardnu otopinu olova kao limit test. Iako je još u upotrebi, ova metoda je nespecifična i neosjetljiva, zahtijeva puno vremena i vrlo često ima nisku iskoristivost. Nespecifičnost znači da s ovom metodom nemamo informaciju o tome koji teški metal daje pozitivni rezultat što je veliki nedostatak metode. [12]

Navedene smjernice uvedene su kako bi se ispunile potrebe pacijenata, farmaceutske industrije i regulatornih vlasti te kako bi se postavilo dopušteno dnevno izlaganje (*Permitted Daily Exposure* – PDE) za svaki metal od toksikološkog značaja. U procjeni sigurnosti za utvrđivanje PDE razmatrani su oksidacijsko stanje elementa u kojem će se on nalaziti u lijeku, ljudska izloženost, najrelevantnija studija na životinjama, način primjene i relevantne završne točke. [2, 6,11]

Elementi uključeni u ove smjernice smješteni su u tri razreda na temelju njihove toksičnosti (PDE) i vjerojatnosti pojave u lijeku. Svrha te klasifikacije je usredotočiti procjenu rizika na one elemente koji su najotrovniji, ali također imaju razumnu vjerojatnost uključivanja u lijek. [2]

Klasa 1: Elementi As, Cd, Hg i Pb su humani toksični agensi koji imaju ograničenu ili nikakvu primjenu u proizvodnji lijekova.

Klasa 2: Elementi u ovoj klasi općenito se smatraju ljudskim toksičnim sredstvima, a dalje su podijeljeni u podklase 2A i 2B na temelju njihove relativne vjerojatnosti pojavljivanja u lijeku.

Klasa 2A – Co, Ni i V imaju relativno veliku vjerojatnost pojavljivanja u lijeku i stoga zahtijevaju procjenu rizika u svim potencijalnim izvorima elementarnih onečišćenja i za sve načine primjene (kako je naznačeno).

Klasa 2B – Ag, Au, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Se i Tl imaju smanjenu vjerojatnost pojave u lijeku zbog njihove malobrojnosti i niske vjerojatnosti da se izoliraju s drugim materijalima. Zato oni mogu biti isključeni iz procjene rizika osim ako nisu namjerno dodani tijekom proizvodnje ljekovitih tvari, pomoćnih tvari ili drugih komponenti lijeka.

Klasa 3: Ba, Cr, Cu, Li, Mo, Sb i Sn su elementi koji imaju relativno nisku toksičnost oralnom primjenom (visoki PDE, općenito više od 500 μg / dan), ali mogu zahtijevati razmatranje u procjeni rizika za inhalacijske i parenteralne putove.

Ostali elementi: Al, B, Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, W i Zn su elementarna onečišćenja za koja nisu utvrđene PDE zbog njihove niske inherentne toksičnosti i / ili razlike u regionalnim propisima. Ako su ta elementarna onečišćenja prisutna ili su uključena u lijek, one su obrađene drugim smjernicama i / ili regionalnim propisima i praksama koje se mogu primijeniti na određene elemente ili razmatranja kvalitete za konačni lijek.

U ICH smjernici Q3D propisane su dopuštene koncentracije elementarnih onečišćenja za oralnu (tablica 1), parenteralnu i inhalacijsku primjenu u svrhu procjene sadržaja elementarnih onečišćenja kod ljekovitih oblika, s dozom ne višom od 10 g/dan.

Tablica 1. Propisani specifikacijski limiti za dnevni unos (10 g) oralnim putem prema smjernici ICH Q3D [2]

Element	**Razred**	**Granice za oralnu primjenu (µg/g)**
Cd	1	0.5
Pb	1	0.5
As	1	1.5
Hg	1	3
Co	2A	5
V	2A	10
Ni	2A	20
Tl	2B	0.8
Au	2B	10
Pd	2B	10
Ir	2B	10
Os	2B	10
Rh	2B	10
Ru	2B	10
Se	2B	15
Ag	2B	15
Pt	2B	10
Li	3	55
Sb	3	120
Ba	3	140
Mo	3	300
Cu	3	300
Sn	3	600
Cr	3	1100

2.3. INDUKTIVNO SPREGNUTA PLAZMA (ICP)

Sa znanstvenog gledišta, materija u poznatom svemiru često se klasificira u smislu četiri stanja: krutog, tekućeg, plinovitog i plazme. Osnovna razlika između krutina, tekućina i plinova leži u razlici između čvrstoće veza koje drže njihove sastavne čestice zajedno. Da li se određena tvar nalazi u jednom od tih stanja ovisi o kinetičkoj energiji (toplinskoj energiji) njegovih atoma ili molekula, tj. o njezinoj temperaturi.

Ako se osigura dovoljna energija, molekularni plin će se postupno disocirati u atomski plin kao rezultat sudara između čestica čija toplinska kinetička energija nadmašuje molekularnu energiju. Pri dovoljno povišenim temperaturama, sve veći udio atoma imati će dovoljno kinetičke energije da sudarima savlada energiju vezanja krajnjih orbitalnih elektrona i postane ionizirani plin ili plazma. Međutim, taj prijelaz iz plina u plazmu nije fazni prijelaz u termodinamičkom smislu, budući da se javlja postupno s porastom temperature. [13]

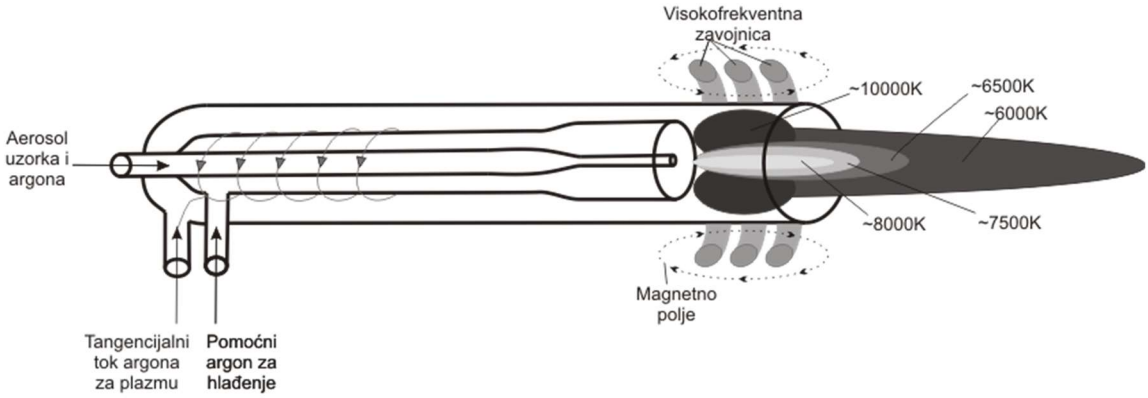
Pojam plazma su prvi put primijenili Tonks i Langmuir, 1929. godine, da bi opisali unutarnje područje užarenog ioniziranog plina proizvedenog električnim pražnjenjem u cijevi, pri čemu ionizirani plin kao cjelina ostaje električno neutralan. [13, 14]

Plazma se može proizvesti podizanjem temperature tvari sve dok se ne postigne relativno visoka frakcijska ionizacija. U uvjetima termodinamičke ravnoteže stupanj ionizacije i temperatura elektrona su usko povezani. Također, plazme se mogu generirati i ionizacijskim procesima koji podižu stupanj ionizacije mnogo iznad njegove toplinske ravnotežne vrijednosti. Postoji mnogo različitih metoda stvaranja plazme u laboratoriju i, ovisno o metodi, plazma može imati visoku ili nisku gustoću, visoku ili nisku temperaturu, može biti postojana ili prolazna, stabilna ili nestabilna, i tako dalje [14]. Plazme se mogu klasificirati ovisno o vrsti električnog polja koje se primjeni za stvaranje i održavanje plazme. Tako se plazma može stvoriti ako se preko elektroda formira polje istosmjerne struje (*Direct current plasma*, DCP), ako se preko zavojnice primijeni visokofrekventno polje (*Inductively Coupled Plasma*, ICP) ili ako se primijeni mikrovalno polje na plin u šupljini (*Microwave-induced plasma*, MIP). [15]

Argon je najčešće korišteni plin za generiranje plazme. On je, kao i ostali plemeniti plinovi, monoatomni element s visokom energijom ionizacije (15,76 eV) te dobrom kemijskom inertnošću. Stoga se uz njegovim korištenjem dobiva vrlo jednostavni spektar koji emitira argon, ima mogućnost pobuditi gotovo svaki element periodnog sustava te ne tvori stabilne specije s analitima. Unatoč tome, treba imati na umu da se pojedine nestabilne molekularne ionizirane ili pobuđene specije mogu stvoriti u plazmi koje se obično raspadaju po završetku

pobude. Naravno, vrlo je bitna stavka i cijena plina prema kojoj je argon najpovoljniji od plemenitih plinova. [16]

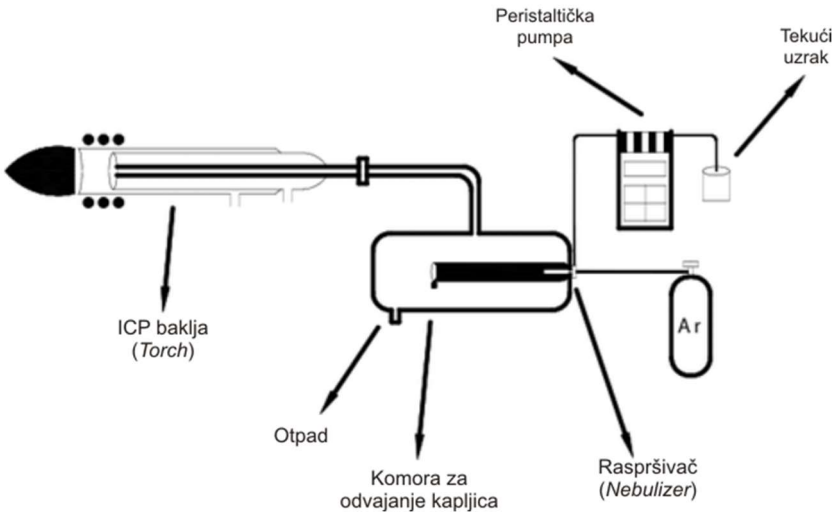
Induktivno spregnuta plazma formira se pri atmosferskom tlaku u elementu sastavljenom od kvarcnih cijevi različitih dijametara, koji se naziva baklja (*torch*), a kroz koje protječe argon. Preko njega je namotana indukcijska bakrena zavojnica, napajana radiofrekventnim generatorom, koja stvara promjenjivo magnetno polje. Ionizacija argona započinje iskrom iz Tesline zavojnice, a prolaskom kroz magnetno polje u kojem dolazi do prstenastog kretanja iona i Ohmskog pregrijavanja, ioni argona apsorbiraju energiju koja održava temperaturu na stupnju prikladnom za daljnju ionizaciju i održavanje plazme (6000 – 10000 K). [17]



Slika 3. Shematski prikaz baklje u kojoj se stvara plazma.

Baklja se sastoji od tri koncentrične kvarcne cijevi (slika 3). Kroz jednu protječe argon koji formira plazmu, kroz drugu pomoćni argon za hlađenje, a kroz centralnu cijev prolazi aerosol uzorka pomiješan s argonom kao nosiocem. Uzorak se ionizira u plazmi, preuzimajući energiju od argona. Ulaskom u plazmu, prolazeći kroz različite temperaturne zone, aerosol uzorka prolazi faze desolvacije, isparavanja, atomizacije i ionizacije. Prilikom toga, uzorak prelazi iz tekućih kapljica u čvrste čestice, a potom u plin.

Najčešći način unošenja uzorka je da se tekući ili potpuno otopljeni uzorak peristaltičkom pumpom dovodi do raspršivača (*nebulizer*) koji stvara fini aerosol uzorka pneumatskim učinkom protoka argona koji se također uvodi u raspršivač. Kako bi se uzorak što efikasnije ionizirao, potrebno je odabrati samo najsitnije kapljice iz aerosola, a taj se proces odvija u posebnoj komori (*spray chamber*). Uz to, ona ima ulogu stabilizacije protoka aerosola koji odlazi u plazmu, obzirom da se zbog peristaltičke pumpe pojavljuju fluktuacije. Probrane kapljice potom ulaze u baklju za stvaranje plazme (slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz sustava za unos tekućeg uzorka u plazmu.

Uzorak se može unositi u plazmu i na brojne druge načine što omogućava vrlo široku Može se unositi u obliku tekućine (bilo da je otopljen ili je uzorak sam tekućina), plina ili krutine. Opisani princip za unos tekućeg uzorka može se prilagoditi različitim izvedbama i principima rada instrumentacije, kao što su drugačiji raspršivač (pneumatski, ultrazvučni...), komore za odvajanje kapljica (ciklonske, desolvatacijske...) ili izvedba u kojoj se svi kvarcni dijelovi mijenjaju s teflonskim (u slučaju korištenja fluorovodične kiseline). Također, postoje i potpuno drugačiji principi unosa uzorka koji se koriste ukoliko uzorak nije tekuć, sadrži veliki udio interferencija itd. Tu se posebno izdvajaju separacijske tehnike (tekućinska i plinska kromatografija, kapilarna elektroforeza...) i laserska ablacija. [17, 18, 19]

Dobivena se plazma u analitičkim laboratorijima koristi kao izvor fotona određenih, za svaki atom specifičnih, valnih duljina, ili kao izvor iona određene mase i određenog naboja. Stoga se za detekciju koriste atomski emisijski spektrometar i maseni spektrometar. [19] Karakteriziraju ih vrlo niske granice detekcije, određivanja i kvantifikacije, velika brzina uz nizak utjecaj interferencija, velika točnost i preciznost i mogućnost određivanja više elemenata istovremeno, u jednoj analizi. [15]

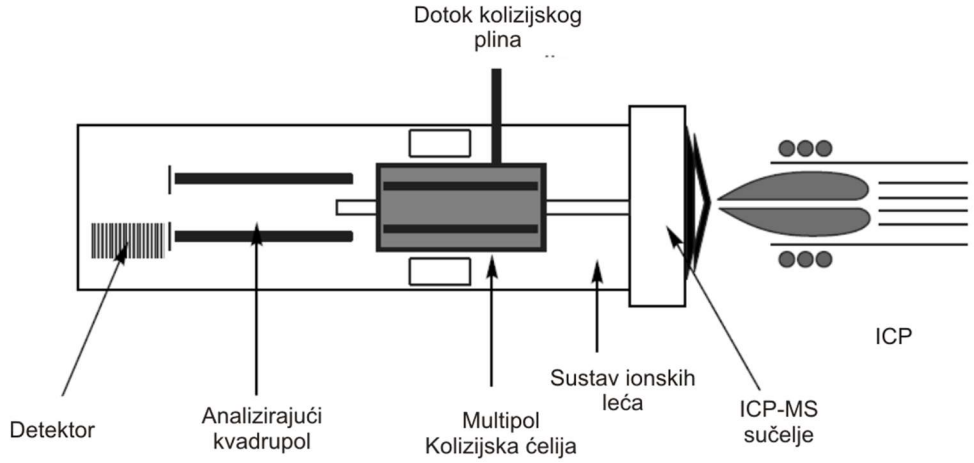
Primjena induktivno spregnute plazme s masenom detekcijom (*Inducively Coupled Plasma – Mass Spectrometry*, ICP-MS) i one s atomskom emisijskom detekcijom (*Inducively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry*, ICP-AES), češće zvanom optičkom detekcijom (*Inducively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry*, ICP-OES) ubrzano se širi otkako su na snagu stupili određeni, postroženi zahtjevi, zakoni i regulative za sadržaje elementarnih onečišćenja. Uvelike se koriste za ispitivanja glavnih komponenata, elemenata u

tragovima i omjera prisutnih izotopa određenog elementa (ICP-MS) u geološke svrhe, u analizama zraka, vode, kliničkih uzoraka, hrane i lijekova. [15, 19, 20]

2.3.1. Induktivno spregnuta plazma – masena spektrometrija (ICP-MS)

Induktivno spregnuta plazma – masena spektrometrija (*Inducively Coupled Plasma – Mass Spectrometry*, ICP-MS) je najbrže razvijajuća danas dostupna tehnika za određivanje elemenata u tragovima [16] Koristi se ponajviše u područjima analize okoliša, geološkim ispitivanjima i ispitivanjima poluvodiča, te u biomedicinskim i nuklearnim područjima. Najbitnija njegova karakteristika koja osigurava ovakav razvoj i široku primjenu je brzo određivanje više elemenata istovremeno i to na razini ultra-tragova (<1 ppb), uz mogućnost određivanja izotopa elemenata.

Danas postoje različite izvedbe ICP-MS instrumentacije koje dijele mnoge zajedničke komponente kao što su raspršivač, komora za odvajanje kapljica, sučelje konusa, vakumsku komoru, ionsku optiku, analizator masa i detektor (slika 5). Te se komponente mogu izvoditi i primjenjivati na različite načine ovisno o potrebama za konačnim rezultatima, o uzorku i o cijeni. Odjeljak za unos uzorka i stvaranje plazme u principu je analogan kod ICP-MS i ICP-OES uređaja, ali nakon formiranja plazme, sličnosti staju. Kod ICP-MS-a plazma je pozicionirana horizontalno i emitira ione, a emisija fotona je dapače i nepoželjna, za razliku od slučaja kod ICP-OES-a, jer može povećati šum signala. Upravo je to stvaranje velikog broja iona u plazmi karakteristika koja omogućava ICP-MS-u detekciju pri niskim ppt razinama, odnosno čak do četiri reda veličine nižu nego što ima ICP-OES. [16, 21]



Slika 5. Shematski prikaz tipičnog ICP-MS instrumenta s kolizijskom ćelijom. [15]

Kada se ioni formiraju u plazmi, oni se usmjeravaju prema masenom detektoru preko sučelja pod vakuumom koje se sastoji od dva ili tri konusa, obično od nikla ili platine, i koje

omogućavaju ionima da prođu do ionske optike, također pod vakuumom, u kojoj se usmjeravaju prema uređaju za odvajanje masa. Ionska se optika sastoji od niza elektrostatskih leća kojima je svrha elektrostatski usmjeriti zraku iona i prilikom toga onemogućiti fotonima, česticama i neutralnim specijama da dođu do detektora. Potom ioni dospijevaju u srce masenog analizatora – uređaj za odvajanje masa koji se također nalazi pod visokim vakuumom.

Postoje tri vrste uređaja koji se koriste za odvajanje masa, a to su kvadrupolni (*quadrupole*) i magnetski sektorni (*magnetic sector*) analizator te analizator vremena leta (*time-of-flight*, TOF), a svaki sa svim svojim prednostima i manama služi stoj svrsi koja je propustiti ione analita određenog omjera mase i naboja do detektora, a prilikom toga odvojiti sve ione koji nisu od analita, interferirajuće i ione matrice. Kvadrupolni maseni analizator koristi kombinaciju električnih polja istosmjerne i izmjenične struje iona, a većina ih se danas prodaje s kolizijskom, odnosno reakcijskom ćelijom pomoću koje se mogu znatno minimalizirati utjecaji poliatomnih spektralnih interferencija na način da reaktivne specije izreagiraju s kolizijskim plinom umjesto s drugim ionom. Nakon odvajanja, ioni dospijevaju do detektora gdje se sudaraju s metalnim multiplikatorima elektrona na kojima se prilikom tih sudara elektroni oslobađaju i multipliciraju. Dobiveni električni signal prima računalo i preračunava u koncentraciju analita pomoću signala dobivenog mjerenjem kalibracijskih standarada. Većina detekcijskih sustava može raditi u dinamičko rasponu od osam redova veličine, što omogućava analizu uzoraka s udjelima analita od ppt razine do nekoliko stotina ppm. [17, 22]

2.4. VALIDACIJA

Validacija je potvrda ispitivanjem i prikupljanjem dobivenih objektivnih dokaza o ispunjavanju osobitih zahtjeva za predviđenu posebnu namjenu. Ona nam treba potvrditi da određeni podaci sa sigurnošću predstavljaju ono što bi trebali predstavljati, te da su utemeljeni na istini, činjenicama i zakonima. [25, 26]

Analitička metoda podrazumijeva način provođenja analize. Ona mora detaljno opisati svaki korak potreban za provođenje svakog pojedinog analitičkog ispitivanja. To uključuje opis uzorka, referentnih standarada i pripreme reagencija, korištenje aparature, generiranje kalibracijske krivulje, korištenje formula za izračun itd. [25, 26, 27] Za validaciju analitičke metode potrebno je najprije karakterizirati metodu, potom njene karakteristike usporediti sa zahtjevima korisnika i konačno, ukoliko ih zadovoljava, izdati izjavu o prikladnosti metode za predviđenu namjenu. Kako bi se karakterizirala određena metoda, nužno je definirati i opisati specifične zahtjeve koji se postavljaju pri konkretnom određivanju izabranom metodom, a potom ispitati, ovisno o opsegu validacije i namjeni metode, određene izvedbene značajke. Prilikom kvalitativne analize, odnosno identifikacije analita, nužna je potvrda identiteta tako da se sa sigurnošću odziv instrumenta može pripisati prisutnosti analita, a ne neke druge, fizikalno ili kemijski slične tvari. U tu se svrhu nužno ispituje specifičnost, odnosno selektivnost, te granica detekcije do koje je specifičnost dane metode pouzdana. Kod kvantitativne analize potrebno je ispitati točnost i istinitost, ponovljivost i obnovljivost, selektivnost, otpornost i prema potrebi granicu kvantifikacije te linearnost. [25, 29]

Metoda se mora ponovno validirati ukoliko dođe do promjena u sintezi uzorka, sastavu gotovog proizvoda ili se bilo koji postupak analitičke metode mijenja. Opseg ponovne validacije ovisi o prirodi promjena radi kojih se ona provodi, tako da nekada može biti neophodno provesti iznova potpunu validaciju, a nekad je dovoljno ispitati samo kritične izvedbene značajke metode. [26]

2.4.1 **Specifičnost**

Specifičnost je sposobnost nedvosmislenog određivanja analita u prisutnosti komponenata za koje se može očekivati da se nalaze u uzorku spremnom za analizu. Obično, to uključuje nečistoće, razgradne produkte, sastojke matrice itd., koji primjenom specifičnih metoda određivanja analita ne smetaju. Specifičnost je, dakle, parametar koji govori o tome koliko sastavnica složene matrice uzorka interferira određivanju analita.

2.4.2 Radno područje

Raspon analitičke metode je interval između donje i gornje koncentracije ili količine analita u uzorku , uključujući te granične koncentracije ili količine, za koje se određuje da analitička metoda zadovoljava kriterije preciznosti, točnosti i linearnosti.

2.4.3 Linearnost

Linearnost analitičke metode je njezina mogućnost da, unutar zadanog radnog područja, daje rezultate (odziv) koji su direktno ili pomoću dobro definirane matematičke transformacije proporcionalni veličini koja se mjeri (koncentracija, količina...). Određuje se postupkom umjeravanja (kalibracije), odnosno analizom standardnih otopina različitih, poznatih i definiranih koncentracija analita te grafičkim prikazom ovisnosti odziva instrumenta o koncentraciji analita.

2.4.4 Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije pojedine analitičke metode je je kritična najniža razina mjerene varijable (signala, količine, koncentracije) koja je potrebna da bi se željeni signal analita razlikovao od pozadinskog šuma, uz određenu vjerojatnost. Pri toj razini, varijabla se može detektirati, ali ne nužno i kvantificirati.

Granica kvantifikacije je najmanja količina ili koncentracija analita u uzorku koja se može kvantificirati s određenom točnošću i preciznošću pod definiranim eksperimentalnim uvjetima. To je izvedbena značajka koja se nužno ispituje kod kvantitativnog određivanja pri niskim koncentracijama tvari u matrici uzorka, npr. određivanje onečišćenja ili razgradnih produkata.

2.4.5 Točnost i istinitost

Točnost analitičke metode opisuje bliskost vrijednosti dobivene danom analitičkom metodom s dogovorenom ili referentnom vrijednošću za koju se smatra da je jednaka pravoj vrijednosti. Određuje se ispitivanjem istinitosti (sustavna pogreška) i preciznosti (slučajna pogreška).

Istinitost izražava slaganje srednje vrijednosti beskonačnog broja ponovljenih mjerenja i prave ili referentne vrijednosti.

2.4.6 Preciznost

Preciznost analitičke metode izražava bliskost rezultata dobivenih uzastopnim mjerenjima istog homogenog uzorka uzorkovanog prema prikladnoj propisanoj proceduri i pri propisanim uvjetima. Definira na tri razine: ponovljivost, unutarlaboratorijska preciznost i

međulaboratorijska preciznost, a obično se izražava kao varijanca, standardna devijacija (relativna) ili koeficijent varijacije niza mjerenja.

2.5.6.1 Ponovljivost

Ponovljivost govori o preciznosti analitičke metode pod istim radnim uvjetima kroz kratki vremenski interval. Iskazuje se rasipanjem rezultata kao kratkoročno standardno odstupanje, a govori o broju ponovljenih mjerenja koja se mogu učiniti u nekom vremenu kako bi se postigla željena razina preciznosti.

2.5.6.2 Unutarlaboratorijska preciznost

Unutarlaboratorijska preciznost (međupreciznost) podrazumijeva varijacije unutar laboratorija uz primjenu iste metodologije. Iskazuje se rasipanjem rezultata kao dugoročno standardno odstupanje pri čemu se mogu mijenjati analitičar, oprema, reagensi…

2.5.6.3 Međulaboratorijska preciznost

Međulaboratorijska preciznost (obnovljivost) iskazuje bliskost rezultata ponovljenih mjerenja istog analita pri promijenjenim mjernim okolnostima (mjerno načelo, metoda, analitičar, instrument, referentni uzorak, mjesto i vrijeme određivanja…). Ona uspoređuje preciznost između više laboratorija i ispituje se prilikom međulaboratorijskih studija, obično za standardizaciju metodologije. [26, 27]

2.4.7 **Otpornost**

Otpornost (robusnost) analitičke metode je njezino svojstvo da ne reagira na male promjene mjernih parametara i daje informaciju o njenoj pouzdanosti prilikom narednih korištenja metode. Razlog smanjenja pouzdanosti mogu biti minimalne promjene u mjernom postupku, npr. promjena koncentracije reagensa, brzine zagrijavanja… [26, 29]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Reagensi i otopine

Za izradu ovog rada, korištene su kemikalije prikazane u tablici 2 te certificirane referentne standardne otopine (*Certificated Reference Standard*, CRS) elemenata prikazane u tablici 3.

Tablica 2. Kemikalije

Kemikalija	Proizvođač	Koncentracija / čistoća
Fosamprenavir kalcij	Pliva	-
Nitratna kiselina	J. T. Baker	69,0-70,0 %
Perkloratna kiselina	J. T. Baker	69-72 %
Klorovodična kiselina	J. T. Baker	36,5-38,0 %
Vodikov peroksid	Merck	30 %
Amonijak	Merck	25 %
Tiourea	Sigma-Aldrich	≥99,999 %

Tablica 3. Certificirani referentni standardi proizvođača Inorganic Ventures.

CRS elementa	Koncentracija / mg L^{-1}	CRS elementa	Koncentracija / mg L^{-1}
Ag	1000	Pd	1000
As	10	Pt	1000
Au	1000	Rh	1000
Ba	10000	Ru	1000
Cd	10	Sb	1000
Co	1000	Se	1000
Cr	10000	Sn	10000
Cu	10000	Tl	10
Hg	1000	V	1000
Ir	1000	Sc	1000
Li	1000	Ge	1000
Mo	10000	Dy	1000
Ni	1000	In	1000
Pb	10	Os	1000

3.2. Uređaji

Za izradu pripremu uzoraka i standardnih otopina korištenih u ovom radu, korištena je analitička vaga METTLER TOLEDO AX205 DeltaRange, s rasponom vaganja 1 – 200 mg i s preciznošću 0,01 mg. Također, korišteni su poluautomatski pipetori Eppendorf umjereni na 2-200 µL, 100-1000 µL i 500-5000 µL, uređaj za ultra čistu vodu MiliQ Advantage i mikrovalni reaktor Milestone, model UltraWave.

3.3. ICP-MS sustav

Za provođenje analiza, odnosno validacije metoda, korišteni su ICP-MS uređaju tvrtke Agilent Technologies, modeli 7700x i 7900, koji su ekvivalentni pa su njihove karakteristike zajednički opisane.

U navedenim se ICP-MS instrumentima koristi kvarcni koncentrični pneumatski raspršivač s protokom uzorka ~0,2 mL/min, kvarcni, niskovolumni, Scott-tip komore za odvajanje kapljica s dvostrukim prolazom, peristaltička pumpa s 10 valjaka i 3 odjeljaka za dovod uzorka i internog standarda te za odvod otpada iz komore za odjeljivanje kapljica. Plin nosioc je argon, a radiofrekventni generator radi na 27 MHz s impedancijom varijabilne frekvencije, s radnim rasponom snage od 500 W do 1600 W. Baklja za plazmu (*torch*) načinjena je od 2,5 mm kvarcnog stakla, a konusi su bakreni s niklenim ili platinskim vrhom (za potrebe ovog rada koristile su se oni s niklenim vrhom), od kojih prvi konus za uzorkovanje ima otvor dijametra 1 mm, a drugi, tzv. *skimmer* konus, 0,45 mm. Kolizijski plin je helij, a oktopolni reakcijski sustav četvrte generacije omogućava brzu izmjenu plinova i učinkovito uklanjanje interferencija koristeći diskriminaciju na temelju kinetičke energije u kolizijskom helij-modu. Maseni analizator je hiperbolični kvadrupolni koji radi na visokoj frekvenciji (3 MHz), a detektor ortogonalni (*Orthogonal detector system*, ODS) koji omogućava široki linearni dinamički raspon do 11 redova veličine. Računalno korisničko sučelje (*software*) koji se koristi kod ovih instrumenata naziva se MassHunter.

3.4. Metode rada

3.4.1. Priprema uzoraka

Priprema uzoraka je od osobite važnosti kod svake analize komponenata u tragovima čiji je udio u uzorku manji od 100 ppm. Stoga je prilikom razvoja i validacije metoda u ovom radu, posebna pažnja pridana upravo tom glavnom izvoru kontaminacije, gubitka uzorka i drugih izvora pogreške mjerenja. Bitno je da svi korišteni reagensi, laboratorijsko posuđe i okruženje imaju zadovoljavajući stupanj čistoće. Iznimno je bitno pažljivo raditi s uzorkom i sa standardima tijekom cijelog procesa pripreme. Uz to je, kao i prilikom svake analize, vrlo bitan faktor vrijeme koje se utroši na pripremu, kao i količina reagensa i energije (cijena). Stoga je procesom ispitivanja otapanja ispitano koja će metoda biti idealna da zadovolji sve navedeno, što kraću i jednostavniju pripremu, uz davanje točnih i preciznih rezultata.

Fosamprenavir kalcij je, kako je već navedeno u odjeljku 2.1, vrlo slabo topljiv u vodi, iako bolje topljiv od fosamprenavira i amprenavira, a njegova je topljivost ovisna o pH i zakiseljavanjem se povećava, a najveća je pri pH 3 – 4. Unatoč tome, za analizu je potrebno uzorak u potpunosti otopiti kako bi bio prikladan za ICP-MS sustav na raspolaganju. Stoga su isprobane različite kombinacije kiselina i mikrovalne digestije pod povišenim tlakom i temperaturom. Mikrovalna digestija je idealna metoda za razaranje organskih matrica, a reaktor na raspolaganju prilagođen je radu s kiselinama u smislu otpornosti na njihove nagrizajuće i oksidirajuće učinke. Njome se omogućava zagrijavanje uzorka na relativno visoku temperaturu pod povišenim tlakom, čime se znatno povećavaju sudari u otopini i pospješuje proces otapanja. Također, rad u zatvorenom sustavu pod tlakom onemogućava gubitak hlapivih komponenti, kao i eventualne eksplozivne pojave. Korištene su razne kombinacije nitratne, klorovodične i perkloratne kseline te vodikovog peroksida, obzirom da one imaju sposobnost otapanja većine organskih matrica.

Za potrebe analiza, vagani su uzorci fosamprenavir kalcija mase 50 mg u odnosu na koje su preračunate ICH Q3D dopuštene količine elementarnih onečišćenja u proizvodima za oralnu primjenu. Iskustveno, koncentracije koje se snimaju na instrumentu dobivene preračunavanjem limita za oralnu primjenu na masu uzorka od 50 mg razrijeđenu do 50 mL (koncentracija uzorka tada je jednaka 1 mg/mL), daju dobre rezultate u pogledu granice kvantifikacije, točnosti i preciznosti, te nemaju znatan utjecaj manjih kontaminacija.

Po razvijenoj pogodnoj metodi za otapanje fosamprenavir kalcija, uzorak se priprema tako da se, nakon homogenizacije uzorka, u kvarcne kivete odvagane mase od 50 mg (± 10 %) doda 5 mL HNO_3, 250 µL $HClO_4$ i 100 µL internog standarda (ISTD, vidi odjeljak 3.4.2.). Kivete se

zatvore, pažljivo protresu, i postave u mikrovalni reaktor na digestiju prema programu opisanom u tablici 4. Nakon mikrovalne digestije, uzorci se kvantitativno prebacuju u odmjerne tikvice od polipropilena, volumena 50 mL, te se nadopunjuju prikladnom otopinom za razrjeđivanje (vidi odjeljak 3.4.2.).

Također se priprema i slijepa digestirana otopina (SPD) na analogan način kao što se priprema uzorak, ali bez odvage uzorka.

Tablica 4. Program za digestiju fosamprenavir kalcija u mikrovalnom reaktoru.

br.	vrijeme / min	snaga / W	T1 / °C	T2 / °C	tlak / bar
1	00:25:00	1500	210	70	130
2	00:20:00	1500	210	70	130

3.4.2. Priprema temeljnih standardnih otopina (TSO)

Za pripremu temeljnih standardnih otopina koristili su se certificirani referentni standardi proizvođača Inorganic Ventures navedeni u tablici 3. Volumeni koje je potrebno dodati kako bi dobili TSO pogodnih koncentracija za daljnju pripremu radnih standardnih otopina, računali su se na temelju ICH Q3D smjernica za elementarna onečišćenja u proizvodima za oralnu primjenu (vidi tablicu 1). TSO se pripremaju tako da se odvoje elementi koji su, prema preporuci proizvođača certificiranog radnog standarda (Inorganic Ventures), stabilni u razrijeđenoj nitratnoj kiselini od onih koji se čuvaju u razrijeđenoj klorovodičnoj kiselini. Time se postiže bolja stabilnost dobivenih temeljnih standardnih otopina. Stoga su pripremale TSO1 i TSO2 u odmjernim tikvicama od 50 mL uz dodatak određenog volumena certificiranog referentnog standarda prikladne koncentracije (tablica 5 za TSO1 i tablica 6 za TSO2), a nadopunjavane s 1 % v/v HNO_3 za TSO1, odnosno HCl za TSO2. Na taj su način dobivene stabilne otopine prikladnih koncentracija analita od interesa pomoću kojih će se vrlo jednostavno pripravljati radni standardi za kalibraciju i ispitivanje linearnosti radnog područja, kao i za svaku sljedeću kalibraciju. Također, TSO1 i TSO2 koristiti će se kao standardni dodatak koji se dodaje u uzorak za ispitivanje izvedbenih značajki metode.

Tablica 5. Koncentracije certificiranih referentnih standarada koji se koriste za pripremu temeljne standardne otopine TSO1 te volumeni koji se dodaju u odmjernu tikvicu od 50 mL.

Element	koncentracija CRS / mg L^{-1}	Volumen / µL
Cd	10	500
Pb	10	500
Tl	10	800
As	10	1500
Co	1000	50
Rh	1000	100
V	1000	100
Au	1000	100
Se	1000	150
Ag	1000	150
Ni	1000	200
Li	1000	550
Sb	1000	1200
Mo	10000	300
Ba	10000	140
Cu	10000	300
Sn	10000	600
Cr	10000	1100

Tablica 6. Koncentracije certificiranih referentnih standarada koji se koriste za pripremu temeljne standardne otopine TSO2 te volumeni koji se dodaju u odmjernu tikvicu od 50 mL.

Element	koncentracija CRS / mg L^{-1}	Volumen / µL
Hg	1000	30
Pd	1000	100
Pt	1000	100
Ir	1000	100
Ru	1000	100
Os	1000	100

U analizama koje se provode ICP-MS tehnikom dobro je koristiti interni standard za praćenje stabilnosti sustava i eventualnih gubitaka analita. Kao interni standard koriste se elementi koje normalno ne očekujemo u matrici i koja nisu analiti, ali imaju dobar odziv i stabilnost. Oni se dodaju svim uzorcima te slijepim i umjernim standardima, a povezuju se pojedinačno s elementima bliskog omjera mase i naboja iona koji u plazmi nastaju. ICP-MS programsko korisničko sučelje koji se koristi u ovom radu automatski korigira koncentracije pojedinih elemenata u odnosu na variranja pridruženog internog standarda, pa se zapravo rezultat prikazuje relativni omjer signala analita i signala internog standarda. Pretpostavlja se da će učinci koji mogu utjecati na promjene u koncentraciji analita u uzorku i određivanja općenito, biti isti za analit od interesa kao i za pridruženi mu interni standard. Odabrani elementi koji se koriste kao interni standardi su skandij, germanij, disprozij i indij.

Za pripremu internog (unutarnjeg) standarda (ISTD) potrebno je u tikvicu od 50 mL dodati malu količinu 1 % v/v otopine HNO_3, volumene certificiranih referentnih standarada prikazanih u tablici 7, te nadopuniti do oznake 1 % v/v otopinom HNO_3.

Tablica 7. Volumeni certificiranih referentnih standarada koje je potrebno dodati u tikvicu od 50 mL za pripremu internog (unutarnjeg) standarda.

Element	koncentracija CRS / mg L^{-1}	Volumen / µL
Sc	1000	1250
Ge	1000	1250
Dy	1000	1250
In	1000	1250

3.4.3. Priprema radnih standardnih otopina (RS)

Najprije su se pripremile otopine za razrjeđivanje, diluent 1 i diluent 2. Diluent 1 sadrži 2,5 % v/v HCl kako bi se postigla stabilizacija elemenata koji se čuvaju u HCl prema preporuci proizvođača korištenih certificiranih referentnih standarada Inorganic Ventures (Hg, Pd, Ir, Pt, Ru i Os). Priprema se u odmjernoj tikvici od polipropilena, volumena 1 L, tako da se ulije manja količina ultračiste vode, potom 25 mL HCl te se nadopuni do oznake ultračistom vodom. Ova se otopina koristi za razvoj i validaciju metode za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V u fosamprenavir kalciju. Diluent 2 sadrži 0,01 M tiouree u 2,5 % v/v HCl, a priprema se analogno diluentu 1, uz dodatak 761,20 mg tiouree. Tiourea se dodaje radi kompleksiranja vrlo otrovnog i hlapljivog osmijevog tetraoksida koji nastaje u reakciji s nitratnom kiselinom. Diluent 2 se stoga koristi za razvoj i validaciju metode za određivanje osmija u fosamprenavir kalciju. Obje se otopine koriste za razrjeđivanje svih uzoraka i radnih standardnih otopina pri odgovarajućoj metodi.

Radne standardne otopine pripremale su se iz temeljnih standardnih otopina, a koristile su se za ispitivanje linearnosti i izradu kalibracijskih pravaca. Pripremale su se na način da njihova matrica odgovara onoj kod uzorka spremnog za analizu, kako bi se uklonio njen utjecaj. Uz to, svima je, kao i uzorcima, dodana jednaka količina prikladnog internog standarda. Konačno, nužan je dodatak određene, točno poznate količine analita od interesa, a kada se pripremi niz takvih otopina, njihov se će odziv na instrumentu uz poznate koncentracije analita u otopini, tvoriti krivulju za svaki pojedini analit koja će služiti kao kalibracijski pravac. Pomoću kalibracijskog pravca se tada određuje koncentracija analita u uzorku na način da se izmjereni odziv za uzorak (*y*-os) smjesti na kalibracijski pravac s kojeg se tada povuče okomica na *x*-os na kojoj se nalazi pripadajuća koncentracija, odnosno uvrštavanjem u jednadžbu kalibracijskog pravca. Radne standardne (RS) otopine pripremaju se tako da se u odmjerne tikvice od polipropilena, volumena 50 mL, dodati malo odgovarajućeg diluenta, potom 5 mL HNO_3 i 0,25

mL $HClO_4$, 100 µL ISTD te volumene temeljnih standardnih otopina propisanih u tablici 8, nakon čega se tikvice nadopunjavaju do oznake diluentom. U slijepu standardnu otopinu (SP) ne dodaju se analiti i ona služi za uklanjanje utjecaja matrice. Dobivene su koncentracije za svaki pojedini element u svakoj pripremljenoj radnoj standardnoj otopini prikazane u tablici 9 i njih je potrebno upisati u programsko korisničko sučelje instrumenta.

Tablica 8. Volumeni temeljnih standardnih otopina 1 i 2 koje je potrebno dodati u radne standarde za ispitivanje linearnosti kako bi oni imali točno 0, 10, 30, 50, 100, 150, odnosno 200 % koncentracije svakog elementa s obzirom na ICH Q3D zahtjeve za oralnu primjenu.

	Volumen / µL						
	SP	**RS-1**	**RS-2**	**RS-3**	**RS-4**	**RS-5**	**RS-6**
% PDE	0	10	30	50	100	150	200
***V*(TSO1)/µL**	/	25	75	125	250	375	500
***V*(TSO2)/µL**	/	25	75	125	250	375	500

Tablica 9. Koncentracije u RS otopinama pripremljenim na način opisan u tablici 8.

	Koncentracija / ng mL^{-1}						
ELEMENT	SP	RS-1	RS-2	RS-3	RS-4	RS-5	RS-6
Li	0	5,5	16,5	27,5	55	82,5	110
V	0	1	3	5	10	15	20
Cr	0	110	330	550	1100	1650	2200
Co	0	0,5	1,5	2,5	5	7,5	10
Ni	0	2	6	10	20	30	40
Cu	0	30	90	150	300	450	600
As	0	0,15	0,45	0,75	1,5	2,25	3
Se	0	1,5	4,5	7,5	15	22,5	30
Mo	0	30	90	150	300	450	600
Ru	0	1	3	5	10	15	20
Rh	0	1	3	5	10	15	20
Ag	0	1,5	4,5	7,5	15	22,5	30
Cd	0	0,05	0,15	0,25	0,5	0,75	1
Sn	0	60	180	300	600	900	1200
Sb	0	12	36	60	120	180	240
Ba	0	14	42	70	140	210	280
Pd	0	1	3	5	10	15	20
Ir	0	1	3	5	10	15	20
Pt	0	1	3	5	10	15	20
Au	0	1	3	5	10	15	20
Hg	0	0,3	0,9	1,5	3	4,5	6
Tl	0	0,08	0,24	0,4	0,8	1,2	1,6
Pb	0	0,05	0,15	0,25	0,5	0,75	1
Os	0	1	3	5	10	15	20

3.4.4. Instrumentalni uvjeti

U tablicama 10, 11, 12, i 13 prikazani su instrumentalni uvjeti za analize provedene u svrhu razvoja i validacija metoda. Prije pokretanja svake analize obavlja se proces automatskog umjeravanja te se pregledava dobiveni izvještaj o obavljenom umjeravanju kako bi se provjerile performanse instrumenta.

Tablica 10. Instrumentalni uvjeti za detekciju elemenata.

Element	Masa izotopa	Kolizijski plin	Integracijsko vrijeme (s)	Određivanje	Interni standard
Li	7	-	5.00	Analit	^{45}Sc
V	51	He	0.30	Analit	^{45}Sc
Cr	52	He	0.30	Analit	^{45}Sc
Co	59	He	0.30	Analit	^{45}Sc
Ni	60	He	0.30	Analit	^{45}Sc
Cu	63	He	0.30	Analit	^{45}Sc
As	75	He	1.50	Analit	^{72}Ge
Se	78	He	1.50	Analit	^{72}Ge
Mo	95	-	0.30	Analit	^{115}In
Ru	101	-	0.30	Analit	^{115}In
Rh	103	-	0.30	Analit	^{115}In
Pd	105	-	0.30	Analit	^{115}In
Ag	107	-	0.30	Analit	^{115}In
Cd	111	-	1.00	Analit	^{115}In
Sn	118	-	0.30	Analit	^{115}In
Sb	121	-	0.30	Analit	^{115}In
Ba	138	-	0.30	Analit	^{115}In
Os	189	-	0.30	Analit	^{163}Dy
Ir	193	-	0.30	Analit	^{163}Dy
Pt	195	-	0.30	Analit	^{163}Dy
Au	197	-	0.30	Analit	^{163}Dy
Hg	202	-	2.00	Analit	^{163}Dy
Tl	205	-	1.50	Analit	^{163}Dy
Pb	208	-	0.30	Analit	^{163}Dy
Sc	45	-/He	0.12/0.30	ISTD	-
Ge	72	He	0.30	ISTD	-
In	115	-	0.12	ISTD	-
Dy	163	-	0.12	ISTD	-

Tablica 11. Akvizicijski parametri

Parametar	**Postavka**
Akvizicijska metoda	Spektralna
Detekcijska metoda	Dvostruka
Replikati	3
Vrijeme stabilizacije (s)	15

Tablica 12. Parametri peristaltičke pumpe.

Parametar	**Vrijeme (s)**	**Brzina okretanja (s^{-1})**	**Pozicija**
Uzimanje uzorka	40	0.3	Uzorak
Stabilizacija	60	Parametar umjeravanja	Uzorak
Ispiranje sonde (uzorak)	15	0.3	Utor za ispiranje
Ispiranje sonde (standard)	15	0.3	Utor za ispiranje
Ispiranje 1	60	0.4	Pozicija 1*
Ispiranje sonde 1	30	0.4	Utor za ispiranje
Ispiranje 2	60	0.4	Pozicija 2**
Ispiranje sonde 2	30	0.4	Rinse Port

* Otopina za ispiranje 1 – 1 % HNO_3

**Otopina za ispiranje 2 – 8/ v/v HNO_3 + 2.5% v/v HCl + 0.5% v/v $HClO_4$.

Tablica 13. Operativni uvjeti (optimiziraju se prilikom procesa automatskog umjeravanja).

Parameter	**Radni uvjet**
Način rada plazme	Opća namjena
RF ulazna snaga (W)	1550
Protok plina nosioca (L/min)	1.0-1.1
Pumpa za raspršivač (s^{-1})	0.10
Temperatura komore za kapljice (ºC)	2
Protok helija (mL/min)	5.0

3.5. Radni postupci

Sva se ispitivanja provode na uređaju Agilent Technologies 7900 ICP-MS, osim unutarlaboratorijske preciznosti koja se provodi na Agilent Technologies 7700x ICP-MS.

Instrument direktno daje koncentracije elemenata u otopini uzorka u ng/mL. Sadržaj u obliku masenog udjela svakog metala u ppm (*parts per milion*, 10^{-6} g elementa u 1 g uzorka) računa se pomoću slijedeće formule:

$$w\ (ppm) = \frac{c\left(\frac{ng}{mL}\right) \times V(mL)}{m(mg)}$$

gdje je:

c – koncentracija analita očitana na instrumentu u ng/mL

V – konačni volumen otopljenog uzorka u mL

M – masa uzorka u mg

Iskoristivost (*Recovery*) se izražava kao postotak rezultata određivanja pojedinog analita prema njegovoj stvarnoj vrijednosti, a računa se prema formuli:

$$Iskoristivost\ (\%) = \left[\frac{c_{u,sd} - c_u}{c_{sd}}\right] \times 100$$

gdje je:

$c_{u,sd}$ – udio analita u uzorku sa standardnim dodatkom (ppm)

c_u – udio analita u uzorku bez standardnog dodatka (ppm)

c_{sd} – udio analita u standardnom dodatku (ppm)

3.5.1. Ispitivanje linearnosti

Kako bi se ispitalo zadovoljava li metoda ovaj parametar, najprije je bilo potrebno definirati predviđeno područje (raspon) koncentracija analita u uzorku. Kao središnja vrijednost područja za koje ispitujemo linearnost postavljena je ona koncentracija elementarnog onečišćenja u aktivnoj farmaceutskoj tvari koja je propisana kao granična prema ICH Q3D zahtjevima (PDE). Za gornju je granicu uzeta dvostruko veća vrijednost za svaki element, a za donju pretpostavljena granica kvantifikacije metode, koja je kasnije i ispitana.

Za ispitivanje linearnosti pripremaju se radne standardne otopine, kako je prikazano u odjeljku 3.4.3. i snimaju u triplikatima te se iz dobivenih odziva i poznatih koncentracija konstruiraju pravci koji moraju biti u skladu sa propisanim zahtjevom, odnosno dopuštenim odstupanjem od linearnosti. Dobivene su krivulje obrađene prikladnim statističkim metodama, kao što je metoda najmanjih kvadrata. Rezultat se prikazuje grafički i pomoću faktora korelacije (R).

3.5.2. Ispitivanje granice kvantifikacije

Odvaže se šest odvaga uzorka kojima se, prije bilo kakvog preparativnog postupka, dodaju volumeni TSO1 i TSO2 koji odgovaraju koncentraciji pretpostavljenoj za granicu kvantifikacije, koja je za obje validirane metode iznosila 10 % granične vrijednosti propisane ICH Q3D smjernicama. Nakon toga slijedi normalna, metodom propisana, procedura pripreme uzorka. Analizira se u nastavku na barem 3 standarada za izradu umjernih pravaca Za račun se koriste srednje vrijednosti dobivene iz mjerenja uzoraka bez standardnog dodatka u sklopu ispitivanja točnosti kako bi se izmjerene vrijednosti umanjile za iznos eventualno već prisutnih elemenata u uzorku. Rezultati se izražavaju kao prosječna iskoristivost metode za svaki element, a trebaju biti unutar propisanih hranica kako bi zadovoljili.

3.5.3. Ispitivanje točnosti i selektivnosti

Pripremaju se uzorci tako da se odvažu te im se, u setovima tripleta, dodaju odgovarajuće količine analita prije bilo kakvog preparativnog postuka. Pripremaju se po tri uzorka bez standardnog dodatka, i devet uzoraka ukupno sa standardnim dodatkom na tri različite razine. Slijedi propisani nastavak procedure za pripremu uzorka i analizira se u nastavku na standarde za izradu umjernih pravaca. Izražava se kao prosječna točnost metode kao iskoristivost za pojedini element, a sve trebaju zadovoljiti postavljene zahtjeve maksimalno dopuštenog odstupanja od prave vrijednosti. Selektivnost metode potvrđuje se ukoliko su rezultati za točnost unutar granica prihvatljivosti.

3.5.4. Ispitivanje preciznosti

Preciznost metode se određuje sumiranjem rezultata ispitivanja ponovljivosti i rezultata ispitivanja unutarlaboratorijske preciznosti. Rezultat se prikazuje kao relativna standardna devijacija (RSD) koja uzima u obzir oba testiranja. i mora biti unutar propisanih zahtjeva da bi zadovoljila.

3.5.4.1 Ispitivanje ponovljivosti

Pripremaju se i analiziraju 6 odvaga uzorka kojima je dodan standardni dodatak elemenata na 100 % graničnih vrijednosti propisanih ICH Q3D smjernicama prije bilo kakvog preparativnog postupka. Rezultat se izražava kao relativna standardna devijacija (RSD) provedenih mjerenja.

3.5.4.2. Ispitivanje unutarlaboratorijske preciznosti

Ispitivanje unutarlaboratorijske preciznosti provodi se na isti način kao i ispitivanje ponovljivosti, samo što se analiza odvija na drugom, ekvivalentnom instrumentu. U tu je svrhu

korišten Agilent 7700x ICP-MS. Također, analizirani su isti uzorci drugi dan, pa će se ovi rezultati također spominjati u raspravi o otpornosti metode.

3.5.5. Ispitivanje otpornosti

Za ispitivanje otpornosti koristile su se male promjene u koncentracijama kiselina, temperaturnim programima mikrovalne digestije. Za svaku se promjenu koristilo po četiri odvage uzorka, dvije bez, a dvije sa standardnim dodatkom na 100 % (250 µL TSO1 i 250 µL TSO2) graničnih vrijednosti elemenata propisanih ICH Q3D smjernicama. Ovdje je bilo osobito važno prije ikakve analize dobro provjeriti je li se uzorak otopio. Mijenjao se temperaturni program mikrovalne digestije sa 210 °C na 200 °C i na 220 °C, te smanjivale koncentracije nitratne kiseline i perkloratne kiseline (sa ~69 % na ~ 59 %). Svaka se promjena individualno odvijala kako bi se mogao prepoznati eventualni utjecaj neke pojedine promjene.

Rezultati se prikazuju kao relativne razlike dobivenih rezultata analizom uzoraka pripremljenih uz provedene promjene i rezultata dobivenih analizom uzoraka pripremljenih prema razvijenom metodom propisanim uvjetima.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Razvoj ICP-MS metode

4.1.1. Ispitivanje otapanja

U kvarcne kivete je odvagano po 50 mg (± 10 %) Fosamprenavir kalcija u duplikatima te dodana određena količina jedne kiseline ili kombinacije više njih. Nakon pripadajuće mikrovalne digestije uzorci su prebačeni u tikvice od 50 mL i nadopunjeni do oznake ultra čistom vodom, te su pregledani da se ustanovi je li uzorak otopljen. Rezultati ispitivanja otapanja prikazani uz digestiju pri temperaturi od 210 °C prikazani su u tablici 14, a uz digestiju pri 230 °C u tablici 15.

Tablica 14. Rezultati ispitivanja otapanja fosamprenavir kalcija uz mikrovalnu digestiju pri temperaturi od 210 °C.

Temperaturni program mikrovalne digestije					
br.	**vrijeme / min**	**snaga / W**	**T1 / °C**	**T2 / °C**	**tlak / bar**
1	00:25:00	1500	210	70	130
2	00:20:00	1500	210	70	130

Korištene kombinacije kiselina	**Stanje nakon digestije**
2 mL HCl	neotopljeno
3 mL HCl	neotopljeno
3 mL 50 % v/v HCl	neotopljeno
2 mL HNO_3	neotopljeno
3 mL HNO_3	neotopljeno
3 mL HNO_3 + 0,5 mL HCl	neotopljeno
2 mL HNO_3 + 0,5 mL HCl	neotopljeno
4 mL HNO_3	neotopljeno
3 mL HNO_3+ 0,25 mL $HClO_4$	neotopljeno
4 mL HNO_3 + 0,25 mL $HClO_4$	neotopljeno
5 mL HNO_3	neotopljeno
5 mL HNO_3 + 0,25 ml $HClO_4$	otopljeno
5 mL HNO_3 + 0,5 mL H_2O_2	otopljeno
4 mL HNO_3 + 0,5 ml $HClO_4$	otopljeno
3 mL HNO_3 + 0,5 mL H_2O_2	otopljeno
3 mL HNO_3 + 0,25 ml $HClO_4$+ 0,5 mL H_2O_2	otopljeno

Kisele matrice koje su se pokazale zadovoljavajućima, ponovno su korištene za pripremu uzoraka bez standardnog dodatka i sa standardnim dodatkom na 100 % specifikacije u

triplikatima, a nadopunjavane do 50 mL s 2,5 % v/v otopinom HCl, te su najbolji rezultati ponovljivosti i točnosti dobiveni analitom uzoraka pripremljenih s dodatkom 5 mL HNO_3 + 0,25 ml $HClO_4$ uz mikrovalnu digestiju na 230 °C. Stoga je ta kombinacija kiselina odabrana za korištenje u daljnjem razvoju i validaciji metode.

Tablica 15. Rezultati ispitivanja otapanja fosamprenavir kalcija uz mikrovalnu digestiju pri temperaturi od 230 °C.

Temperaturni program mikrovalne digestije					
br.	**vrijeme / min**	**snaga / W**	**T1 / °C**	**T2 / °C**	**tlak / bar**
1	00:25:00	1500	230	70	130
2	00:20:00	1500	230	70	130

Korištene kombinacije kiselina	**Stanje nakon digestije**
4 mL HNO_3 + 0,25 ml $HClO_4$ + 1,25 mL HCl	neotopljeno
3 mL HNO_3 + 0,5 ml $HClO_4$	neotopljeno
4 mL HNO_3 + 0,5 ml $HClO_4$	otopljeno
5 mL HNO_3	otopljeno
4 mL HNO_3 + 0,25 ml $HClO_4$	neotopljeno

4.1.2. Optimizacija sustava za uklanjanje interferencija

Na analizu elemenata u tragovima ICP-MS tehnikom mogu utjecati različite spektralne interferencije uzrokovane izobaričnim i poliatomnim interferencijama. [30] Utjecaj se očituje kao preklapanje spektralnih linija na određenim veličinama mjerenih omjera mase i naboja, što uzrokuje krivu procjenu prisutne količine pojedinog analita.

Izobarične interferencije uključuju monoatomne specije istog omjera mase i naboja kao što su pojedini izotopi (npr. $^{58}Fe^{+}$ i $^{58}Ni^{+}$) ili neke višestruko nabijene vrste. Poliatomne interferencije mogu se pojaviti od argona ili nečistoća koje su u njemu prisutne, od otapala ili kiselina, lužina ili soli, ili iz same matrice uzorka. Također mogu biti uzrokovane reakcijom nekih analita međusobno ili s drugim specijama prisutnim u plazmi, što čini njihovo prepoznavanje iznimno složenim. [31, 32]

Za optimizaciju razvijane metode, najprije se provelo nekoliko preliminarnih analiza u kojima su se snimali različiti izotopi analita i u različitim načinima rada (s kolizijom ili bez). Utjecaj interferencija uzrokovanih zbog argona kao plina koji je nositelj plazme i koji je u njoj prisutan u daleko najvećem udjelu, uvelike se uklonio korištenjem helija kao kolizijskog plina za sve elemente mase od 40 do 80, prema preporuci proizvođača instrumenta. Također, odabir izotopa svakog pojedinog elementa prema preporuci proizvođača pokazao se optimalnim izborom za razvijanu metodu.

Molekula fosamprenavir kalcija sadrži neke pojedine elemente za koje se pretpostavljalo da bi mogli interferirati u određivanju elemenata od interesa, a to su fosfor, sumpor i ponajviše kalcij. Iz tog su se razloga uzorci ponovno analizirali na ICP-OES instrumentu na koji, obzirom na drugačiji princip rada, tj. detekciju, utječu potpuno različite interferencije. Upitni rezultati dobili su se za Li, Ni, As, Co, Se i Mo, ali su se rezultati snimljeni objema tehnikama pokazali usporedivima, čime je isključen utjecaj interferencija i vrijednosti su prihvaćene.

4.1.3. Optimizacija sustava za bolji odziv osmija

Osmij se u korištenim certificiranim referentnim standardima nalazi u obliku otopljenog $(NH_4)_2OsCl_6$, odnosno $[OsCl_6]^{2-}$ u razrijeđenoj otopini HCl. Izlaganjem oksidacijskim uvjetima nitratne kiseline, naročito uz povišenu temperaturu, formira se jako hlapljiv i iznimno otrovan osmijev tetraoksid (OsO_4). Osim što se na taj način gubi tijekom pripreme uzorka, njegova prisutnost daje lažno povišeni odziv jer zbog svoje hlapivosti dolazi u povećanoj mjeri u raspršivač kroz koji potom dospijeva do plazme i detektora u većoj mjeri. [8]

Pretraživanjem literature nađeno je kako se osmijev tetraoksid može kompleksirati s tioureom pripravljenom u razrijeđenoj otopini HCL i na taj način stabilizirati u otopini. [9]

Stoga su provedena preliminarna ispitivanja uz korištenje otopine za razrjeđivanje koja je sadržavala 0,01 mol/L tiouree u 2,5 % v/v HCl kojima je potvrđeno da su rezultati višestruko poboljšani (tablica 16) u odnosu na one dobivene analizom gdje se kao otopina za razrjeđivanje koristila samo 2,5 % v/v HCl. Nakon potvrdnih rezultata preliminarnih ispitivanja, takva je otopina za razrjeđivanje korištena za metodu za određivanje osmija u fosamprenavir kalciju ICP-MS tehnikom.

Tablica 16. Rezultati dobiveni analizom osmija u uzorcima pripravljenih s otopinom za razrjeđivanje koja sadrži tioureu i uzoraka pripravljenih s otopinom za razrjeđivanje koja ne sadrži tioureu.

Osmij s tioureom					**Osmij bez tiouree**				
Uzorak br.	Izračunata koncentracija / ppm	Prosječna koncentracija / ppm	Točnost / %	Prosječna točnost / %	Uzorak br.	Izračunata koncentracija / ppm	Prosječna koncentracija / ppm	Točnost / %	Prosječna točnost / %
1	0,01		-		*1*	0,10		-	
2	0,00	0,01	-	-	*2*	0,15	0,12	-	-
3	0,01		-		*3*	0,12		-	
4	2,86		95		*4*	11,05		364	
5	2,76	2,79	92	93	*5*	11,79	11,51	389	380
6	2,75		91		*6*	11,70		386	
7	9,01		90		*7*	33,24		331	
8	8,99	8,97	90	90	*8*	34,85	34,69	347	346
9	8,90		89		*9*	35,99		359	
10	13,65		91		*10*	50,83		338	
11	13,37	13,59	89	91	*11*	50,98	51,95	339	346
12	13,75		92		*12*	54,03		359	

4.2. Validacija ICP-MS metode za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V u fosamprenavir kalciju

Da bi se provela validacija razvijene metode za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V u fosamprenavir kalciju, uzorci i standardne otopine pripravljale su se načinima opisanim u odijeljku 3.4., osim što se nije dodavao osmij u TSO 2. Također, kao otopina za razrjeđivanje koristila se 2,5 % v/v HCl.

Kriteriji prihvatljivosti koje je nužno zadovoljiti kako bi rezultati dobiveni ispitivanjem izvedbenih značajki razvijene metode bili prihvatljivi i kako bi se razvijena metoda mogla validirati, prikazani su u tablici 17.

Tablica 17. Kriteriji prihvatljivosti metode.

Parametar	Kriterij prihvatljivosti
Specifičnost	
Iskorištenje	70 % - 150 %
Linearnost	
Korelacijski koeficijent (*R*)	≥ 0.99
Granica kvantifikacije	
Vrijednost	10 % PDE
Iskorištenje	70 % - 150 %
Točnost	
Razina 1 (30 % PDE) – Iskorištenje	70 % -150 %
Razina 2 (100 % PDE) – Iskorištenje	
Razina 3 (150 % PDE) – Iskorištenje	
Preciznost	
Ponovljivost – RSD	≤ 20 %
Unutarlaboratorijska preciznost – RSD	≤ 20 %
Ukupno - RSD	≤ 25 %
Otpornost	
Razlika	≤ 10 %

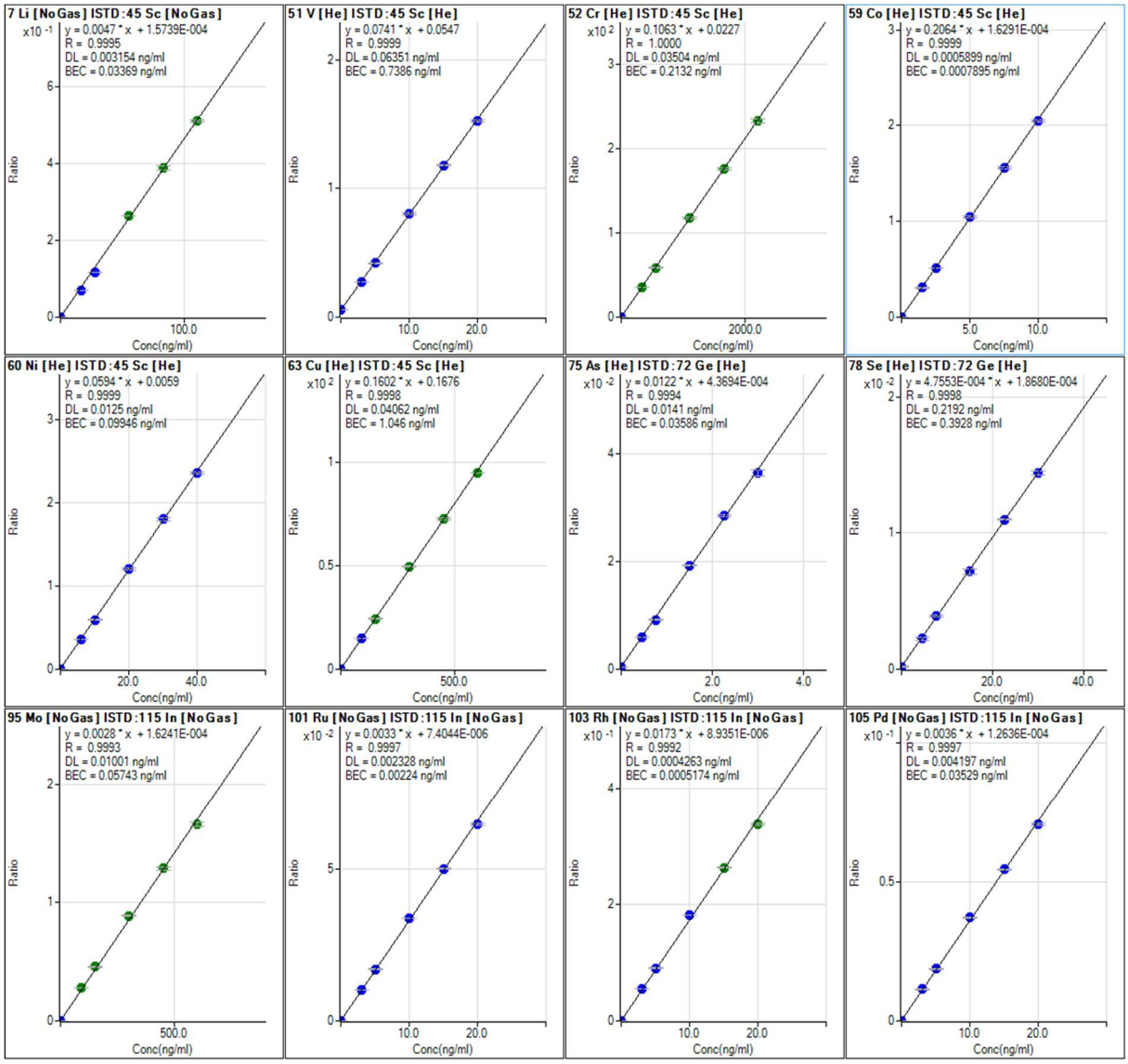
4.2.1. Linearnost

Ispitivanjem linearnosti dobiveni su rezultati u obliku relativnog omjera odziva analita i pridruženog mu internog standarda za mjerenu slijepu standardnu otopinu, kojoj se pridružuje vrijednost koncentracije 0 ng/mL za svaki analizirani element, te za radne standardne otopine pripadajućih koncentracija prikazanih u tablici 9. Slijepom probom poništavaju se eventualno prisutni analiti u samoj matrici otopine (dodane kiseline i voda).

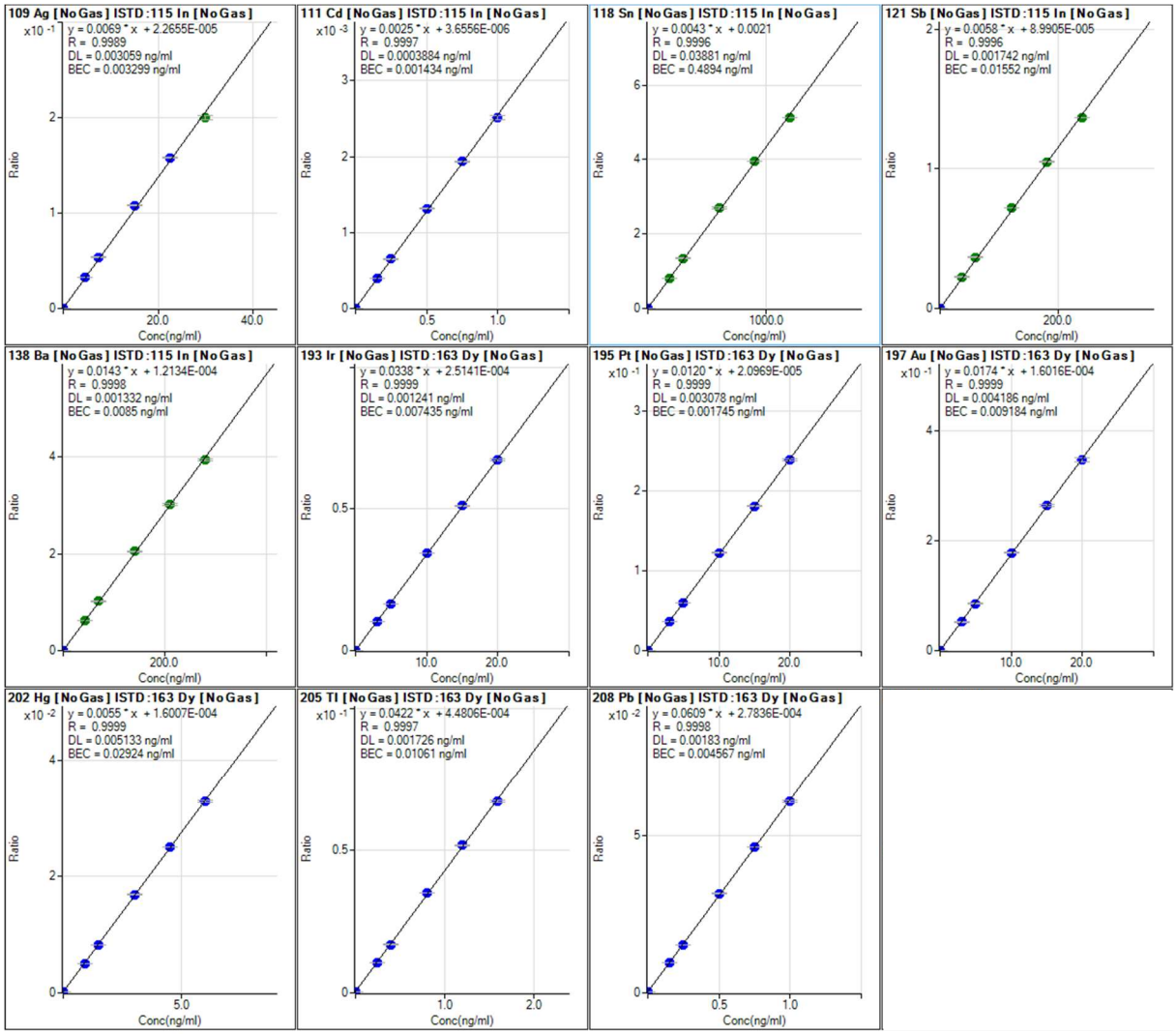
Rezultati su statistički obrađeni automatski u programskom korisničkom sučelju instrumenta, MassHunter, te su prikazani u obliku pravaca s pripadajućom jednadžbom čija vrijednost korelacijskog faktora upućuje na linearnost rezultata. Također, instrument računa za

dane uvjete pripadajuću granicu detekcije (*detection limit*, DL) pojedinog mjerenog elementa, kao i mjeru pozadinske prisutnosti pojedinog elementa (*Background Equivalent Concentration*, BEC). DL se računa na osnovu pozadinskog šuma, a BEC na osnovu pozadinskog intenziteta.

Grafički prikazi dobivenih pravaca uz numeričke vrijednosti navedenih parametara prikazani su na slikama 6 i 7.



Slika 6. Rezultati ispitivanja linearnosti za Li, V, Cr, Co, Ni, Cu, As, Se, Mo, Ru, Rh i Pd razvijenom metodom za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V u fosamprenavir kalciju ICP-MS tehnikom.



Slika 7. Rezultati ispitivanja linearnosti za Ag, Cd, Sn, Sb, Ba, Ir, Pt, Au, Hg, Tl i Pb razvijenom metodom za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V u fosamprenavir kalciju ICP-MS tehnikom.

Razvijena metoda daje linearne rezultate za sve ispitivane elemente i zadovoljava kriterij prihvatljivosti za linearnost koji glasi da korelacijski faktor mora biti veći ili jednak 0,99. Najnižu vrijednost korelacijskog faktora ima srebro, a ona iznosi 0,9988.

4.2.2. Granica kvantifikacije

Granica kvantifikacije određivana je pri koncentracijama ispitivanih elemenata koje odgovaraju 10 % granične količine propisane ICH Q3D smjernicama za proizvode za oralnu primjenu. Koncentracije dobivene na uređaju preračunate su u masene udjele svakog pojedinog onečišćenja u uzorku, te su, u odnosu na stvarno dodane količine elemenata, određene pojedinačne iskoristivosti za svako mjerenje te prosječne iskoristivosti razvijene metode za svaki element. Rezultati su prikazani u tablicama 18, 19 i 20.

Tablica 18. Rezultati ispitivanja granice kvantifikacije za Li, V, Cr, Co, Ni, Cu, As, Se, Mo i Ru razvijenom metodom za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V u fosamprenavir kalciju ICP-MS tehnikom.

Litij					**Vanadij**				
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Iskoristivost / %	Prosječna iskoristivost metode / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Iskoristivost / %	Prosječna iskoristivost metode / %
1	5,02	5,13	89	91	*1*	0,95	1,03	95	103
2	5,18		92		*2*	1,00		100	
3	5,35		95		*3*	1,05		105	
4	4,95		88		*4*	1,06		106	
5	5,07		90		*5*	1,09		109	
6	5,19		92		*6*	1,03		103	
Krom					**Kobalt**				
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Iskoristivost / %	Prosječna iskoristivost metode / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Iskoristivost / %	Prosječna iskoristivost metode / %
1	112,33	116,42	99	103	*1*	0,65	0,66	102	103
2	114,65		101		*2*	0,68		109	
3	114,95		102		*3*	0,61		94	
4	120,09		106		*4*	0,67		106	
5	122,18		108		*5*	0,62		96	
6	114,30		101		*6*	0,71		114	
Nikal					**Bakar**				
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Iskoristivost / %	Prosječna iskoristivost metode / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Iskoristivost / %	Prosječna iskoristivost metode / %
1	8,67	8,69	96	97	*1*	29,98	30,36	99	100
2	8,69		97		*2*	30,75		102	
3	8,56		90		*3*	31,12		103	
4	8,73		99		*4*	29,64		98	
5	9,00		113		*5*	30,34		100	
6	8,50		87		*6*	30,35		100	
Arsen					**Selen**				
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Iskoristivost / %	Prosječna iskoristivost metode / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Iskoristivost / %	Prosječna iskoristivost metode / %
1	0,16	0,16	94	96	*1*	1,59	1,49	106	99
2	0,17		105		*2*	1,59		106	
3	0,16		94		*3*	1,49		99	
4	0,15		89		*4*	1,38		92	
5	0,16		95		*5*	1,50		100	
6	0,17		100		*6*	1,40		93	
Molibden					**Rutenij**				
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Iskoristivost / %	Prosječna iskoristivost metode / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Iskoristivost / %	Prosječna iskoristivost metode / %
1	35,44	35,79	102	103	*1*	1,02	1,06	102	106
2	36,78		106		*2*	1,07		107	
3	36,09		104		*3*	1,07		107	
4	33,85		96		*4*	1,06		105	
5	35,33		101		*5*	1,06		106	
6	37,26		108		*6*	1,07		107	

Tablica 19. Rezultati ispitivanja granice kvantifikacije za Rh, Pd, Ag, Cd, Sn, Sb, Ba, Ir, Pt i Au razvijenom metodom za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V u fosamprenavir kalciju ICP-MS tehnikom.

Rodij					**Paladij**				
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Iskoristivost / %	Prosječna iskoristivost metode / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Iskoristivost / %	Prosječna iskoristivost metode / %
1	1,04	1,07	104	107	*1*	1,18	1,16	109	108
2	1,07		107		*2*	1,17		108	
3	1,09		109		*3*	1,17		108	
4	1,06		106		*4*	1,15		106	
5	1,06		106		*5*	1,15		106	
6	1,07		107		*6*	1,16		108	
Srebro					**Kadmij**				
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Iskoristivost / %	Prosječna iskoristivost metode / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Iskoristivost / %	Prosječna iskoristivost metode / %
1	1,55	1,59	103	106	*1*	0,05	0,06	106	110
2	1,60		107		*2*	0,05		105	
3	1,62		108		*3*	0,06		109	
4	1,58		105		*4*	0,06		116	
5	1,59		106		*5*	0,06		115	
6	1,60		106		*6*	0,06		110	
Kositar					**Antimon**				
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Iskoristivost / %	Prosječna iskoristivost metode / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Iskoristivost / %	Prosječna iskoristivost metode / %
1	66,56	67,72	103	105	*1*	12,40	12,81	103	106
2	68,94		107		*2*	12,81		106	
3	68,72		106		*3*	13,00		108	
4	67,10		104		*4*	12,73		106	
5	67,24		104		*5*	12,84		107	
6	67,74		105		*6*	13,05		108	
Barij					**Iridij**				
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Iskoristivost / %	Prosječna iskoristivost metode / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Iskoristivost / %	Prosječna iskoristivost metode / %
1	14,95	15,43	104	107	*1*	0,98	0,97	98	97
2	15,48		108		*2*	0,99		99	
3	15,75		110		*3*	0,98		98	
4	15,11		105		*4*	0,95		95	
5	15,68		109		*5*	0,97		96	
6	15,60		108		*6*	0,98		98	
Platina					**Zlato**				
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Iskoristivost / %	Prosječna iskoristivost metode / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Iskoristivost / %	Prosječna iskoristivost metode / %
1	0,99	0,99	99	99	*1*	1,03	1,01	97	95
2	1,00		100		*2*	1,03		96	
3	1,00		99		*3*	1,01		95	
4	0,96		96		*4*	0,98		92	
5	0,99		99		*5*	1,00		93	
6	1,00		100		*6*	1,00		94	

Tablica 20. Rezultati ispitivanja granice kvantifikacije za Hg, Tl i Pb razvijenom metodom za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V u fosamprenavir kalciju ICP-MS tehnikom.

Živa					**Talij**				
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Iskoristivost / %	Prosječna iskoristivost metode / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Iskoristivost / %	Prosječna iskoristivost metode / %
1	0,36	0,30	114	92	*1*	0,07	0,07	83	83
2	0,29		91		*2*	0,07		85	
3	0,28		87		*3*	0,07		86	
4	0,29		90		*4*	0,07		81	
5	0,29		89		*5*	0,07		83	
6	0,27		84		*6*	0,07		83	

Olovo				
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Iskoristivost / %	Prosječna iskoristivost metode / %
1	0,06	0,06	96	97
2	0,06		100	
3	0,06		97	
4	0,06		98	
5	0,06		97	
6	0,06		94	

Razvijena metoda za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V u fosamprenavir kalciju ICP-MS tehnikom daje dobre rezultate za ispitivanu granicu kvantifikacije pri koncentracijama od 10 % granične dopuštene prema ICH Q3D za proizvode za oralnu primjenu za sva ispitivana elementarna onečišćenja.

Granice kvantifikacije za svaki ispitivani element, određene ovom metodom, zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti koji nalaže da iskoristivost mora biti u rasponu od 70 % do 150 %. Najniža prosječna iskoristivost metode dobivena je za talij, i ona iznosi 83 %, a najviša za kadmij za koji ona iznosi 110 %.

4.2.3. Točnost i specifičnost

Specifičnost ove metode određena je iz rezultata za ispitivanje točnosti.

Ispitivanje točnosti provelo se na 12 uzoraka, od kojih su prva tri pripremljena bez standardnog dodatka, a sljedeća tri niza sa po tri uzorka sa standardnim dodatkom na 30 %, 100 % i 150 % graničnih količina propisanih ICH Q3D smjernicama za proizvode za oralnu primjenu. Izmjerene koncentracije preračunate su u masene udjele za svaku pripremu i za svaki pojedini element i uspoređivane s pravom vrijednošću za odgovarajući standardni dodatak. Rezultati su za svaki element prikazani kao točnosti za svako pojedino mjerenje te kao prosječne točnosti ispitivane metode (tablice 21, 22, 23).

Tablica 21. Rezultati ispitivanja točnosti za Li, V, Cr, Co, Ni, Cu, As, Se razvijenom metodom za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V u fosamprenavir kalciju ICP-MS tehnikom.

Litij					**Vanadij**				
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Točnost / %	Prosječna točnost / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Točnost / %	Prosječna točnost / %
1	0,17		-		*1*	0,00		-	
2	0,08	0,11	-	-	*2*	0,00	0,00	-	-
3	0,07		-		*3*	0,00		-	
4	15,87		96		*4*	2,61		87	
5	15,64	15,64	94	94	*5*	2,61	2,57	87	86
6	15,41		93		*6*	2,49		83	
7	57,18		104		*7*	9,95		99	
8	57,43	57,55	104	104	*8*	10,14	10,06	101	101
9	58,04		105		*9*	10,10		101	
10	86,41		105		*10*	14,93		100	
11	84,56	85,55	102	104	*11*	14,79	14,86	99	99
12	85,68		104		*12*	14,87		99	
Krom					**Kobalt**				
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Točnost / %	Prosječna točnost / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Točnost / %	Prosječna točnost / %
1	2,93		-		*1*	0,13		-	
2	3,62	3,11	-	-	*2*	0,16	0,14	-	-
3	2,79		-		*3*	0,13		-	
4	341,84		103		*4*	2,03		126	
5	334,86	334,78	101	101	*5*	1,62	1,76	99	108
6	327,63		98		*6*	1,64		100	
7	1123,11		102		*7*	5,31		103	
8	1122,21	1125,84	102	102	*8*	5,24	5,28	102	103
9	1132,21		103		*9*	5,30		103	
10	1631,48		99		*10*	7,51		98	
11	1649,28	1635,09	100	99	*11*	7,58	7,54	99	99
12	1624,51		98		*12*	7,54		99	
Nikal					**Bakar**				
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Točnost / %	Prosječna točnost / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Točnost / %	Prosječna točnost / %
1	6,70		-		*1*	0,28		-	
2	7,79	6,75	-	-	*2*	0,29	0,25	-	-
3	5,76		-		*3*	0,20		-	
4	12,86		102		*4*	91,54		101	
5	12,63	12,85	98	102	*5*	91,88	91,34	102	101
6	13,06		105		*6*	90,61		100	
7	29,18		112		*7*	297,17		99	
8	28,93	28,92	111	111	*8*	294,58	297,56	98	99
9	28,64		109		*9*	300,94		100	
10	37,42		102		*10*	433,08		96	
11	36,54	37,17	99	101	*11*	440,16	434,37	98	96
12	37,53		103		*12*	429,88		95	
Arsen					**Selen**				
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Točnost / %	Prosječna točnost / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Točnost / %	Prosječna točnost / %
1	0,03		-		*1*	0,00		-	
2	0,01	0,02	-	-	*2*	0,01	0,00	-	-
3	0,01		-		*3*	0,00		-	
4	0,45		97		*4*	4,59		102	
5	0,46	0,45	99	97	*5*	4,90	4,68	109	104
6	0,44		94		*6*	4,56		101	
7	1,49		98		*7*	16,32		109	
8	1,60	1,55	106	102	*8*	15,71	16,34	105	109
9	1,56		103		*9*	16,99		113	
10	2,25		99		*10*	23,19		103	
11	2,24	2,25	99	99	*11*	23,62	23,64	105	105
12	2,25		99		*12*	24,10		107	

Tablica 22. Rezultati ispitivanja točnosti za Mo, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, Sn i Sb razvijenom metodom za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V u fosamprenavir kalciju ICP-MS tehnikom.

Molibden					**Rutenij**				
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Točnost / %	Prosječna točnost / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Točnost / %	Prosječna točnost / %
1	5,47		-		*1*	0,00		-	
2	4,87	4,90	-	-	*2*	0,00	0,00	-	-
3	4,36		-		*3*	0,00		-	
4	96,92		102		*4*	3,16		105	
5	99,48	98,64	105	104	*5*	3,09	3,10	103	103
6	99,51		105		*6*	3,07		102	
7	321,92		106		*7*	10,32		103	
8	320,45	320,06	105	105	*8*	10,35	10,36	103	104
9	317,81		104		*9*	10,41		104	
10	455,79		100		*10*	14,79		99	
11	461,22	458,15	101	101	*11*	14,99	14,90	100	99
12	457,44		101		*12*	14,92		99	
Rodij					**Paladij**				
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Točnost / %	Prosječna točnost / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Točnost / %	Prosječna točnost / %
1	0,00		-		*1*	0,09		-	
2	0,00	0,00	-	-	*2*	0,09	0,09	-	-
3	0,00		-		*3*	0,08		-	
4	3,18		106		*4*	3,20		104	
5	3,12	3,13	104	104	*5*	3,14	3,15	102	102
6	3,09		103		*6*	3,10		101	
7	10,39		104		*7*	10,31		102	
8	10,41	10,40	104	104	*8*	10,37	10,34	103	103
9	10,41		104		*9*	10,34		103	
10	14,71		98		*10*	14,78		98	
11	15,00	14,83	100	99	*11*	14,94	14,85	99	98
12	14,78		99		*12*	14,84		98	
Srebro					**Kadmij**				
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Točnost / %	Prosječna točnost / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Točnost / %	Prosječna točnost / %
1	0,01		-		*1*	0,00		-	
2	0,00	0,00	-	-	*2*	0,00	0,00	-	-
3	0,00		-		*3*	0,00		-	
4	4,43		98		*4*	0,17		112	
5	4,35	4,37	97	97	*5*	0,16	0,17	108	110
6	4,32		96		*6*	0,17		109	
7	14,41		96		*7*	0,55		110	
8	14,50	14,48	97	97	*8*	0,55	0,55	111	110
9	14,53		97		*9*	0,55		111	
10	20,76		92		*10*	0,80		107	
11	20,99	20,93	93	93	*11*	0,80	0,81	107	107
12	21,04		94		*12*	0,82		109	
Kositar					**Antimon**				
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Točnost / %	Prosječna točnost / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Točnost / %	Prosječna točnost / %
1	5,26		-		*1*	0,05		-	
2	4,81	4,89	-	-	*2*	0,04	0,05	-	-
3	4,61		-		*3*	0,04		-	
4	197,90		107		*4*	37,08		103	
5	194,20	194,60	105	105	*5*	36,38	36,57	101	101
6	191,70		104		*6*	36,26		101	
7	641,45		106		*7*	123,67		103	
8	646,60	642,30	107	106	*8*	122,49	123,42	102	103
9	638,85		106		*9*	124,09		103	
10	899,40		99		*10*	180,65		100	
11	920,66	910,57	102	101	*11*	184,81	182,95	103	102
12	911,65		101		*12*	183,40		102	

Tablica 23. Rezultati ispitivanja točnosti za Ba, Ir Pt, Au, Hg, Tl i Pb razvijenom metodom za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V u fosamprenavir kalciju ICP-MS tehnikom.

Barij

Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Točnost / %	Prosječna točnost / %
1	0,78		-	
2	0,24	0,42	-	-
3	0,22		-	
4	45,24		107	
5	44,84	44,84	106	106
6	44,44		105	
7	147,53		105	
8	150,48	148,86	107	106
9	148,57		106	
10	213,08		101	
11	216,14	214,82	103	102
12	215,22		102	

Iridij

Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Točnost / %	Prosječna točnost / %
1	0,00		-	
2	0,00	0,00	-	-
3	0,00		-	
4	2,93		98	
5	2,91	2,88	97	96
6	2,82		94	
7	9,87		99	
8	9,88	9,95	99	100
9	10,12		101	
10	14,60		97	
11	14,84	14,74	99	98
12	14,78		99	

Platina

Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Točnost / %	Prosječna točnost / %
1	0,00		-	
2	0,00	0,00	-	-
3	0,00		-	
4	2,94		98	
5	2,91	2,90	97	97
6	2,85		95	
7	9,90		99	
8	9,95	10,01	99	100
9	10,18		102	
10	14,62		97	
11	14,79	14,76	99	98
12	14,86		99	

Zlato

Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Točnost / %	Prosječna točnost / %
1	0,09		-	
2	0,05	0,06	-	-
3	0,04		-	
4	2,88		94	
5	2,92	2,87	95	94
6	2,83		92	
7	9,81		97	
8	9,95	9,99	99	99
9	10,22		102	
10	14,82		98	
11	14,96	14,95	99	99
12	15,06		100	

Živa

Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Točnost / %	Prosječna točnost / %
1	0,03		-	
2	0,02	0,02	-	-
3	0,01		-	
4	0,93		101	
5	0,91	0,91	99	99
6	0,88		96	
7	3,05		101	
8	3,06	3,07	101	102
9	3,11		103	
10	4,48		99	
11	4,55	4,53	101	100
12	4,56		101	

Talij

Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Točnost / %	Prosječna točnost / %
1	0,00		-	
2	0,00	0,00	-	-
3	0,00		-	
4	0,21		87	
5	0,21	0,21	89	88
6	0,21		87	
7	0,71		88	
8	0,72	0,72	90	90
9	0,73		92	
10	1,06		89	
11	1,08	1,08	90	90
12	1,08		90	

Olovo

Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Točnost / %	Prosječna točnost / %
1	0,01		-	
2	0,01	0,01	-	-
3	0,01		-	
4	0,17		108	
5	0,17	0,17	109	108
6	0,17		107	
7	0,59		117	
8	0,56	0,57	111	112
9	0,55		108	
10	0,77		101	
11	0,79	0,78	103	103
12	0,79		104	

Razvijena metoda za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V u fosamprenavir kalciju ICP-MS tehnikom daje dobre rezultate za ispitivanu točnosti pri koncentracijama od 30 %, 100 % i 150 % granične dopuštene prema ICH Q3D za proizvode za oralnu primjenu za sva ispitivana elementarna onečišćenja.

Točnosti za svaki ispitivani element, određene ovom metodom, na svakoj ispitnoj razini zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti prema kojem određena točnost mora biti u rasponu iskoristivosti od 70 % do 150 % u odnosu na pravu vrijednost standardnog dodatka. Najnižu iskoristivost za ispitivanu točnost pokazuje vanadij pri standardnom dodatku od 30 % granične dopuštene količine, i ona iznosi 86 %, a najvišu olovo pri standardnom dodatku od 100 % granične dopuštene količine, a iznosi 112 %.

Zadovoljavanjem kriterija prihvatljivosti rezultata ispitivanja točnosti, potvrđena je specifičnost metode za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V u fosamprenavir kalciju ICP-MS tehnikom za sve ispitivane elemente.

4.2.4. Preciznost

Preciznost ispitivane metode procijenjena je na dvije razine, kao ponovljivost i kao unutarlaboratorijska preciznost. Rezultati su prikazani kao relativna standardna odstupanja ponovljenih mjerenja i ukupno.

4.2.4.1. Ponovljivost

Ponovljivost je ispitana na temelju šest jednako priređenih uzoraka sa standardnim dodatkom svakog pojedinog ispitivanog elementa od 100 % granične propisane količine prema ICH Q3D smjernicama. Rezultati su prikazani kao relativno standardno odstupanje dobivenih vrijednosti, a prikazani su u tablicama 24 i 25.

Tablica 24. Rezultati ispitivanja ponovljivosti za Li, V, Cr, Co, Ni, Cu, As, Se, Mo, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd i Sn razvijenom metodom za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V u fosamprenavir kalciju ICP-MS tehnikom.

Litij				**Vanadij**				**Krom**			
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %
1	57,86	57,57	3	*1*	10,04	10,14	2	*1*	1077,47	1104,14	2
2	58,81			*2*	10,26			*2*	1105,40		
3	56,49			*3*	10,19			*3*	1104,92		
4	56,34			*4*	10,12			*4*	1097,49		
5	57,01			*5*	10,22			*5*	1132,08		
6	59,37			*6*	10,10			*6*	1107,50		
Kobalt				**Nikal**				**Bakar**			
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %
1	4,97	5,51	7	*1*	24,50	26,90	6	*1*	290,64	294,39	1
2	5,71			*2*	27,52			*2*	294,49		
3	6,01			*3*	26,06			*3*	288,17		
4	5,27			*4*	29,10			*4*	296,63		
5	5,80			*5*	28,07			*5*	299,83		
6	5,28			*6*	26,13			*6*	296,56		
Arsen				**Selen**				**Molibden**			
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %
1	1,52	1,53	1	*1*	15,67	15,50	3	*1*	304,72	317,56	2
2	1,54			*2*	15,26			*2*	316,66		
3	1,52			*3*	15,21			*3*	320,08		
4	1,52			*4*	14,79			*4*	317,05		
5	1,53			*5*	16,21			*5*	327,05		
6	1,53			*6*	15,89			*6*	319,79		
Rutenij				**Rodij**				**Paladij**			
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %
1	9,91	10,13	2	*1*	9,81	10,08	2	*1*	10,00	10,17	1
2	10,04			*2*	10,01			*2*	10,08		
3	10,12			*3*	10,01			*3*	10,11		
4	10,09			*4*	10,12			*4*	10,17		
5	10,33			*5*	10,27			*5*	10,39		
6	10,30			*6*	10,24			*6*	10,30		
Srebro				**Kadmij**				**Kositar**			
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %
1	14,95	15,29	2	*1*	0,50	0,52	2	*1*	611,24	625,05	1
2	15,18			*2*	0,52			*2*	625,43		
3	15,19			*3*	0,52			*3*	622,26		
4	15,31			*4*	0,52			*4*	624,85		
5	15,60			*5*	0,53			*5*	634,33		
6	15,53			*6*	0,53			*6*	632,17		

Tablica 25. Rezultati ispitivanja ponovljivosti za Sb, Ba, Ir, Pt, Au, Hg, Tl i Pb razvijenom metodom za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V u fosamprenavir kalciju ICP-MS tehnikom.

Antimon				**Barij**				**Iridij**			
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %
1	119,40	121,98	2	*1*	142,19	144,60	2	*1*	9,70	9,82	2
2	119,93			*2*	142,72			*2*	9,70		
3	120,72			*3*	143,01			*3*	9,65		
4	121,43			*4*	145,07			*4*	9,81		
5	124,90			*5*	147,36			*5*	10,09		
6	125,52			*6*	147,26			*6*	9,95		
Platina				**Zlato**				**Živa**			
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %
1	9,79	9,89	2	*1*	9,62	9,94	2	*1*	2,99	3,07	2
2	9,80			*2*	9,85			*2*	3,08		
3	9,78			*3*	9,87			*3*	3,05		
4	9,80			*4*	9,95			*4*	3,06		
5	10,11			*5*	10,24			*5*	3,14		
6	10,08			*6*	10,09			*6*	3,08		
Talij				**Olovo**							
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %				
1	0,69	0,71	2	*1*	0,50	0,51	2				
2	0,71			*2*	0,51						
3	0,71			*3*	0,51						
4	0,72			*4*	0,52						
5	0,74			*5*	0,53						
6	0,73			*6*	0,52						

Razvijena metoda za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V u fosamprenavir kalciju ICP-MS tehnikom daje dobre rezultate za ispitivanu ponovljivost pri koncentraciji od 100 % granične dopuštene prema ICH Q3D za proizvode za oralnu primjenu za sva ispitivana elementarna onečišćenja.

Ponovljivosti za svaki ispitivani element, određene ovom metodom, zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti prema kojem određeno relativno standardno odstupanje (RSD) između mjerenja mora biti manje ili jednako 20 %. Najviše relativno standardno odstupanje između mjerenja za provedeno ispitivanje ponovljivosti pokazuje nikal, i ono iznosi 6 %. Međutim, testom točnosti za uzorke pripremljene bez standardnog dodatka, primjećuje se da uzorak sam sadrži određenu količinu nikla, a ona prosječno iznosi 6,75 ppm za 3 ponovljena mjerenja bez standardnog dodatka kod ispitivanju točnosti (vidi tablicu 21). Taj sadržaj nikla, koji možda nije potpuno

homogeno raspoređen u uzorku, može biti uzrok uočenog odstupanja između mjerenja provedenih za ispitivanje ponovljivosti.

4.2.4.2. Unutarlaboratorijska preciznost

Unutarlaboratorijska preciznost je ispitana na temelju uzoraka priređenih za ispitivanje ponovljivosti. Ti su se uzorci ponovno analizirali na analogan način drugi dan na ekvivalentnom instrumentu. Rezultati su prikazani kao relativno standardno odstupanje dobivenih vrijednosti, a prikazani su u tablicama 26 i 27.

Tablica 26. Rezultati ispitivanja unutarlaboratorijske preciznosti za Li, V, Cr, Co, Ni, Cu, As, Se, Mo, Ru, Rh i Pd razvijenom metodom za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V u fosamprenavir kalciju ICP-MS tehnikom.

Litij				**Vanadij**				**Krom**			
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %
1	48,57	51,52	6	*1*	9,83	10,10	2	*1*	1107,90	1126,67	2
2	52,27			*2*	10,02			*2*	1133,70		
3	57,21			*3*	10,00			*3*	1094,71		
4	50,38			*4*	10,29			*4*	1134,91		
5	48,44			*5*	10,31			*5*	1154,39		
6	52,26			*6*	10,15			*6*	1134,40		
Kobalt				**Nikal**				**Bakar**			
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %
1	5,02	5,20	2	*1*	24,59	27,09	8	*1*	303,92	302,45	2
2	5,14			*2*	26,76			*2*	303,02		
3	5,11			*3*	25,05			*3*	294,05		
4	5,27			*4*	30,13			*4*	302,18		
5	5,33			*5*	28,57			*5*	310,68		
6	5,31			*6*	27,43			*6*	300,87		
Arsen				**Selen**				**Molibden**			
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %
1	1,52	1,56	3	*1*	15,18	14,63	3	*1*	312,23	313,54	2
2	1,54			*2*	14,46			*2*	315,92		
3	1,54			*3*	14,53			*3*	303,92		
4	1,61			*4*	14,19			*4*	317,60		
5	1,55			*5*	14,14			*5*	316,34		
6	1,62			*6*	15,29			*6*	315,21		
Rutenij				**Rodij**				**Paladij**			
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %
1	9,96	9,95	1	*1*	9,75	9,81	2	*1*	9,94	9,95	1
2	10,04			*2*	9,94			*2*	10,08		
3	9,71			*3*	9,48			*3*	9,73		
4	10,01			*4*	9,91			*4*	9,96		
5	10,07			*5*	10,01			*5*	10,12		
6	9,93			*6*	9,77			*6*	9,88		

Tablica 27. Rezultati ispitivanja unutarlaboratorijke preciznosti za Ag, Cd, Sn, Sb, Ba, Ir, Pt, Au, Hg, Tl i Pb metodom za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V u fosamprenavir kalciju ICP-MS tehnikom.

Srebro				**Kadmij**				**Kositar**			
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %
1	14,75	14,91	2	*1*	0,52	0,53	2	*1*	602,69	626,06	2
2	15,08			*2*	0,55			*2*	628,75		
3	14,56			*3*	0,52			*3*	620,51		
4	15,02			*4*	0,53			*4*	635,39		
5	15,24			*5*	0,54			*5*	639,52		
6	14,81			*6*	0,53			*6*	629,51		
Antimon				**Barij**				**Iridij**			
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %
1	121,59	126,32	2	*1*	139,53	141,76	1	*1*	9,73	9,69	1
2	127,19			*2*	143,23			*2*	9,68		
3	124,93			*3*	140,12			*3*	9,55		
4	126,97			*4*	140,48			*4*	9,62		
5	128,59			*5*	144,73			*5*	9,84		
6	128,64			*6*	142,50			*6*	9,73		
Platina				**Zlato**				**Živa**			
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %
1	9,67	9,68	1	*1*	9,52	9,58	1	*1*	2,92	2,91	1
2	9,67			*2*	9,51			*2*	2,91		
3	9,52			*3*	9,41			*3*	2,86		
4	9,65			*4*	9,60			*4*	2,90		
5	9,86			*5*	9,75			*5*	2,94		
6	9,70			*6*	9,70			*6*	2,93		
Talij				**Olovo**							
Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %	Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %				
1	0,67	0,68	1	*1*	0,49	0,48	1				
2	0,67			*2*	0,47						
3	0,66			*3*	0,47						
4	0,68			*4*	0,48						
5	0,68			*5*	0,48						
6	0,68			*6*	0,47						

Razvijena metoda za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V u fosamprenavir kalciju ICP-MS tehnikom daje dobre rezultate za ispitivanu unutarlaboratorijsku preciznost pri koncentraciji od 100 % granične dopuštene prema ICH Q3D smjernicama za proizvode za oralnu primjenu za sva ispitivana elementarna onečišćenja.

Unutarlaboratorijske preciznosti za svaki ispitivani element, određene ovom metodom, zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti prema kojem odgovarajuće relativno standardno

odstupanje (RSD) između mjerenja mora biti manje ili jednako 20 %. Najviše relativno standardno odstupanje između mjerenja za provedeno ispitivanje unutarlaboratorijske preciznosti ponovno pokazuje nikal, a ovaj put ono iznosi 8 %.

Ukupni rezultati preciznosti izražavaju se kao relativna standardna odstupanja vrijednosti dobivenih ispitivanjem ponovljivosti od onih dobivenih ispitivanjem unutarlaboratorijske preciznosti. Rezultati su prikazani u tablici 28 i za svaki ispitivani element zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti prema kojem relativno standardno odstupanje između vrijednosti dobivenih ispitivanjem ponovljivosti i vrijednosti dobivenih ispitivanjem unutarlaboratorijske preciznosti mora biti manje ili jednako 25 %. Uz najmanju preciznost, određeni su litij i nikal, uz pripadajuće relativno standardno odstupanje koje iznosi 7 % za oba navedena.

Tablica 28. Ukupni rezultati ispitivanja preciznosti razvijenom metodom za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V u fosamprenavir kalciju.

Element	**Li**	**V**	**Cr**	**Co**	**Ni**	**Cu**	**As**	**Se**
Prosječna udio u uzorku / ppm	54,55	10,12	1115,40	5,35	26,99	298,42	1,55	15,07
RSD / %	7	2	2	6	7	2	2	4
Element	**Mo**	**Ru**	**Rh**	**Pd**	**Ag**	**Cd**	**Sn**	**Sb**
Prosječna udio u uzorku / ppm	315,55	10,04	9,94	10,06	15,10	0,53	626,06	126,32
RSD / %	2	2	2	2	2	2	2	2
Element	**Ba**	**Ir**	**Pt**	**Au**	**Hg**	**Tl**	**Pb**	
Prosječna udio u uzorku / ppm	143,18	9,75	9,68	9,58	2,99	0,69	0,50	
RSD / %	2	2	2	1	3	3	4	

4.2.5. Otpornost

Otpornost razvijene metode se određivala malim promjenama u temperaturi mikrovalne digestije uzoraka i u koncentracijama kiselina, kako je opisano u odjeljku 3.5.5. Svi su uzorci bili otopljeni, stoga su analizirani prema instrumentalnim uvjetima propisanim za razvijenu metodu. Rezultati, prikazani u obliku relativne razlike između referentnog mjerenja (korišteni su rezultati dobiveni mjerenjem ponovljivosti, vidi odjeljak 4.2.4.1.) i mjerenja uz pripremu s pripadajućom promjenom, prikazani su u tablici 29. Stupac 1 opisuje relativnu razliku između rezultata referentnog mjerenja i rezultata dobivenih analizom uzoraka pripremljenih uz smanjenu temperaturu mikrovalne digestije za 10 °C, stupac 2 uz povećanu temperaturu mikrovalne digestije za 10 °C, stupac 3 uz korištenje nitratne kiseline smanjene koncentracije, a stupac 4 uz korištenje perkloratne kiseline smanjene koncentracije.

Tablica 29. Rezultati ispitivanja otpornosti razvijene metode za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V u fosamprenavir kalciju ICP-MS tehnikom.

	1	2	3	4
Li	8,32%	1,32%	1,54%	0,78%
V	1,22%	0,87%	1,53%	0,78%
Cr	0,97%	0,50%	1,92%	0,86%
Co	2,00%	5,15%	5,07%	6,71%
Ni	5,36%	8,38%	3,46%	2,45%
Cu	2,99%	1,17%	1,60%	0,31%
As	2,19%	1,22%	0,83%	0,76%
Se	2,02%	4,20%	0,06%	1,46%
Mo	0,51%	2,05%	0,07%	0,90%
Ru	1,49%	1,06%	1,73%	1,79%
Rh	2,09%	1,13%	0,80%	0,69%
Pd	2,25%	0,93%	1,17%	1,81%
Ag	4,98%	4,94%	3,32%	3,02%
Cd	4,02%	6,86%	7,94%	8,50%
Sn	0,76%	1,10%	1,25%	1,82%
Sb	2,78%	0,35%	5,28%	1,62%
Ba	0,31%	0,97%	2,15%	2,76%
Ir	3,02%	2,93%	2,99%	2,61%
Pt	0,54%	1,22%	0,74%	1,20%
Au	1,15%	4,48%	0,38%	1,57%
Hg	1,02%	1,92%	0,04%	1,47%
Tl	1,49%	4,47%	1,27%	0,86%
Pb	0,10%	0,24%	1,25%	1,07%

Rezultati dobiveni ispitivanjem otpornosti zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti koji zahtjeva da relativne razlike rezultata između mjerenja uzoraka s promijenjenom pripremom i mjerenja uzoraka pripremljenih pri propisanim uvjetima budu manje ili jednake od 10 %. Svaka ispitana promjena daje za svaki ispitivani element rezultate koji zadovoljavaju taj kriterij te se razvijena metoda za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V u fosamprenavir kalciju smatra otpornom, odnosno robusnom.

4.3. Validacija ICP-MS metode za određivanje osmija u fosamprenavir kalciju

Da bi se provela validacija razvijene metode za određivanje osmija u fosamprenavir kalciju, uzorci i standardne otopine pripravljale su se načinima opisanim u odjeljku 3.4., ali se od certificiranih radnih standarada koristio samo osmij. Koristi se samo TSO2, koja sadrži isključivo propisani dodatak osmija. Također, kao otopina za razrjeđivanje koristi se 0,01 mol/L otopina tiouree u 2,5 % V/V HCl.

Kriteriji prihvatljivosti koje je nužno zadovoljiti kako bi rezultati dobiveni ispitivanjem izvedbenih značajki razvijene metode bili prihvatljivi i kako bi se razvijena metoda mogla validirati, prikazani su u tablici 30.

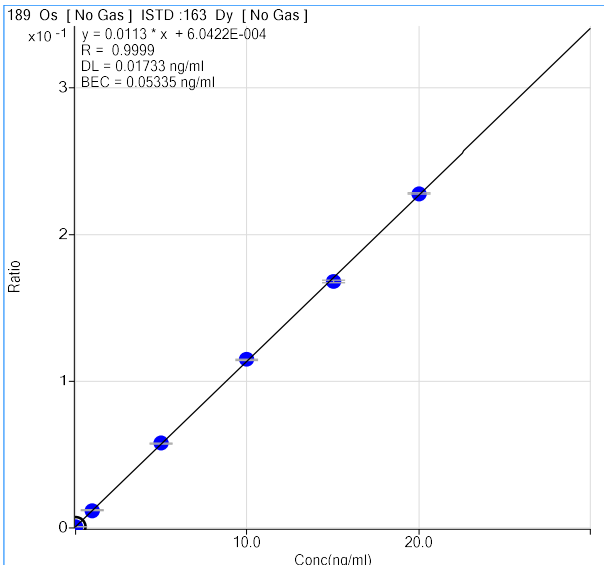
Tablica 30. Kriteriji prihvatljivosti metode.

Parametar	Kriterij prihvatljivosti
Specifičnost	
Iskorištenje	70 % - 150 %
Linearnost	
Korelacijski koeficijent (*R*)	≥ 0.99
Granica kvantifikacije	
Vrijednost	10 % PDE
Iskorištenje	70 % - 150 %
Točnost	
Razina 1 (30 %) – Iskorištenje	70 % -150 %
Razina 2 (100 %) – Iskorištenje	
Razina 3 (150 %)- Iskorištenje	
Preciznost	
Ponovljivost – RSD	≤ 20 %
Unutarlaboratorijska preciznost – RSD	≤ 20 %
Ukupno - RSD	≤ 25 %
Otpornost	
Razlika	≤ 10 %

4.3.1. Linearnost

Ispitivanjem linearnosti dobiveni su rezultati u obliku relativnog omjera odziva osmija i internog standarda disprozija, za mjerenu slijepu standardnu otopinu, kojoj se pridružuje vrijednost koncentracije 0 ng/mL za svaki analizirani element, te za radne standardne otopine pripadajućih koncentracija osmija prikazanih u tablici 9.

Rezultati su statistički obrađeni automatski u programskom korisničkom sučelju instrumenta, MassHunter, te su prikazani u obliku pravca čija vrijednost korelacijskog faktora upućuje na linearnost rezultata. Također, uz grafički prikaz pravca, njegovu jednadžbu i korelacijski faktor, prikazani su granica detekcije te BEC za osmij određivan razvijenom metodom (slika 8).



Slika 8. Rezultati ispitivanja linearnosti za osmij razvijenom metodom za određivanje Os u fosamprenavir kalciju ICP-MS tehnikom.

Rezultati ispitivanja linearnosti za određivanje osmija u fosamprenavir kalciju razvijenom metodom su linearni i zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti koji za linearnost glasi da korelacijski faktor mora biti veći ili jednak 0,99.

4.3.2. Granica kvantifikacije

Granica kvantifikacije određivana je u šest uzoraka sa standardnim dodatkom koncentracije od 1 ng/mL osmija koja odgovara 10 % granične količine propisane ICH Q3D smjernicama za proizvode za oralnu primjenu. Koncentracije dobivene na uređaju preračunate su u masene udjele te su, u odnosu na stvarno dodane količine osmija, određene pojedinačne iskoristivosti za svako mjerenje te prosječne iskoristivosti razvijene metode. Rezultati su prikazani u tablici 31.

Tablica 31. Rezultati ispitivanja granice kvantifikacije za osmij razvijenom metodom za određivanje osmija u fosamprenavir kalciju.

Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Iskoristivost / %	Prosječna iskoristivost metode / %
1	0,90	0,90	90	89
2	0,89		88	
3	0,90		89	
4	0,90		89	
5	0,92		91	
6	0,89		89	

Na temelju rezultata ispitivanja granice kvantifikacije osmija pri koncentraciji od 1 ng/mL utvrđeno je da je zadovoljen kriterij prihvatljivosti koji nalaže da prosječna iskoristivost metode za granicu kvantifikacije mora biti u rasponu od 70 % do 150 %.

4.3.3. Točnost i specifičnost

Specifičnost ove metode određena je iz rezultata za ispitivanje točnosti.

Ispitivanje točnosti provelo se na 12 uzoraka, od kojih su prva tri pripremljena bez standardnog dodatka, a sljedeća tri niza sa po tri uzorka sa standardnim dodatkom na 30 % (3 ng/mL) , 100 % (10 ng/mL) i 150 % (15 ng/mL) granične vrijednosti osmija propisane ICH Q3D smjernicama za proizvode za oralnu primjenu. Izmjerene koncentracije preračunate su u masene udjele za svaku pripremu i uspoređivane s pravom vrijednošću za odgovarajući standardni dodatak. Rezultati su prikazani kao točnosti za svako pojedino mjerenje te kao prosječna točnost ispitivane metode u tablici 32.

Tablica 32. Rezultati ispitivanja točnosti određivanja osmija razvijenom metodom.

Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	Točnost / %	Prosječna točnost / %
1	0,01		-	
2	0,00	0,01	-	-
3	0,01		-	
4	2,86		95	
5	2,76	2,79	92	93
6	2,75		91	
7	9,01		90	
8	8,99	8,97	90	90
9	8,90		89	
10	13,65		91	
11	13,37	13,59	89	91
12	13,75		92	

Razvijena metoda za određivanje osmija u fosamprenavir kalciju daje dobre rezultate za ispitivanu točnosti pri koncentracijama od 3 ng/mL, 10 ng/mL i 15 ng/mL. Na svakoj ispitnoj razini pojedinačne, kao i prosječne točnosti određene ovom metodom zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti prema kojem određena točnost mora biti u rasponu iskoristivosti od 70 % do 150 % u odnosu na pravu vrijednost standardnog dodatka.

Zadovoljavanjem kriterija prihvatljivosti rezultata ispitivanja točnosti, potvrđena je specifičnost metode za određivanje osmija u fosamprenavir kalciju.

4.3.4. Preciznost

Preciznost ispitivane metode procijenjena je na dvije razine, kao ponovljivost i kao unutarlaboratorijska preciznost. Rezultati su prikazani kao relativna standardna odstupanja ponovljenih mjerenja i ukupno.

4.3.4.1. Ponovljivost

Ponovljivost je ispitana na temelju šest jednako priređenih uzoraka sa standardnim dodatkom osmija na 100 % (10 ng/mL) granične propisane količine prema ICH Q3D smjernicama. Rezultati su prikazani kao relativno standardno odstupanje dobivenih vrijednosti (tablica 33).

Tablica 33. Rezultati ispitivanja ponovljivosti razvijene metode za određivanje osmija u fosamprenavir kalciju.

Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %
1	9,08	9,05	1
2	9,07		
3	9,11		
4	9,07		
5	9,02		
6	8,97		

Razvijena metoda za određivanje osmija u fosamprenavir kalciju daje dobre rezultate za ispitivanu ponovljivost pri koncentraciji od 10 ng/mL i zadovoljava kriterij prihvatljivosti prema kojem relativno standardno odstupanje (RSD) između mjerenja mora biti manje ili jednako 20 % s određenom RSD vrijednošću koja iznosi 1 %.

4.3.4.2. Unutarlaboratorijska preciznost

Unutarlaboratorijska preciznost je ispitana na temelju uzoraka priređenih za ispitivanje ponovljivosti. Ti su se uzorci ponovno analizirali na analogan način drugi dan na ekvivalentnom instrumentu. Rezultati ispitivanja unutarlaboratorijske preciznosti prikazani su u tablici 34, a konačan se rezultat prikazuje kao relativno standardno odstupanje izmjerenih vrijednosti.

Tablica 34. Rezultati ispitivanja unutarlaboratorijske preciznosti razvijene metode za određivanje osmija u fosamprenavir kalciju.

Uzorak br.	Izračunati udio u uzorku / ppm	Prosječni udio u uzorku / ppm	*RSD* / %
1	9,06	8,94	2
2	8,80		
3	9,22		
4	8,77		
5	8,86		
6	8,93		

Razvijena metoda za određivanje osmija u fosamprenavir kalciju daje dobre rezultate za ispitivanu unutarlaboratorijsku preciznost pri koncentraciji od 10 ng/mL, a određeno relativno standardno odstupanje (RSD), koja iznosi 2 %, zadovoljava kriterij prihvatljivosti za unutaraboratorijsku preciznost prema kojem relativno standardno odstupanje (RSD) između mjerenja mora biti manje ili jednako 20 %.

Ukupni rezultat ispitivanja preciznosti izražava se kao relativno standardno odstupanje vrijednosti dobivenih ispitivanjem ponovljivosti od onih dobivenih ispitivanjem unutarlaboratorijske preciznosti i ono iznosi 1 %, što zadovoljava kriterij prihvatljivosti za preciznost koji nalaže da mora biti manji ili jednak 25 %.

4.3.5. Otpornost

Otpornost razvijene metode se određivala malim promjenama u temperaturi mikrovalne digestije uzoraka i u koncentracijama kiselina, kako je opisano u odjeljku 3.5.5. Svi su uzorci bili otopljeni, stoga su analizirani prema instrumentalnim uvjetima propisanim za razvijenu metodu. Rezultati, prikazani u obliku relativne razlike između referentnog mjerenja (korišteni su rezultati dobiveni mjerenjem ponovljivosti, vidi odjeljak 4.3.4.1.) i mjerenja uz pripremu s pripadajućom promjenom, prikazani su u tablici 35.

Tablica 35. Rezultati ispitivanja otpornosti razvijene metode za određivanje osmija u fosamprenavir kalciju.

Promjena	**Relativna razlika**
Temperatura mikrovalne digestije - 200 °C	5,26 %
Temperatura mikrovalne digestije - 220 °C	9,48 %
Smanjena koncentracija nitratne kiseline	3,60 %
Smanjena koncentracija perkloratne kiseline	0,43 %

Rezultati dobiveni ispitivanjem otpornosti zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti koji zahtjeva da relativne razlike rezultata između mjerenja uzoraka s promijenjenom pripremom i mjerenja uzoraka pripremljenih pri propisanim uvjetima budu manje ili jednake od 10 %. Svaka ispitana promjena daje rezultate koji zadovoljavaju taj kriterij te se razvijena metoda za određivanje osmija u fosamprenavir kalciju smatra otpornom, odnosno robusnom.

Mikrovalna digestija pri povišenoj temperaturi pokazuje se kao kritičan parametar u pripremi uzorka za analizu osmija razvijenom metodom. To je razumljivo i očekivano obzirom na hlapivost osmijevog tetraoksida koji nastaje u doticaju s oksidirajućom nitratnom kiselinom. Stoga je svakako bitno posvetiti pažnju stabilnosti rada mikrovalnog reaktora. Slično se može primijetiti kod upotrebe razrijeđene nitratne kiseline, gdje je prikazana relativna razlika posljedica povećanog iskorištenja u odnosu na referentno mjerenje. Bolja iskorištenja općenito se dobivaju provođenjem mikrovalne digestije pri nižim temperaturama i korištenjem kvarcnih kiveta manjeg volumena.

5. ZAKLJUČCI

Elementarna onečišćenja u farmaceutskim proizvodima moraju se kontrolirati prikladnim metodama kako bi se osigurala kvaliteta proizvoda i njegovo sigurno korištenje. Prikladna tehnika pokazala se ICP-MS zbog svojih karakteristika brze i multielementne analize te niskih granica detekcije neophodnim za određivanje elemenata u tragovima. Stoga su razvijene dvije metode za određivanje elementarnih onečišćenja u fosamprenavir kalciju upravo tom tehnikom.

Na temelju provedenih eksperimenata, može se zaključiti sljedeće:

1. Priprema uzorka kritičan je parametar u analizi elementarnih onečišćenja ICP-MS tehnikom. Nužna je pažljiva priprema i korištenje opreme, kemikalija, reagensa i certificiranih referentnih standarada visoke kvalitete i čistoće kako bi se spriječilo eventualno uvođenje kontaminacija u uzorak pripravljan za analizu. Također je potrebno voditi računa o svim postupcima (vaganje, dodavanje reagensa, mikrovalna digestija, nadopunjavanje) kojima bi moglo doći do gubitka analita na bilo koji način. Potrebno je striktno se pridržavati propisanih procedura za svaki korak kako bi se osigurali kvalitetni i pouzdani rezultati.
2. Prisutne interferencije moraju se svesti na minimum i to uporabom kolizijskog plina i odabirom pogodnih izotopa analita, a prema potrebi i uvođenjem dodatnih postupaka kojima se uklanjaju interferencije prisutne u matrici uzorka.
3. Osmij, koji u prisutnosti oksidirajuće nitratne kiseline daje vrlo hlapiv i otrovan osmijev tretraoksid, može se stabilizirati kompleksiranjem s tioureom u otopini klorovodične kiseline. Na taj se način smanjuje gubitak osmija, te se postižu višestruko poboljšani rezultati u smislu iskoristivosti, točnosti i preciznosti.
4. Razvijena metoda za kvantitativno određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V u fosamprenavir kalciju ICP-MS tehnikom validirana je ispitivanjem njenih glavnih izvedbenih značajki – linearnosti, granice kvantifikacije, selektivnosti, točnosti, preciznosti (koja je uključila ponovljivost i unutarlaboratorijsku preciznost) te otpornosti. Svaka je od navedenih izvedbenih značajki zadovoljila kriterij prihvatljivosti te je stoga zaključeno da je metoda prikladna za određivanje Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl i V u fosamprenavir kalciju ICP-MS tehnikom. Validacijskim postupkom potvrđeno je da se razvijenom metodom dobivaju specifični, točni i precizni rezultati unutar metodom definiranog radnog područja za svaki određivani element.

5. Razvijena metoda za kvantitativno određivanje osmija u fosamprenavir kalciju ICP-MS tehnikom validirana je ispitivanjem njenih glavnih izvedbenih značajki – linearnosti, granice kvantifikacije, selektivnosti, točnosti, preciznosti (koja je uključila ponovljivost i unutarlaboratorijsku preciznost) te otpornosti. Svaka je od navedenih izvedbenih značajki zadovoljila kriterij prihvatljivosti te je stoga zaključeno da je metoda prikladna za određivanje osmija u fosamprenavir kalciju ICP-MS tehnikom, te da se njome dobivaju specifični, točni i precizni rezultati unutar radnog područja metode u rasponu koncentracija osmija između 1 ng/mL i 20 ng/mL.

6. LITERATURA

1. ICH Harmonised Guideline, Guideline for Elemental Impurities, Q3D, 2014.
2. Qiu, F., Norwood, L.D.: Identification of Pharmaceutical Impurities, Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies 30 (2007) 877-935
3. European Medicines Agency: Telzir: EPAR – Scientific discussion, EMEA 2005.
4. Rama Rao, N, Mani Kiran, S. S., Prasanthi, N. L: Pharmaceutical Impurities: An Overview, Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research 44 (2010)
5. Pilaniya, K., Chandrawanshi, H. K., Pilaniya, U., Manchandani, P., Jain, P., Singh, N.: Recent trends in the impurity profile of pharmaceuticals, Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research 1 (2010) 302-310
6. Second supplement to USP37– NF32*:* General Chapter <233> "Elemental Impurities in Pharmaceutical Materials – Procedures", United StatesPharmacopeial Convention, Rockville, Maryland*,* 2014.
7. Second supplement to USP37– NF32*:* General Chapter <231> "Heavy Metals Test", United States Pharmacopeial Convention, Rockville, Maryland *,* 2014
8. Marczenko, Z., & Balcerzak, M. (2000). Ruthenium and osmium. Separation, Preconcentration and Spectrophotometry in Inorganic Analysis, 365–374
9. Sauerbrunn, R. D., & Sandell, E. B.: The Reaction of Osmium Tetroxide with Thiourea, Journal of the American Chemical Society 75 (1953) 3554–3556
10. Second supplement to USP37– NF32: General chapter <2232> "Elemental Contamination in Dietary Supplement", United States Pharmacopeial Convention, Rockville, Maryland, 2014 .
11. Second supplement to USP37– NF32*:* General Chapter <232> "Elemental Impurities in Pharmaceutical Materials – Limits", United States Pharmacopeial Convention, Rockville, Maryland, 2014.
12. Wang, T., Wu, J., Hartman, R., Jia, X., Egan, S. R.: A multi-element ICP-MS survey method as an alternative to the heavy metals limit test for pharmaceutical materials, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 23(2000) 867–890
13. J.A. Bittencourt: Fundamentals of Plasma Physics, 3. izdanje, Springer, New York, 2004.
14. Ohls, K., & Bogdain, B.: History of inductively coupled plasma atomic emission spectral analysis: from the beginning up to its coupling with mass spectrometry, Journal of Analytical Atomic Spectrometry 31(2016) 22–31

15. S. J. Hill: Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications; Plymouth, UK, 2007.
16. R. Thomas: Practical Guide to ICP-MS: a tutorial for beginners; 3. izadnje, CRC Press, 2013.
17. R. Thomas: A Beginner's Guide to ICP-MS, Spectroscopy 17 (2002) 42
18. Ammann, A. A., Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): A Versatile Tool, Journal of Mass Spectrometry, 42 (2007) 419–427
19. Montaser, A., Golightly, D. W, Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry, VCH Publishers, New York, 1992.
20. Bulska, E., & Wagner, B. (2016). Quantitative aspects of inductively coupled plasma mass spectrometry. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 374(2079), 20150369.
21. Agilent Technologies, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: General Article
22. Agilent Technologies, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Basic components od ICP-MS
23. Tanner, S. D., Baranov, V. I., & Bandura, D. R. (2002). Reaction cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 57(9), 1361–1452
24. Jarvis, I., Jarvis, K. E.: Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry in exploration geochemistry, Journal of Geochemical Exploration 44 (1992) 139–200
25. International Conference on Harmonisation, Harmonized Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures, Text and Methodology, Q2(R1), 2005.
26. Bièvre, P.D., Günzler, H.: Validation in Chemical Measurement, Springer, Germany, 2005.
27. Swartz, M. E., Krull, I. S.: Handbok of Analytical Method Validation, Taylor and Francis, 2006.
28. Second supplement to USP37– NF32: General Chapter <1225> “Validation of Compendial Procedures”, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, Maryland, 2014.
29. Second supplement to USP37– NF32: General Chapter <730> “Guidelines on Plasma Spectrochemistry”, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, Maryland, 2014.

30. Machado, R. C., Amaral, C. D. B., Schiavo, D., Nóbrega, J. A., & Nogueira, A. R. A., Complex samples and spectral interferences in ICP-MS: Evaluation of tandem mass spectrometry for interference-free determination of cadmium, tin and platinum group elements, Microchemical Journal 130 (2017) 271–275
31. Lum, T.-S., & Sze-Yin Leung, K., Strategies to overcome spectral interference in ICP-MS detection, Journal of Analytical Atomic Spectrometry 31 (2016) 1078–1088
32. Reducing the Effects of Interferences in Quadrupole ICP-MS na: http://www.spectroscopyonline.com/reducing-effects-interferences-quadrupole-icp-ms?id=&sk=&date=&%0A%09%09%09&pageID=2, pristup: lipanj 2019.

ŽIVOTOPIS

Maja Halužan [redacted] Po završetku osnovne škole upisuje XVIII. gimnaziju u Zagrebu. Nakon završene srednje škole, 2012. godine upisuje preddiplomski studij primijenjene kemije na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom akademske godine 2016/2017 izrađuje rad pod nazivom Određivanje ekotoksičnosti farmaceutika u vodi koji dobiva Rektorovu nagradu u kategoriji timski znanstveni i umjetnički rad.

U rujnu 2017. godine obranila je završni rad na temu „Ispitivanje toksičnosti kemoterapeutika u vodi bakterijama *Vibrio Fisheri*“ pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Ašperger. Potom upisuje diplomski studij primijenjene kemije Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu.

Tijekom čitavog studija radi preko Studentskog servisa, najprije u poslovima van struke, a posljednje tri godine u ICP laboratoriju u sklopu Pliva, TAPI R&D, Analitika.