

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**Aplikace technik atomové spektroskopie pro kontrolu kvality farmaceutické výroby**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:

Michael Ručka

Studijní obor:

Chemie

Vedoucí práce:

RNDr. Tomáš Pluháček, Ph.D.

2018 Olomouc

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora: Michael Ručka

Název práce: Aplikace technik atomové spektroskopie pro kontrolu kvality farmaceutické výroby

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra analytické chemie

Vedoucí práce: RNDr. Tomáš Pluháček, Ph.D.

Rok odevzdání práce: 2018

Anotace:

Tato bakalářská práce se zabývá aplikací laserové ablace ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (LA-ICP-MS) pro stanovení prvkových nečistot ve farmaceutických produktech. V teoretické části jsou popsány nově upravené kapitoly amerického lékopisu „<232> *Elemental Impurities – Limits*“ a „<233> *Elemental Impurities – Procedures*“, princip a instrumentace hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem a laserové ablace. Součástí je rešerše shrnující využití různých technik atomové spektrometrie pro kontrolu kvality farmaceutické výroby.

Experimentální část uvádí vývoj a validaci LA-ICP-MS metody pro stanovení prvkových nečistot (Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Th, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt) v orálně podávaných farmaceutických produktech s doporučenou denní dávkou nepřesahující 2,0 g. Validace metody zahrnovala následující validační parametry: linearita, mez stanovitelnosti, správnost, přesnost, specifická, robustnost a rozsah. Následně byla validovaná metoda úspěšně aplikována pro stanovení prvkových nečistot v 9 účinných farmaceutických substancích, 3 vstupních surovinách a 2 finálních farmaceutické produktech.

Klíčová slova: hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, laserová ablace, prvkové nečistoty

Počet stran: 69

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

**Bibliographical identification:**

Author's first name and surname: Michael Ručka

Title: The application of atomic spectrometry in the quality control of pharmaceutical production

Type of thesis: Bachelor's

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: RNDr. Tomáš Pluháček, Ph.D.

The year of submission: 2018

Annotation:

The objective of this bachelor thesis is application of laser ablation in connection with inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) for the monitoring of elemental impurities in pharmaceutical products. In the theoretical part the newly edited capitols of American pharmacopeia „<232> *Elemental Impurities – Limits*“ and „<233> *Elemental Impurities – Procedures*“ are discussed in theoretical part together with the principle and the instrumentation of inductively coupled plasma mass spectrometry and laser ablation. The last chapter of the theoretical part covers the utilization of atomic spectrometry techniques in the quality control of pharmaceutical production.

The experimental part describes the development and the validation of LA-ICP-MS method for the determination of elemental impurities (Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Th, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt) in orally administered drug products with a daily intake not more than 2.0 g. The LA-ICP-MS method was validated in terms of linearity, limit of quantification, accuracy, precision, specificity, robustness, and range. Finally, the LA-ICP-MS method was successfully applied on the elemental impurities screening in 9 active pharmaceutical substances, 3 raw materials, and 2 final pharmaceutical products.

Keywords: inductively coupled plasma mass spectrometry, laser ablation, elemental impurities

Number of pages: 69

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně, a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci 02.05.2018

.....

Podpis

## Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Tomáši Pluháčkovi PhD. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a čas, který mi při vypracování mé bakalářské práce věnoval.

Dále bych rád poděkoval Katedře analytické chemie a Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci za poskytnutí přístrojů a chemikálií pro vypracování mé bakalářské práce.

## OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	2
2.1	Prvkové nečistoty .....	2
2.1.1	Způsoby podání finálních léčivých přípravků.....	4
2.2	Lékopisné metody .....	4
2.2.1	<232> Prvkové nečistoty – Limity .....	4
2.2.2	<233> Prvkové nečistoty – Postupy.....	7
2.3	Hmotnostní spektrofotometrie s indukčně vázaným plazmatem .....	9
2.3.1	Zavádění vzorku .....	10
2.3.2	Zmlžovače .....	10
2.3.3	Mlžná komora.....	11
2.3.4	Plazma .....	12
2.3.5	Plazmová hlavice.....	12
2.3.6	Vytváření výboje a ionizace prvků v ICP .....	13
2.3.7	Spojení.....	14
2.3.8	Iontová optika.....	15
2.3.9	Hmotnostní analyzátory .....	16
2.3.10	Detektory .....	18
2.4	Interference .....	18
2.4.1	Spektrální interference .....	18
2.4.2	Nespektrální interference .....	19
2.4.3	Možnosti eliminace spektrálních interferencí .....	20
2.5	Laserová ablace.....	20
2.5.1	Princip .....	21
2.5.2	Laser .....	22
2.5.3	Druhy laserů .....	23

2.5.4	Parametry ovlivňující ablační proces .....	24
2.5.5	Frakcionace .....	25
2.5.6	Příprava vzorku pro ablaci .....	26
2.5.7	Kalibrace pro LA-ICP-MS .....	27
2.6	Aplikace technik atomové spektroskopie při analýze prvkových nečistot ve farmaceutických produktech .....	28
2.6.1	Atomová absorpční spektrometrie.....	29
2.6.2	Rentgenová fluorescenční spektrometrie .....	29
2.6.3	Metody využívající indukčně vázané plazma .....	29
2.6.4	Metody přípravy farmaceutických vzorků .....	30
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	34
3.1	Chemikálie, přístroje a pomůcky .....	34
3.1.1	Chemikálie.....	34
3.1.2	Přístroje .....	35
3.1.3	Pomůcky.....	35
3.1.4	Analyzované farmaceutické látky .....	36
3.1.5	LA-ICP-MS a ICP-MS.....	36
3.2	Příprava vzorků pro ICP-MS s laserovou ablací.....	38
3.3	Příprava kalibračních standardů s přizpůsobenou maticí pro LA-ICP-MS .....	38
3.4	Validace metody.....	41
3.4.1	Rovnice.....	42
3.4.2	Linearita.....	42
3.4.3	Mez stanovitelnosti.....	42
3.4.4	Správnost (výtěžnost).....	42
3.4.5	Přesnost (opakovatelnost).....	43
3.4.6	Přesnost (mezilehlá preciznost).....	43
3.4.7	Specifická.....	43

3.4.8	Robustnost.....	43
3.4.9	Rozsah .....	44
3.4.10	Zajištění kvality měření.....	44
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	45
4.1	Validace metody.....	45
4.1.1	Linearita.....	45
4.1.2	Mez stanovitelnosti (LOQ).....	52
4.1.3	Správnost (výtěžnost).....	53
4.1.4	Přesnost (opakovatelnost).....	54
4.1.5	Přesnost (mezilehlá preciznost).....	55
4.1.6	Specifická.....	56
4.1.7	Robustnost.....	57
4.1.8	Rozsah .....	58
4.1.9	Zajištění kvality měření.....	59
4.2	Analýza prvkových nečistot v reálných vzorcích .....	61
5	ZÁVĚR.....	64
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	65
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	67



## 1 ÚVOD

Monitorování prvkových nečistot je nedílnou součástí farmaceutické výroby, a to již od kontroly vstupních surovin, účinných farmaceutických látek až po samotné finální léčivé přípravky. Monitoring prvkových nečistot vychází z důvodu toxicity a potenciálního nebezpečí prvkových nečistot vůči lidskému organismu. Nečistoty se zde mohou dostat například ze vstupních surovin, v průběhu výroby (rozpouštědla, katalyzátory atd.), nebo z obalového materiálu.

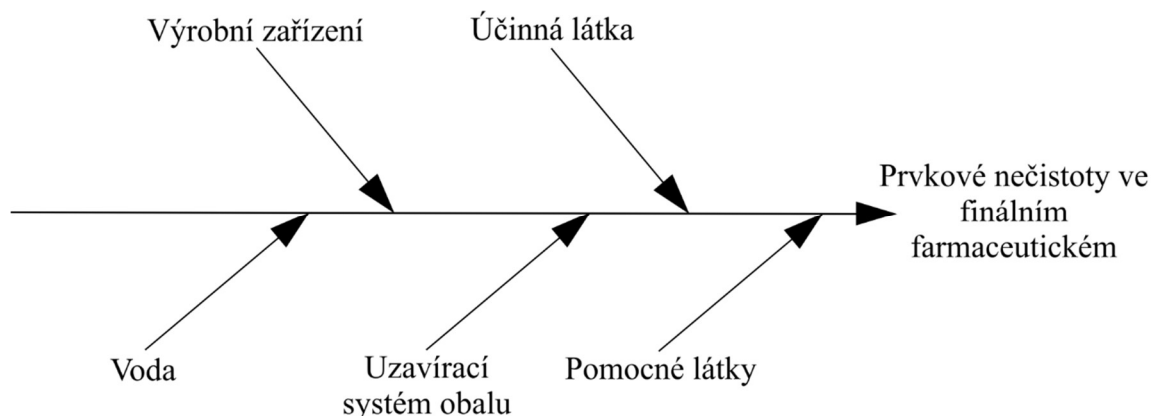
Počátkem roku 2018 vstoupily v platnost nové kapitoly lékopisu Spojených států amerických (USP), a to <232> Elemental Impurities – Limits a <233> Elemental Impurities – Procedures. První ze zmíněných kapitol upravuje maximální povolené limity jednotlivých prvkových nečistot. Druhá ze zmíněných kapitol upravuje doporučené postupy stanovení prvkových nečistot, a to zejména ICP-OES a ICP-MS po předchozím mikrovlnném rozkladu farmaceutických produktů a současně popisuje požadavky na validační parametry pro alternativní metody stanovení prvkových nečistot.

Experimentální část je zaměřena na vývoj a validaci LA-ICP-MS metody pro stanovení prvkových nečistot v orálně podávaných farmaceutických meziproduktech a produktech s doporučenou denní dávkou nepřesahující 2,0 g. Vývoj LA-ICP-MS metody zaměřuje na kvantitativní stanovení prvků třídy 1, 2A a 2B. Konkrétně se jedná o tyto prvky: Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag a Pt. Validace metody zahrnovala linearitu, mez stanovitelnosti, správnost, přesnost, specificita, robustnost a rozsah. Následně byla validovaná metoda úspěšně aplikována pro stanovení prvkových nečistot v 9 účinných farmaceutických substancích, 3 vstupních surovinách a 2 finálních farmaceutické produktech. Ve většině analyzovaných farmaceutických produktech byly nalezené koncentrace prvkových nečistot pod mezí detekce LA-ICP-MS metody, výjimku tvořila API 2, ve které bylo nalezeno množství 34,7  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Pd.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Prvkové nečistoty

V současné době je kontrola prvkových nečistot (*Elemental impurities*) ve výchozích látkách, meziproduktech a finálních léčivých přípravcích nedílnou součástí vstupní a výstupní kontroly kvality farmaceutické výroby, a to zejména z důvodu, že jednotlivé prvkové nečistoty mohou představovat významné riziko pro lidské zdraví. Podle nově implementovaných lékopisných kapitol a směrnice ICH-Q3D, zahrnují prvkové nečistoty skupinu toxických prvků (Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Th, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt, Li, Sb, Ba, Mo, Cu, Sn, a Cr), které ve většině případů neposkytují terapeutický (pozitivní) účinek na lidské zdraví [1, 2]. Prvkové nečistoty obsažené ve finálních farmaceutických přípravcích mohou pocházet z různých zdrojů zahrnujících vstupní suroviny (aktivní farmaceutické ingredience, pomocné látky, reakční činidla, katalyzátory, rozpouštědla (voda atd.), výrobní zařízení, obalový materiál (Obr. 1).



Obr. 1 Možné zdroje prvkových nečistot během výroby finálního farmaceutického přípravku

#### Prvkové nečistoty pocházející z vody

Přítomnosti prvkových nečistot ve vodě je velmi zredukována dodržením požadavků na lékopisnou kvalitu vody (např. lékopisné články uvedené v Evropském (Ph.Eur.), Americkém (USP), Japonském (JP) lékopise atd.). Obzvláště pak pokud se jedná o vysoce čištěnou vodu či vodu pro injekce.

### **Prvkové nečistoty pocházející z výrobního zařízení**

Přítomnost prvkových nečistot pocházející z výrobního zařízení je omezeno na prvky odpovídající složení materiálu zařízení a jejich jednotlivých součástí použitých během celého výrobního procesu finálního léčivého přípravku. Množství uvolněných prvkových nečistot z výrobního zařízení lze omezit dobrou znalostí jednotlivých částí výrobního procesu (katalyzátory, agresivnější prostředí, vyšší teplota, tlak atd.), výběrem vhodného výrobního zařízení a v neposlední řadě kvalifikací a následnou pravidelnou kontrolou výrobního zařízení dle požadavků správné výrobní praxe.

### **Prvkové nečistoty pocházející z aktivních farmaceutických ingrediencí, nebo pomocných látek**

V případě jednotlivých složek finálního farmaceutického přípravku mohou prvkové nečistoty pocházet z různé kombinace jednotlivých zdrojů: vstupní suroviny (zejména přírodní látky), výrobní zařízení, katalyzátory, rozpouštědla použitých během celého výrobního procesu. V případě, že prvkové nečistoty nejsou záměrně přidávány, tak i přesto je nutné sledovat Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni (orální způsob podání), Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Li, Sb, Cu (parenterální způsob podání) a Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Li, Sb, Ba, Mo, Cu, Sn, Cr (inhalační způsob podání).

### **Prvkové nečistoty pocházející z obalového materiálu**

Identifikace zdroje prvkových nečistot uvolňovaných z obalového materiálu spočívá v odhalení (porozumění) možných chemických interakcí mezi finálním léčivým produktem a obalovým materiálem. V případě pevné lékové formy je pravděpodobnost vyluhování nečistot z obalového materiálu zanedbatelná a vliv obalového materiálu nemusí být zahrnut do následné analýzy rizik pro hodnocení prvkových nečistot ve finálních léčivých přípravcích. V případě kapalných lékových forem nebo suspenzí je pravděpodobnost vyluhování prvkových nečistot z obalového materiálu mnohem vyšší. Z tohoto důvodu je nutné provést stabilitní a vyluhovací studie vedoucí odhalení stupně vyluhování prvkových nečistot z obalového materiálu po jeho čištění, sterilizaci či ozařování atd. Existuje zde několik faktorů, které mohou negativně ovlivnit vyluhování nečistot z obalu, jako např. pH, teplota, balicí proces, degradace obalového materiálu atd. [2].

### 2.1.1 Způsoby podání finálních léčivých přípravků

Finální léčivé přípravky mohou být pacientů podávány různými způsoby, a to v závislosti na jejich účincích a biologické dostupnosti účinné látky. Nejběžněji používané způsoby podání jsou orální, parenterální a inhalační. Mimo uvedené způsoby podání lze finální léčivé přípravky pacientů podávat např. rektálním, sublingválním (pod jazyk), bukálním (na sliznici), dermálním (na kůži), subkutánním (pod kůži), intramuskulárním (do svalu) způsobem podání.

## 2.2 Lékopisné metody

V rámci nového vydání Amerického lékopisu USP-NF vstoupily v platnost 1.1.2018 nové upravené kapitoly týkající se povolených limitů pro jednotlivé prvkové nečistoty a požadavků na analytické metody vhodné pro jejich kvantitativní stanovení, a to <232> Elemental impurities – Limits“ a <233> „Elemental impurities – Procedures“. Tyto kapitoly nahradily s již téměř sto let platnou lékopisnou kapitolu zaměřenou na stanovení těžkých kovů (Pb, Hg, Bi, As, Sb, Sn, Cd, Ag, Cu a Mo) pomocí vizuálního limitního testu založeného na reakci kationtů těžkých kovů se sulfidovým aniontem za vzniku barevné koloidní sraženiny nerozpustných sulfidů.

### 2.2.1 <232> Prvkové nečistoty – Limity

Tato lékopisná kapitola shrnuje maximální povolené limity pro denní expozici (PDE) prvkovými nečistotami. Prvkové nečistoty jsou děleny do 4 základních tříd (třída 1, 2A, 2B a 3) podle jejich toxicity pro lidský organismus a pravděpodobnosti výskytu ve finálních léčivých přípravcích [2, 3].

**Třída 1:** Patří zde prvky As, Cd, Hg a Pb jenž jsou pro lidský organismus velmi toxické, a proto již nejsou prakticky používány během přípravy farmaceutických přísad. Jejich přítomnost ve finálních léčivých přípravcích tak souvisí zejména s použitím přírodních vstupních surovin (např. těžené pomocné látky, extrakty bylin atd.) [2, 3].

**Třída 2:** Prvky ze druhé třídy jsou stále považovány za toxické pro člověka, přičemž jejich toxicita silně závisí na způsobu podání. Prvkové nečistoty z třídy 2 jsou proto rozděleny do 2 podskupin, a to na základě pravděpodobnosti jejich výskytu ve finálních léčivých přípravcích [2, 3].

**Třída 2A:** Patří zde prvky Co, V, Ni, které mají relativně vysokou pravděpodobnost výskytu ve finálních léčivých přípravcích. Z tohoto důvodu musí být zahrnuty do analýzy rizik pro hodnocení prvkových nečistot ve finálních léčivých přípravcích pro všechny způsoby podání [2, 3].

**Třída 2B:** Patří zde prvky Ag, Au, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Se a Tl, jejichž pravděpodobnost výskytu ve finálních léčivých přípravcích je velmi nízká. Tedy pokud nebyly úmyslně přidávány v průběhu výroby ať už léčiva, pomocných látek, nebo obalových materiálů, tak nemusí být zahrnuty do analýzy rizik pro hodnocení prvkových nečistot ve finálních léčivých přípravcích pro všechny způsoby podání [2, 3].

**Třída 3:** Patří zde prvky Cr, Cu, Li, Mo, Sb a Sn. Tyto prvky mají relativně nízkou toxicitu pro orální podání (vysoké PDE, obvykle >500µg/den). Tedy v případě, že nebyly úmyslně přidávány v průběhu výroby ať už léčiva, pomocných látek, nebo obalových materiálů nemusí být zahrnuty do analýzy rizik pro hodnocení prvkových nečistot. Avšak pro parenterální a inhalační způsob podání musí být jednotlivé prvkové nečistoty (Li, Sb, Cu – parenterální podání a Li, Sb, Ba, Mo, Cu, Sn, Cr – inhalační podání) zahrnuty do analýzy rizik pro hodnocení prvkových nečistot ve finálních léčivých přípravcích [2, 3].

### **Povolené denní expozice pro prvkové nečistoty a jejich přepočítání na povolené koncentrační limity**

PDE uváděný (µg/den) definuje maximální možný denní příjem prvkové nečistoty v podobě léčivého přípravku, proto pro účely kontroly kvality farmaceutické výroby je nutné jednotlivé PDE limity přepočítat na koncentrační limity vyjádřené nejčastěji v µg.g<sup>-1</sup>. Jednotlivé PDE limity jsou vypsány v Tab. I. K tomuto účelu lze využít 4 základní postupy. První z nich je založen na předpokladu, že denní dávka finálního léčivého přípravku, aktivní farmaceutické substance, pomocné látky nepřesáhne hodnotu 10 g (způsob 1) a jednotlivé povolené koncentrační limity pro prvkové nečistoty jsou vypočteny z rovnice (1).

$$\text{Koncentrace}(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}) = \frac{\text{PDE}(\mu\text{g}/\text{den})}{\text{denní dávka léčiva}(\text{g}/\text{den})} \quad (1)$$

Další způsoby výpočtu povolených koncentračních limitů pro prvkové nečistoty jsou založeny na použití aktuálních denních dávkách příslušného finálního farmaceutického přípravku jakožto celku (způsob 2a, dle rovnice (1)) či jednotlivých komponent finálního farmaceutického produktu (způsob 2b) s ohledem na jejich aktuální denní dávky. V případě

posledně zmiňovaného postupu je nutné od výrobců získat doplňující informace o přítomnosti a koncentraci prvkových nečistot v jednotlivých komponentách finálního léčivého přípravku. Posledním způsobem je analýza finálního produktu, kdy jednotlivé povolené koncentrační limity pro prvkové nečistoty jsou vypočteny z uvedené rovnice (1) s využitím maximální denní dávky finálního farmaceutického přípravku (způsob 3) [2].

Tab. I Povolené limity pro denní expozici dle <232> Elemental Impurities–Limits [1, 2]

Prvek	Třída	Orální podání PDE (µg/den)	Parenterální podání PDE (µg/den)	Inhalační podání PDE (µg/den)
Cd	1	5	2	2
Pb	1	5	5	5
As	1	15	15	2
Hg	1	30	3	1
Co	2A	50	5	3
V	2A	100	10	1
Ni	2A	200	20	5
Tl	2B	8	8	8
Au	2B	100	100	1
Pd	2B	100	10	1
Ir	2B	100	10	1
Os	2B	100	10	1
Rh	2B	100	10	1
Ru	2B	100	10	1
Se	2B	150	80	130
Ag	2B	150	10	7
Pt	2B	100	10	1
Li	3	550	250	25
Sb	3	1 200	90	20
Ba	3	1 400	700	300
Mo	3	3 000	1 500	10
Cu	3	3 000	300	30
Sn	3	6 000	600	60
Cr	3	11 000	1 100	3

### **2.2.2 <233> Prvkové nečistoty – Postupy**

Tato lékopisná kapitola popisuje jednak metody přípravy farmaceutických vzorků od jejich přímého naředění vodou či organickým rozpouštědlem, přes mikrovlnně asistovanou extrakci prvků za vzniku suspenzí až po mikrovlnný rozklad vzorku v uzavřeném systému. Kapitola dále popisuje dva základní postupy založené na použití ICP-OES a ICP-MS pro kvantitativní analýzu elementárních nečistot. Součástí kapitoly jsou i požadavky na validaci alternativních metod (postupů) pro kvantitativní analýzu elementárních nečistot [2, 3].

#### **Validace metody – validační parametry a požadavky**

Každá ICP-OES, ICP-MS, ale i alternativní metoda musí být před vlastním analýzou prvkových nečistot v aktivních farmaceutických substancích, pomocných látkách a finálních léčivých produktech validována. Validace metody zahrnuje následující parametry: linearita, mez stanovitelnosti, správnost, přesnost, specificita, robustnost a rozsah (Tab. II) [2, 3].

Tab. II Požadavky na validaci analytické metody pro kvantitativní stanovení prvkových nečistot [2, 3]

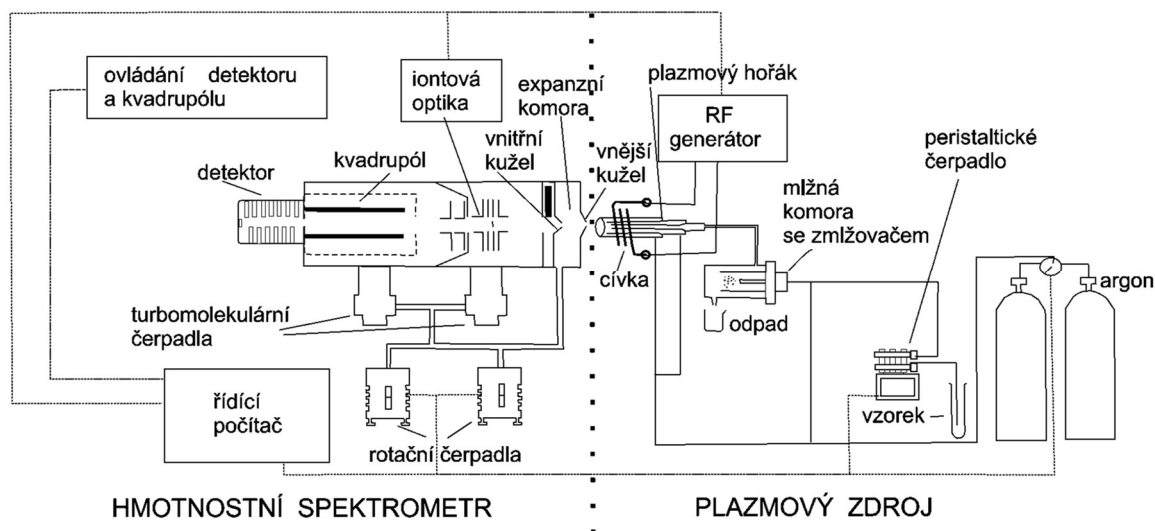
Parametr	Požadavek	Poznámka
Linearita	$R^2 \geq 0,99$	Analýza nejméně 3 kalibračních standardů v rozmezí od LOQ až po dvojnásobek povoleného koncentračního limitu.
Mez stanovitelnosti (LOQ)	$LOQ \leq 0,3$ povoleného koncentračního limitu	Analýza 3 vzorků spikovaných na 30 % povoleného koncentračního limitu.
Správnost (výtěžnost)	Výtěžnost 70-150 %	Analýza 3 vzorků spikovaných na 30 % povoleného koncentračního limitu. Analýza 3 vzorků spikovaných na 100 % povoleného koncentračního limitu. Analýza 3 vzorků spikovaných na 150 % povoleného koncentračního limitu.
Přesnost (opakovatelnost)	Relativní směrodatná odchylka (RSD) $\leq 20$ %	Analýza 6 vzorků spikovaných na 100 % povoleného koncentračního limitu.
Přesnost (mezilehlá preciznost)	RSD pro 6 vzorků $\leq 20$ % RSD pro 12 vzorků $\leq 25$ %	Analýza 6 vzorků spikovaných na 100 % povoleného koncentračního limitu. Poté je opakovatelnost zopakována jiný den, jiným analytikem či na jiném přístroji, anebo kombinací obojího.
Specifická	Výtěžnost 70-150 %	Analýza 3 vzorků spikovaných na 100 % povoleného koncentračního limitu.
Robustnost	RSD pro 6 vzorků $\leq 20$ % RSD pro 12 vzorků $\leq 25$ %	Analýza 6 vzorků spikovaných na 100 % povoleného koncentračního limitu. Poté je opakovatelnost zopakována jiný den, jiným analytikem či na jiném přístroji, anebo kombinací obojího.
Rozsah	Výtěžnost 70-150 %	Analýza 3 vzorků spikovaných na 30 % povoleného koncentračního limitu. Analýza 3 vzorků spikovaných na 150 % povoleného koncentračního limitu.



### 2.3 Hmotnostní spektrofotometrie s indukčně vázaným plazmatem

Hmotnostní spektrofotometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) patří mezi nejrychleji se rozšiřující techniky multielementární analýzy kovů, polokovů a nekovů. Mezi hlavní výhody ICP-MS patří multielementární analýza většiny prvků periodické tabulky, nízké meze detekce na koncentrační úrovni  $\text{pg.l}^{-1}$  až  $\mu\text{g.l}^{-1}$ , široký lineární dynamický rozsah až 10 koncentračních řádů, vysoká selektivita, schopnost poskytnout informaci o izotopovém složení, možnost analýzy plyných, kapalných i pevných vzorků. Technika ICP-MS našla široké uplatnění pro účely multielementárního stanovení stopových až ultrastopových koncentrací prvků ve vzorcích pocházejících ze životního prostředí geologie, archeologie, farmaceutického, potravinářského, jaderného, polovodičového průmyslu, ale i biologického a medicínského výzkumu. Speciální aplikací ICP-MS jsou studium izotopových poměrů, zobrazování prostorové distribuce prvků ve spojení s laserovou ablací (LA) a prvková speciální analýza, kde ICP-MS ve spojení se separačními metodami (HPLC, GC, CE, FIA, aj.) slouží jako prvkově specifický detektor [4-7].

V současné době se setkáváme s širokou nabídkou rozdílných typů ICP-MS přístrojů, které však mají společné konstrukční prvky jako například systém zavádění kapalných vzorků (zmlžovač, mlžná komora), plazmová hlavice, hmotnostní analyzátor a detektor. Princip funkce ICP-MS spočívá ve vnášení nejčastěji kapalného vzorku, pomocí peristaltické pumpy skrze zmlžovač a mlžnou komoru do indukčně vázaného plazmatu (ICP). Při průchodu vzorku ICP dochází k desolvataci, odpaření, atomizaci a následné ionizaci přítomných prvků za vzniku kladně nabitých iontů, které jsou dále extrahovány (transportovány) skrze spojení („*interface*“) do hmotnostního spektrometru. K extrakci a fokusaci svazku iontů prvků a matrice z ICP slouží iontová optika umístěná ve vakuové komoře mezi spojením a hmotnostním analyzátozem. Po separaci iontů v hmotnostním analyzátozem dle poměru hmotnosti ku náboji ( $m/z$ ) dopadají ionty na detektor, který převádí proud iontů na měřitelný elektrický signál. Schéma konstrukce ICP-MS uspořádání s kvadrupólovým analyzátozem je znázorněno na Obr. 2. V následujících kapitolách budou podrobněji diskutovány základní části ICP-MS s důrazem na uspořádání využívající kvadrupólový analyzátor a kolizně/reakční celu.



Obr. 2 Schéma hmotnostního spektrometru s kvadrupólovým analyzátozem [8]

### 2.3.1 Zavádění vzorku

Ve většině případů se ICP-MS využívá k analýze kapalných vzorků, které jsou do ICP vnášeny ve formě jemného aerosolu s velikostí částic menší než 10  $\mu\text{m}$ . Systém zavádění kapalných vzorků se skládá ze dvou částí, a to zmlžovače a mlžné komory. Princip tvorby jemného aerosolu je založen na dávkování vzorku rychlostí 1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  do zmlžovače pomocí peristaltické pumpy (generování polydisperzního aerosolu) a následné separaci jemného aerosolu v mlžné komoře. Výhodou zařazení peristaltické pumpy je konstantní dávkování vzorku bez ohledu na rozdíly ve viskozitě mezi vzorky, kalibračními standardy a slepými pokusy a odvádění nezmlžené části analyzovaných roztoků z mlžné komory do odpadu. Výběr vhodného typu a konstrukčního materiálu zmlžovače a mlžné komory může velmi ovlivnit kvalitu získaných ICP-MS dat [4-7].

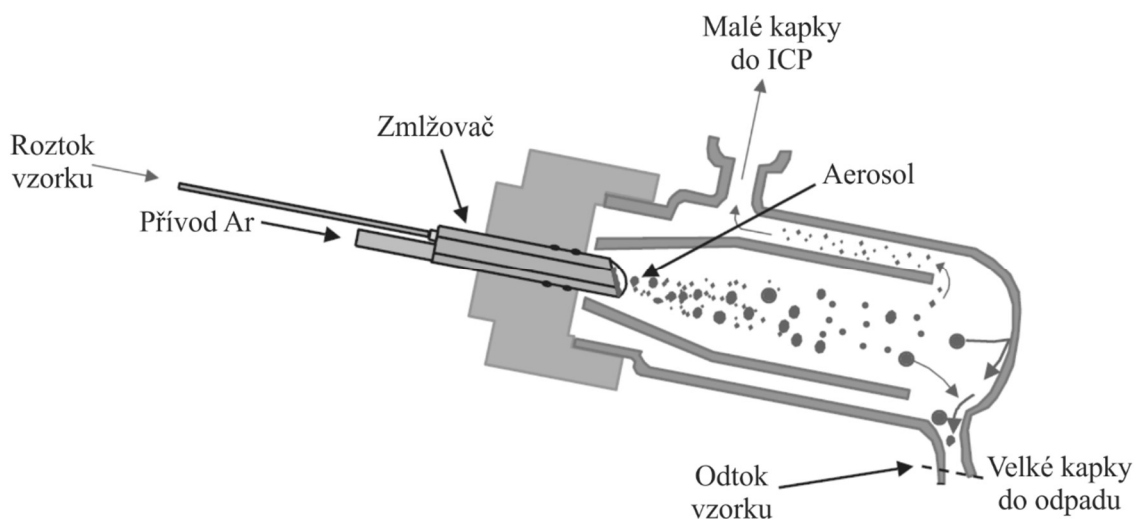
### 2.3.2 Zmlžovače

Přiváděná kapalina je ve zmlžovači převáděna (rozprašována) na polydisperzní aerosol (přibližně 1-2 % původního vzorku) vlivem působení kinetické energie proudícího nosného plynu na kapalinu proudící tenkou kapilárou. Nejběžnější typy pneumatických zmlžovačů jsou koncentrický, mikrokoncentrický a úhlový („cross-flow“). Koncentrický zmlžovač vykazuje dobrou citlivost a stabilitu pro analýzu „čistých“ roztoků, zatímco v případě analýzy složitých (zasolených) roztoků a roztoků obsahujících pevné částice je vhodnější využít úhlového zmlžovače, který je méně náchylný k ucpávání. Zmlžovače jsou

vyráběny z křemene, borosilikátového skla a polymerních materiálů (PVF, PTFE, aj.) odolnějších vůči korozivním roztokům [4-7].

### 2.3.3 Mlžná komora

Hlavním účelem mlžné komory je odstranění kapek větších než 10  $\mu\text{m}$  z polydisperzního aerosolu a vyrovnání pulzů způsobených pulzací peristaltické pumpy. Většina mlžných komor je vybavena externím chlazením, což poskytuje zvýšení teplotní stability vzorku, redukci množství rozpouštědel vstupujících do ICP vedoucích k zvýšení stability signálu, snížení zatížení plazmatu (např. organickými rozpouštědly). Nejčastěji používanými typy mlžných komor jsou Scottova (Obr. 3) a cyklonická mlžná komora [4-7].



Obr. 3 Schéma koncentrického zmlžovače a Scottovy mlžné komory [9]

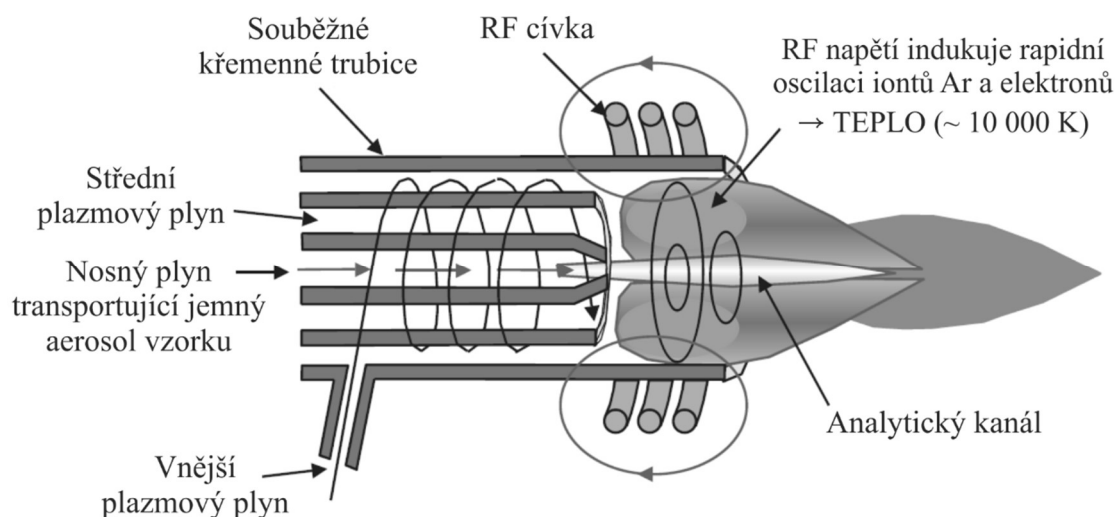
K analýze pevných vzorků, které nelze kvantitativně převést do roztoku přímo nebo po použití mineralizačních postupů, se k vnášení do ICP-MS využívá spojení s elektrotermickým vypařováním a laserovou ablací, které bude dále věnována samostatná kapitola. Oproti klasickému zavádění kapalných roztoků pomocí zmlžovače a mlžné komory poskytují obě techniky zavádění pevných vzorků přechodové signály s dobou trvání jen několik sekund.

### 2.3.4 Plazma

Plazma vytvářené z plynu po dodání dostatečné energie převyšující ionizační energii atomů plynu můžeme definovat jako elektricky vodivý, kvazineutrální ionizovaný plyn, který obsahuje dostatečné množství kladně a záporně nabitých iontů. V případě ICP-MS se nejčastěji využívá argonového indukčně vázaného plazmatu („*inductively coupled plasma*“ - ICP) udržovaného pomocí radiofrekvenčního pole vytvářeného v plazmové hlavici ovinuté indukční cívkou napojenou na vysokofrekvenční generátor. Mezi další používané plazmata patří stejnosměrně vázané („*direct current plasma*“ - DCP) a mikrovlně indukované plazma („*microwave induced plasma*“ - MIP), které však v analytické praxi nejsou tak rozšířené jako ICP [4-7].

### 2.3.5 Plazmová hlavice

Plazmová hlavice („*torch*“) se skládá ze 3 souběžných křemenných trubic (vnější, prostřední a injektor), kterými proudí plazmový plyn nejčastěji argon. Plazmové trubice jsou konstruovány jako kompaktní, nebo kombinovatelné, které mají odnímatelný injektor. K analýze korozivních vzorků se používá injektory vyrobené z platiny, oxidu hlinitého, nebo safíru. Mezi vnější a prostřední trubicí proudí vnější plazmový plyn (nositel výboje) o průtoku 12–17 l.min<sup>-1</sup>, mezi vnitřní trubicí a injektorem proudí střední plazmový plyn (stabilizace výboje a oddělení plazmového výboje od trubice) průtoku 1 l.min<sup>-1</sup> a injektorem proudí nosný plyn o průtoku 1 l.min<sup>-1</sup> transportující jemný aerosol vzorku a vytvářející analytický kanál uprostřed plazmového výboje. Plazmová hlavice obklopená indukční cívkou je umístěna v horizontální poloze přibližně 10-20 mm od rozhraní. Indukční cívka je přímo připojena k vysokofrekvenčnímu generátoru pracujícím s frekvencí 27,1 nebo 40,6 MHz a účinností 70-75 %. Schéma konstrukce plazmové hlavice a jednotlivých toků plazmového plynu je znázorněno na Obr. 4 [4-7, 9].



Obr. 4 Schéma plazmové hlavice [9]

### 2.3.6 Vytváření výboje a ionizace prvků v ICP

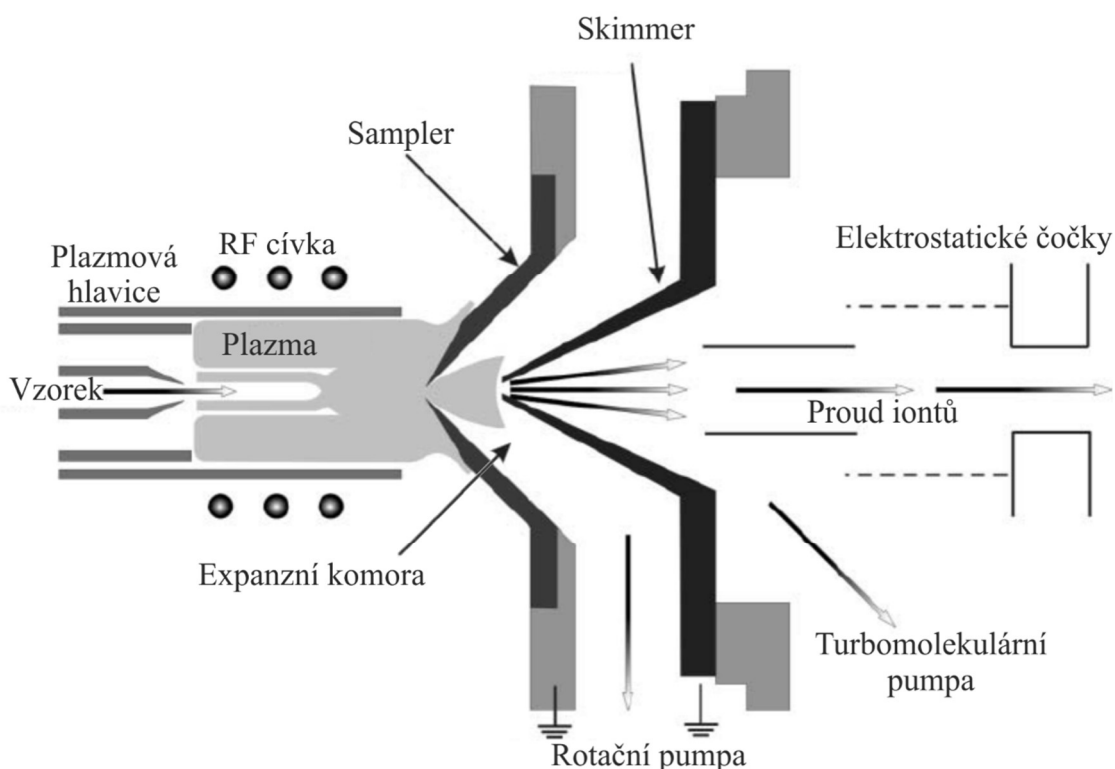
Na tangenciálně přiváděný proud vnějšího plazmového plynu procházejícího plazmovou hlavici se aplikuje silné elektromagnetické pole, a to vložení radiofrekvenční energie (obvykle 750-1500 W v závislosti na typu vzorku) na indukční cívku obklopující plazmovou hlavici. Po vložení RF napětí na indukční cívku začne vzniklý střídavý proud oscilovat uvnitř indukční cívky s rychlostí odpovídající frekvenci generátoru, což vede k vytvoření silného elektromagnetického pole. Samotný plazmový výboj je iniciován vysokonapěťovým pulzem z Teslova generátoru způsobujícího odtržení elektronů z atomů plazmového plynu, argonu. Odtržené elektrony jsou zachyceny a urychleny v elektromagnetickém poli a následně svou kinetickou energii předávají srážejí v podobě srážek s ostatními atomy argonu a vyrážejí tak stále více elektronů. Tato kolizí indukovaná ionizace pokračuje řetězovou reakcí za vzniku prstencového plazmatu o teplotě 6 000–10 000 K složené z neutrálních atomů argonu, kladně nabitých iontů argonu a elektronů. Indukčně vázané plazma je udržováno uvnitř plazmové hlavice a cívky po dobu vkládání RF energie na indukční cívku.

Ionizace analyzovaných prvků a matrice probíhá během průchodu jemného aerosolu skrze jednotlivé zóny plazmového výboje, ve kterých dochází k desolvataci, odpaření, atomizaci a ionizaci prvků za vzniku kladně nabitých iontů prvků a matrice. Argonové ICP s hodnotou prvního ionizačního potenciálu 15,8 eV je vhodné k ionizaci většiny prvků periodické tabulky s výjimkou helia, neonu a fluoru [4-7].

### 2.3.7 Spojení

Role spojení („*interface*“) spočívá ve stabilním a účinném transportu iontů z plazmatu (teplota 6 000-10 000 K, atmosférického tlaku), do hmotnostního spektrometru pracujícího při laboratorní teplotě (300 K) a tlaku přibližně  $10^{-4}$  Pa [4-7]. Interface se skládá z 2 kovových kónusů s velmi malými vstupními otvory v jejich vrcholech (Obr. 5). Kónusy jsou nejčastěji vyrobeny z niklu, ale mohou být i z jiných materiálů jako například měď, hliník a platina, jenž je odolnější vůči korozivním vzorkům [5, 7].

Kladně nabitě ionty z ICP jsou při průchodu prvním kónusem, „*samplerem*“ (s průměrem otvoru přibližně 0,8 – 1,2 mm) odděleny od hlavního toku argonu a vstupují do expanzní komory s teplotou 100-200 °C a tlakem  $10^2$  Pa [4]. Z expanzní komory jsou ionty prvků a matrice vedeny skrze druhý kónus „*skimmer*“ (s průměrem otvoru přibližně 0,4 – 0,8 mm) do hmotnostního analyzátoru. Oba kónusy jsou zašroubovány do kovového bloku intenzivně chlazeného vodou tak, aby nedošlo k jejich roztavení vlivem vysoké teploty plazmatu. Během ICP-MS analýzy velkého počtu zasolených či složitých vzorků s vyšším obsahem rozpuštěných pevných částic může docházet k postupné depozici méně těkavých složek matrice na obou kónusech a následně až k ucpání jejich vstupních otvorů [4-7].



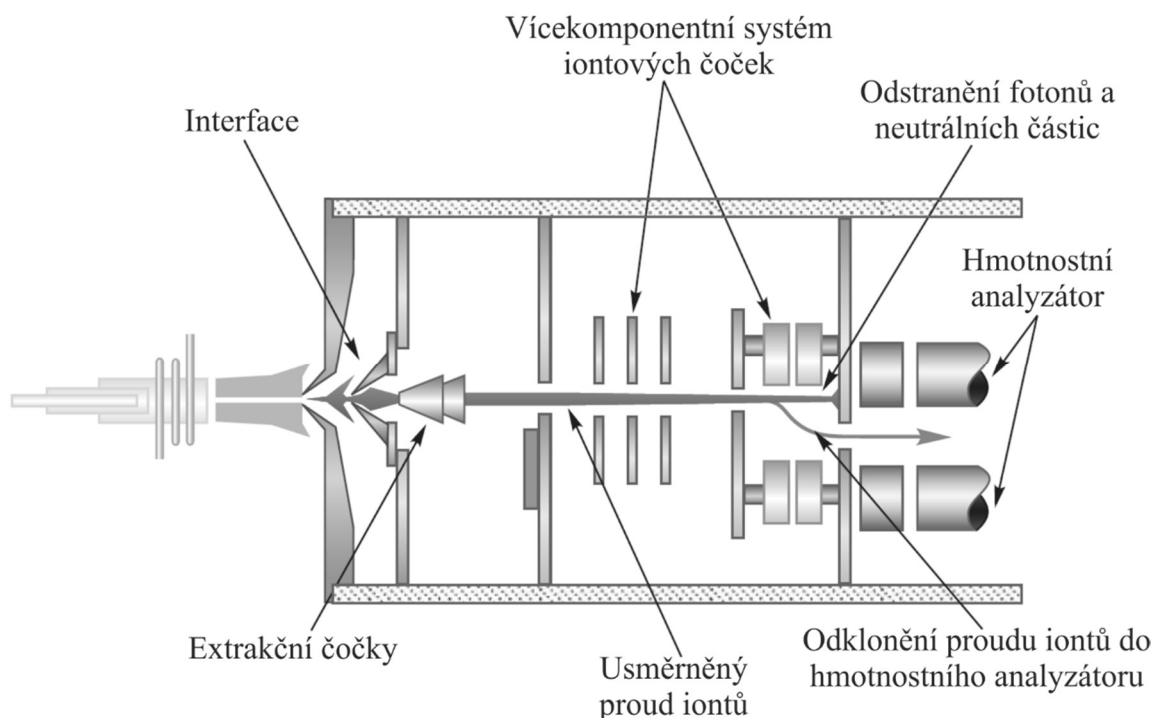
Obr. 5 Schéma spojení „*interface*“ ICP-MS [10]

### 2.3.8 Iontová optika

Její význam spočívá ve stabilním a účinném transportu iontů z plazmatu do hmotnostního analyzátoru. Další funkcí je oddělení neutrálních částic a fotonů ze svazku iontů a tím snížit pozadí a zvýšit stabilitu detektoru. Iontová optika se skládá z několika elektricky ovládaných čoček v podobě kovových destiček či válečků (Obr. 6). Konstrukce iontových optik vychází z předpokladu, že trajektorie neutrálních částic a fotonů nejsou ovlivňovány v elektromagnetickém poli, dle konstrukce se dělí na 3 základní typy:

- 1) „*In line*“ – vložení uzemněné „*photon stop*“ bariéry přímo do proudu iontů prvků a matrice. Neutrální částice a fotony narazí do bariéry, přičemž svazek iontů je vychýlen elektrickým polem iontových čoček tak, aby se vyhnul bariéře a zároveň opět utvořili zaostřený proud iontů vstupující do hmotnostního analyzátoru.
- 2) „*Off axis*“ – osa hmotnostního analyzátoru je vytočena vůči spojení o úhel přibližně 45°.
- 3) „*90° ion optics design*“ – svazek iontů je vychýlen „dutým iontovým zrcadlem“ o úhel 90° do hmotnostního analyzátoru umístěného „*off axis*“

Některé iontové optiky bývají doplněny o tzv. extrakční čočky nacházející se za „*skimmerem*“, které podporují extrakci lehkých prvků vytlačovaných z iontového svazku vlivem efektu „*prostorového náboje*“. Toto má za důsledek zlepšení transportu iontů do hmotnostního analyzátoru vedoucího ke zlepšení mezí detekce pro lehké prvky [4-7, 9].



Obr. 6 Schéma iontové optiky [7]

### 2.3.9 Hmotnostní analyzátor

K separaci iontů dle poměru hmotnosti ku náboji  $m/z$  se v ICP-MS používají hmotnostní analyzátor, které podle principu separace iontů můžeme rozdělit na kvadrupólový, sektorový, nebo průletový analyzátor [4-7].

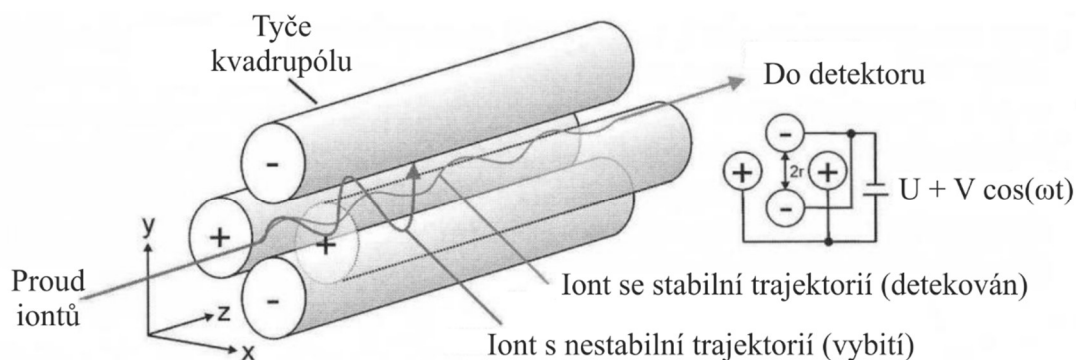
#### Kvadrupólový analyzátor

Jedná se o nejpoužívanější hmotnostní analyzátor. Skládá se ze 4 válcových v ideálním případě hyperbolických kovových tyčí o stejné délce (15-25 cm) a průměru (okolo 1 cm). Kvadrupóly jsou vyráběny z nerezové oceli, nebo molybdenu a někdy mohou být potažené keramickou vrstvou kvůli odolnosti vůči korozi [4-7, 9].

Separace iontů v kvadrupólovém analyzátoru je založena na postupném vkládání stejnosměrného ( $U$ ) a fázově posunutého vysokofrekvenčního napětí ( $V$ ) na protilehlé tyče se shodnou polaritou. Při definované hodnotě napětí  $U$  a amplitudy střídavého napětí  $V$  bude mít v elektrickém poli kvadrupólu stabilní trajektorii pouze ion s vhodným  $m/z$ , přičemž ostatní ionty budou vypuzeny z elektrického pole kvadrupólu a po srážce s tyčemi kvadrupólu vybity (Obr. 7). Plynulou změnou hodnot napětí  $U$  a  $V$  se postupně proměří všechny ionty analyzovaných prvků v definovaném rozsahu  $m/z$  [4-7, 9].



Teoretická skenovací rychlost kvadrupólu je  $2500 \text{ Da}\cdot\text{s}^{-1}$  a může tak proměřit celý hmotnostní rozsah 0-300 Da přibližně za desetinu sekundy. Ačkoliv reálná analýza je mnohem pomalejší. Například kvantitativní analýza 25 prvků může trvat 1-2 minuty v závislosti na požadavcích analýzy [4-7, 9].



Obr. 7 Princip separace dvojice iontů s rozdílnou hodnotou  $m/z$  s využitím kvadrupólového hmotnostního analyzátoru [11]

### Sektorový analyzátor

Sektorové analyzátorů dosahují v porovnání s kvadrupóly velmi vysoké rozlišovací schopnosti ( $R \sim 10\,000$ ), což předurčuje jejich využití pro účely ultra-stopové analýzy prvků zatížených spektrálními interferencemi, kde jsou kladeny vysoké nároky na mez detekce a přesnost stanovení. Další významnou aplikací tzv. Multikolektorů vybavených sektorovým analyzátořem pracujících v módu nízkého rozlišení (rozlišovací schopnost  $R = 400$ ) a detektorem složeným ze soustavy Faradayových klecí a elektronásobičů je velmi přesné měření izotopových poměrů [4-7].

### Průletový analyzátor

Princip průletového analyzátoru je založena na předpokladu, že pokud iontům s různým poměrem  $m/z$  dodáme stejnou kinetickou energii, tak se ionty budou pohybovat různou rychlostí v závislosti na jejich hmotnosti. V případě průletového analyzátoru jsou ionty vzorkovány v jeden okamžik a poté jsou urychleny napěťovým pulzem 1 keV do ortogonálně umístěné letové trubice, kde dochází k jejich separaci. Detekci vzorkovaných iontů lze získat simultánní záznam hmotnostního spektra v rozsahu od  ${}^6\text{Li}$  –  ${}^{238}\text{U}$ . Při použití

letové trubice o délce 1 m je doba letu nejtěžšího iontu  $^{238}\text{U}$  menší než 50  $\mu\text{s}$  a tedy lze teoreticky nasbírat až 20 000 kompletních spekter za sekundu [4-7].

### 2.3.10 Detektory

Detektor, převádějící proud iontů na měřitelný elektrický signál, je důležitou součástí všech ICP-MS. V současnosti jsou hmotnostní spektrometry s indukčně vázaným plazmatem vybaleny elektronovým násobičem s oddělenými dynodami, jenž nejlépe splňují kladené požadavky na potřeby stopové analýzy prvků, široký dynamický rozsah a nízký šum. Dříve používané typy detektorů byly „Chaneltron“ a „Faradayova klec“ [4-7, 9].

#### Elektronásobič s oddělenými dynodami

Elektronový násobič s oddělenými dynodami je umístěn tzv. „off-axis“ kvůli minimalizaci šumu pocházejícího z rozptýleného světla a neutrálních částic vznikajících v ICP. Skládá se z několika dynod (15–20 dynod) pokrytých vrstvičkou oxidů s vysokou emisí sekundárních elektronů. Při dopadu iontu na první dynodu jsou vyraženy sekundární elektrony, které jsou směřovány pomocí elektrického pole k následující dynodě. Při dopadu elektronů na každou další dynodu dochází k postupnému vyrážení stále většího počtu sekundárních elektronů (zesílení signálu). Vzniklý zesílený elektronový pulz je poté zachycen na anodě. V případě elektronového násobiče s oddělnými dynodami dosahujeme dostatečně širokého dynamického rozsahu použitím dvou měřících módů, a to analogového (nižší zesílení, detekce vysokých koncentrací) a pulzního (vyšší zesílení, detekce nízkých koncentrací) [4-7, 9].

## 2.4 Interference

Interference lze rozdělit do dvou hlavních skupin, a to na interference spektrální a nespektrální, přičemž spektrální interference představují nejvíce problematický druh interferencí zatěžujících kvantitativní stanovení prvků pomocí hmotnostních spektrometrů s nízkou rozlišovací schopností.

### 2.4.1 Spektrální interference

Existují 2 základní typy spektrálních interferencí, a to polyatomické a izobarické interference. Polyatomické (molekulární) interference vznikají kombinací dvou, nebo více

atomů, jejichž výsledná hodnota  $m/z$  je téměř shodná s hodnotou  $m/z$  izotopu analyzovaného prvku. Mezi nejznámější příklady polyatomických interferencí patří ionty vzniklé kombinací plazmového plynu (Ar) s atomy matrice, rozpouštědla anebo atomy ostatních prvků ve vzorku (polyatomický ion  $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$  interferující stanovení  $^{56}\text{Fe}$ ,  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$  interferující stanovení  $^{75}\text{As}$ ). Dalším zdrojem interferencí v ICP-MS může být vznik dvojnásobně nabitých iontů vytvářejících izotopický pík v oblasti jejich poloviční hodnoty hmotnosti. Například ion  $^{136}\text{Ba}^{2+}$  zatěžuje stanovení  $^{68}\text{Zn}^+$  [4-7].

### **Izobarická interference**

Jelikož se až 70 % prvků v přírodě nachází jako směs několika izotopů, tak může docházet k případům, kdy dva izotopy odlišných prvků (např. prvek matrice a analytu) mohou mít velice podobnou hodnotu  $m/z$ . Příkladem může být olovo mající 4 stabilní izotopy, a to  $^{204}\text{Pb}$ ,  $^{206}\text{Pb}$ ,  $^{207}\text{Pb}$ ,  $^{208}\text{Pb}$ . Přičemž izotop  $^{204}\text{Pb}$  je zatížen interferencí izotopu  $^{204}\text{Hg}$  a izotop  $^{205}\text{Pb}$  zase interferencí izotopu  $^{205}\text{Tl}$ . Pro potlačení izobarických interferencí se využívá nejčastěji vhodná volba izotopu (v případě Pb izotopů  $^{206}\text{Pb}$ ,  $^{207}\text{Pb}$ ,  $^{208}\text{Pb}$ ) nebo použití matematických korekčních rovnic zahrnujících do výpočtu přirozené zastoupení jednotlivých izotopů [4, 6].

#### **2.4.2 Nespektrální interference**

Existují 3 základní typy interferencí způsobené komplexní matricí vzorku, a to interference ovlivňující transport vzorku a jeho zmlžování, interference ovlivňující ionizaci prvků v ICP výboji a interference způsobující zanášení až ucpání otvorů ve vrcholech kónusů rozhraní. Nespektrální interference jsou způsobeny vyšším obsahem rozpuštěných látek, nebo koncentrací kyselin a snadno ionizovatelných prvků v analyzovaném vzorku. Nejčastější metodou korekce nespektrálních interferencí je využití vhodného interního standardu přidávaného v nízké koncentraci (nejčastěji jednotky  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) ke kalibračním standardům, slepým a reálným vzorkům. Na vhodně zvolený interní standard jsou kladeny následující požadavky: nesmí být přirozeně obsažen v analyzovaných vzorcích, musí mít podobný ionizační potenciál, chování v plazmatu a poměr  $m/z$  jako analyzovaný prvek, což v případě multielementární analýzy představuje použití různých interních standardů ( $^6\text{Li}$ ,  $^{45}\text{Sc}$ ,  $^{89}\text{Y}$ ,  $^{115}\text{In}$ ,  $^{209}\text{Bi}$ , aj.) pokrývajících měřený rozsah prvků [4-7].

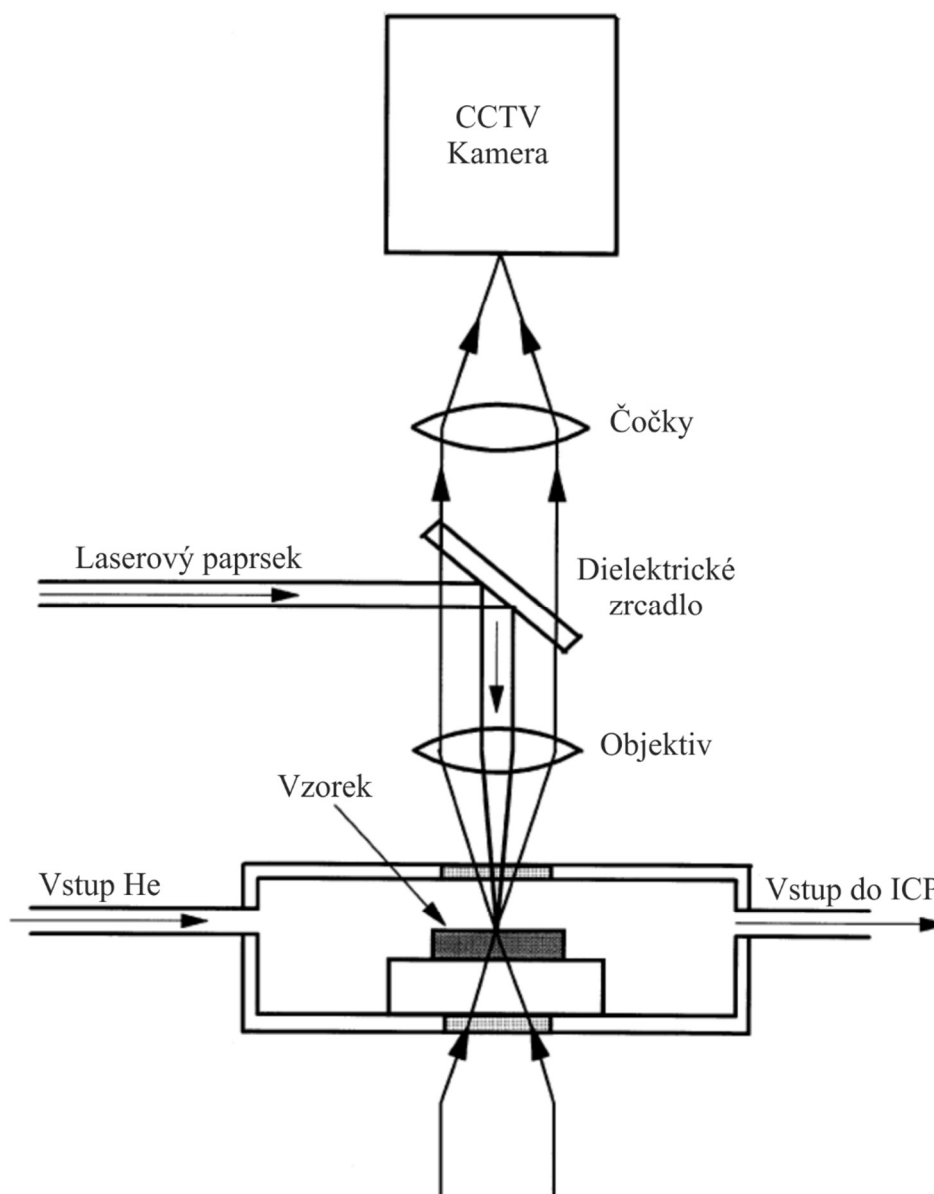
### 2.4.3 Možnosti eliminace spektrálních interferencí

Existuje několik možností eliminace spektrálních interferencí. Jeden ze způsobů je volba vhodného izotopu pro stanovení, který je minimálně zatížen spektrálními interferencemi anebo využití ICP-MS přístrojů s vysokým rozlišením. Další způsob je využití matematických korekčních rovnic, které jsou vhodné pro eliminaci izobarických interferencí, nebo méně závažných polyatomických interferencí. Dalším způsobem je použití „studeného plazmatu“ („*cool/cold plasma*“) založeném na snížení příkonu do plazmatu (500–800 W) a zvýšením průtoku nosného Ar, což vede k potlačení vzniku polyatomických interferencí odvozených od argonu ( $^{38}\text{Ar}^1\text{H}^+$ ,  $^{40}\text{Ar}^+$ ,  $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ , atd.). Další způsob spočívá v užití kolizní/reakčních cel, jejíž princip spočívá ve využití celé řady ion-molekulových kolizí a reakcí k efektivnímu odstranění polyatomických interferencí. Kolizně/reakční cely se dle mechanismu eliminace a použitého multipólu dělí na cely kolizní a reakční. Kolizní cely využívají hexapól či oktapól promývaný inertním plynem (He, Ne, Xe, atd.) a k potlačení interferencí dochází pomocí principu diskriminace kinetické energie založeném na rozdílné pravděpodobnosti vícenásobných srážek iontů analytu a interferentu s kolizním plynem. Reakční cely využívají kvadrupól promývaný reaktivním plynem ( $\text{H}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{O}_2$  atd.) a mechanismus potlačení interferencí spočívá v reakci polyatomických iontů s reakčním plynem za vzniku neinterferujících iontů s odlišnou hodnotou  $m/z$  nebo neutrálních částic [6, 7].

### 2.5 Laserová ablace

Laserová ablace (LA) je považována za nejrozšířenější techniku vnášení pevných vzorků pro ICP-MS. Spojení laserové ablace s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem LA-ICP-MS našlo široké uplatnění pro přímou analýzu pevných vzorků, hloubkové profilování, ale i mapování prostorové distribuce prvků na povrchu analyzovaných vzorků. Systém laserové ablace se skládá z laseru, ablační komory a transportního systému. Vzorek je umístěn v ablační komoře, která je vyplněna a promývána nosným plynem, který slouží pro přenos ablovaného materiálu do ICP-MS. Jako nosný plyn se většinou používá He, nebo Ar. Pomocí CCD kamery lze skrze okno ablační komory pozorovat povrch analyzovaného materiálu s cílem vybrat vhodné místo k LA-ICP-MS

analýze, na které je poté přesně fokusován (zaměřen) laserový svazek. Schéma systému laserové ablace je znázorněno na Obr. 8 [4, 12].



Obr. 8 Schéma systému laserové ablace [13]

### 2.5.1 Princip

Vlivem působení (dopadu) laserového svazku s vhodnou energií na povrch vzorku dojde k rychlému zahřátí vzorku a uvolnění ablatovaných částic, které následně vytvářejí mikroplazma. To se skládá z pevných částiček vzorku, vypařených kapek, elektronů, atomů a iontů analyzovaných prvků a matrice [5]. Částečně ionizovaný aerosol je následně

kontinuálním proudem nosného plynu (nejčastěji helium) zaváděn do ICP, ve kterém je aerosol atomizován a ionizován za vzniku kladně nabitých iontů analytu a matrice. Během interakce laseru s povrchem vzorku se uplatňují nejčastěji dva typy mechanismů, a to termický (odpařování) a netermický (ablace). Termický mechanismus zahrnuje tavení a odpařování vzorku. Energie se přenáší z fotonů na elektrony a atomovou mřížku. Termický mechanismus se uplatňuje u laserů s delší dobou trvání pulzu (mikrosekundové lasery) a nižší hustotě zářivého toku ( $<10^6 \text{ W.cm}^{-2}$ ). Netermický mechanismus (ablace) spočívající v přímém narušení atomové mřížky a uvolnění atomů bez difúze tepla se uplatňuje u laserů s kratší dobou trvání pulzu (femtosekundové lasery) a vyšší hustotě zářivého toku ( $>10^9 \text{ W.cm}^{-2}$ ). U typů laserů s hustotou zářivého toku  $10^6\text{--}10^9 \text{ W.cm}^{-2}$  dochází během interakce laserového svazku s povrchem vzorku současně k odpařování a k ablaci [14].

### 2.5.2 Laser

Laser je optické zařízení, jehož název je zkratkou z anglického „*light amplification by stimulated emission of radiation*“, což v překladu znamená zesílení světla s využitím stimulované emise záření. Laser produkuje pulzní monochromatické, koherentní světelné záření o vysoké intenzitě, které je soustředěno do jednoho bodu. Z těchto důvodů je laser vhodný zdroj pro interakci s povrchem analyzovaného vzorku za účelem vzorkování jeho malé a přesně definované části. Laser se skládá ze 3 částí, ze zdroje buzení, aktivního prostředí a optického rezonátoru.

Pomocí budícího zdroje jsou elektrony aktivního prostředí excitovány na metastabilní hladinu. Následně dojde k tomu, že počet excitovaných elektronů je vyšší než počet elektronů v základním stavu. Toto se nazývá inverzní populace. Aktivní prostředí má z obou stran optický rezonátor, jehož cílem je interferencí fotonů zesílit požadovanou vlnovou délku a ostatní zeslabuje. Optický rezonátor je tvořen polopropustným zrcadlem a totálním zrcadlem. Při přechodu elektronu z metastabilní hladiny na základní dojde k emisi elektronu (spontánní emisi). Tyto fotony mohou být odraženy optickým rezonátorem a mohou interagovat s jinými excitovanými atomy, což způsobí emisi světla (stimulovaná emise). Polopropustné zrcadlo odráží mezi 20 až 98 % záření, v závislosti na typu laseru. Tento proces se opakuje, čímž je podporována stimulovaná emise. Vzniklé záření poté prochází polopropustným zrcadlem mimo laser [6].

### 2.5.3 Druhy laserů

Na základě typu laseru lze získat emitované záření o různých vlnových délkách od UV až po IR. Dále se lasery dělí podle materiálu aktivního prostředí (pevnolátkové, plynové a excimerové), doby trvání pulzu (mikrosekundové, nanosekundové, pikosekundové a femtosekundové). Za nejvýhodnější lasery jsou považovány UV femtosekundové lasery, které díky působení velmi krátkého pulzu na povrch analyzovaného vzorku dochází k jeho účinnější ablací vedoucí ke vzniku homogennější distribuce velikosti ablatovaných částic, stabilnějšího signálu a minimalizaci elementární a izotopické frakcionace [5, 6].

#### **Pevnolátkové lasery**

Aktivní prostředí laseru je tvořeno opticky propustnou pevnou látkou (obvykle sklo, nebo průhledný krystal), který je dopovaný malým množstvím iontů kovu sloužících jako luminiscenční centra. Jako budící zdroj se používají výbojky nebo jiné lasery. V LA-ICP-MS se používají zejména neodymový a Nd:YAG laser.

V současnosti je však nejpoužívanějším laserem Nd:YAG, kdy aktivním materiálem je izotropní krystal Yttrium Aluminium granátu ( $Y_3Al_5O_{12}$ ) dopovaný ionty neodymu ( $Nd^{3+}$ ). Nd:YAG je schopen emitovat záření o různých vlnových délkách. Základní vlnovou délkou Nd:YAG laseru je 1064 nm, přičemž pomocí optických součástek lze získat a využít laserové paprsky s poloviční (532 nm), třetinovou (355 nm), čtvrtinovou (266 nm) nebo až pětinovou (213 nm) vlnovou délkou. Nicméně jen Nd:YAG lasery mající vlnovou délkou 213 nm a 266 nm jsou součástí ablačních systému pro účely LA-ICP-MS [6].

#### **Plynové lasery**

Aktivní prostředí laseru je tvořeno plynnou fází, která je homogenní, a tedy při průchodu záření aktivním prostředím nedochází k deformaci a rozbíhavosti výstupního paprsku. V porovnání s pevnolátkovými lasery, má výstupní paprsek plynové laseru velmi stabilní vlnovou délkou, ale nižší výstupní výkon, a to z důvodu nižší objemové hustoty počtu částic. Jako budící zdroj se používá elektrický výboj. Plynové lasery mají velký rozsah vlnových délek a lze je rozdělit na lasery s výbojem v plynu, dynamické plynové lasery, fotodisociační lasery, chemické lasery a excimerové lasery, přičemž poslední ze jmenovaných je nejčastěji používaný typ v LA-ICP-MS [6, 14].

## **Excimerové lasery**

Název vychází ze spojení anglických slov „excited“ a „dimers“ a označuje dimerní molekuly vzácného plynu a halogenidu (např. ArF.), jejichž vznik je podmíněn vzájemnou interakcí excitované částice s částicí v základním energetickém stavu. Tyto excitované molekuly jsou velmi nestabilní a v řádu několika nanosekund se rozpadají čímž dojde k vyzaření poměrně velké energie. Aktivním prostředím excimerových laserů jsou směsi inertních a reaktivních plynů (Ar, Kr, Xe, Cl<sub>2</sub> a F<sub>2</sub>) o vysoké čistotě, které je nutné pravidelně měnit (vyšší provozní náklady). Mezi nejdůležitější excimerové lasery patří F-F (157 nm), Ar-F (193 nm), Kr-F (248 nm), Xe-Cl (308 nm) a Xe-F (351 nm) [14].

### **2.5.4 Parametry ovlivňující ablační proces**

Mezi nejdůležitější parametry ovlivňující ablační proces patří parametry charakterizující vlastnosti laseru a optického systému (vlnová délka, energie, délka pulzu, frekvence, energetický profil laserového paprsku, zaostření laseru), použitý nosný plyn (druh plynu, tlak a průtok ablační celou – ovlivnění transportu aerosolu do ICP-MS) a v neposlední řadě matrice (optické vlastnosti, homogenita, morfologie).

#### **Vlnová délka laseru**

Vlnová délka laseru je jedním z nejdůležitějších parametrů laserové ablace. Pro laserovou ablaci jsou preferovány především lasery s vlnovou délkou v UV oblasti, a to nejen pro jejich netermický mechanismus ablace (přímé rozrušení krystalové mřížky bez zbytečného zahřívání způsobující frakcionaci), ale i možnost jejich zaostření na menší plochu analyzovaného vzorku [6, 14].

#### **Doba trvání pulzu**

Dalším důležitým parametrem ovlivňující ablační proces je doba trvání pulzu. Obecně platí, že čím kratší doba trvání pulzu, tím se více uplatňuje netermický mechanismus ablace (snížení termických dějů vedoucích ke zlepšení prostorového či hloubkového rozlišení). Nejčastěji se používají femtosekundové a nanosekundové lasery [6, 14].

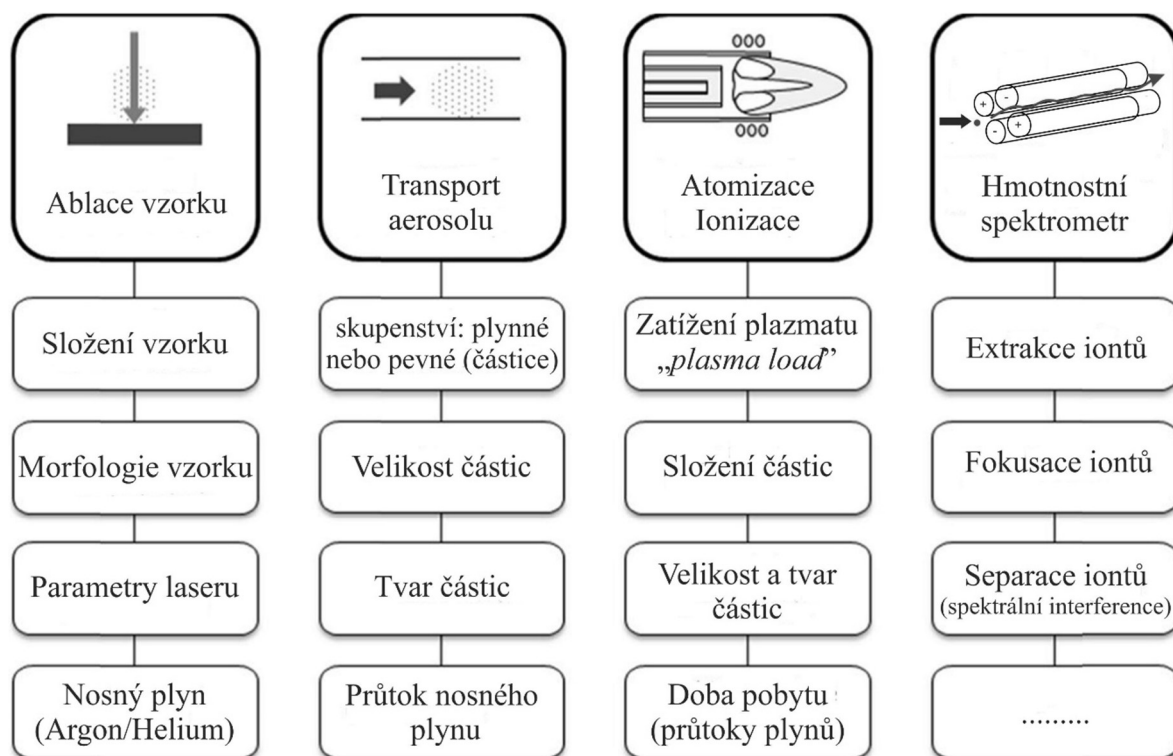


## **Energie laseru**

V neposlední řadě je dalším důležitým parametrem energie laserového pulzu ovlivňující průběh ablace a rozměr vzniklého kráteru po ablaci. Energie laseru ovlivňuje průběh ablace, množství ablatovaného materiálu a velikost kráteru. Energie laserového pulzu je volena v závislosti na tloušťce (např. tenké řezy biologických vzorků či rostlin), tvrdosti a optických vlastností analyzovaného vzorku. Mimo to i energetický profil laserového svazku značně ovlivňuje tvar vznikajícího kráteru, excimerové lasery, paprsek s plochou horní částí, vytvářejí krátery s rovnými stěnami, přičemž NdYAG lasery, paprsek s Gaussovským profilem, vytvářejí krátery s kuželovitým tvarem [14].

### **2.5.5 Frakcionace**

Jde o jev vedoucí k výskytu nestechiometrických jevů v přechodových signálech projevujících se odlišným složením ablatovaného aerosolu vzorku od průměrného složení analyzovaného vzorku. K tomuto dochází na základě různých chemických a fyzikálních vlastností. Jedná se o elementární a izotopickou frakcionaci. U elementární frakcionace dochází ke změnám poměru signálů jednotlivých prvků. U izotopické frakcionace dochází ke změnám poměru signálů jednotlivých izotopů. Pro kvantifikaci frakcionace se používá „Index frakcionace“, který závisí na typu vzorku a celkové době ablace. Pro jeho výpočet se používá vnitřních standardů nejčastěji pomocí vápníků. K frakcionaci obvykle dochází při samotné ablaci, transportu částic z ablační cely do ICP a v plazmatu (Obr. 9). Frakcionaci lze ovlivnit výběrem vhodného laseru, protože UV lasery způsobují menší frakcionaci, než IR lasery [14].



Obr. 9 Zdroje chyb při LA-ICP-MS

### 2.5.6 Příprava vzorku pro ablaci

Před analýzou je důležité, aby byl vzorek dostatečně homogenní a měl hladký povrch. Speciální skupinou vzorků jsou oceli a slitiny, jež jsou dostatečně homogenní a nepotřebují být nikterak upravovány před vlastní LA-ICP-MS analýzou.

Naopak při analýze hornin mohou být stopové prvky distribuovány jako shluky náhodně rozmístěné v materiálu. Práškové vzorky se obvykle připravují 2 hlavními způsoby: lisováním a tavením. Pokud je vzorek ve formě prášku či krystalu, tak se pomocí lisování převede v tabletku. Při lisování se také může využít pojiv jako jsou vysokomolekulární alkoholy, nebo pryskyřice.

Dalším způsobem je tavení, jehož velká výhoda je získání vysoké homogenity vzorku. Tavení může být provedeno za použití tavidla jako je borax nebo bez něj. Použití tavidla snižuje teplotu tavení a tím zabraňuje odpaření těkavějších prvků. Nicméně tavení vzorku bez tavidla odstraňuje nevýhody použití tavidla, a to ředění vzorku a možnou kontaminaci vzorku, jako u lisování tabletek za použití pojiv.

Mezi další postupy přípravy vzorků pro LA-ICP-MS patří zalití vzorků do epoxidové pryskyřice, parafínu či jiného polymeru (zachování 3D struktury), speciální metodou

přípravy biologických a rostlinných tkání je jejich nařezání na tenké řezy s tloušťkou 10 – 30  $\mu\text{m}$  pomocí kryomikrotomu [13].

### **2.5.7 Kalibrace pro LA-ICP-MS**

Použitím laserové ablace v propojení s ICP-MS se dají získat užitečné informace o kovových a některých nekovových prvcích v materiálu. Můžeme získat informaci o distribuci jednotlivých prvků v materiálu. Pro jejich kvantitativní analýzu však je potřebná kalibrace, která potlačí odchylky způsobené především rozdílnou interakcí laserového svazku s povrchem vzorku, tvorbou reprezentativního jemného aerosolu, transportem částic aerosolu do ICP a následným odpařením, atomizací, ionizací prvků v ICP. Kalibrace se dá provést několika způsoby (výhody a nevýhody jednotlivých postupů jsou popsány v Tab. III):

- Matriční certifikované referenční materiály (CRM)
- Laboratorně připravené standardy
- Přimíchávání aerosolu kapalného standardu
- Izotopické zředování
- Inkoustový tisk

Tab. III Výhody a nevýhody jednotlivých kalibračních postupů [15]

Kalibrační postup	Výhody	Nevýhody
Matriční certifikované referenční materiály (CRM)	Přizpůsobená matrice, rychlost, nezávislost certifikované koncentrace	Omezená dostupnost, jednobodová kalibrace, omezená volba kalibračního rozsahu, obvykle vysušené standardy
Laboratorně připravené standardy s přizpůsobenou maticí	Přizpůsobená matrice, volba koncentračního rozsahu, ekvivalentní obsah vody	Specifická aplikace, zdouhavá příprava
Přimíchávání aerosolu kapalného standardu	Rychlost, vyšší počet analytů, využití standardních vodních kalibračních roztoků	Doposud popsáno omezené množství aplikací pro zobrazování
Izotopické zředování	Robustní jednobodová kalibrace, přesnost	Homogenní promíchání obohaceného standardu se vzorkem je značně obtížné, náročnost provedení, nepoužitelné pro monoizotopické prvky
Inkoustový tisk	Rychlost, snadná přizpůsobitelnost pro nové aplikace, možnost přizpůsobení matrice	Doposud popsáno omezené množství aplikací pro zobrazování

Při kalibraci i měření je vhodné použití interního standardu, díky kterému získáme data korigovaná na interní standard. Toto umožňuje přesnější měření.

## 2.6 Aplikace technik atomové spektroskopie při analýze prvkových nečistot ve farmaceutických produktech

Pro kontrolu prvkových nečistot ve farmaceutické výrobě se používá mnoho technik. Mezi tyto techniky patří například atomová absorpční spektroskopie (AAS), rentgenová

fluorescenční spektrometrie (RFS) a metody využívající indukčně vázané plazma (ICP-MS, ICP-OES, LA-ICP-MS).

### **2.6.1 Atomová absorpční spektrometrie**

AAS je jednou ze starších metod stanovení obsahu prvkových nečistot ve vzorku. V porovnání s častěji používanými metodami jsou ICP-OES a ICP-MS, dosahuje obecně horších mezí detekce (zejména FA-AAS). Proto se pro zlepšení mezí detekce využívá elektrotermické atomizace (ETA-AAS) dosahujících nižších mezí detekce, které jsou pro vybrané prvky srovnatelné s ICP-OES [16]. ETA-AAS umožňuje stanovení pevných, kapalných, ale i suspenzních vzorků. Nevýhodou technik AAS oproti ICP-OES a ICP-MS je to, že při jedné analýze lze stanovit pouze jeden prvek, oproti možné multielementární analýze za použití ICP-OES a MS. Nicméně možnost analyzovat pevné vzorky přináší značné snížení času potřebného na přípravu vzorku, oproti ICP-OES a ICP-MS [17].

### **2.6.2 Rentgenová fluorescenční spektrometrie**

Pomocí RFS lze analyzovat pevné a kapalně vzorky bez jejich zdlouhavé přípravy. Další výhodou RFS jsou velmi nízké interference způsobené maticí vzorku. RFS ale spíše nachází své uplatnění při kvalitativní analýze. Kvantitativně se dají stanovit především Fe, Ni, Zn, Cu a Pd [17].

### **2.6.3 Metody využívající indukčně vázané plazma**

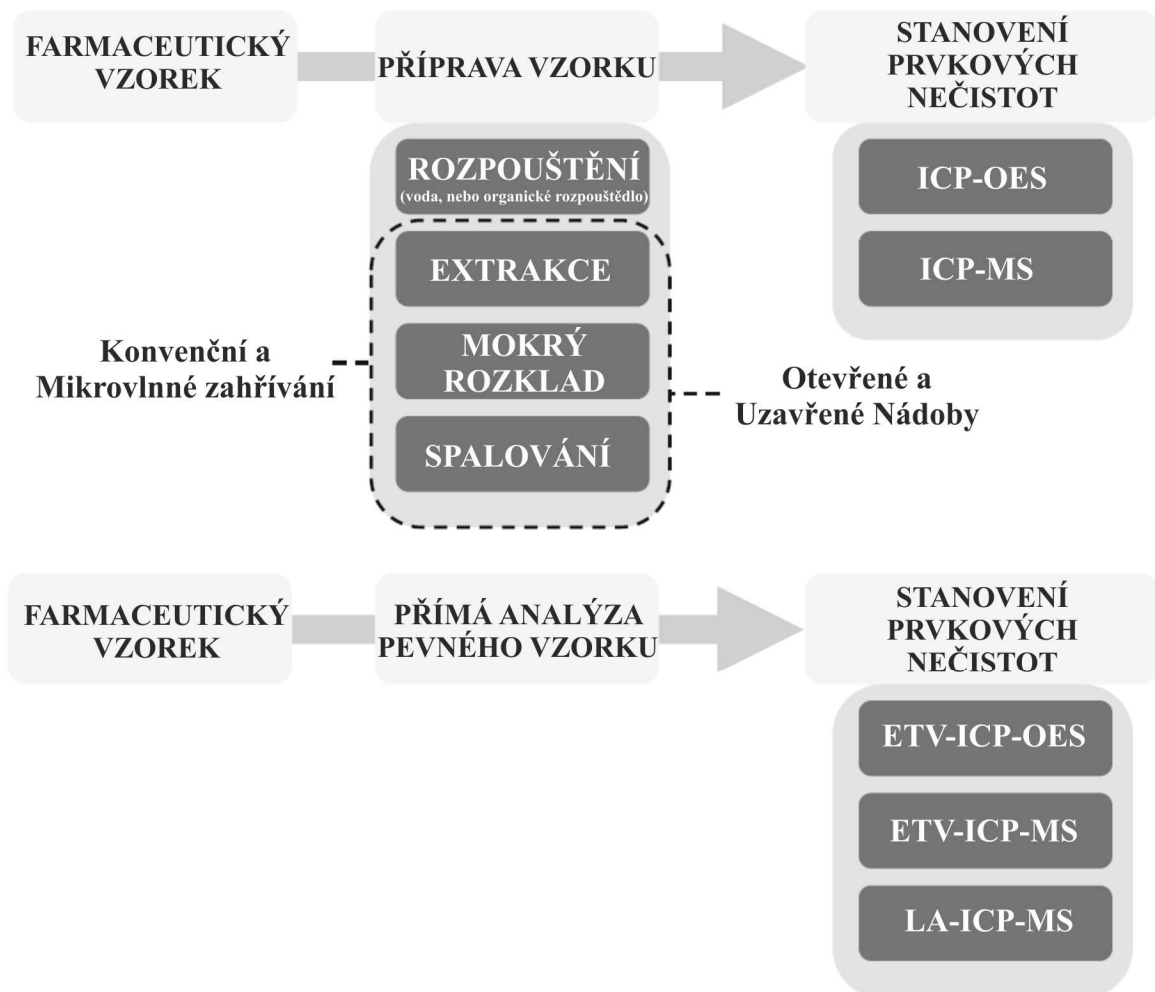
ICP-OES a ICP-MS patří v dnešní době k nejrozšířenějším metodám analýzy prvkových nečistot. Vynikají především díky možnosti multielementární analýzy a dosažení velmi nízkých mezí detekce. Limitace standardních ICP-MS a ICP-OES přístrojů spočívá v možnosti analýzy především kapalných vzorků. Toto omezení vedlo k vývoji metod založených na ICP, které umožní přímou analýzu pevných vzorků, a to laserová ablace (LA-ICP-MS) [18] a elektrotermické vypařování (ETV-ICP-MS a ETV-ICP-OES) [19].

Výhodou ETV oproti LA je množství vzorku, které je transportováno do ICP. U ETV to může být až 2,5 mg, zatímco u LA to bývají ng. Její další výhodou je odstranění (potlačení) matrice díky postupné pyrolýze vzorku dle předem nastaveného teplotního programu.

Nicméně některé prvky nemohou být stanoveny pomocí ETV, kvůli ztrátám při pyrolýze vzorku [17].

#### 2.6.4 Metody přípravy farmaceutických vzorků

Pro účely kvantitativního stanovení prvkových nečistot ve farmaceutických produktech byly navrženy dva základní způsoby přípravy farmaceutických vzorků, a to v závislosti na použité technice atomové spektrometrie. Obecně tyto postupy zahrnují přímou analýzu pevných farmaceutických vzorků, a nebo (častěji) je nutné před vlastní analýzou vzorek převést do roztoku (Obr. 10). K převedení vzorku do roztoku se využívá rozpuštění vzorku ve vodě či jiném rozpouštědle, mikrovlnně asistovanou extrakci až po mikrovlnné rozklady vzorku v otevřeném a uzavřeném systému.



Obr. 10 Postup stanovení prvkových nečistot pomocí metod založených na ICP [17]

## **Rozpouštění**

Rozpouštění se provádí buďto ve vodě nebo v organických rozpouštědlech. Rozpouštění ve vodě se většinou provádí roztoky zředěných minerálních kyselin (obvykle HCl, nebo HNO<sub>3</sub>). Avšak rozpouštění ve vodě má značné omezení v podobě špatně rozpustnosti účinných farmaceutických substancí (10-100 mg). Rozpouštění farmaceutických produktů v organických rozpouštědlech (nejčastěji N,N-dimethylformamid a ethanol), však v případě ICP-MS a ICP-OES přináší řadu obtíží v podobě omezení vnášení organických rozpouštědel do ICP (do 5 -10 %), zvýšení pravděpodobnosti vzniku polyatomických interferencí. Toto omezení lze potlačit použitím membránových desolvatačních jednotek, přidáváním kyslíku do nosného plynu vedoucího k dokonalému spálení organické matrice v ICP a korekčními rovnicemi (polyatomické interference odvozené od uhlíku). Použití vnášení kyslíku do ICP a membránových desolvatačních jednotek patří mezi nákladné přístupy ICP-MS a ICP-OES analýzy zvyšující [17].

## **Extrakce**

Je to alternativní způsob přípravy farmaceutických vzorků založený na předpokladu že prvkové nečistoty nebyvají obsaženy přímo ve struktuře API. Existují dvě hlavní metody extrakce a to „cloud point extraction“ (CPE), mikrovlnně asistovaná CPE a extrakce pomocí ultrazvuku. Jako extrakční činidla se používá směs povrchově aktivní látky a ligandu, jako je například směs Tritonu X-100 s 2-merkaptobenzothiazolem [17].

## **Rozklad na mokré cestě**

Většinou se organické matrice rozkládají působením oxidujících kyselin, jako je například kyselina dusičná. Díky použití kyseliny dusičné je zajištěno, že většina prvkových nečistot bude v mineralizátu ve formě rozpustných dusičnanů. Často se také využívají směsi kyseliny dusičné s oxidujícím činidlem, jako je například peroxid vodíku nebo kyselina chloristá. Kvůli nízké stabilitě některých prvků (Ru, Os, Ir, Pt, Au) ve vzniklých mineralizátech se přidávají další látky, které zvyšují jejich stabilitu. Jedná se například o kyselinu chlorovodíkovou, směs thiomčoviny a kyseliny askorbové. Pro rozklad je často nutno použít rozklad za zvýšeného tlaku, a to proto, abychom dosáhly vyšší teploty varu rozkladné směsi. Rozklad se proto může dělit podle nádoby, ve které probíhají (otevřený, uzavřený) a podle způsobu, jakým je teplo dodáváno (konvenčním zahříváním, zahřívání působením mikrovlnného či infračerveného záření). Výhodou rozkladu v uzavřeném systému je snížení kontaminace vzorku a minimalizace ztrát analytu z rozkladné nádoby

během rozkladu. Nejčastěji se používá mikrovlnných rozkladů v uzavřených systémech. Příklady použití rozkladných směsí na různé matrice jsou uvedeny v Tab. IV [17].

Tab. IV Příklady rozkladů na mokré cestě [17]

Matrice	Rozkladná směs	Stabilizace Os/Hg	Citace
Kyselina acetylsalicylová L-serin	HNO <sub>3</sub>	Os a Hg – směsí HCl a thiomčoviny	[20]
Antibiotické tabletky	HNO <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	[21]
Antihypertenzní tabletky	HNO <sub>3</sub> + HCl, poté H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + HNO <sub>3</sub> + HCl	-	[19]
Arbidol	HNO <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	[18]
Fingolimod	HNO <sub>3</sub> + HClO <sub>4</sub>	-	[22]
Levetiracetam	HNO <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	[23]
Levodopa Primaquine difosfát, Propranolol hydrochlorid Sulfamethoxazole	HNO <sub>3</sub> / HNO <sub>3</sub> + HCl	-	[24]
Lu tabletky	HNO <sub>3</sub> + HCl	-	[25]
Mikrokrytalická celulóza	HNO <sub>3</sub>	Os – směsí CH <sub>3</sub> COOH, thiomčoviny a kys. askorbové	[26]
Některé API Tabletky	Voda + HNO <sub>3</sub> + HCl	-	[27]
Některé API tabletky	HNO <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	[28]

### Spalování

Spalování zahrnuje 4 kroky. Je to sušení, spalování, zpopelnění a následné rozpuštění (loužení) vzniklého popela v minerální kyselině. Díky tomu, že většina účinných látek jsou organické sloučeniny, tak spalování může být velice účinný způsob rozkladu při, kterém je organická matrice převedena především na CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O a anorganický zbytek (popel) rozpustný ve zředěných minerálních kyselinách. Spalování probíhá v otevřených kelímecích, což může vyústit ve ztrátu těkavějších prvků. V poslední době se mikrovlnně indukované



spalování (MIC) ukazuje jako účinná metoda spalování API, díky které jdou stanovit i těkavé prvky jako jsou halogenidy [17].

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Chemikálie, přístroje a pomůcky

##### 3.1.1 Chemikálie

- Certipur® Vanad ICP Standard;  $c = 995 \pm 5 \text{ mg.kg}^{-1}$ , (1 000  $\text{mg.l}^{-1}$ ), Merck s.r.o, Německo.
- Certipur® Kobalt ICP Standard;  $c = 987 \pm 5 \text{ mg.kg}^{-1}$  (1 000  $\text{mg.l}^{-1}$ ), Merck s.r.o, Německo.
- Certipur® Nikl ICP Standard;  $c = 988 \pm 5 \text{ mg.kg}^{-1}$  (1 000  $\text{mg.l}^{-1}$ ), Merck s.r.o, Německo.
- Certipur® Arsen ICP Standard;  $c = 992 \pm 5 \text{ mg.kg}^{-1}$  (1 000  $\text{mg.l}^{-1}$ ), Merck s.r.o, Německo.
- Certipur® Selen ICP Standard;  $c = 990 \pm 8 \text{ mg.kg}^{-1}$  (1 000  $\text{mg.l}^{-1}$ ), Merck s.r.o, Německo.
- Certipur® Ruthenium ICP Standard;  $c = 968 \pm 8 \text{ mg.kg}^{-1}$  (1 000  $\text{mg.l}^{-1}$ ), Merck s.r.o, Německo.
- Certipur® Rhodium ICP Standard;  $c = 988 \pm 6 \text{ mg.kg}^{-1}$  (1 000  $\text{mg.l}^{-1}$ ), Merck s.r.o, Německo.
- Certipur® Paladium ICP Standard;  $c = 984 \pm 5 \text{ mg.kg}^{-1}$  (1 000  $\text{mg.l}^{-1}$ ), Merck s.r.o, Německo.
- Certipur® Stříbro ICP Standard;  $c = 987 \pm 5 \text{ mg.kg}^{-1}$  (1 000  $\text{mg.l}^{-1}$ ), Merck s.r.o, Německo.
- Certipur® Kadmium ICP Standard;  $c = 988 \pm 5 \text{ mg.kg}^{-1}$  (1 000  $\text{mg.l}^{-1}$ ), Merck s.r.o, Německo.
- Certipur® Osmium ICP Standard;  $c = 964 \pm 5 \text{ mg.kg}^{-1}$  (1 000  $\text{mg.l}^{-1}$ ), Merck s.r.o, Německo.
- Certipur® Iridium ICP Standard;  $c = 969 \pm 8 \text{ mg.kg}^{-1}$  (1 000  $\text{mg.l}^{-1}$ ), Merck s.r.o, Německo.
- Certipur® Platina ICP Standard;  $c = 963 \pm 5 \text{ mg.kg}^{-1}$  (1 000  $\text{mg.l}^{-1}$ ), Merck s.r.o, Německo.
- Certipur® Zlato ICP Standard;  $c = 969 \pm 4 \text{ mg.kg}^{-1}$  (1 000  $\text{mg.l}^{-1}$ ), Merck s.r.o, Německo.
- Certipur® Rtuť ICP Standard;  $c = 947 \pm 8 \text{ mg.kg}^{-1}$  (1 000  $\text{mg.l}^{-1}$ ), Merck s.r.o, Německo.
- Certipur® Thallium ICP Standard;  $c = 988 \pm 4 \text{ mg.kg}^{-1}$  (1 000  $\text{mg.l}^{-1}$ ), Merck s.r.o, Německo.
- Certipur® Olovo ICP Standard;  $c = 987 \pm 6 \text{ mg.kg}^{-1}$  (1 000  $\text{mg.l}^{-1}$ ), Merck s.r.o, Německo.
- Jednoprvkový kalibrační roztok ASTASOL® Skandium;  $c = 1\,000 \pm 2 \text{ mg.l}^{-1}$  ve 2 %  $\text{HNO}_3$ , Analytika spol. s.r.o., Praha.
- Jednoprvkový kalibrační roztok ASTASOL® Yttrium;  $c = 1\,000 \pm 2 \text{ mg.l}^{-1}$  ve 2 %  $\text{HNO}_3$ , Analytika spol. s.r.o., Praha.
- Jednoprvkový kalibrační roztok ASTASOL® Indium;  $c = 1\,000 \pm 2 \text{ mg.l}^{-1}$  ve 2 %  $\text{HNO}_3$ , Analytika spol. s.r.o., Praha.
- Jednoprvkový kalibrační roztok ASTASOL® Bismut;  $c = 1\,000 \pm 2 \text{ mg.l}^{-1}$  ve 5 %  $\text{HNO}_3$ , Analytika spol. s.r.o., Praha.
- Víceprvkový kalibrační roztok ASTASOL – MIX; Bi, In, Sc, Tb, Y;  $c = 10 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ , Analytika spol. s.r.o., Praha.

- Ladicí roztok pro ICP-MS (7500 Series PA Tuning 1); As, Be, Cd, Zn;  $c = 20 \text{ mg.l}^{-1}$ , Mg, Ni, Pb;  $c = 10 \text{ mg.l}^{-1}$ , Al, Ba, Bi, Co, Cr, Cu, In, Li, Lu, Mn, Na, Sc, Sr, Th, Tl, U, V;  $c = 5 \text{ mg.l}^{-1}$ , Y, Yb;  $c = 2,5 \text{ mg.l}^{-1}$ , Agilent Technologies, USA.
- Ladicí roztok pro ICP-MS (7500 Series PA Tuning 2); Ge, Mo, Pd, Ru, Sb, Sn;  $c = 10 \text{ mg.l}^{-1}$ , Ir, Ti;  $c = 5 \text{ mg.l}^{-1}$ , Agilent Technologies, USA.
- Ladicí roztok pro ICP-MS; Ce, Co, Li, Tl, Y;  $c = 10 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ , Agilent Technologies, USA.
- Kyseliny dusičná Analpure®, 69 %, Analytika spol. s.r.o., Praha.
- Kyseliny chloristá Analpure®, 68 %, Analytika spol. s.r.o., Praha.
- Kyseliny chlorovodíková Analpure®, 36 %, Analytika spol. s.r.o., Praha.

### 3.1.2 Přístroje

- Agilent 7700x ORS-ICP-MS, Agilent Technologies, Japonsko
- Analyte G2 LA systém s ArF excimerovým laserem, Photon Machines, USA
- Milestone MLS 1200 Mega mikrovlnný rozkladný systém, Milestone, Itálie
- NK200-1B koncentrátor vzorku, Hangzhou Miu Instruments Co., Ltd., Čína
- Hydraulický lis do 15 tun, GRASEBY SPECAC.
- Laboratorní kulový vibrační mlýnek Pulverisette 21, Fritsch, Německo.
- Elektronické váhy Mettler Toledo New Classic MS, Mettler Toledo, Švýcarsko
- Přístroj na přípravu deionizované vody, Milli-Q® Reference systém, Millipore, Francie

### 3.1.3 Pomůcky

- Skleněné a plastové laboratorní nádobí
- Automatické pipety, špičky na automatické pipety
- Teflonové kelímky na rozklad s teflonovými víčky
- Achátová třecí miska
- Sada na lisování tablet
- Mikroskopická sklíčka

Veškeré plastové i skleněné nádobí, použité k přípravě standardů a vzorků, bylo před použitím ponecháno v 10 % kyselině dusičné po dobu 24 hodin. Poté bylo několikrát promyto deionizovanou vodou, vysušeno v sušárně a skladováno v uzavíratelných plastových sáčcích, kvůli zabránění kontaminace okolním prostředím.

### 3.1.4 Analyzované farmaceutické látky

Validace stanovení prvkových nečistot pomocí LA-ICP-MS byla provedena na 14 různých farmaceutických materiálech, a to 9 různých účinných farmaceutických substancí (API 1, API 2, API 3, API 4, API 5, API 6, API 7, API 8, API 9), 3 vstupních surovinách (VS 1, VS 2, VS 3) a 2 finálních farmaceutických produktech (FIN 1, FIN 2) s doporučenou denní dávkou menší než 2,0 g.

### 3.1.5 LA-ICP-MS a ICP-MS

Pro LA-ICP-MS stanovení prvkových nečistot bylo využito laserového ablačního systému Analyte G2 vybaveného nanosekundovým ArF excimerovým laserem s vlnovou délkou 193 nm, dvou objemovou ablační komorou HelEx II a barevnou CCD kamerou v HD rozlišení. K propojení LA s 7700x ORS-ICP-MS bylo využito Tygon® hadičky (4 mm × 1.2 m). ORS-ICP-MS byl vybaven oktapólovou kolizně-reakční celou pracující v heliovém modu pro potlačení spektrálních interferencí. Pro ověření koncentrace a homogenity kalibračních standardů s přizpůsobenou maticí bylo využito roztokové ICP-MS analýzy po předchozím mikrovlnném rozkladu v rozkladném systému MLS 1200 Mega. Před vlastní LA-ICP-MS analýzou byla provedena optimalizace parametrů LA (energie laseru, frekvence, průtoky nosných plynů) a ORS-ICP-MS (optimalizace průtoku kolizního plynu skrze kolizně-reakční celou). Optimalizované parametry nastavení LA-ICP-MS jsou uvedeny v tabulce (Tab. V).

#### Optimalizace energie laseru

Pro jednotlivé matrice byla testována energie laseru, a to v rozmezí 10–100 % po 10 %. Pro optimalizaci byla připravena sada kalibračních standardů s přizpůsobenou maticí o koncentraci 10  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Optimalizace se prováděla s velikostí laserového paprsku 150  $\mu\text{m}$ , rychlostí posunu 150  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , frekvencí 10 Hz a průtokem He kolizně-reakční celou 2,0  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Optimalizace probíhala 90 sekund, z čehož prvních 10 sekund a posledních 30 sekund byla sbíraná data pozadí.

#### Optimalizace průtoku He kolizně-reakční celou

Pro optimalizaci byl testován průtok He kolizně-reakční celou, a to v rozmezí od 0,0-3,5  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  po 0,5  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Pro optimalizaci byl využito ablance kalibračního standardu s přizpůsobenou maticí (VS1) o koncentraci 10  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Optimalizace se prováděla s velikostí

laserového paprsku 150  $\mu\text{m}$ , rychlostí posunu 150  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , frekvencí 10 Hz a optimalizovanou energií laseru 40 %. Optimalizace probíhala 90 sekund, z čehož prvních 10 sekund a posledních 30 sekund byla sbíraná data pozadí.

Tab. V Parametry nastavení měření

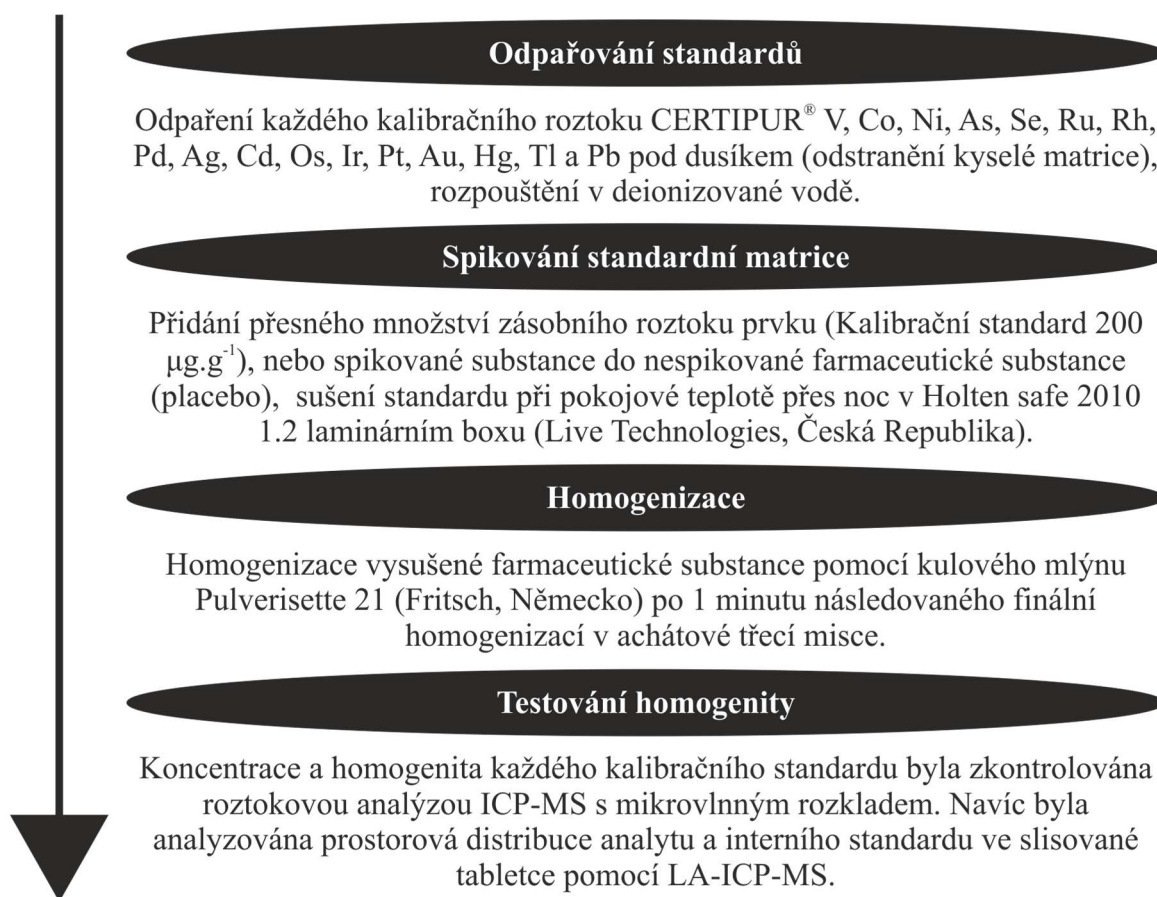
	LA-ICP-MS	Roztoková ICP-MS
Hustota zářivé energie laseru ( $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	4,24	-
Frekvence (Hz)	20	
Ablační mód	liniový sken	-
Průměr laserového paprsku ( $\mu\text{m}$ )	150	
Rychlost pohybu vzorku ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )	150	
Vzdálenost mezi liniemi ( $\mu\text{m}$ )	10	-
Nosný plyn He ( $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ )	0,65	-
Příkon RF generátoru (W)	1 200	1 550
Vnější plazmový plyn ( $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ )	15,0	15,0
Středního plazmový plyn ( $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ )	0,9	0,9
pomocný/nosný plazmový plyn ( $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ )	0,75	1,1
Integrační čas prvkových nečistot (ms)	40	100 (mimo Se $\rightarrow$ 300)
Integrační čas interních standardů (ms)	10	100
Měření izotopy	$^{45}\text{Sc}$ , $^{51}\text{V}$ , $^{59}\text{Co}$ , $^{60}\text{Ni}$ , $^{75}\text{As}$ , $^{78}\text{Se}$ , $^{89}\text{Y}$ , $^{101}\text{Ru}$ , $^{103}\text{Rh}$ , $^{105}\text{Pd}$ , $^{107}\text{Ag}$ , $^{111}\text{Cd}$ , $^{115}\text{In}$ , $^{159}\text{Tb}$ , $^{189}\text{Os}$ , $^{193}\text{Ir}$ , $^{195}\text{Pt}$ , $^{197}\text{Au}$ , $^{202}\text{Hg}$ , $^{205}\text{Tl}$ , $^{208}\text{Pb}$ , $^{209}\text{Bi}$	$^{45}\text{Sc}$ , $^{51}\text{V}$ , $^{59}\text{Co}$ , $^{60}\text{Ni}$ , $^{75}\text{As}$ , $^{78}\text{Se}$ , $^{89}\text{Y}$ , $^{101}\text{Ru}$ , $^{103}\text{Rh}$ , $^{105}\text{Pd}$ , $^{107}\text{Ag}$ , $^{111}\text{Cd}$ , $^{115}\text{In}$ , $^{159}\text{Tb}$ , $^{189}\text{Os}$ , $^{193}\text{Ir}$ , $^{195}\text{Pt}$ , $^{197}\text{Au}$ , $^{202}\text{Hg}$ , $^{205}\text{Tl}$ , $^{208}\text{Pb}$ , $^{209}\text{Bi}$
Průtok He kolizně-reakční celou ( $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ )	2,0	4,3

### **3.2 Příprava vzorků pro ICP-MS s laserovou ablací**

Naváží se přesně asi 100 mg vzorku (kalibrační standard s přizpůsobenou maticí, API, VS, FIN atd.), rozdrtí se to v achátové třecí misce s tloučkem, přidá se 10 % hmotnosti prášku placebo, které obsahuje interní standardy (Sc, Y, In a Bi) o koncentraci  $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  a provede se homogenizace. Poté se z homogenizovaného materiálu lisují tabletky o průměru 12 mm při tlaku 10 t po dobu 1 minuty. Takto připravené vzorky jsou následně přímo analyzovány pomocí LA-ICP-MS.

### **3.3 Příprava kalibračních standardů s přizpůsobenou maticí pro LA-ICP-MS**

Pro kvantitativní LA-ICP-MS stanovení prvkových nečistot ve farmaceutických produktech byla připravena sada 7 kalibračních standardů s přizpůsobenou maticí. Provádí se analýza 7 vzorků o koncentracích 0 (blank); 1; 5; 10; 25; 50; 100 a  $200 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  pro Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt. Postup přípravy kalibračních standardů s přizpůsobenou maticí a následného ověření koncentrace a homogenity je znázorněn na Obr. 11.



Obr. 11 Postup přípravy kalibračních standardů s přizpůsobenou matricí

### **Ověření koncentrace a homogenity pomocí roztokové ICP-MS analýzy**

Pro ověření koncentrace a homogenity kalibračních standardů s přizpůsobenou matricí byly z každého standardu odebrány tři 50 mg navážky, které byly podrobeny mikrovlnnému rozkladu v systému MLS 1200 Mega. Koncentrace Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt v mineralizátech matričních standardů byly stanoveny pomocí validované ICP-MS metody, kdy validace zahrnovala následující validační parametry: linearitu, mez stanovitelnosti, správnost, přesnost, mezilehlou přesnost, specifitu, robustnost a rozsah.

### **Rozklad farmaceutických vzorků**

Navází se přesně asi 50 mg vzorku do teflonových nádobek a přidají se 4,0 ml koncentrované kyseliny dusičné, 1,0 ml kyseliny chloristé a 0,25 ml kyseliny chlorovodíkové. Teflonové nádobky se uzavřou teflonovými víčky a umístí se do mikrovlnného rozkladného systému Milestone MLS 1200 Mega. Pro mineralizaci byl použit již předem optimalizovaný program viz. Tab. VI. Po mineralizaci se převede vzniklý roztok

do 25 ml odměrných baněk a doplní se deionizovanou vodou po rysku. Po převedení vzorků se mineralizační kelímky několikrát promyjí deionizovanou vodou a po napipetování 3 ml 67 % kyseliny dusičné se provede kompletní proces mineralizace (čistící krok). Slepý vzorek připravuje se stejně jako reálné vzorky, kdy do mineralizačních kelímků je napipetována jen rozkladná směs kyselin.

Tab. VI Program pro rozklad vzorků (vlevo) a čistící krok (vpravo)

Krok č.	Doba trvání kroku (min)	Výkon (W)
1	10	250
2	2	0
3	5	400
4	2	0
5	10	600
6	2	0
7	10	600

Ventilace: 10 minut

Krok č.	Doba trvání kroku (min)	Výkon (W)
1	10	600

Ventilace: 5 minut

### Příprava kalibračních standardů, interního standardu a QC vzorku

Pro přípravu kalibračních roztoků pro roztokovou ICP-MS analýzu byly využity jednoprvkové vodné kalibrační roztoky Certipur® (Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt) s koncentrací 1,000 g/l. Pro přípravu kalibračních roztoků byly používány 10 a 25 ml skleněné odměrné baňky, pipetovací špičky a plastové kelímky předem předpřipravené pro stopovou analýzu prvků. Při přípravě bylo v jednom zředovacím kroku uplatněno maximálně 100 násobné ředění a finální roztoky byly okyseleny směsí kyseliny dusičné, chloristé a chlorovodíkové tak, aby koncentrace kyseliny v kalibračních roztocích odpovídala přídatku kyseliny k rozloženým vzorkům kalibračních standardů s přizpůsobenou maticí. Kalibrace pro ORS-ICP-MS stanovení prvkových nečistot se sestávala z 7 kalibračních roztoků o koncentraci 0; 0,5; 1; 10; 100; 250; 500  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  pro Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt. Roztok interního standardu o koncentraci 100  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  (Sc, Y, In, Yb, Bi) byl připraven 100 násobným ředěním zásobního roztoku interního standardu pro ICP-MS (INT MIX 1) s koncentrací 10  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Navíc pro kontrolu kvality naměřených



výsledků byl připraven roztok kontrolního vzorku (QC vzorek) o koncentraci 100  $\mu\text{g.l}^{-1}$ , který byl v průběhu ICP-MS analýzy opakovaně měřen (každá 10. analýzy).

### 3.4 Validace metody

Pro zdokonalení již validované metody ICP-MS byly validovány parametry linearita, mez stanovitelnosti, správnost, přesnost, mezilehlá přesnost, specifická, robustnost a rozsah.

Tab. VII Povolené koncentrační limity a jejich násobky [1, 2]

Prvek	Třída	PDE $\mu\text{g}/\text{den}$	30 % limitní koncentrace $\mu\text{g.g}^{-1}$	100 % limitní koncentrace $\mu\text{g.g}^{-1}$	150 % limitní koncentrace $\mu\text{g.g}^{-1}$
Cd	1	5	1	3	4
Pb	1	5	1	3	4
As	1	15	2	8	2
Hg	1	30	5	15	23
Co	2A	50	8	25	38
V	2A	100	15	50	75
Ni	2A	200	30	100	150
Tl	2B	8	1,2	4	6
Au	2B	100	15	50	75
Pd	2B	100	15	50	75
Ir	2B	100	15	50	75
Os	2B	100	15	50	75
Rh	2B	100	15	50	75
Ru	2B	100	15	50	75
Se	2B	150	23	75	113
Ag	2B	150	23	75	113
Pt	2B	100	15	50	75

Limitní koncentrace byly vypočteny pomocí rovnice (1).

### 3.4.1 Rovnice

#### Výpočet výtěžnosti

$$\text{Výtěžnost (\%)} = \frac{c_S - c_{US}}{c_A} * 100 \quad (2)$$

kde  $c_S$  je koncentrace analytu ve spikovaném vzorku ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ),  $c_{US}$  je koncentrace analytu ve nespikovaném vzorku ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) a  $c_A$  je spikované množství ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

#### Výpočet relativní směrodatné odchylky

$$\text{RSD (\%)} = \frac{\text{směrodatná odchylka}}{\text{aritmetický průměr}} 100 \quad (3)$$

### 3.4.2 Linearita

Provádí se analýza 7 vzorků o koncentracích 0 (blank); 1; 5; 10; 25; 50; 100 a 200  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  pro Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt. Vyhodnocuje se zda-li má kalibrační křivka lineární závislost a poté korelační koeficient (R).

Akceptační kritérium: Lineární závislost kalibrační křivky,  $R \geq 0,99$

### 3.4.3 Mez stanovitelnosti

Provádí se analýza 3 vzorků spikovaných Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt na koncentrační hladinu 30 % povoleného koncentračního limitu viz. Tab. VII. Vyhodnocuje se výtěžnost, která je vypočítaná pomocí rovnice (2).

Akceptační kritérium:  $\text{LOQ} \leq 30 \%$  limitní koncentrace, výtěžnost 70-150 %

### 3.4.4 Správnost (výtěžnost)

Provádí se analýza 3 vzorků spikovaných Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt na koncentrační hladinu 30; 100 a 150 % povoleného koncentračního limitu viz. Tab. VII. Vyhodnocuje se výtěžnost, která je vypočítaná pomocí rovnice (2).

Akceptační kritérium: výtěžnost 70-150 %.

### **3.4.5 Přesnost (opakovatelnost)**

Provádí se analýza 6 vzorků spikovaných Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt na koncentrační hladinu 100 % povoleného koncentračního limitu viz. Tab. VII. Vyhodnocuje se relativní směrodatná odchylka, která je vypočítaná pomocí rovnice (3).

Akceptační kritérium:  $RSD \leq 20 \%$

### **3.4.6 Přesnost (mezilehlá preciznost)**

Provádí se analýza 12 vzorků spikovaných Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt na koncentrační hladinu 100 % povoleného koncentračního limitu viz. Tab. VII. Poté je analýza zopakována jiný den, jiným analytikem či na jiném přístroji, anebo kombinací obojího. Vyhodnocuje se relativní směrodatná odchylka, která je vypočítaná pomocí rovnice (3).

Akceptační kritérium:  $RSD \leq 25 \%$

### **3.4.7 Specificita**

Provádí se analýza 3 vzorků spikovaných Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt na koncentrační hladinu 100 % povoleného koncentračního limitu viz. Tab. VII. Vyhodnocuje se výtěžnost, která je vypočítaná pomocí rovnice (2).

Akceptační kritérium: výtěžnost 70-150 %.

### **3.4.8 Robustnost**

Provádí se analýza 12 vzorků spikovaných Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt na koncentrační hladinu 100 % povoleného koncentračního limitu viz. Tab. VII. Poté je analýza zopakována jiný den, jiným analytikem či na jiném přístroji, anebo kombinací obojího. Vyhodnocuje se relativní směrodatná odchylka, která je vypočítaná pomocí rovnice (3).

Akceptační kritérium:  $RSD \leq 25 \%$

### **3.4.9 Rozsah**

Provádí se analýza 3 vzorků spikovaných Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt na koncentrační hladinu 30 a 150 % povoleného koncentračního limitu viz. Tab. VII. Vyhodnocuje se výtěžnost, která je vypočítaná pomocí rovnice (2).

Akceptační kritérium: výtěžnost 70-150 %.

### **3.4.10 Zajištění kvality měření**

V průběhu LA-ICP-MS měření se průběžně měří QC vzorek pro kontrolu stability kalibrace. U LA-ICP-MS se měří po každém 5. vzorku farmaceutického produktu kalibrační standard s přizpůsobenou maticí o koncentraci  $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  pro Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Validace metody

Validační parametry pro jednotlivé parametry pro validaci vychází z požadavků kapitol ICH-Q3D, USP <232> Prvkové nečistoty – Limity a USP <233> Prvkové nečistoty – Procedury. Stručný přehled validace je uveden v Tab. VIII.

Tab. VIII Validované parametry

Parametr	Akceptační kritérium	Vyhovuje akceptačnímu kritériu
Linearita	Lineární závislost, $R \geq 0,99$	✓
Mez stanovitelnosti (LOQ)	$LOQ \leq 0,3$ povoleného koncentračního limitu, výtěžnost 70-150 %	✓
Správnost (výtěžnost)	Výtěžnost 70-150 %	✓
Přesnost (opakovatelnost)	$RSD \leq 20 \%$	✓
Přesnost (mezilehlá preciznost)	$RSD$ pro 12 vzorků $\leq 25 \%$	✓
Specifická	Výtěžnost 70-150 %	✓
Robustnost	$RSD$ pro 12 vzorků $\leq 25 \%$	✓
Rozsah	Výtěžnost 70-150 %	✓

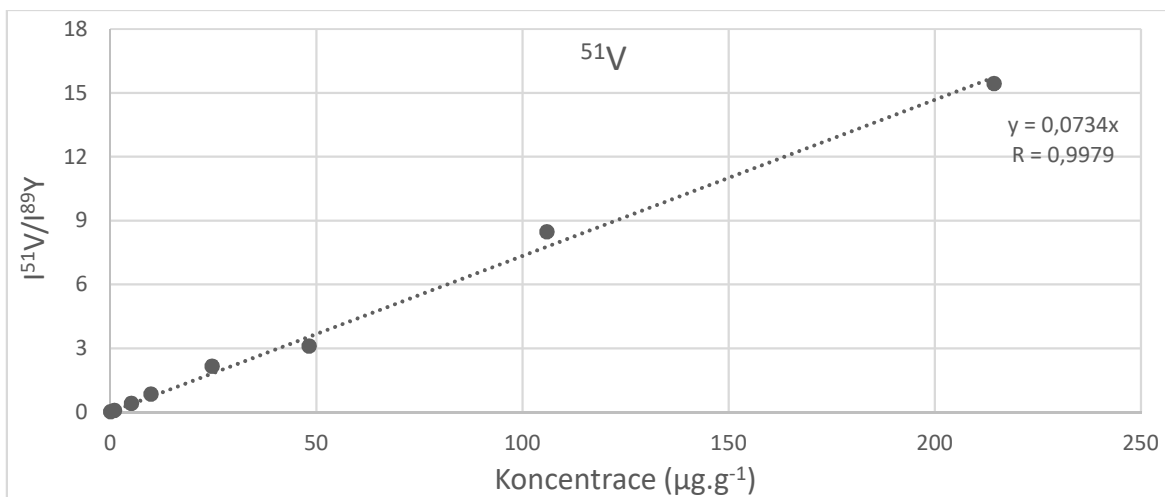
#### 4.1.1 Linearita

Měření bylo provedeno při koncentračních hladinách 0; 1; 5; 10; 25; 50; 100 a 200  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  pro Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt. Hodnoty korelačních koeficientů pro prvkové nečistoty jsou shrnuty v Tab. IX a kalibrační závislosti jsou prezentovány na Obr. 12 až Obr. 28.

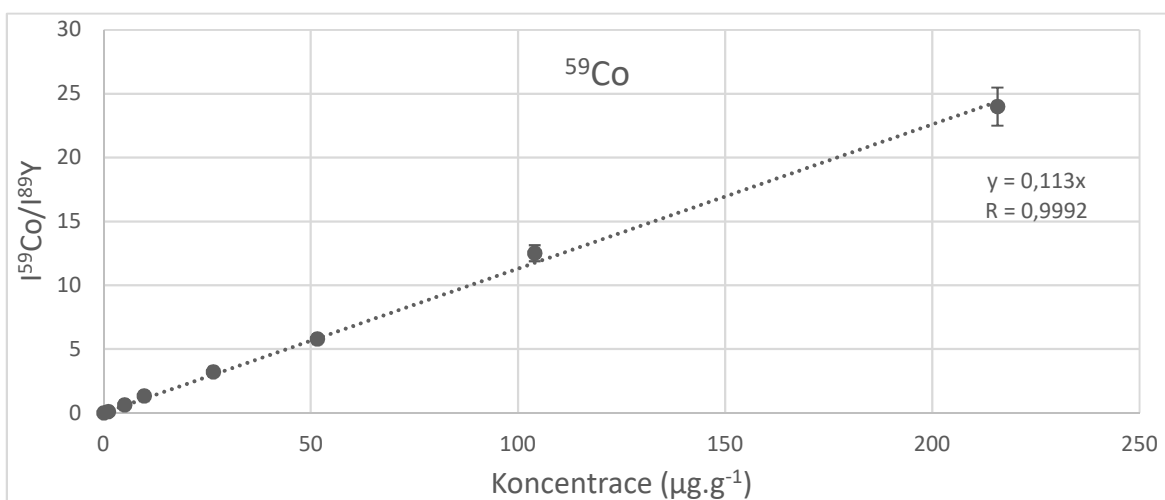
Akceptační kritérium: Lineární závislost kalibrační křivky,  $R \geq 0,99$

Tab. IX Linearita

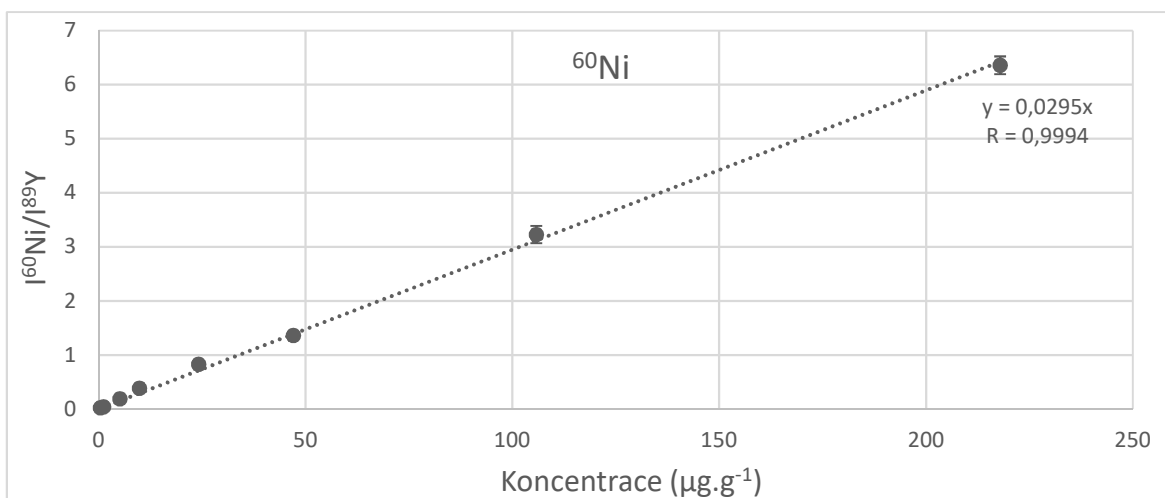
Prvek	Akceptační kritérium	Korelační koeficient (R)	Vyhovuje kritériu
<sup>51</sup> V	$R \geq 0,99$	0,9979	✓
<sup>59</sup> Co	$R \geq 0,99$	0,9992	✓
<sup>60</sup> Ni	$R \geq 0,99$	0,9994	✓
<sup>75</sup> As	$R \geq 0,99$	0,9991	✓
<sup>78</sup> Se	$R \geq 0,99$	0,9993	✓
<sup>101</sup> Ru	$R \geq 0,99$	0,9996	✓
<sup>103</sup> Rh	$R \geq 0,99$	0,9993	✓
<sup>105</sup> Pd	$R \geq 0,99$	0,9958	✓
<sup>107</sup> Ag	$R \geq 0,99$	0,9978	✓
<sup>111</sup> Cd	$R \geq 0,99$	0,9967	✓
<sup>189</sup> Os	$R \geq 0,99$	0,9963	✓
<sup>193</sup> Ir	$R \geq 0,99$	0,9936	✓
<sup>195</sup> Pt	$R \geq 0,99$	0,9977	✓
<sup>197</sup> Au	$R \geq 0,99$	0,9987	✓
<sup>202</sup> Hg	$R \geq 0,99$	0,9996	✓
<sup>205</sup> Tl	$R \geq 0,99$	0,9963	✓
<sup>208</sup> Pb	$R \geq 0,99$	0,9979	✓



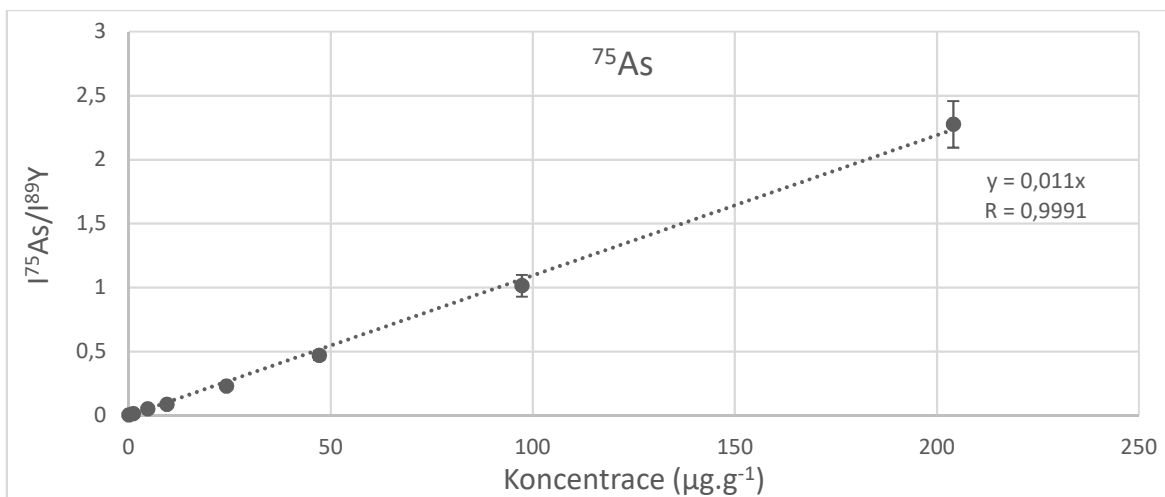
Obr. 12 Kalibrační křivka  $^{51}\text{V}$



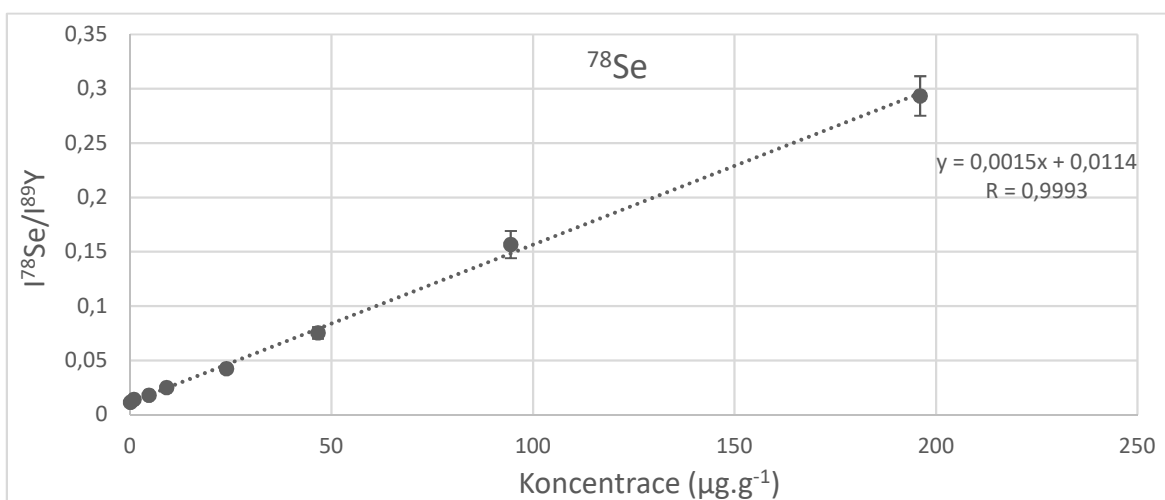
Obr. 13 Kalibrační křivka  $^{59}\text{Co}$



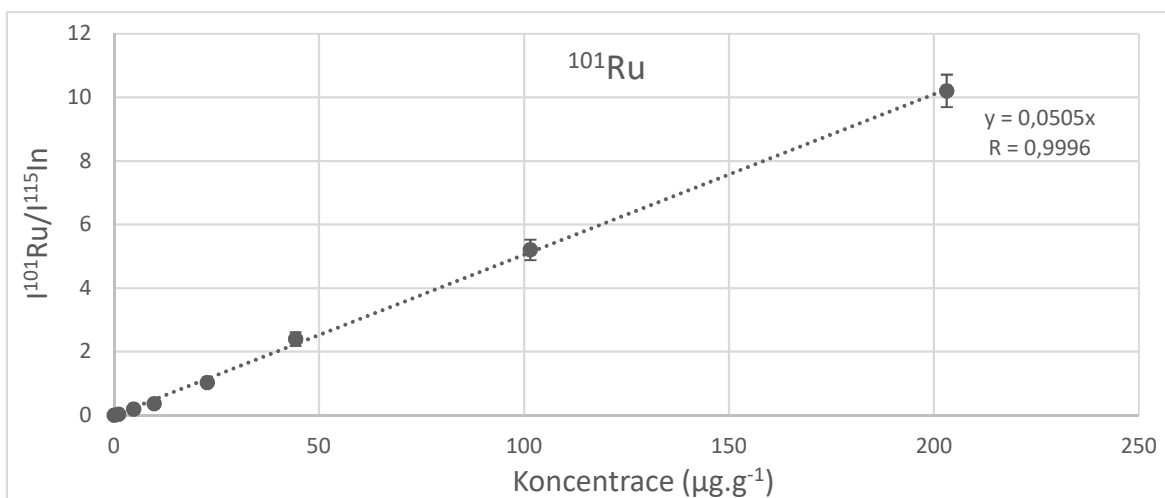
Obr. 14 Kalibrační křivka  $^{60}\text{Ni}$



Obr. 15 Kalibrační křivka  $^{75}\text{As}$

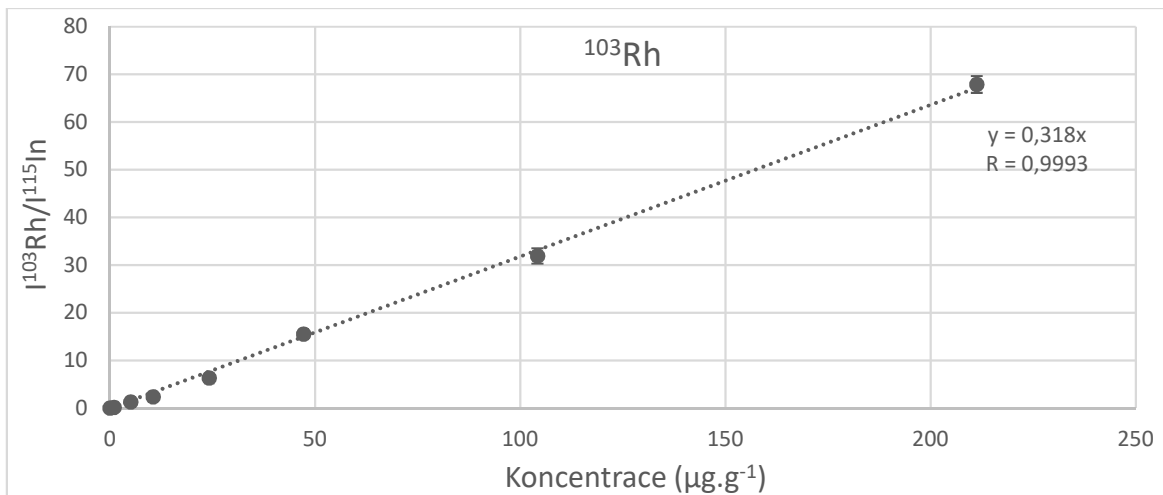


Obr. 16 Kalibrační křivka  $^{78}\text{Se}$

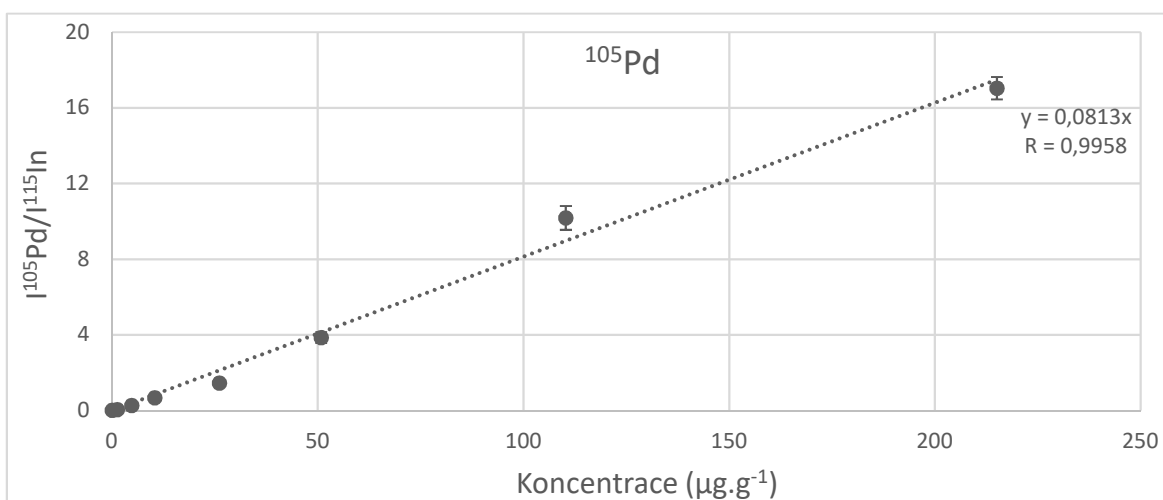


Obr. 17 Kalibrační křivka  $^{101}\text{Ru}$

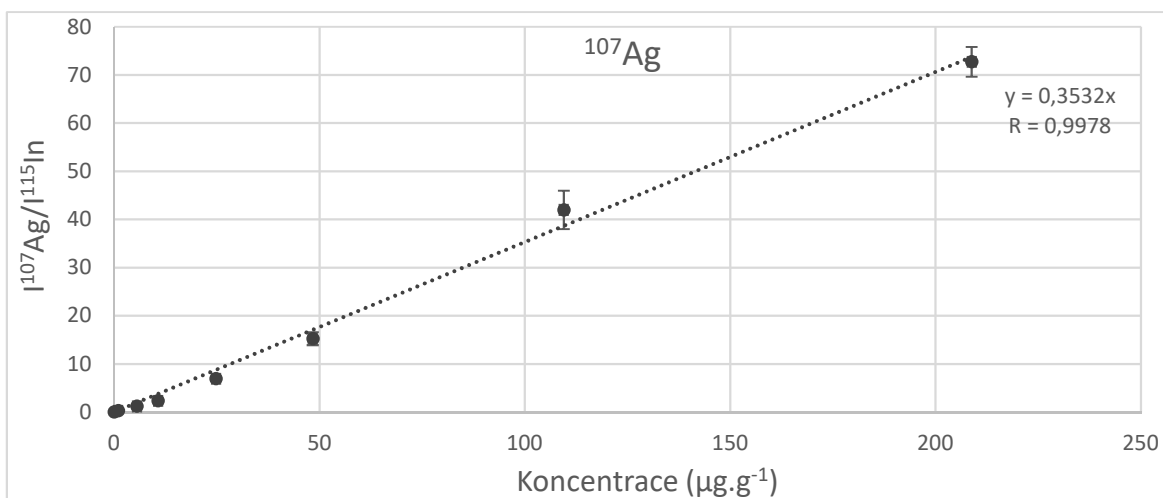




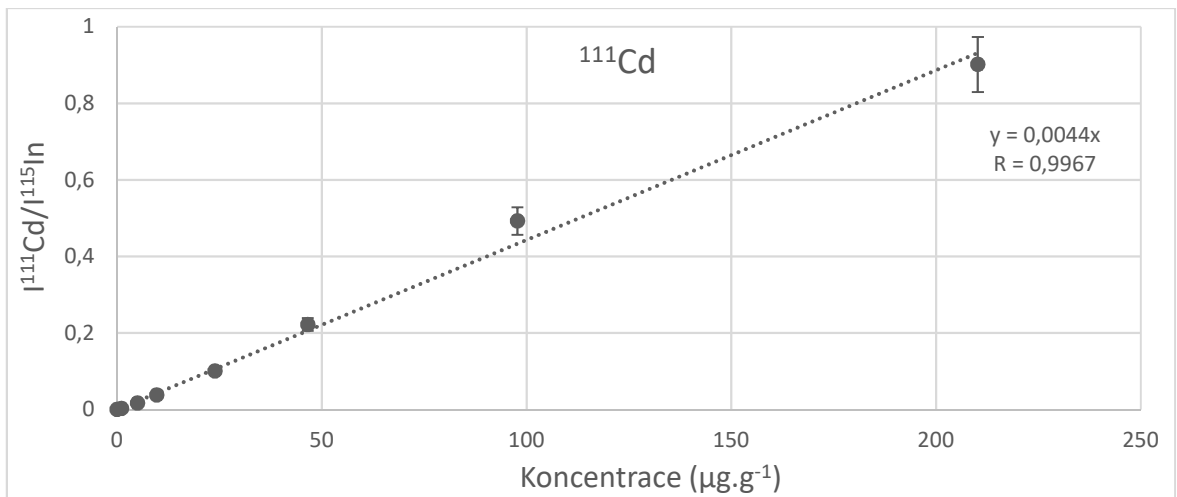
Obr. 18 Kalibrační křivka  $^{103}\text{Rh}$



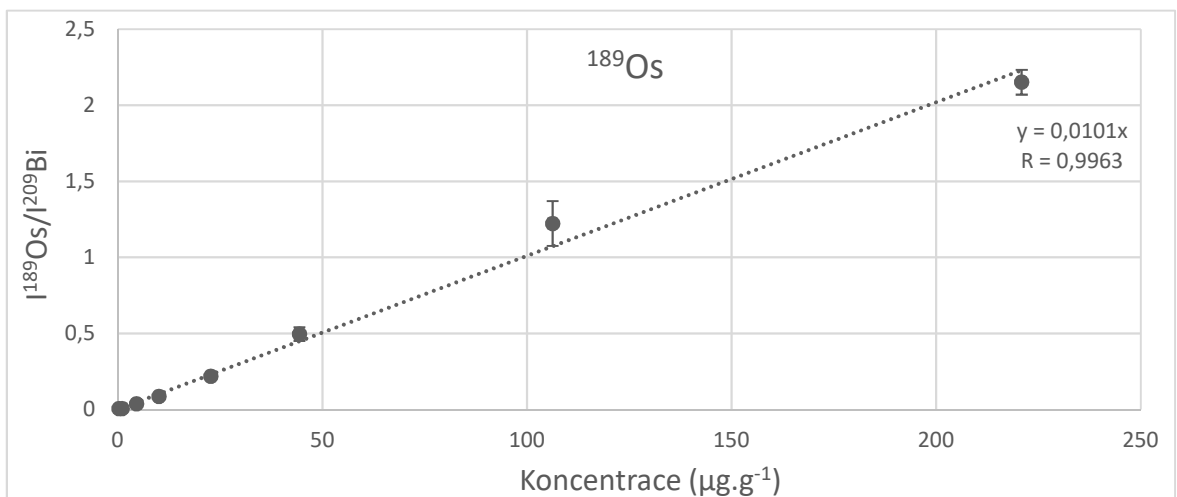
Obr. 19 Kalibrační křivka  $^{105}\text{Pd}$



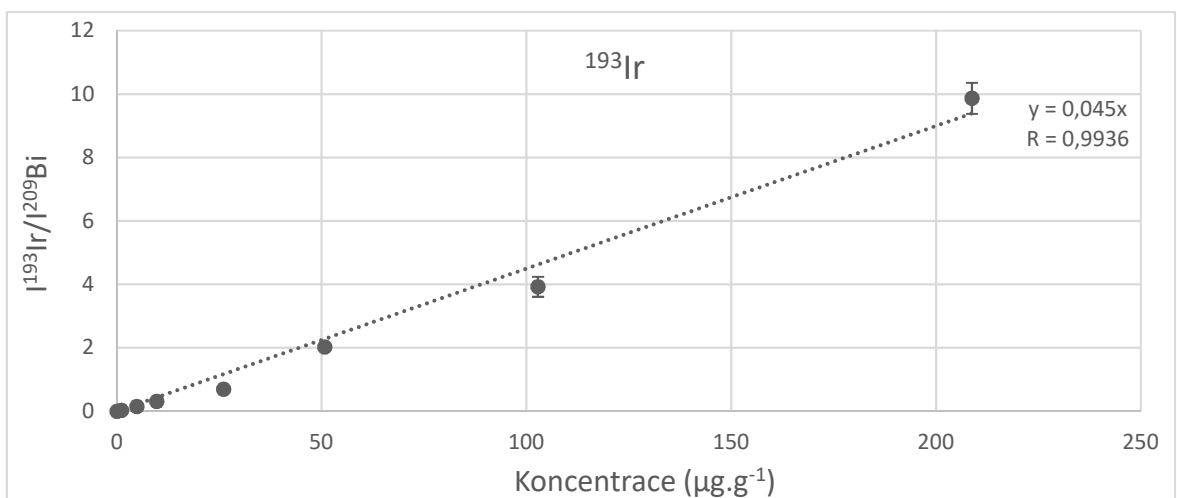
Obr. 20 Kalibrační křivka  $^{107}\text{Ag}$



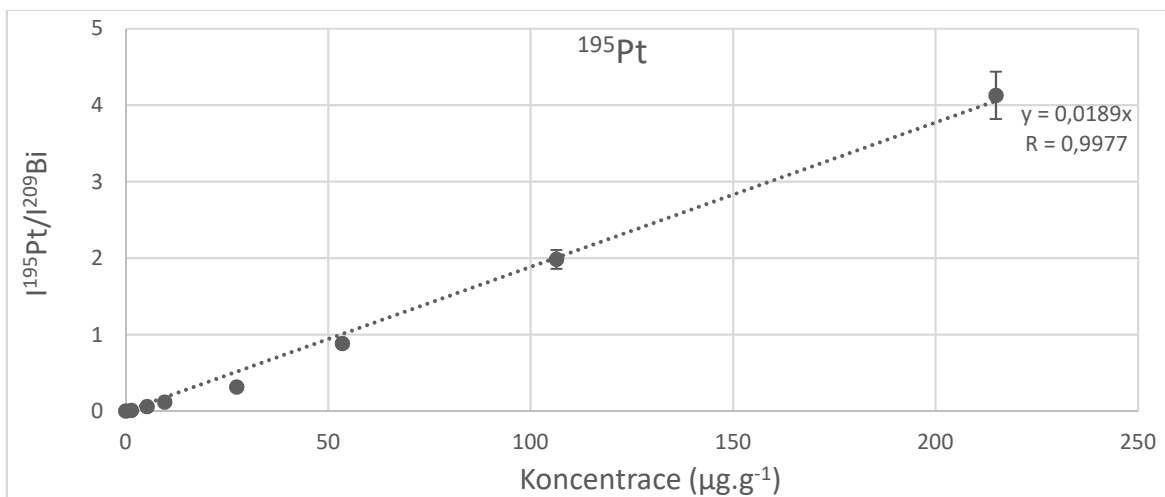
Obr. 21 Kalibrační křivka  $^{111}\text{Cd}$



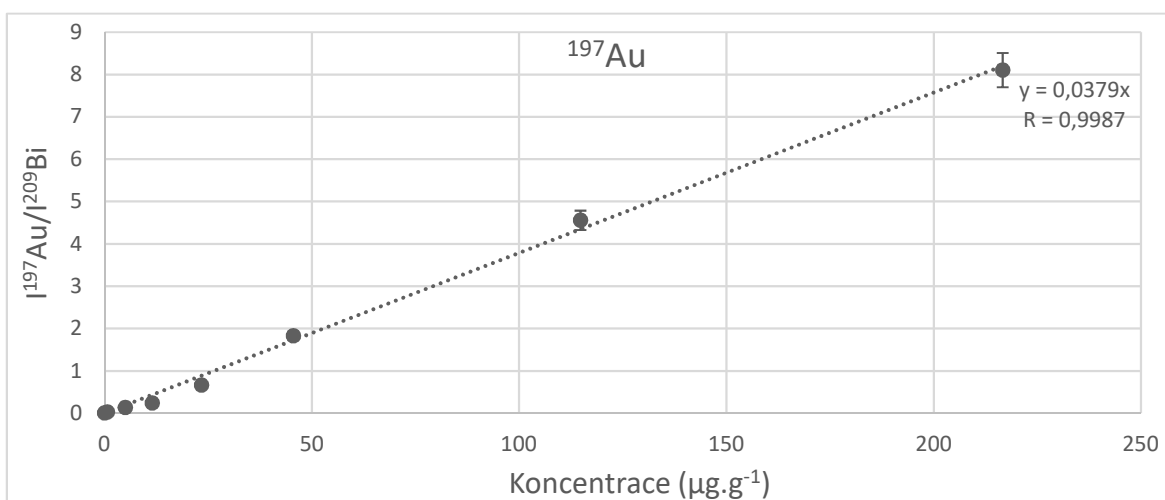
Obr. 22 Kalibrační křivka  $^{189}\text{Os}$



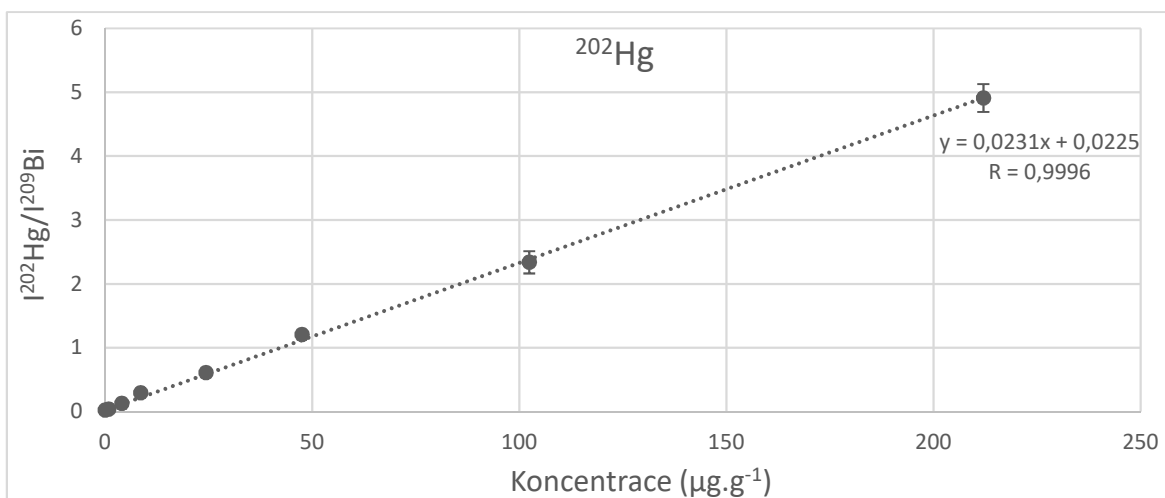
Obr. 23 Kalibrační křivka  $^{193}\text{Ir}$



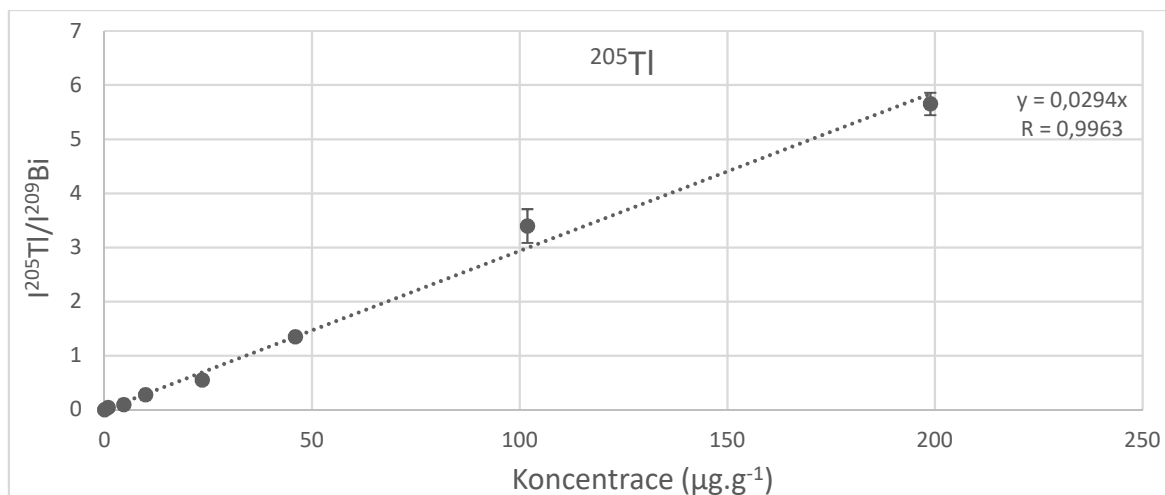
Obr. 24 Kalibrační křivka  $^{195}\text{Pt}$



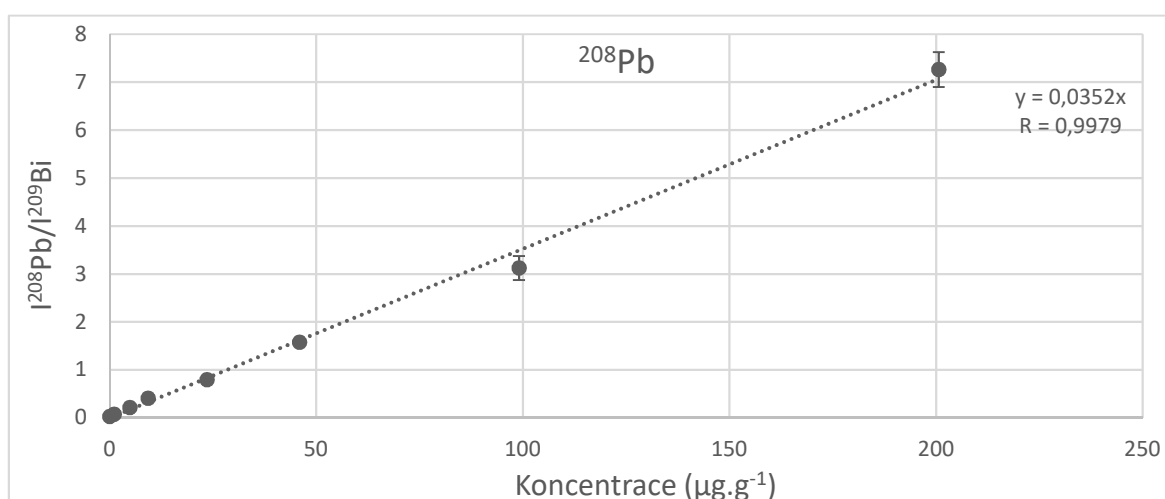
Obr. 25 Kalibrační křivka  $^{197}\text{Au}$



Obr. 26 Kalibrační křivka  $^{202}\text{Hg}$



Obr. 27 Kalibrační křivka  $^{205}\text{Tl}$



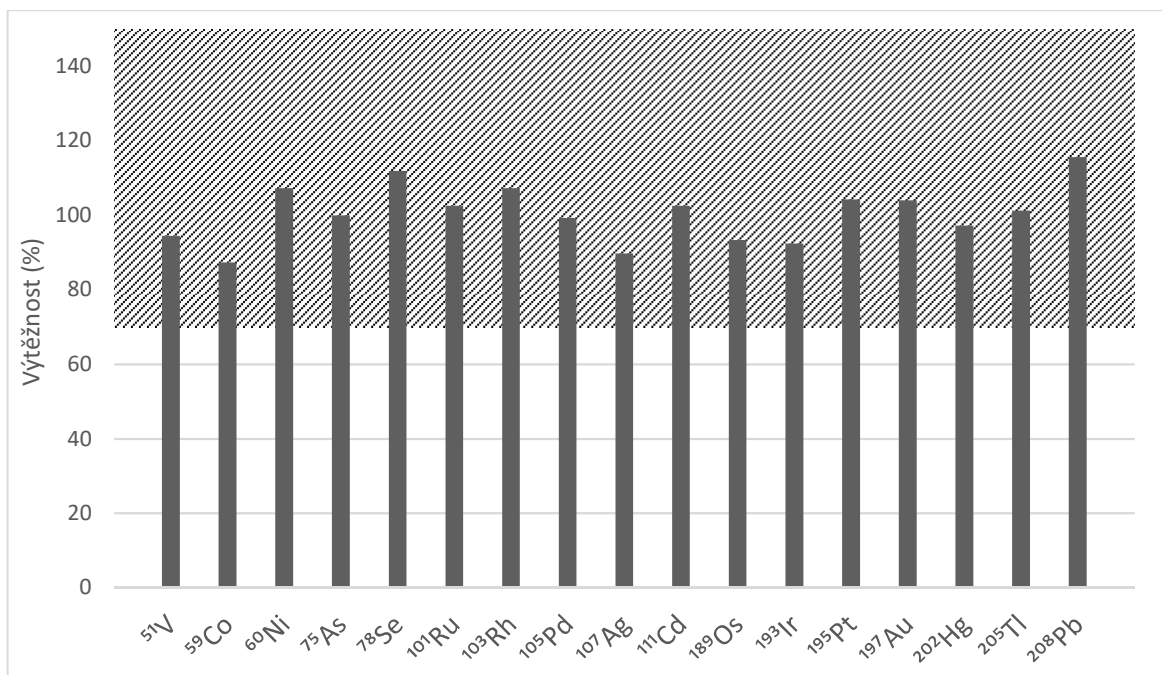
Obr. 28 Kalibrační křivka  $^{208}\text{Pb}$

**Závěr:** Akceptační kritérium splněno. Korelační koeficient se pohyboval od 0,9958 až do 0,9996 pro všechny kalibrační křivky (Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt).

#### 4.1.2 Mez stanovitelnosti (LOQ)

Měření bylo provedeno na 3 vzorcích spikovaných Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt na koncentrační hladinu 30 % povoleného koncentračního limitu. Hodnoty výtěžnosti jsou prezentovány na Obr. 29.

Akceptační kritérium:  $\text{LOQ} \leq 30\%$  limitní koncentrace, výtěžnost 70-150 %



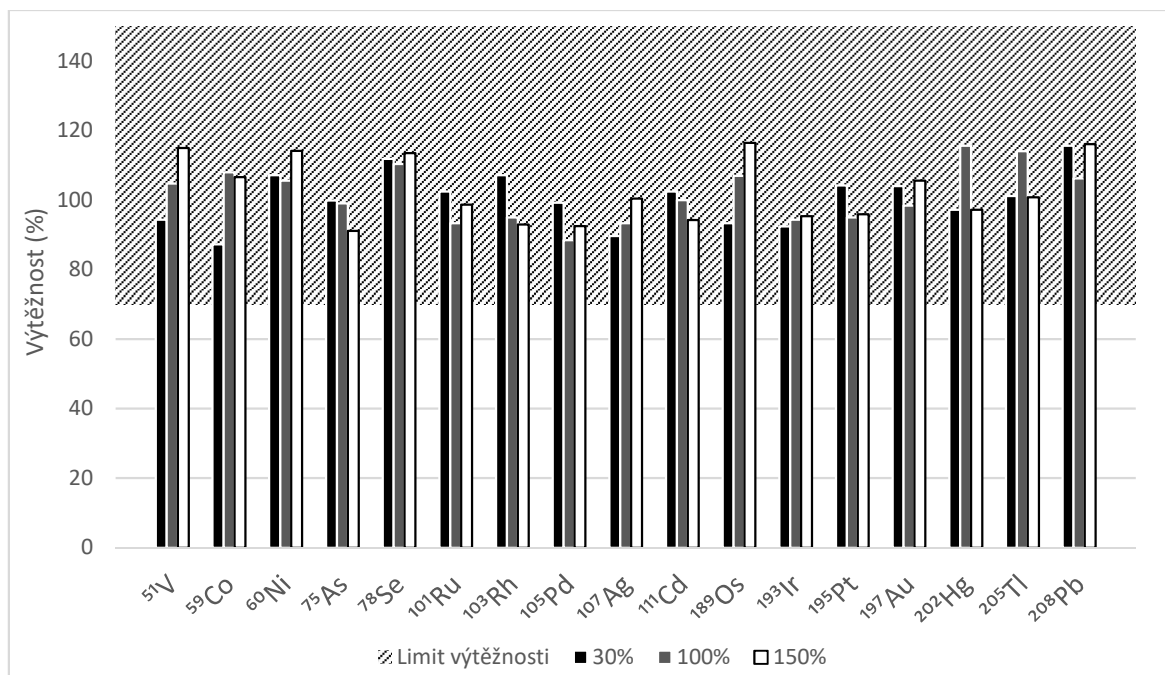
Obr. 29 Výtěžnost pro mez stanovitelnosti

**Závěr:** Akceptační kritérium splněno. Výtěžnost se pohybovala v rozmezí 87,3-115,6 % pro všechny prvkové nečistoty.

#### 4.1.3 Správnost (výtěžnost)

Měření bylo provedeno na 3 vzorcích spikovaných Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt na koncentrační hladinu 30, 100 a 150 % povoleného koncentračního limitu. Hodnoty výtěžnosti jsou prezentovány na Obr. 30.

Akceptační kritérium: výtěžnost 70-150 %.



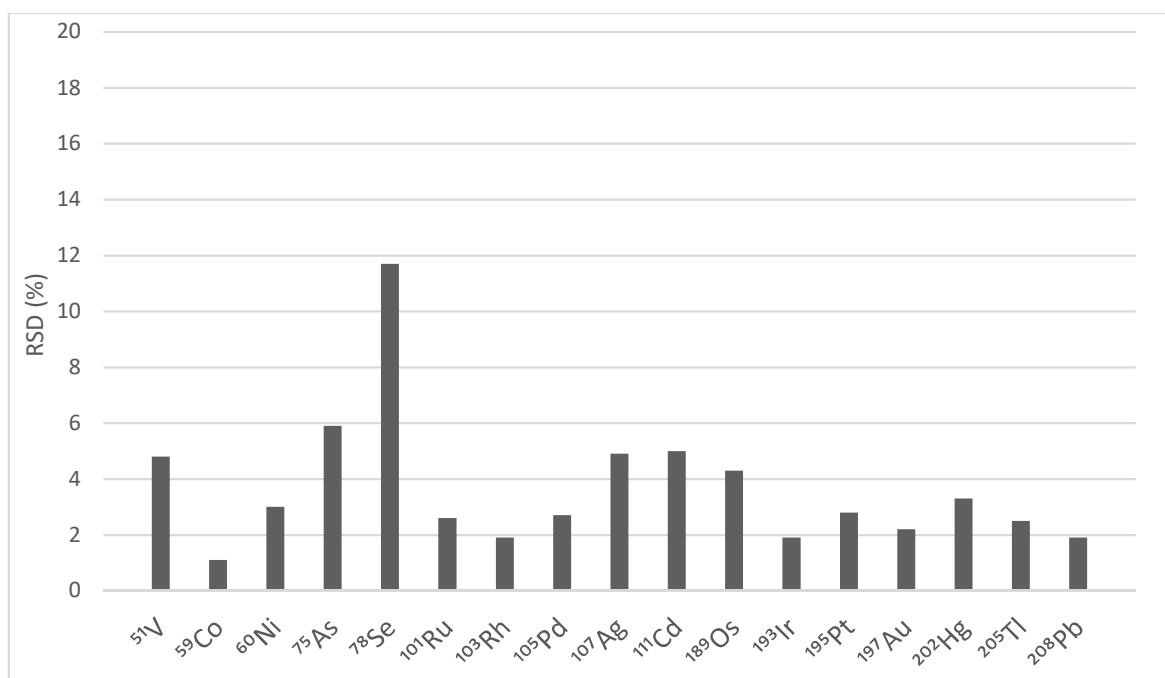
Obr. 30 Výtěžnost u správnosti (výtěžnosti)

**Závěr:** Akceptační kritérium splněno. Výtěžnost při 30 % povoleného koncentračního limitu se pohybovala v rozmezí 87,3-115,6 % pro všechny prvky. Výtěžnost při 100 % povoleného koncentračního limitu se pohybovala v rozmezí 88,5-115,6 % pro všechny prvky. Výtěžnost při 150 % povoleného koncentračního limitu se pohybovala v rozmezí 91,1-116,5 % pro všechny prvkové nečistoty.

#### 4.1.4 Přesnost (opakovatelnost)

Měření bylo provedeno na 6 vzorcích spikovaných Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt na koncentrační hladinu 100 % povoleného koncentračního limitu. Hodnoty RSD jsou prezentovány na Obr. 31.

Akceptační kritérium:  $RSD \leq 20 \%$



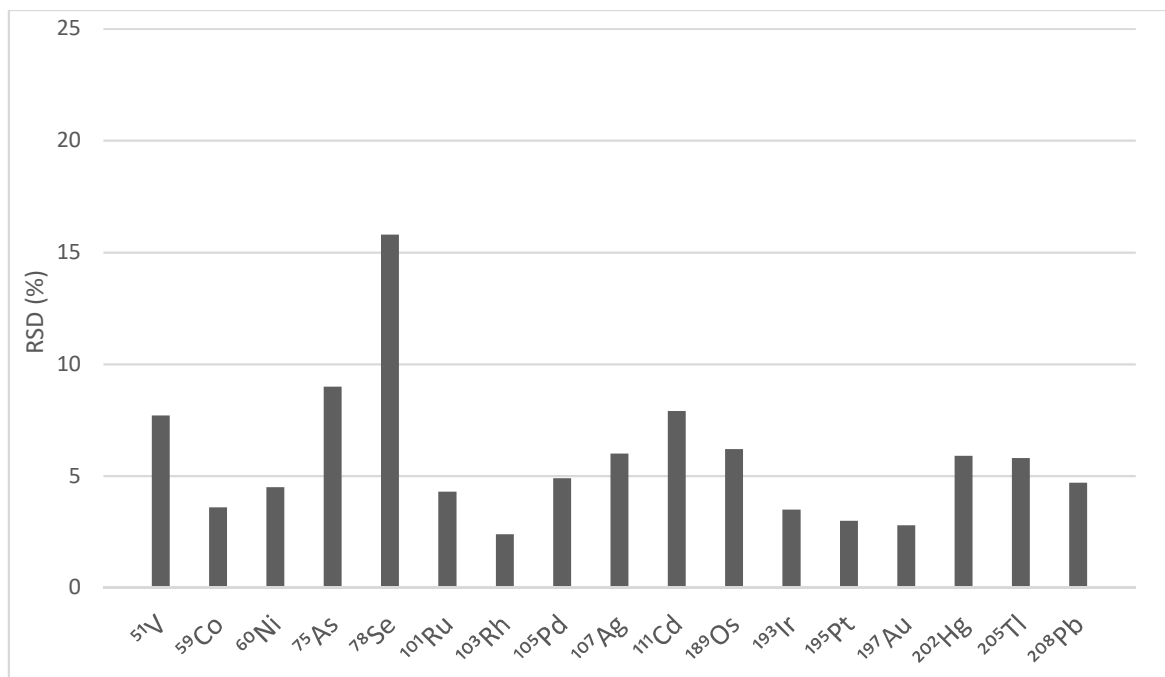
Obr. 31 Relativní směrodatná odchylka u přesnosti (opakovatelnosti)

**Závěr:** Akceptační kritérium splněno. Relativní směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí 1,1-11,7 % pro všechny prvkové nečistoty.

#### 4.1.5 Přesnost (mezilehlá preciznost)

Měření bylo provedeno na 12 vzorcích spikovaných Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt na koncentrační hladinu 100 % povoleného koncentračního limitu. Hodnoty RSD jsou prezentovány na Obr. 32.

Akceptační kritérium:  $RSD \leq 25 \%$



Obr. 32 Relativní směrodatná odchylka u přesnosti (mezilehlé preciznosti)

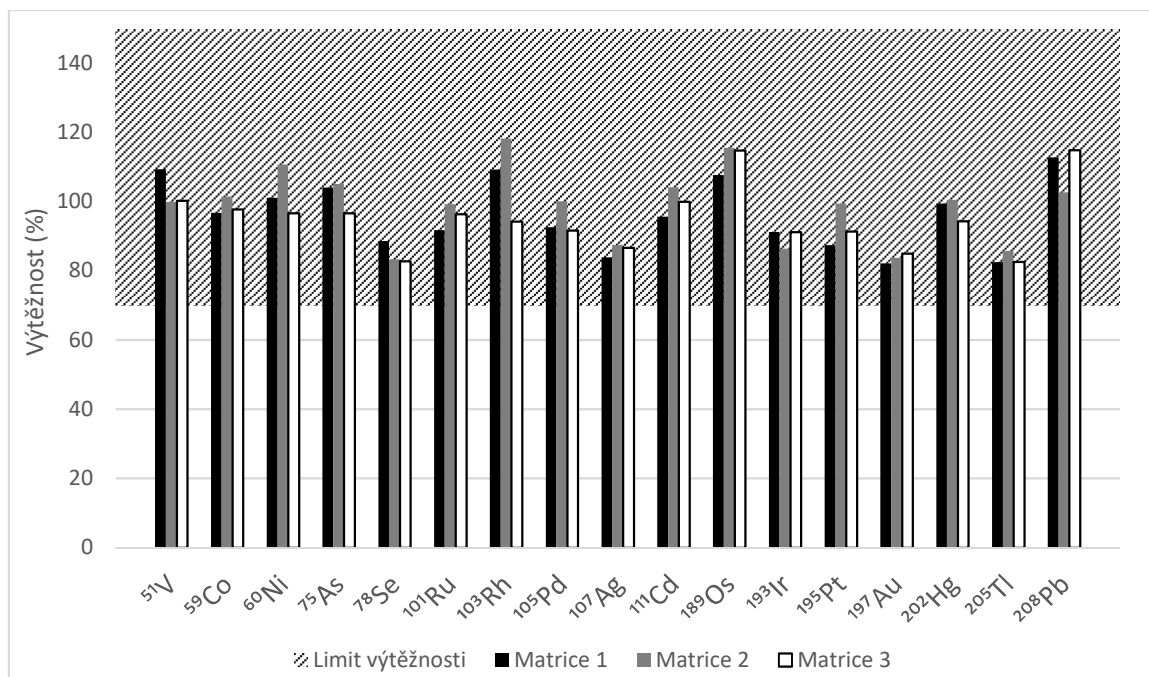
**Závěr:** Akceptační kritérium splněno. Relativní směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí 2,4-15,8 % pro všechny prvkové nečistoty.

#### 4.1.6 Specificita

Měření bylo provedeno na 3 vzorcích 3 různých matric spikovaných Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt na koncentrační hladinu 100 % povoleného koncentračního limitu. Hodnoty výtěžnosti jsou prezentovány na Obr. 33.

Akceptační kritérium: výtěžnost 70-150 %





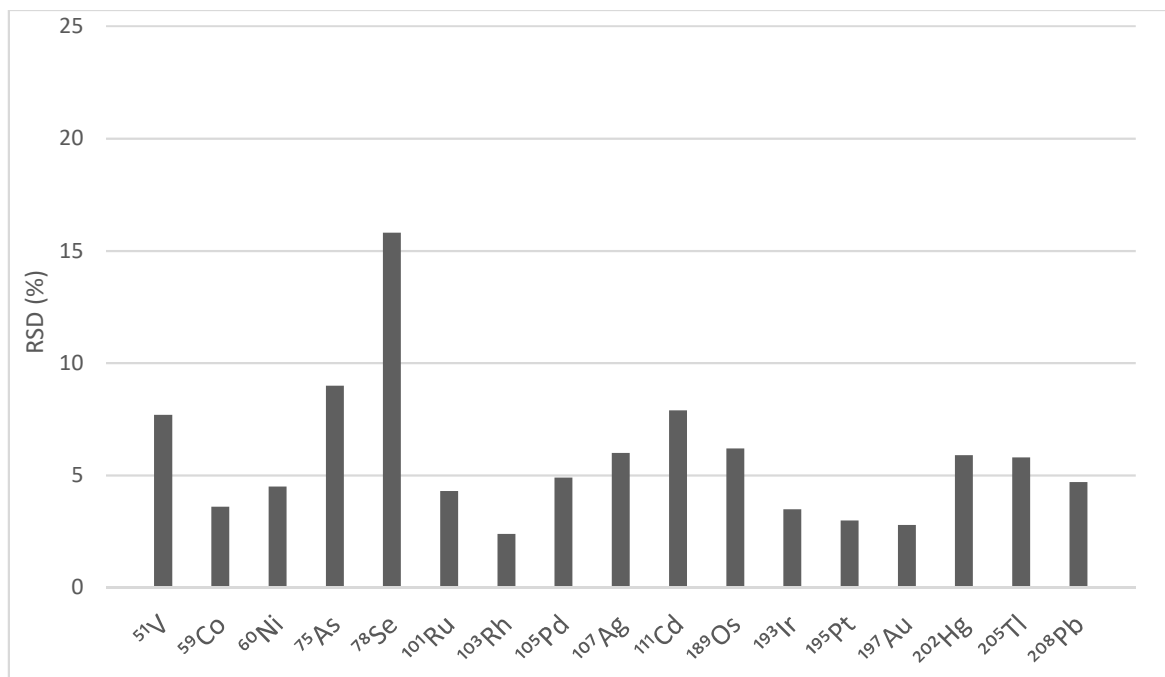
Obr. 33 Výtěžnost u specifacity

**Závěr:** Akceptační kritérium splněno. Pro matrici 1 se výtěžnost pohybovala v rozmezí 82,2-112,8 % pro všechny prvky. U matrice 2 byla výtěžnost v rozmezí 83,4-118,3 % pro všechny prvky. Pro matrici 3 se výtěžnost pohybovala v rozmezí 82,6-114,9 % pro všechny prvkové nečistoty.

#### 4.1.7 Robustnost

Měření bylo provedeno na 12 vzorcích spikovaných Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt na koncentrační hladinu 100 % povoleného koncentračního limitu. Poté je celá analýza zopakována jiný den, jiným pracovníkem na stejném přístroji. Hodnoty RSD jsou prezentovány na Obr. 34.

Akceptační kritérium:  $RSD \leq 25 \%$



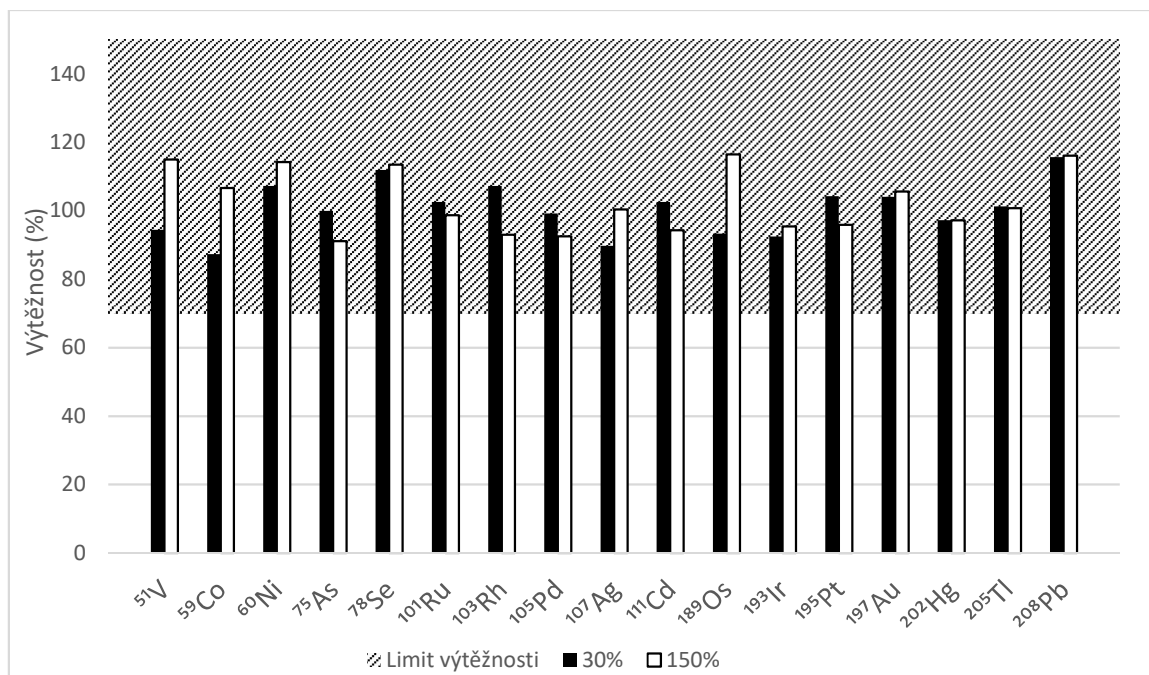
Obr. 34 Relativní směrodatná odchylka u robustnosti

**Závěr:** Akceptační kritérium splněno. Relativní směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí 2,4-15,8 % pro všechny prvky.

#### 4.1.8 Rozsah

Měření bylo provedeno na 3 vzorcích spikovaných Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt na koncentrační hladinu 30 a 150 % povoleného koncentračního limitu. Hodnoty výtěžnosti jsou prezentovány na Obr. 35.

Akceptační kritérium: výtěžnost 70-150 %



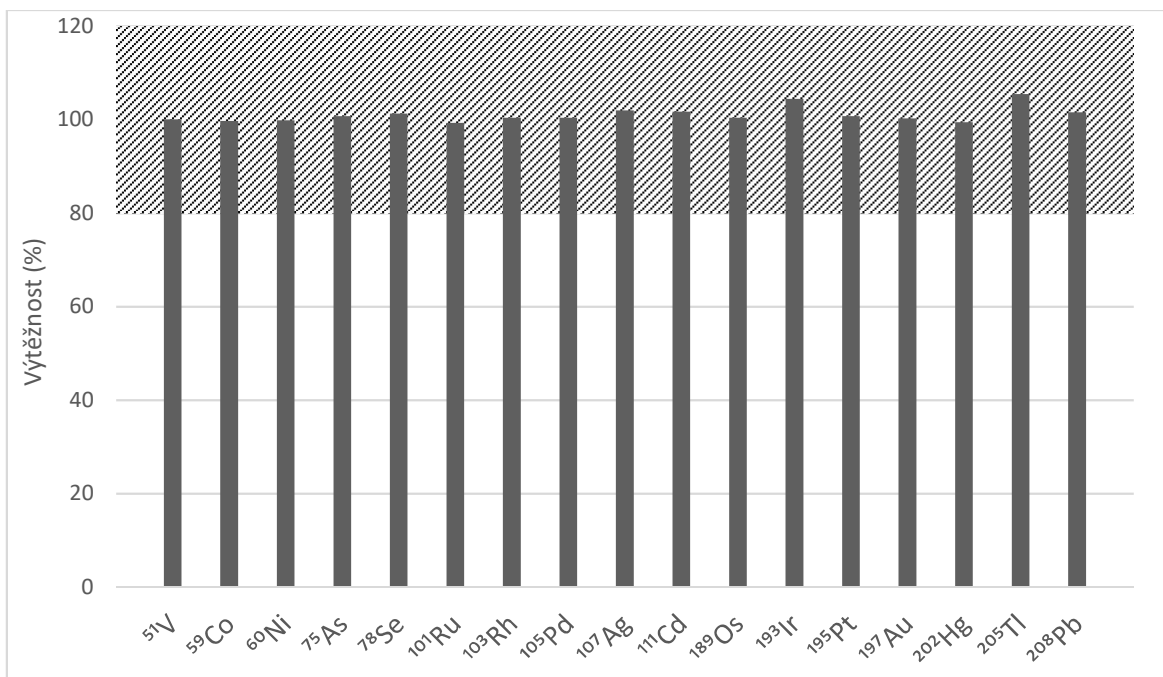
Obr. 35 Výtěžnost u rozsahu

**Závěr:** Akceptační kritérium splněno. Výtěžnost při 30 % povoleného koncentračního limitu se pohybovala v rozmezí 87,3-115,6 % pro všechny prvky. Výtěžnost při 150 % povoleného koncentračního limitu se pohybovala v rozmezí 91,1-116,5 % pro všechny prvkové nečistoty.

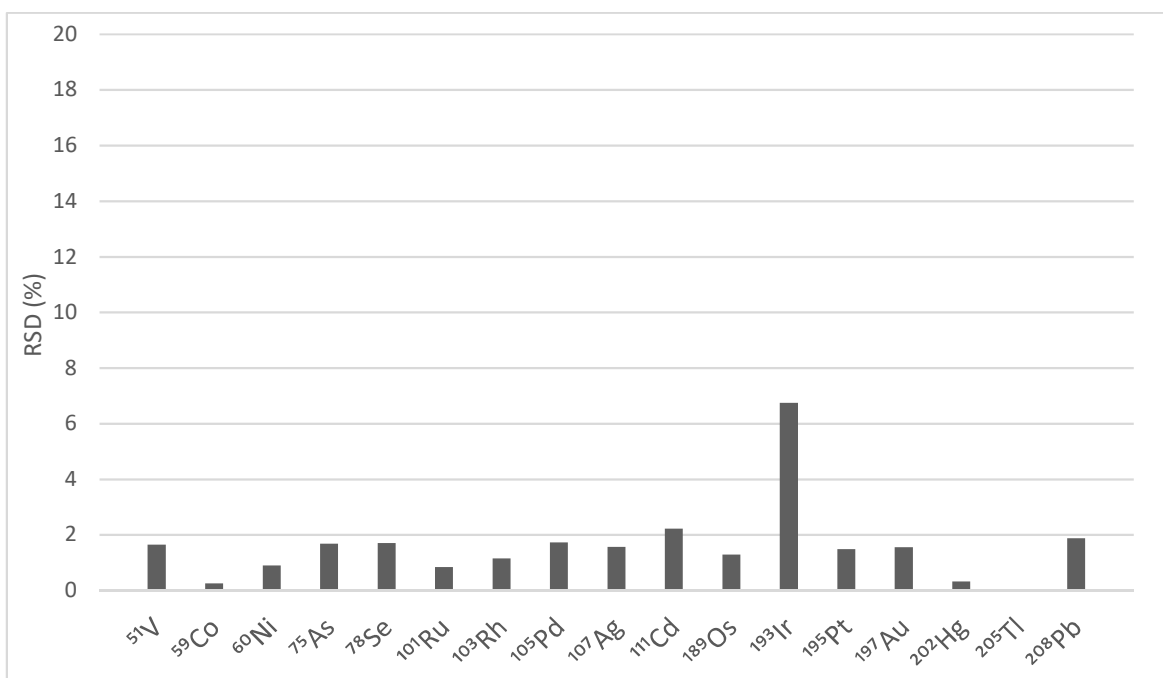
#### 4.1.9 Zajištění kvality měření

Měření QC vzorku probíhalo po každém 5. vzorku při koncentraci  $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  pro Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt. Hodnoty výtěžnosti a RSD jsou prezentovány na Obr. 36 a Obr. 37.

Akceptační kritérium: Výtěžnost 80-120 %, RSD  $\leq 20$  %



Obr. 36 Výtěžnost QC vzorku



Obr. 37 Relativní směrodatná odchylka QC vzorku

**Závěr:** Akceptační kritérium splněno. Výtěžnost QC vzorku se pohybovala v rozmezí 99,3-105,5 % pro všechny prvkové nečistoty. Relativní směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí 0,02-6,74 % pro všechny prvkové nečistoty.

## 4.2 Analýza prvkových nečistot v reálných vzorcích

Nově validovaná metoda LA-ICP-MS byla použita k analýze reálných vzorků a to 9 účinných farmaceutických látek (API 1-9), 3 vstupních surovin (VS 1-3) a 2 finálních farmaceutických produktů (FIN 1-2) s doporučenou denní dávkou 2 g/den. Výsledky LA-ICP-MS analýzy jsou shrnuty v Tab. X (účinné farmaceutické produkty), Tab. XI (vstupní suroviny) a Tab. XII (finální farmaceutické produkty)

Tab. X Výsledky LA-ICP-MS stanovení prvkových nečistot v účinných farmaceutických látkách (API 1-9).

Vzorek	API 1	API 2	API 3	API 4	API 5	API 6	API 7	API 8	API 9	
Koncentrace ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	<sup>51</sup> V	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>59</sup> Co	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>60</sup> Ni	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>75</sup> As	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>78</sup> Se	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>101</sup> Ru	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>103</sup> Rh	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>105</sup> Pd	< LOQ	<b>34,7</b>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>107</sup> Ag	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>111</sup> Cd	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>189</sup> Os	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>193</sup> Ir	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>195</sup> Pt	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>197</sup> Au	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>202</sup> Hg	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>205</sup> Tl	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
<sup>208</sup> Pb	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	

<LOQ – pod mezí stanovitelnosti

Tab. XI Výsledky LA-ICP-MS stanovení prvkových nečistot ve vstupních surovinách (VS 1-3).

Vzorek	VS 1	VS 2	VS 3	
Koncentrace ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	<sup>51</sup> V	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>59</sup> Co	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>60</sup> Ni	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>75</sup> As	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>78</sup> Se	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>101</sup> Ru	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>103</sup> Rh	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>105</sup> Pd	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>107</sup> Ag	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>111</sup> Cd	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>189</sup> Os	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>193</sup> Ir	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>195</sup> Pt	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>197</sup> Au	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>202</sup> Hg	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	<sup>205</sup> Tl	< LOQ	< LOQ	< LOQ
<sup>208</sup> Pb	< LOQ	< LOQ	< LOQ	

<LOQ – pod mezí stanovitelnosti

Tab. XII Výsledky LA-ICP-MS stanovení prvkových nečistot ve finálních farmaceutických produktech (FIN 1-2).

Vzorek		FIN 1	FIN 2
Koncentrace ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$^{51}\text{V}$	< LOQ	< LOQ
	$^{59}\text{Co}$	< LOQ	< LOQ
	$^{60}\text{Ni}$	< LOQ	< LOQ
	$^{75}\text{As}$	< LOQ	< LOQ
	$^{78}\text{Se}$	< LOQ	< LOQ
	$^{101}\text{Ru}$	< LOQ	< LOQ
	$^{103}\text{Rh}$	< LOQ	< LOQ
	$^{105}\text{Pd}$	< LOQ	< LOQ
	$^{107}\text{Ag}$	< LOQ	< LOQ
	$^{111}\text{Cd}$	< LOQ	< LOQ
	$^{189}\text{Os}$	< LOQ	< LOQ
	$^{193}\text{Ir}$	< LOQ	< LOQ
	$^{195}\text{Pt}$	< LOQ	< LOQ
	$^{197}\text{Au}$	< LOQ	< LOQ
	$^{202}\text{Hg}$	< LOQ	< LOQ
	$^{205}\text{Tl}$	< LOQ	< LOQ
$^{208}\text{Pb}$	< LOQ	< LOQ	

<LOQ – pod mezí stanovitelnosti

U většiny testovaných API byly naměřené koncentrace prvkových nečistot pod mezí kvantifikace výjimku tvoří vzorek označený API 2, v kterém byla nalezena koncentrace Pd  $34,7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Koncentrace Pd ve vzorku API 2 je však stále pod hodnotou povoleného koncentračního limitu pro orálně podávané farmaceutické produkty s denní dávkou 2,0 g. Nicméně u všech testovaných vstupních surovin a finálních farmaceutických produktech byly nalezené koncentrace prvkových nečistot pod mezí stanovitelnosti. Tedy analyzované farmaceutické produkty splnily požadavek USP a ICH-Q3D na obsah prvkových nečistot, který stanovuje, že koncentrace prvkových nečistot ve farmaceutických produktech by měla být menší než 30 % povoleného koncentračního limitu.

## 5 ZÁVĚR

Metoda LA-ICP-MS byla vyvinuta a validována pro stanovení prvkových nečistot v léčivech s orálním způsobem podání. Jednalo o prvky třídy 1, 2A a 2B, konkrétně Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag a Pt. Validovaly se parametry linearita, mez stanovitelnosti, správnost (výťažnost), přesnost (opakovatelnost), přesnost (mezilehlá preciznost) specifická, robustnost a rozsah. Pro kontrolu kalibrace se po každém 5. vzorku měřil QC vzorek.

U parametru linearita byla prokázána lineární závislost a korelační koeficient se pohyboval v rozmezí 0,9958-0,9996. U parametru LOQ se výťažnost pohybovala v rozmezí 87,3-115,6 %. U parametru správnost (výťažnost) se výťažnost pohybovala v rozmezí 87,3-116,5 %. U parametru přesnost (opakovatelnost) se RSD pohybovalo v rozmezí 1,1-11,7 %. U parametru přesnost (mezilehlá preciznost) se RSD pohybovalo v rozmezí 2,4-15,8 %. U parametru specifická se výťažnost pohybovala v rozmezí 82,2-118,3 %. U parametru robustnost se RSD pohybovalo v rozmezí 2,4-15,8 %. U parametru rozsah se výťažnost pohybovala v rozmezí 87,3-116,5 %. Při měření QC vzorku se výťažnost pohybovala v rozmezí 99,3-105,5 % a RSD v rozmezí 0,02-6,74 %. Akceptační kritéria byly splněny pro všechny výše zmíněné validační parametry, a tedy LA-ICP-MS metoda splňuje požadavky na alternativní metody vyplývající z lékopisné kapitoly <233> „Elemental impurities – Procedures“.

Metoda LA-ICP-MS byla poté aplikována na rutinní stanovení prvkových nečistot ve 14 orálně podávaných farmaceutických vzorcích. Jednalo se o 9 účinných farmaceutických substancích, 3 vstupní suroviny a 2 finální farmaceutické produkty s doporučenou denní dávkou nižší než 2,0 g. Při analýze 14 vzorků byly koncentrace všech prvkových nečistot pod limitem kvantifikace, mimo Pd ve vzorku API 2, s hodnotou 34,7  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , která je nižší než maximální povolená koncentrace (50  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Závěrem lze říci, že validovaná LA-ICP-MS metoda umožňuje přímé, přesné a správné stanovení prvkových nečistot v kratším čase a s nižší spotřebou vzorku a chemikálií.



## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAS	Atomová absorpční spektrometrie ( <i>Atomic absorption spectrometry</i> )
API	Účinná farmaceutická látka ( <i>Active pharmaceutical substance</i> )
CCD	Zařízení s vázanými náboji ( <i>Charged-coupled device</i> )
CE	Kapilární elektroforéza ( <i>Capillary Electrophoresis</i> )
CPE	( <i>Cloud point extraction</i> )
CRM	Certifikovaný referenční materiál ( <i>Certified reference material</i> )
DCP	Stejněsměrně vázané plazma ( <i>Direct current plasma</i> )
ETA	Elektrotermická atomizace ( <i>Electrothermal atomization</i> )
ETV	Elektrotermické odpařování ( <i>Electrothermal vaporization</i> )
FA	Plamenová atomizace ( <i>Flame atomization</i> )
FIA	Průtoková analýza ( <i>Flow injection analysis</i> )
FIN	Finální farmaceutický produkt ( <i>Final pharmaceutical product</i> )
GC	Plynová chromatografie ( <i>Gas chromatography</i> )
HD	Vysoké rozlišení ( <i>High definition</i> )
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie ( <i>High pressure liquid chromatography</i> )
ICP	Indukčně vázané plazma ( <i>Inductively coupled plasma</i> )
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem ( <i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i> )
ICP-OES	Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem ( <i>Inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i> )
ICH	Mezinárodní rada pro harmonizaci technických požadavků na registraci humánních léčiv ( <i>International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use</i> )
IR	Infračervené záření ( <i>Infrared radiation</i> )

JP	Japonský lékopis ( <i>Japanese pharmacopeia</i> )
LA	Laserová ablace ( <i>Laser ablation</i> )
LOQ	Mez stanovitelnosti ( <i>Limit of quantification</i> )
MIC	Mikrovlně indukované spalování ( <i>Microwave-induced combustion</i> )
MIP	Mikrovlně indukované plazma ( <i>Microwave-induced plasma</i> )
MS	Hmotnostní spektrometrie ( <i>Mass spectrometry</i> )
Nd:YAG	Yttrium-aluminiový granát dopovaný neodymem ( <i>Neodymium-doped yttrium aluminum garnet</i> )
ORS-ICP-MS	ICP-MS s oktapólovým reakčním systémem ( <i>ICP-MS with octopole reaction system</i> )
PDE	Doporučená denní expozice ( <i>Permitted day exposure</i> )
Ph.Eur.	Evropský lékopis ( <i>European pharmacopeia</i> )
PTFE	Polytetrafluorethylen (teflon)
PVF	Polyvinyl fluorid
QC	Kontrola kvality ( <i>Quality control</i> )
R	Korelační koeficient ( <i>Correlation coefficient</i> )
RF	Radiofrekvenční ( <i>Radiofrequency</i> )
RFS	Rentgenová fluorescenční spektroskopie ( <i>X-ray fluorescence spectrometry</i> )
RSD	Relativní směrodatná odchylka ( <i>Relative standard deviation</i> )
USP-NF	Americký lékopis – národní sbírka předpisů ( <i>United States pharmacopeia – national formulary</i> )
UV	UV záření ( <i>Ultraviolet radiation</i> )
VS	Vstupní surovina

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] United States Pharmacopeia, General Chapter <232> Elemental Impurities-Limits, 40-NF35, 2017.
- [2] T.J. McGovern, Guideline for elemental impurities Q3D, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2014, pp. 1-75.
- [3] United States Pharmacopeia, General Chapter <233> Elemental Impurities-Procedures, 40-NF35, 2017.
- [4] J.S. Becker, Inorganic Mass Spectrometry: Principles and Applications, John Wiley & Sons New York, 2008.
- [5] S.J. Hill, Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications, 2nd ed., Blackwell Publishing Ltd., Oxford, 2007.
- [6] S.M. Nelms, ICP Mass Spectrometry Handbook, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, 2005.
- [7] R. Thomas, Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners, 2nd ed., CRC Press Boca Raton, 2008.
- [8] M. Mihaljevič, L. Strnad, O. Šebek, Využití Hmotnostní Spektrometrie s Indukčně Vázaným Plazmatem v Geochemii, Chemické Listy, 98 (2004) 123-130.
- [9] I. Agilent Technologies, ICP-MS: Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: a Primer, Agilent Technologies, Inc., USA, 2005.
- [10] J. Kosler, P.J. Sylvester, Present Trends and the Future of Zircon in Geochronology: Laser Ablation ICPMS, Reviews in Mineralogy & Geochemistry, 53 (2003) 243-275.
- [11] C.A. Schalley, Analytical Methods in Supramolecular Chemistry, 1st. ed., Wiley VCH Weinheim, 2007.
- [12] R. Thomas, Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners, 3rd ed., CRC Press, Boca Raton, 2013.
- [13] D. Günther, S.E. Jackson, H.P. Longerich, Laser Ablation and Arc/Spark Solid Sample Introduction into Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometers, Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 54 (1999) 381-409.
- [14] M. Jarošová, P. Sulovský, D. Milde, Současný Stav a Perspektivy Spojení Laserové Ablace s Hmotnostní Spektrometrií s Indukčně Vázaným Plazmatem v Geochemii, Chemické Listy, 110 (2016) 769-778.

- [15] A. Becue, S. Moret, C. Champod, P. Margot, Use of Stains to Detect Fingermarks, *Biotechnic & Histochemistry*, 86 (2011) 140-160.
- [16] N. Lewen, The Use of Atomic Spectroscopy in the Pharmaceutical Industry for the Determination of Trace Elements in Pharmaceuticals, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55 (2011) 653-661.
- [17] J.S. Barin, P.A. Mello, Determination of Elemental Impurities in Pharmaceutical Products and Related Matrices by ICP-based Methods: A Review, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408 (2016) 4547-4566.
- [18] V. Rudovica, A. Viksna, A. Actins, Application of LA-ICP-MS as a Rapid Tool for Analysis of Elemental Impurities in Active Pharmaceutical Ingredients, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 91 (2014) 119-122.
- [19] M.-L. Lin, S.-J. Jiang, Determination of Trace Cr, Mo, Pd, Cd, Pt and Pb in Drug Tablets by Ultrasonic Slurry Sampling Electrothermal Vaporization Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 26 (2011) 1813-1818.
- [20] L. Fischer, B. Zipfel, G. Koellensperger, S.B. Jessica Kovac, A. Kunkel, C. Venzago, S. Hann, Flow Injection Combined with ICP-MS for Accurate High Throughput Analysis of Elemental Impurities in Pharmaceutical Products According to USP <232>/<233>, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 95 (2014) 121-129.
- [21] G.A. Zachariadis, C.E. Michos, Development of a Slurry Introduction Method for Multi-Element Analysis of Antibiotics by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry Using Various Types of Spray Chamber and Nebulizer Configurations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43 (2007) 951-958.
- [22] J. Correale, E. Chiquete, S. Milojevic, N. Frider, I. Bajusz, Assessing the Potential Impact of Non-Proprietary Drug Copies on Quality of Medicine and Treatment in Patients with Relapsing Multiple Sclerosis: The Experience with Fingolimod, *Drug Design, Development and Therapy*, 14 (2014) 859-867.
- [23] P. Raghuram, S.R. IV, J. Sriramulu, Heavy Metals Testing in Active Pharmaceutical Ingredients: An Alternate Approach, *Pharmazie*, 65 (2010) 15-18.
- [24] A.L.H. Muller, J.S.S. Oliveira, P.A. Mello, E.I. Muller, E.M.M. Flores, Study and Determination of Elemental Impurities by ICP-MS in Active Pharmaceutical Ingredients Using Single Reaction Chamber Digestion in Compliance with USP Requirements, *Talanta*, 136 (2015) 161-169.
- [25] C. Støving, H. Jensen, B. Gammelgaard, S. Stürup, Development and Validation of an ICP-OES Method for Quantitation of Elemental Impurities in Tablets According to Coming

US Pharmacopeia Chapters, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 84 (2013) 209-214.

[26] C. Venzago, M. Popp, J. Kovac, A. Kunkel, Pharmacopeial Requirements for Elemental Impurities: A Novel Approach to the Trace Determination of Osmium by Oxidative Pressure Vessel Sample Digestion and Measurement Using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) After Complexation and Stabilisation, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 28 (2013) 1125-1129.

[27] U. Wollein, B. Bauer, R. Habernegg, N. Schramek, Potential Metal Impurities in Active Pharmaceutical Substances and Finished Medicinal Products – A Market Surveillance Study, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77 (2015) 100-105.

[28] G.A. Zachariadis, E. Sahanidou, Analytical Performance of a Fast Multi-Element Method for Titanium and Trace Elements Determination in Cosmetics and Pharmaceuticals by ICP-AES, *Central European Journal of Chemistry*, 9 (2011) 213-217.