

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie



**APLIKACE MIKROVLNNÉHO ROZKLADU PRO INOVACI LIMITNÍCH
LÉKOPISNÝCH TESTŮ VE FARMACEUTICKÉ LABORATOŘI**

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Autor: Mgr. Tomáš Pluháček

Obor: Analytická chemie

Konzultant: Ing. David Milde, Ph.D.

Olomouc 2014

SOUHRN

Tato rigorózní práce se zabývá využitím mikrovlnného rozkladného systému pro inovaci limitních lékopisných testů (Těžké kovy, Síranový popel) v laboratoři TAPI quality control ve společnosti Teva Czech Industries, s.r.o.. V teoretické části práce je podán přehled používaných metod limitních lékopisných testů (Těžké kovy a Síranový popel) uvedených v USP, Ph. Eur. a ČL společně s popisem základního principu a instrumentace hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. Experimentální část uvádí postupy inovovaných lékopisných metod s důrazem na úpravu mineralizátů před samotným vyhodnocením limitních lékopisných testů. Získané hodnoty výtěžností těžkých kovů (Pb, Hg, Bi, As, Sb, Sn, Cd, Ag, Mo, Cu, V, Pd, Pt, Ru, Au, Ir, Rh, Os, Ni, Cr, Mn, Fe, Zn) se pohybovaly v rozmezí od 82,2 - 112,3 %, výjimku tvoří Os, Au, Ru. Dále byly stanoveny výtěžnosti přísadků Na_2SO_4 pohybující se v rozmezí 99 - 101 %. Posledním úkolem experimentální části bylo testování vhodnosti inovovaných metod pro rutinní stanovení těžkých kovů a síranového popela. Testování bylo provedeno na pěti účinných farmaceutických substancích, a to na mykofenolát mofetilu, nicergolinu, silymarinu, bromocriptin mesilátu a buprenorfin hydrochloridu produkovaných farmaceutickou společností Teva Czech Industries, s.r.o..

SUMMARY

The rigorous thesis deals with the use of microwave digestion system for innovation of pharmacopoeia limit tests (Heavy metals, Sulphated ash/Residue on ignition) in TAPI quality control laboratory in company Teva Czech Industries Ltd..

In the theoretical part of thesis, the brief introduction to the pharmacopoeia limit tests (Heavy metals a Sulphated ash/Residue on ignition) and their methods presented in USP, Ph. Eur. a ČL is given together with the basic principles and instrumentation of inductively coupled plasma mass spectrometry.

The experimental part describes the procedure of innovated methods with emphasis on digest treatment before the evaluation of pharmacopoeia limit tests. The obtained heavy metal recoveries (Pb, Hg, Bi, As, Sb, Sn, Cd, Ag, Mo, Cu, V, Pd, Pt, Ru, Au, Ir, Rh, Os, Ni, Cr, Mn, Fe, Zn) were between 82.2 - 112.3 %, apart from Os, Au and Ru. The recoveries of Na₂SO₄ used for testing sulphated ash/residue on ignition method were in the range from 99 to 101 %. The last task of the experimental part was testing the suitability of innovated methods for routine determination of heavy metals and sulphated ash/residue on ignition. These tests were carried out on the analysis of five active pharmaceutical substances such as mycophenolate mofetil, nicergoline, silymarin, bromocriptine mesylate and buprenorphine hydrochloride manufactured by the pharmaceutical company Teva Czech Industries Ltd..

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem při psaní práce využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce bude prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

podpis

Poděkování

Rád bych poděkoval konzultantovi mé rigorózní práce Ing. Davidu Mildemu, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a čas, který mi při vypracovávání práce věnoval.

Dále bych rád poděkoval panu Ing. Bohumírovi Bíbovi a Mgr. Jiřímu Hendrychovi za poskytnutí prostoru, přístrojů a chemikálií pro vypracování mé rigorózní práce.

Obsah

1. ÚVOD	1
2. TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1 Lékopisné limitní testy	2
2.1.1 Těžké kovy.....	2
2.1.3 Síranový popel.....	7
2.2 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem	8
2.2.1 Zavádění vzorků	9
2.2.2 Plazma.....	10
2.2.3 Interface a iontový optika	12
2.2.4 Hmotnostní analyzátory.....	13
2.2.5 Detektory	14
2.2.6 Interference	15
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	17
3.1 Chemikálie, přístroje a pomůcky.....	17
3.1.1 Chemikálie.....	17
3.1.2 Přístroje.....	18
3.1.3 Pomůcky	19
3.1.4 Analyzované účinné farmaceutické látky	20
3.2 Pracovní postupy	21
3.2.1 Příprava roztoků podle Evropského lékopisu	21
3.2.2 Rozklady účinných farmaceutických látek	22
3.2.3 Limitní test Těžké kovy	23
3.2.4 Limitní test Síranový popel.....	24
3.2.5 Příprava modelových roztoků pro stanovení výtěžnosti kovů.....	25
3.2.6 Příprava vodných kalibračních roztoků a interního standardu	25
3.3 Použité instrumentální techniky	26
3.3.1 ORS-ICP-MS	26
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	27
4.1 Výtěžnosti těžkých kovů	27
4.2 Těžké kovy - vyhodnocení a porovnání výsledků.....	28
4.3 Síranový popel - vyhodnocení a porovnání výsledků.....	31
5. ZÁVĚR.....	33
6. LITERATURA	34
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	36

1. ÚVOD

Monitoring anorganických nečistot, zejména těžkých kovů v lékových formách, farmaceutických substancích, či jejich meziproduktech je nedílnou součástí farmaceutické analýzy, z důvodu jejich toxicity či potenciální nebezpečnosti pro lidské zdraví. Kovové nečistoty obsažené ve farmaceutických substancích mohou pocházet jednak z vlastní syntézy (výchozí látky, reakční činidla, katalyzátory, rozpouštědla, koroze reakčních nádob a dalšího vybavení), ale i z degradace obalových materiálů v průběhu skladování (oxidace, produkty hydrolyzy)¹⁻³. Maximální přípustné limity anorganických nečistot jsou spolu se závaznými metodami uvedeny v příslušných lékopisných člancích, a to jak v Americkém (USP), Evropském (Ph. Eur.) a Českém (ČL) lékopise.

Předkládaná rigorózní práce se zabývá inovací lékopisné metody pro stanovení těžkých kovů (Metoda G, dle Ph. Eur. a ČL) a metody pro vyhodnocení množství obsaženého síranového popela ve farmaceutických substancích (dle USP, Ph. Eur. a ČL). Inovace lékopisných testů spočívala v nahrazení rozkladného kroku mikrovlnnou mineralizací v uzavřeném systému s následnou úpravou mineralizátů pro úspěšné provedení limitních lékopisných testů. V rámci testování vhodnosti inovovaných metod pro rutinní stanovení těžkých kovů a síranového popela byly provedeny experimenty týkající se výtěžnosti analyzovaných kovů a dále porovnání výsledků testů s výsledky získanými použitím závazných lékopisných metod na pětici účinných farmaceutických substancích (mykofenolát mofetilu, nicergolinu, silymarinu, bromocriptin mesilátu a buprenorfin hydrochloridu) vyráběných společností Teva Czech Industries, s.r.o..

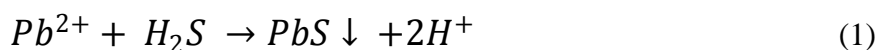
2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Lékopisné limitní testy

První část teoretické části se zaměřuje na přehledný popis dvou fundamentálních lékopisných limitních testů: limitního testu - Těžké kovy a limitního testu - Síranový popel. Příslušné lékopisné metody byly čerpány z článků uvedených v Americkém (USP)^{4, 5}, Evropském (Ph. Eur.)^{6, 7} a Českém lékopise (ČL)^{8, 9}. Z důvodu umístění článků zabývajících se limitními testy do evropské části Českého lékopisu, jenž je harmonizovaným překladem Ph. Eur., mají lékopisné limitní testy nejen shodné označení, ale i stejný počet uvedených lékopisných metod (např. limitní test - Těžké kovy: Ph. Eur. 2.4.8 Heavy metals (Method A-G) vs. ČL 2.4.8 Těžké kovy (Metoda A-G)).

2.1.1 Těžké kovy

V rámci testování farmaceutických substancí na přítomnost těžkých kovů se USP (<231> Heavy metals) zaměřuje na stanovení Pb, Hg, Bi, As, Sb, Sn, Cd, Ag, Cu a Mo (cit.⁴), zatímco Ph. Eur. a ČL (2.4.8 Heavy metals/Těžké kovy) se kromě již zmíněných těžkých kovů zaměřuje dále na V, Pd, Pt, Au a Ru (cit.^{6, 8}). Chemický princip limitního testu spočívá v reakci kationtů těžkých kovů se sulfidovým aniontem za vzniku barevné koloidní sraženiny nerozpustných sulfidů (1). Následné vyhodnocení je založeno na vizuálním porovnání intenzity zbarvení koloidní sraženiny testovaného roztoku vůči intenzitě zbarvení sraženiny porovnávacího roztoku obsahujícího vhodné množství standardu olova nejčastěji ve formě $Pb(NO_3)_2$.



Lékopisné články specifikují různé metody přípravy vzorku v závislosti na jeho rozpustnosti a schopnosti vytvářet koloidní sraženiny v slabě kyselém prostředí. V následujících dvou tabulkách jsou uvedeny metody přípravy vzorku uvedené ve člancích USP (Tab. I)⁴, Ph. Eur. a ČL (Tab. II)^{6, 8}.

Tab. I Specifikace metod dle USP⁴:

Metoda	Popis metody
Metoda I	pro bezbarvé a/nebo ve vodě rozpustné substance, příprava zahrnuje vhodné naředění vodou
Metoda II	pro barevné a/nebo ve vodě nerozpustné substance, příprava zahrnuje žihání při teplotě 500 - 600 °C s využitím kyseliny sírové, dusičné a chlorovodíkové
Metoda III	pro substance nevhodné pro testování dle Metody I a Metody II, příprava zahrnuje mokrý rozklad dle Kjeldahlovy metody

Tab. II Specifikace metod dle Ph. Eur.⁶ a ČL⁸:

Metoda	Popis metody
Metoda A	pro bezbarvé a/nebo ve vodě rozpustné substance, příprava zahrnuje vhodné naředění vodou
Metoda B	pro bezbarvé a/nebo v organických rozpouštědlech rozpustné substance, příprava zahrnuje vhodné naředění vodou
Metoda C	příprava zahrnuje žihání při teplotě nepřesahující 800 °C s přidavkem MgSO ₄
Metoda D	příprava zahrnuje žihání při teplotě nepřesahující 800 °C s přidavkem MgO
Metoda E	příprava zahrnuje rozpuštění vzorku ve vodě a následnou filtraci přes membránový filtr
Metoda F	příprava zahrnuje mokrý rozklad dle Kjeldahlovy metody
Metoda G	příprava zahrnuje více krokový vysokotlaký mikrovlnný rozklad v uzavřeném systému s využitím kyseliny sírové, dusičné a peroxidu vodíku

Následná vybarvovací reakce je složena z uvedených kroků:

- úpravu pH na hodnotu 3,0 - 4,0 roztoky zředěného amoniaku a kyseliny octové
- převedení do zkumavek a naředění na 40 ml vodou s následným promícháním
- přidavek 1,2 ml thioacetamidového činidla (alternativa dle Ph. Eur. a ČL přidavek 0,1 ml glycerinového roztoku sulfidu sodného), promíchání, doplněním vodou na 50 ml a opětovné promíchání
- vyhodnocení intenzity zabarvení vzniklých sraženin po 2 minutovém zrání sraženiny přímo v roztoku.

Pro vyhodnocení limitního testu koloidních roztoků, u kterých lze obtížně vyhodnotit intenzitu zabarvení přímo, lze dle Ph. Eur. a ČL jako alternativní možnost použít porovnání intenzity zabarvení skvrn vzniklých filtrací příslušných koloidních roztoků skrze membránové filtry s velikostí pórů 3 μm .

Alternativní postupem stanovení těžkých kovů ve farmaceutických substancích je využití moderních multielementárních technik jako je ICP-MS nebo ICP-OES, u kterých jsou koncentrace těžkých kovů přímo stanoveny v mineralizátu po předchozí mikrovlnné mineralizaci v uzavřeném systému. Nově uvedené kapitoly Amerického lékopisu konkrétně kapitola <232> Elemental impurities-Limits¹⁰ a kapitola <233> Elemental impurities-Procedures¹¹ specifikují přípustné limity těžkých kovů v lécích a doplňcích stravy (užívaných orálně, inhalačně, parenterálně, ...) společně s metodami přípravy vzorků, procesy měření těžkých kovů pomocí metod ICP-OES nebo ICP-MS, ale i akceptovatelné požadavky validační parametrů alternativních metod.

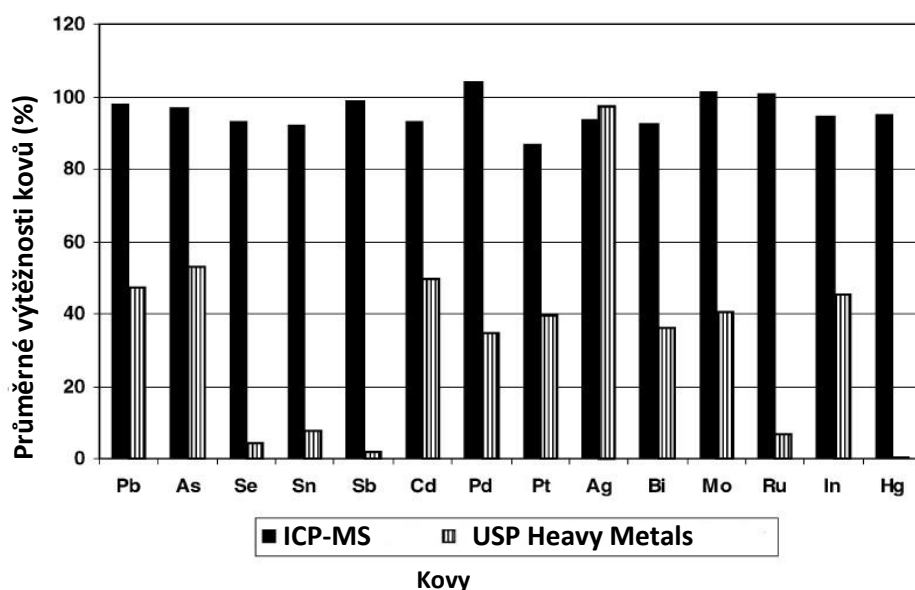
Dalším dokumentem popisujícím stanovení těžkých kovů je EMEA guidance on “Residues of Metal Catalysts or Metal Reagents”, které specifikuje denní akceptovatelné limity a možnosti stanovení Pt, Pd, Ir, Ru, Rh, Os, Mo, Ni, Cr, V, Cu, Mn, Fe a Zn¹².

Analýza těžkých kovů spektrálními metodami

Problematika citlivého a selektivního stanovení kovů a metaloidů ve farmaceutických substancích zaznamenala rostoucí zájem v posledních 10 až 15 letech. Z důvodu kladení požadavků na přesnost, nízké detekční limity a prvkovou specifitu se analýza těžkých kovů stala doménou především ICP-MS, ICP-OES, ale i FA-AAS a GF-AAS. Pro speciální analýzu těžkých kovů se využívá spojení ICP-MS s vhodnou separační technikou (HPLC, GC, CE)³. K přímé analýze pevných lékových forem se využívají techniky LA-ICP-OES a LA-ICP-MS, jenž získávají stále širší uplatnění. Aplikace uvedených spektrálních technik pro analýzu těžkých kovů a jejich specií jsou shrnuty v následujících přehledových člancích^{3, 13, 14}.

Lewen a kol. publikovali porovnání výtěžností těžkých kovů (As, Se, Cd, In, Sn, Sb, Pb, Bi, Ag, Pd, Pt, Hg, Mo a Ru) ve vzorcích připravených Metodou II dle USP a alternativní metodou zahrnující rozpuštění substancí v nejvhodnějším testovaném rozpouštědle (směs 2-butoxyetanol:voda (25:75)) a následném stanovení kovů pomocí ICP-MS (Obr. 1). Dále byly sledovány výtěžnosti těžkých kovů v závislosti na matici vzorku (61 různých matic),

kdy se průměrná hodnota výtěžností jednotlivých kovů pohybovala v rozmezí 89 až 102 % (cit.¹⁵).



Obr. 1 Porovnání výtěžností těžkých kovů¹⁵

Hoecke s kolegy publikovali optimalizaci dvou postupů přípravy vzorků pro stanovení V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Mo, Ru, Rh, Pd, Cd, Os, Ir, Pt, Hg a Pb dle požadavků nově implementovaných článků v USP. První metoda přípravy zahrnovala přímé naředění roztokem 0,009 mmol.l⁻¹ KBrO₃ v 1 % (v/v) HNO₃ + 1 % (v/v) HCl, druhá metoda zahrnovala mikrovlnný rozklad lučavkou královskou. Koncentrace těžkých kovů byly stanoveny Q-ICP-MS a k eliminaci polyatomických interferencí bránící stanovení V, Cr, Mn, Fe a As byla využita kolizně/reakční cela se směsí He/H₂ jako kolizního plynu. Dosažené limity detekce byly desetkrát nižší než požadované limity a výtěžnosti kovů se pohybovaly v rozmezí 93,8 až 109,9 % (cit.¹⁶).

Ke stanovení As, Cd, Cu, Cr, Fe, Hg, Ir, Mn, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, V a Zn v tabletkách substance Lu byla optimalizována ICP-OES metoda dle požadavků uvedených v nově implementovaných kapitolách USP. Příprava vzorků spočívala v mikrovlnné mineralizaci (450 mg vzorku) s přidavkem 12 ml směsi kyseliny dusičné a chlorovodíkové (poměru 3:1). Naměřené LOD byly v rozmezí od 0,04 pro Mn do 8,82 µg.l⁻¹ pro Zn a LOQ v rozmezí 0,14 pro Mn do 29,41 µg.l⁻¹ pro Zn (desetkrát nižší než požadované limity). Výtěžnosti kovů se pohybovaly v rozmezí 85,3 - 103,8 %, kromě Os (161,5 %, paměťový

afekt). Analyzovaná tableta Lu obsahovala $182,8 \pm 18,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Fe a $2,8 \pm 0,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Pt, což vyhovuje požadovaným koncentračním limitům¹⁷.

Wang a kol. publikovali alternativní metodu pro stanovení Li, Be, B, Na, Mg, Al, Si, P, K, Ca, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, In, Sn, Sb, Te, Cs, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi, Th a U ve farmaceutických substancích, meziproduktech a surových materiálech založenou na naředění vzorku (10 mg) buď 1 nebo 80 % (v/v) HNO₃ a následném stanovení koncentrací kovů pomocí ICP-MS. V rámci experimentů se autoři zaměřili na testování stability roztoků (měření po 24 hodinách, po 1, 2, a 4 týdnech od přípravy) a stanovení koncentrací spolu s výtěžnostmi pro 69 analyzovaných prvků v 8 rozdílných vzorcích farmaceutických substancí. Z uvedených výsledků vyplývá, že metoda je vhodná pro alternativní, citlivé, přesné a rychlé stanovení těžkých kovů ve farmaceutických substancích¹⁸.

Stanovení As, Cd, Hg, a Pb v karbazepinu bylo provedeno pomocí ICP-MS po rozkladu farmaceutické substance v podobě žihání dle Metody II (USP) a mikrovlnného rozkladu při teplotě 320 °C po dobu 180 min. Porovnáním výsledků výtěžností obou metod lze říci, že při použití Metody II dochází ke značným ztrátám analytů, což vyplývá z hodnot výtěžností $38,0 \pm 8,9 \%$ pro As, $99,5 \pm 7,1 \%$ pro Cd, $89,4 \pm 6,3 \%$ pro Pb a rtuť byla kompletně odpařena během rozkladu. S využitím mikrovlnné mineralizace jako rozkladného kroku byly výtěžnosti v rozmezí 94 - 103 %, z čehož vyplývá možnost jejího využití k přípravě vzorků pro stanovení těžkých kovů ve farmaceutických substancích¹⁹.

Raghuram a kol. aplikovali novou alternativní, selektivní a citlivou metodu založenou na mikrovlnném rozkladu substancí kyselinou dusičnou a peroxidem vodíku s následným stanovení 23 těžkých kovů (Pb, Hg, Bi, As, Sb, Sn, Cd, Ag, Mo, Cu, V, Pd, Pt, Ru, Au, Ir, Rh, Os, Ni, Cr, Mn, Fe a Zn) pomocí ICP-OES pro stanovení těžkých kovů ve farmaceutických substancích. Na hladině meze kvantifikace byly hodnoty výtěžností v rozmezí 85,6 % pro Sb až 115,6 % pro Sn a přesnost pod 15 % (cit.²).

Těžké kovy byly v dicyclomin HCl, ethambutolu, pyrazinamidu a furazolidonu stanoveny pomocí ICP-MS. Léky byly testovány na přítomnost Ti, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Hg a Pb. Z výsledků vyplývá, že Cr, Fe, Ti a Cu byly obsaženy ve všech lécích, zatímco Ni a Hg nebyly přítomny v žádném, pouze stopové množství Cd bylo obsaženo v pyrazinamidu a furazolidonu²⁰.

Pro přímou analýzu Mn, Ni, Co, Cu, Cd, Pb v substanci arbidol bylo využito techniky LA-ICP-MS. Součástí optimalizace metody byla tvorba pevných lisovaných matričních kalibračních standardů, u nichž byly stanoveny koncentrace kovů (ICP-MS) a homogenita (3 repliky, různá místa). Ke kvantitativní analýze kovů v 5 vzorcích substance arbidolu bylo využito 8 bodové kalibrační přímky ($R^2 \geq 0,997$). Koncentrace kovů v arbidolu byly pod mezí stanovitelnosti a všech pět vzorků vyhovovalo povoleným hodnotám obsahu kovů v substanci. LA-ICP-MS je vhodnou, citlivou, a precizní metodou pro přímou analýzu farmaceutických substancí¹.

2.1.3 Síranový popel

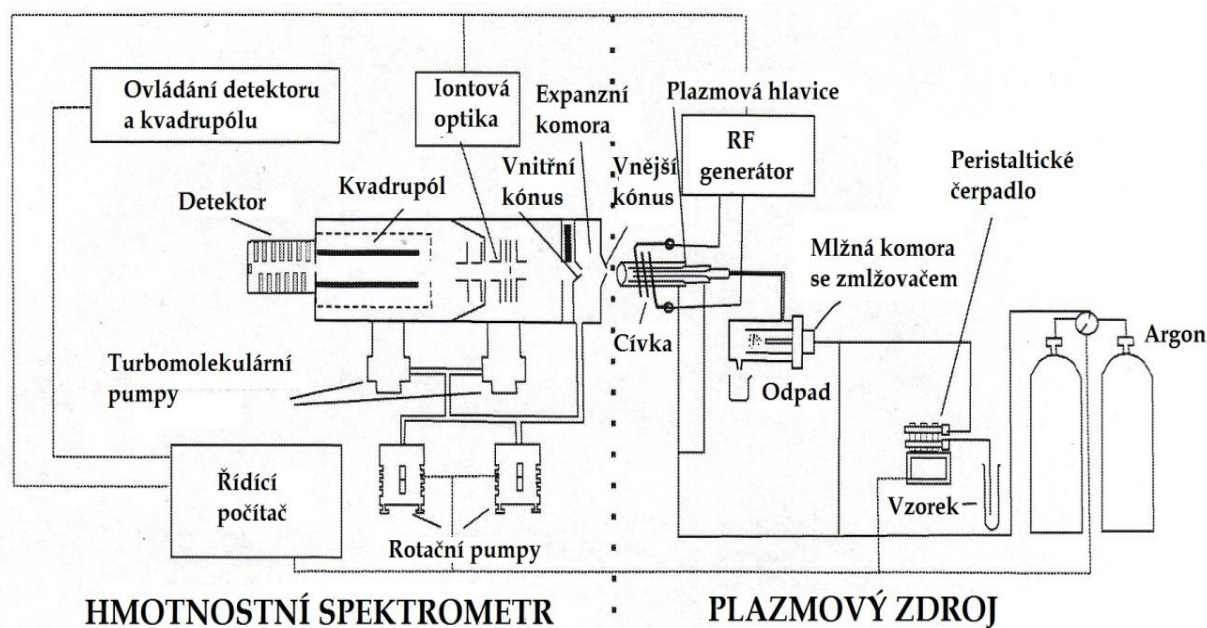
Limitní test na Síranový popel je zaměřen na stanovení obsahu anorganických netěkavých nečistot v organických substancích po předchozím žihání za přítomnosti kyseliny sírové. Postupy provedení limitního testu jsou popsány v následujících lékopisných člancích: <281> Residue on ignition (USP)⁵, 2.4.14 Sulphated ash (Ph. Eur.)⁷ a 2.4.14 Síranový popel (ČL)⁹. Část kapitoly <281> popsané v USP byla harmonizována s odpovídajícími lékopisnými články Evropského a Japonského lékopisu²¹. Princip limitního testu je založen na mineralizaci předepsaného množství substance kyselinou sírovou, a tudíž převedení přítomných anorganických sloučenin na stabilní a netěkavé sírany. Předepsané množství substance (obvykle 1 - 2 g) se naváží do předem vyžíhaného a zvážených platinového kelímku. Substance se zvlhčí malým množstvím kyseliny sírové a opatrně se zahřívá při co nejnižší teplotě až do úplného zuhelnatění. Po ochlazení a opětovném zvlhčení zbytku kyselinou sírovou se obsah platinového kelímku opatrně zahřívá do ukončení vyvíjení bílého dýmu odpařující se kyseliny sírové. Finálním krokem limitního testu je žihání rezidua při teplotě 600 ± 50 °C v muflové peci po dobu 30 minut. Po ochlazení v exsikátoru se platinový kelímeček zváží a vypočte se procentuální obsah síranového popela. Hlavní podmínkou správného provedení je zabránění vzniku plamene během celého pracovního procesu. Převyšuje-li takto získané reziduum předepsaný limit, reziduum se opět zvlhčí malým množstvím kyseliny sírové a znovu se provede proces žihání ve 30 minutových intervalech, dokud se 2 po sobě jdoucí vážení neliší o více než 0,5 mg nebo dokud obsah síranového popela nevyhovuje předepsanému limitu^{5,7,9}.

2.2 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) patří k nejuniverzálnějším metodám prvkové analýzy, jenž našla uplatnění při analýze stopových až ultrastopových koncentrací prvků ve vzorcích pocházejících z různých odvětví lidského bádání např. životní prostředí, potravinářský nebo farmaceutický průmysl, zdravotnictví, ale i geologie či archeologie. Rozšiřující se oblastí aplikace je speciální analýza, kde ICP-MS ve spojení se separačními metodami (HPLC, GC, CE, FIA, ...) plní funkci prvkově specifického detektoru²²⁻²⁴.

Princip metody ICP-MS je založen na vnášení nejčastěji kapalných vzorků skrze zmlžovač a mlžnou komoru do indukčně vázaného plazmatu (ICP), kde dojde k desolvataci, odpaření, atomizaci a následné ionizaci prvků za vzniku kladně nabitých iontů, které jsou transportovány přes interface do hmotnostního analyzátoru. K transportu a fokusaci iontů z ICP slouží iontová optika umístěná mezi interface a hmotnostní analyzátor. Po separaci iontů v hmotnostním analyzátoru podle poměru m/z dopadají rozseparované ionty na detektor převádějící proud iontů na měřitelný elektrický signál (Obr. 2)²²⁻²⁴.

V následujících podkapitolkách budou diskutovány základní části ICP-MS spektrometru s důrazem na ICP-MS s kvadrupólovým analyzátozem a kolizní celou, jenž byl použit k experimentům uvedených v této rigorózní práci.



Obr. 2 Schéma hmotnostního spektrometru s kvadrupólovým analyzátozem²⁵

2.2.1 Zavádění vzorků

System vnášení kapalných vzorků do ICP se skládá ze dvou komponent, a to zmlžovače a mlžné komory. Princip vzniku jemného aerosolu vhodného k ionizaci v ICP je založen na zavádění vzorků pomocí peristaltického čerpadla do zmlžovače (generování polydisperzního aerosolu) a následné separaci kapek s průměrem větším než 10 μm pomocí vhodné mlžné komory. Zařazení peristaltického čerpadla slouží nejen k zajištění konstantního průtoku roztoků bez ohledů na rozdíly ve viskozitě standardů, slepých pokusů a reálných vzorků, ale i k odvodu nezmlžené části roztoku z mlžné komory do odpadu²²⁻²⁴.

Zmlžovače

V ICP-MS se nejčastěji využívají pneumatické zmlžovače, u kterých jemný aerosol vzniká v důsledku působení mechanické síly nosného plynu argonu na vstupující kapalinu (Venturiho efekt). Základními typy pneumatických zmlžovačů jsou koncentrický, mikrokoncentrický a úhlový. Konstrukčním materiálem je borosilikátové sklo, křemen či polymery odolnějších vůči korozivním roztokům. Pro speciální aplikace se využívá ultrazvukového zmlžovače a termospreje (téměř 100 % účinnost generování jemného aerosolu) nebo zmlžovačů známých z ICP-OES jako V-groove a Babingtonův používaných ke zmlžování viskózních a suspenzních roztoků²²⁻²⁴.

Mlžné komory

Mlžné komory se dělí na dva základní typy, a to Scottovu a cyklonickou mlžnou komoru. Mlžná komora slouží nejen k odstranění objemnějších kapek aerosolu generovaných zmlžovačem, ale i k vyrovnávání pulzů způsobených pulzacemi peristaltického čerpadla. V současné době jsou mlžné komory opatřeny externím chlazením, které zajišťuje tepelnou stabilitu vzorku a zároveň redukuje množství rozpouštědel vstupujících do ICP. Chlazení mlžné komory přináší řadu výhod od zvýšení stability signálu, redukce tvorby specií oxidů či omezení zatížení plazmatu např. použitými těkavými organickými rozpouštědly. Potenciálem rozšíření využití cyklonických mlžných komor spočívá v jejich vyšší účinnosti, které můžeme využít pro dosažení vyšší citlivosti a nižších limitů detekce²²⁻²⁴.

Pro analýzu pevných vzorků nebo suspenzí, které se nepodařilo kvantitativně převést do roztoku buď přímo nebo mineralizačními procesy se k transportu vzorků do ICP úspěšně využívá laserové ablace nebo elektrotermického vypařování známého z GF-AAS. Mezi hlavní

nevýhody těchto technik patří tvorba přechodových signálů s délkou trvání jen několik sekund (klasické zmlžovače produkují kontinuální signál)²²⁻²⁴.

2.2.2 Plazma

Plazma vznikající z libovolného plynu po dodání množství energie převyšující ionizační energii atomů plynu definujeme: jako elektricky vodivý, na venek kvazineutrální ionizovaný plyn obsahující dostatečné množství kladně a záporně nabitých iontů. Dle typu elektrického pole lze plazmata dělit na:

- 1) Stejnoseměrně vázané plazma (direct current plasma - DCP)
- 2) Mikrovlnně indukované plazma (microwave induced plasma - MIP)
- 3) Indukčně vázané plazma (inductively coupled plasma - ICP)

Následující podkapitoly budou zaměřeny na popis nejčastěji používaného budicího a ionizačního zdroje v ICP-MS, kterým je ICP skládající se z plazmové hlavice, indukční cívky a v neposlední řadě vysokofrekvenčního generátoru²²⁻²⁴.

Plazmová hlavice (Torch)

Plazmová hlavice je zkonstruována z trojice soustředných křemenných trubic, jimiž proudí plazmový plyn (nejčastěji argon). Plazmové hlavice jsou konstruovány buď jako kompaktní (tvořeny kompaktním celkem) nebo kombinované (odnímatelný injektor). K analýze korozivních vzorků se využívá injektorů vyrobených z platiny, oxidu hlinitého nebo safíru. Průtok argonu skrze plazmovou hlavici je rozdělen na tři části, z nichž každá plní různou funkci při vzniku ICP:

- 1) Vnější plazmový plyn ($12 - 17 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) - nositel výboje
- 2) Střední plazmový plyn ($1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) - stabilizuje výboj a odděluje plazma od trubice
- 3) Nosný plyn ($1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) - tvorba analytického kanálu uprostřed plazmatu a transport aerosolu.

Horizontálně umístěnou plazmovou hlavici obklopuje uzemněná indukční cívka připojená přímo k vysokofrekvenčnímu generátoru pracujícím při frekvenci buď 27,1 nebo 40,6 MHz s účinností 70 - 75 % z čehož vyplývá, že 70 - 75 % dodané energie produkuje ICP²²⁻²⁴.

Vznik výboje v ICP

Před vlastní iniciací plazmového výboje se na tangenciální proud vnějšího plazmového plynu proudícího plazmovou hlavici aplikuje silné elektromagnetické pole, vznikající vložením radiofrekvenční energie (750 - 1700 W) na indukční cívku. Samotný plazmový výboj je iniciován aplikací vysokonapěťového pulzu z Teslova generátoru, jenž způsobí odtržení elektronů z atomů argonu. Po urychlení v elektromagnetickém poli ztrácí odtržené elektrony svou energii ve formě srážek s ostatními atomy plazmového plynu (vznik dalších elektronů). Kolizí indukovaná ionizace probíhá v řetězové reakci a tvorba plazmatu pokračuje, dokud je skrze indukční cívku dodávána radiofrekvenční energie. Vzniklé prstencové plazma se skládá z neutrálních atomů, kladně nabitých atomů argonu a odtržených elektronů.

Ionizace prvků v ICP

Ionizace prvků probíhá během průchodu jemného aerosolu analytickým kanálem skrze jednotlivé zóny plazmového výboje (předehřívací, zářivou a analytickou zónu). Při průchodu aerosolu skrze plazmový výboj nejprve dochází k desolvataci, kdy vznikají velmi malé pevné částičky, které jsou převáděny nejdříve do plynného skupenství (vypařování) a následně na volné atomy v plynném stavu (atomizace). K ionizaci volných atomů v plynném stavu dochází v analytické zóně srážkami s vysokoenergetickými argonovými elektrony, vzniklé pozitivně nabitě ionty jsou vedeny skrze interface do hmotnostního analyzátoru. Argonové ICP je vhodné k ionizaci většiny prvků periodické soustavy kromě helia, neonu a fluoru (první ionizační potenciál argonu 15,76 eV). V ICP je do prvního stupně ionizováno 69 prvků s účinností 90 - 95 % (nižší ionizace pozorována u S, P, Se, As, Au a halogenů...), prvky s nízkým druhým ionizačním potenciálem jako Ba a Ce mohou tvořit dvojnásobně nabitě ionty²²⁻²⁴.

2.2.3 Interface a iontová optika

Interface

Interface sloužící ke stabilnímu a účinnému transportu iontů z plazmatu do hmotnostního analyzátoru, je složen z dvojice kovových kónusů (konstrukční materiál nikl, měď, hliník, nebo platina) s velmi malými kruhovými otvory v jejich vrcholech. Ionty jsou po průchodu prvním kónusem, samplerem, s průměr otvoru 0,8 - 1,2 mm odděleny od hlavního toku argonu a vstupují do expanzní komory (tlak 2 - 5 bar, teplota 100 - 200 °C), z níž jsou vedeny skrze druhý kónus, skimmer, s průměr otvoru 0,4 - 0,8 mm do hmotnostního analyzátoru. Jelikož interface zajišťuje převod iontů z plazmatu s teplotou až 7 500 K, tak proto jsou kónusy součástí vodou chlazeného bloku (ochrana před roztavením)²²⁻²⁴.

Iontová optika

Iontová optika sloužící nejen k transportu iontů z plazmatu skrz interface do hmotnostního analyzátoru, ale i eliminaci neutrálních částic a fotonů (zvyšující pozadí a způsobující nestabilitu detektoru) je složena ze systému elektricky ovládaných čoček (kovové destičky či válečky), na které je vloženo různé napětí. Konstrukce iontových optik je uzpůsobena předpokladu, že trajektorie neutrálních částic a fotonů nejsou ovlivněny elektromagnetickým polem. Dle typu konstrukce se iontové optiky dělí na:

- 1) In line - uzemněná photon stop bariéra vložená přímo do osy iontů
- 2) Off axis - osa hmotnostního analyzátoru vytočena o úhel 45 ° vůči interface
- 3) 90° ion optics design - ionty jsou vychýleny „dutým„ iontovým zrcadlem pod pravým úhlem do hmotnostního analyzátoru umístěného off axis

Iontové optiky mohou být doplněny o extrakční čočky podporující extrakci iontů lehčích prvků, které jsou z iontového paprsku vytlačovány ionty těžšími vlivem efektu „prostorového náboje“^{23, 24}.

2.2.4 Hmotnostní analyzátory

V ICP-MS se k separaci iontů podle m/z používají hmotnostní analyzátory, které můžeme podle konstrukce dělit na:

1) Kvadrupólové analyzátory (diskutovány níže)

2) Průletové analyzátory (Time of flight - TOF) - ionty jsou vzorkovány v jeden okamžik s následným urychlením do ortogonálně umístěné letové trubice, kde dojde k separaci iontů (různé doby letu dle m/z). Po detekci vzorkovaného „balíku iontů“ vzniká kompletní hmotnostní spektrum (při použití 1 m dlouhé letové trubice lze detekovat kompletní spektrum za méně než 50 μ s (teoreticky až 20 000 spekter/s))²²⁻²⁴.

3) Sektorové analyzátory (Sector field - SF) - analyzátory dosahující velmi vysokého rozlišení až $R = 10\ 000$, což předurčuje jejich využití pro stanovení stopových koncentrací prvků ovlivňovaných spektrálními interferencemi, ale i pro velmi přesné měření izotopových poměrů (mód nízkého rozlišení $R = 400$ (multikolektory))²²⁻²⁴.

Kvadrupólový analyzátor

Nejvíce rozšířeným hmotnostní analyzátozem v ICP-MS je kvadrupól skládající se ze čtveřice válcových či hyperbolických tyčí s délkou 15 - 25 cm a průměrem okolo 1 cm. Tyče jsou vyrobeny z nerezové oceli nebo molybdenu a pro vyšší korozivní odolnost mohou být potaženy vrstvou keramiky. Separace iontů v kvadrupólovém analyzátozem je založena na principu vkládání vhodné kombinace stejnosměrné a střídavé vysokofrekvenční složky elektrického napětí (protilehlé spojené tyče mají stejnou polaritu), čehož dosáhneme stabilní trajektorie pro ionty s požadovanou hodnotou m/z , které jsou vedeny kvadrupólem až k detektoru. Trajektorie ostatních iontů jsou nestabilní a dochází k jejich vybití na jednotlivých tyčích kvadrupólu. Proces vkládání vhodného poměru napětí se aplikuje i na ostatní hodnoty m/z izotopů prvků vybraných k analýze. I když se teoretická skenovací rychlost pohybuje okolo 2 500 amu/s, tak pro kvantitativní stanovení 25 prvků ve vzorku je potřeba 1 - 2 minuty²²⁻²⁴.

2.2.5 Detektory

Jednou z posledních součástí každého ICP-MS spektrometru je detektor, který slouží k převedení proudu rozseparovaných iontů na měřitelný elektrický signál. V současnosti je většina spektrometrů vybavena elektronovým násobičem s oddělenými dynodami, který nejlépe vyhovuje kladeným požadavkům (možnost stopové analýzy, široký dynamický rozsah a nízký šum). Dříve používanými typy detektorů byla Faradayova klec a channeltron²²⁻²⁴.

Elektronový násobič s oddělenými dynodami

Elektronový násobič s oddělenými dynodami umístěný obvykle v poloze „off axis“ je složen z 15 až 20 oddělených dynod pokrytých vrstvičkou oxidů kovů s vysokou emisí elektronů. Po dopadu iontů na první dynodu jsou emitovány tzv. sekundární elektrony, jenž jsou směřovány el. polem k dalším dynodám, kde opět dochází k emisi sekundárních elektronů (zesílení). Vzniklý mnohonásobně zesílený elektronový pulz je posléze zachycen na anodě. Dostatečně širokého dynamického rozsahu dosáhneme použitím dvou měřících módů, a to pulzního (vyšší zesílení, detekce nízkých koncentrací) společně s analogovým (nižší zesílení, detekce vysokých koncentrací)^{23, 24}.

2.2.6 Interference

Interference, zatěžující kvantitativní stanovení prvků, lze v ICP-MS rozdělit do dvou hlavních skupin, a to na interference nespektrální a spektrální.

Nespektrální interference

Nespektrální interference způsobené nejčastěji vysokým obsahem rozpuštěných pevných látek (TDS), kyselin a snadno ionizovatelných prvků v analyzovaných roztocích můžeme rozdělit na interference ovlivňující transport a zmlžování, ionizaci a v neposlední řadě interference způsobující zanášení až potažmo ucpání kónusů interface usazenými solemi nebo uhlíkem (sazemi) z použitých organických rozpouštědel. Nespektrální interference lze eliminovat použitím vhodného interního standardu přiváděného v nízké koncentraci (ppb) po celou dobu analýzy^{23, 24}.

Spektrální interference

Spektrální interference, řadící se mezi nejvíce problematické interference zatěžující kvantitativní stanovení prvků, můžeme rozdělit na interference izobarické a polyatomické.

Izobarické interference

Až 70 % prvků periodické soustavy se v přírodě vyskytuje jako směs několika izotopů, proto může dojít k situaci, kdy dva izotopy různých prvků (prvek matrice a analyt) mohou mít shodnou nominální hodnotu (m/z). Tedy izotop prvku pocházejícího z matrice vytváří izobarickou interferenci vůči měřenému analytu. Diference hodnot (m/z) jsou natolik malé, že ani hmotnostní spektrometry s vysokým rozlišením nejsou schopny izobarické interference od sebe rozlišit. Izobarické interference lze eliminovat vhodnou volbou izotopu nebo použitím matematických korekčních rovnic^{23, 24}.

Polyatomické interference

Polyatomické ionty složené z dvou nebo i více atomických iontů, jejichž hodnota m/z je shodná s hodnotou m/z izotopu analyzovaného prvku můžeme rozdělit do dvou skupin:

1) Ionty vzniklé spojením iontů argonu s matricí vzorku, ale i kyslíkem a dusíkem z okolního vzduchu ($^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ ($^{56}\text{Fe}^+$), $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ ($^{75}\text{As}^+$), $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ ($^{52}\text{Cr}^+$), ...)

2) Ionty vzniklé spojením samotných prvků s H^+ , $^{16}\text{O}^+$, $^{16}\text{OH}^+$ ($^{79}\text{BrH}^+$ ($^{80}\text{Se}^+$), $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$ ($^{56}\text{Fe}^+$), $^{31}\text{P}^{18}\text{O}^{16}\text{OH}^+$ ($^{66}\text{Zn}^+$), ...) a dvojnásobně nabitě ionty ($^{140}\text{Ce}^{2+}$ ($^{70}\text{Ge}^+$, $^{70}\text{Zn}^+$),...) - intenzitu výskytu oxidických a dvojnásobně nabitých iontů lze potlačit optimalizací podmínek ICP^{23, 24}.

Eliminace spektrálních interferencí

Nejvhodnějším způsobem jak eliminovat polyatomické interference je volba vhodného izotopu, ale i použití spektrometrů s vysokým rozlišením. Mezi další aplikovatelné postupy patří matematické korekční rovnice, metoda tzv. studeného plazmatu a v neposlední řadě použití kolizně-reakčních cel^{23, 24}.

Matematické korekční rovnice - izobarické a méně závažné polyatomické interference, využití matematického modelu s ohledem na procentuální zastoupení jednotlivých izotopů.

Cool/cold plasma - využívá nižšího příkonu do plazmatu (500 - 800 W) a zvýšení průtoku nosného plynu (1,5 - 1,8 ml/min), což vede k potlačení polyatomických interferencí vycházejících z argonu ($^{38}\text{ArH}^+$, $^{40}\text{Ar}^+$, $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$, ...).

Kolizně-reakční cely - obvykle ve spojení s kvadrupólovým analyzátozem, dle použitého multipólu, mechanismu eliminace a použitého plynu cely dělíme na:

1) *Kolizní cely* - využívají hexapól nebo oktapól naplněný inertním plynem (H_2 , He, Ar, Xe, ...), mechanismus eliminace spočívá ve snížení kinetické energie polyatomického iontu v podobě srážek s kolizním plynem (KED - kinetic energy discrimination). Vhodné pro polyatomické ionty lišících se značně svými srážkovými průřezy od analytu.

2) *Reakční cely* - využívají kvadrupól (hmotnostní filtr) naplněný reaktivním plynem (NH_3 , CH_4 , O_2 , ...), mechanismus eliminace spočívá v chemické reakci mezi polyatomickými ionty a atomy či molekulami reakčního plynu za vzniku specií o rozdílné nominální hodnotě m/z nebo neutrálních částic. Vysoce reaktivní plyny zvyšují počet ion-molekulových reakcí, což přispívá k efektivnější a rychlejší eliminaci polyatomických iontů.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie, přístroje a pomůcky

3.1.1 Chemikálie

- mykofenolát mofetil (šarže 744020-08014, 744020-08114, 744020-08214)
- silymarin (šarže 81315000514, 81315001014, 81315001214)
- nicergolin (šarže 725110-03014, 725110-03114, 725110-03314)
- bromokriptin-mesilát (šarže 72221100314, 72221100414, 72221100514)
- buprenorfin hydrochlorid (šarže 70121203314, 70121203414, 70121203514).
- kyselina dusičná 65 % (Suprapur®), Merck, Darmstadt, Německo
- kyselina dusičná 67 % (Analpure, pro stopovou analýzu), Analytika spol. s.r.o., Praha
- kyselina sírová 96 % (Suprapur®), Merck, Darmstadt, Německo
- kyselina chlorovodíková ≥ 37 % puriss. p.a. ACS reagent, reag. ISO, Reag. Ph. Eur, SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, USA
- kyselina octová 100 % (EMSURE®) ACS, ISO, Reag. Ph. Eur, SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, USA
- peroxid vodíku ≥ 35 % purum p.a., SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, USA
- octan amonný ≥ 98 %, BioXtra, SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, USA
- sulfid sodný hydrát ($\text{Na}_2\text{S} \cdot x\text{H}_2\text{O}$) pro gravimetrickou analýzu, SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, USA
- síran sodný 99,8 % bezvodý, tested according to Ph. Eur., SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, USA
- dusičnan olovnatý ≥ 99 % puriss. p.a. Reag. ACS, Reag. Ph. Eur., Riedel-deHaën
- glycerol 85 % (EMSURE®) Reag. Ph. Eur., Merck, Darmstadt, Německo
- CRM víceprvkový vodný kalibrační roztok o hmotnostní koncentraci $100 \pm 0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ (každý) MIX 007 (Au, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru v 20 % HCl (v/v)), Analytika spol. s.r.o., Praha
- CRM víceprvkový vodný kalibrační roztok o hmotnostní koncentraci $100 \pm 0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ (každý) MIX 015 (Al, Be, Bi, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Si, Sr, V, W, Zn, Zr v 5 % HNO_3 (v/v)), Analytika spol. s.r.o., Praha

- CRM vodného kalibračního roztoku o hmotnostní koncentraci $1,000 \pm 0,002 \text{ g.l}^{-1}$ (Ag v 2 % HNO_3 (v/v)) o čistotě 99,999 %, Analytika spol. s.r.o., Praha
- CRM vodného kalibračního roztoku o hmotnostní koncentraci $1,000 \pm 0,002 \text{ g.l}^{-1}$ (Cr v 2 % HNO_3 (v/v)) o čistotě 99,99+ %, Analytika spol. s.r.o., Praha
- CRM vodného kalibračního roztoku o hmotnostní koncentraci $1,000 \pm 0,002 \text{ g.l}^{-1}$ (Hg v 5 % HNO_3 (v/v)) o čistotě 99,999+ %, Analytika spol. s.r.o., Praha
- kalibrační roztok interního standardu pro ICP-MS INT MIX 1 $10 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ (Y, In, Bi, Tb v 5 % HNO_3 (v/v)), Analytika spol. s.r.o., Praha
- Tuning Solution for ICP-MS 7500cs $1 \mu\text{g.l}^{-1}$ (Ce, Co, Li, Mg, Tl, Y v 2 % HNO_3 (v/v)), Agilent Technologies, USA
- CRM jezerní vody TM-15.2, (LOT 0313), National Laboratory for Environ. Testing, Kanada
- deionizovaná voda ($\geq 18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)

3.1.2 Přístroje

- ORS-ICP-MS 7700x, Agilent Technologies, Japonsko
- mikrovlnný rozkladný systém UltraWave, Milestone, Itálie
- elektronické váhy XP205 Delta Range®, Mettler Toledo, Švýcarsko
- muflová pec Nabertherm B180, Nabertherm, Německo
- pH metr Seven Multi Pro, Mettler Toledo, Švýcarsko
- skleněná elektroda InLab® Routine, Mettler Toledo, Švýcarsko
- zařízení k přípravě deionizované vody Direct-Q UV Millipore, Francie

Mikrovlnný rozkladný systém UltraWave je složen z vodou chlazené nerezové reakční komory, jejíž teplota je udržována pod $60 \text{ }^\circ\text{C}$ (navzdory vysokým teplotám uvnitř reakční komory). Mineralizace probíhá současně buď v 5 nebo 15 křemenných zkumavkách uzavřených volnými teflonovými uzávěry, dle velikosti použitých mineralizačních zkumavek (40 nebo 15 ml) vložených do vhodného teflonového držáku. Před začátkem rozkladu je reakční komora natlakována inertním plynem (dusík) na počáteční tlak, který přispívá ke zvýšení teploty varu mineralizační směsi a zároveň slouží i jako tlakový uzávěr pro každou mineralizační zkumavku. Rozklad probíhá s využitím mikrovlnného záření působícího na

rozkladnou směs, která pomocí absorpce dodávaného mikrovlnného záření dosáhne teploty varu, kdy dojde k výraznému zvýšení tlaku v reakční komoře (maximální urychlení rozkladu).

Hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem byl vybaven autosamplérem ASX-520 (Agilent Technologies, USA), mikrokoncentrickým zmlžovačem GE Micromist, chlazenou Scottovou mlžnou komorou, dvojicí niklových kónusů, oktapólovou reakčně-kolizní celou a v neposlední řadě kvadrupólovým analyzátozem. K analýzám byl použit argon o čistotě 4.6 (zásobník Euro-Cyl 230, SIAD), k eliminaci polyatomických interferencí byla využita oktapólová reakčně-kolizní cela pracující v héliovém módu (kolizní plyn helium o čistotě 5.5, SIAD).

3.1.3 Pomůcky

- křemenné mineralizační zkumavky s volnými teflonovými uzávěry
- automatické pipety Transferpette® S digital (2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl), BRAND, Německo
- nerezové laboratorní pomůcky (špachtle, kleště, pinzeta)
- platinové kelímky
- skleněné laboratorní nádobí (nedělené pipety (2 ml, 5 ml, 10 ml), kádinky 50 ml, zkumavky 50 ml, odměrné baňky se zátkami 25 ml, 50 ml, exsikátor naplněný silikagelem)
- plastové laboratorní nádobí (zkumavky s víčky, kelímky, pipetovací špičky, kapátka, kádinky (50 ml, 100 ml, 500 ml, 1000 ml), filtrační aparatura dle Ph. Eur.)
- teflonové laboratorní nádobí (kádinky 100 ml, míchadlo)

Plastové nádobí použité pro přípravu kalibračních a modelových roztoků bylo předpřipraveno namočením v 10 % kyselině dusičné po dobu 24 hod., následně opakovaně opláchnuto deionizovanou vodou a vysušeno v sušárně při 65 °C. Takto předpřipravené plastové nádobí pro stopovou analýzu pomocí ICP-MS bylo uschováno v plastových sáčcích s uzávěrem.

Skleněné, plastové a teflonové laboratorní nádobí používané v laboratoři QC v Teva Czech Industries s.r.o. bylo předpřipraveno 5 krokovým mycím postupem skládajícím se z výplachu teplou vodou a popřípadě mechanického vyčištění mycím kartáčem, mytí saponátem (Extran MA02 neutral) a teplou vodou, výplachu teplou vodou, výplachu deionizovanou vodou a nakonec opláchnutí 96 % velejmným ethanolem s následným vysušením.

3.1.4 Analyzované účinné farmaceutické látky

K analýzám byly vybrány následující účinné farmaceutické látky (API - active pharmaceutical ingredient), a to mykofenolát mofetil, silymarin, nicergolin, bromokriptin-mesilát a jeden prekurzor buprenorfin hydrochlorid. Od každé substance byly pro analýzu a porovnání inovovaných metod s metodami popsány v Americkém, Evropském a Českém lékopise použity tři šarže, které byly mezi analýzami uchovávány dle platného nařízení, a to buď při laboratorní teplotě (mykofenolát mofetil, silymarin) nebo v lednici (nicergolin, bromokriptin-mesilát a buprenorfin hydrochlorid). Povolené limity obsahu těžkých kovů a síranového popela v jednotlivých substancích jsou uvedeny v Tab. III.

Tab. III Povolené limity

Účinná farmaceutická látka	Těžké kovy (ppm)	Síranový popel (%)
Mykofenolát mofetil	20	0,1
Silymarin	100	1,0
Nicergolin	20	0,1
Bromocriptinmesilát	20	0,1
Buprenorfin hydrochlorid	20	0,1

Pro stanovení výtěžností těžkých kovů pomocí ICP-MS byly vybrány dle USP, Ph. Eur, ČL a směrnice EMEA následující kovy (Pb, Hg, Bi, As, Sb, Sn, Cd, Ag, Mo, Cu, V, Pd, Pt, Ru, Au, Ir, Rh, Os, Ni, Cr, Mn, Fe, Zn)^{4, 6, 8, 12}.

3.2 Pracovní postupy

3.2.1 Příprava roztoků podle Evropského lékopisu

Roztok olova (1 mg Pb/ml)

Přesně navážené množství dusičnanu olovnatého odpovídající 0,400 g $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ se rozpustilo v deionizované vodě a zředilo se jí na 250,0 ml.

Tlumivý roztok o pH 3,5

Přesně navážené množství 25,0 g octanu amonného se rozpustilo ve 25 ml deionizované vodě a přidalo se 38,0 ml kyseliny chlorovodíkové, dále se podle potřeby upravilo pH na hodnotu 3,5 zředěnou kyselinou chlorovodíkovou nebo zředěným amoniakem a následně se tlumivý roztok zředil deionizovanou vodou na 100,0 ml.

Amoniak zředěný RS1 (Obsah 100 - 104 g/l NH_3)

Přesně navážené množství 41,0 g amoniaku 26 % se zředilo deionizovanou vodou na 100,0 ml.

Kyselina octová zředěná RS (Obsah 115 - 125 g/l CH_3COOH)

Přesně navážené množství 12,0 g ledové kyseliny octové se zředilo deionizovanou vodou na 100,0 ml.

Sulfid sodný RS1

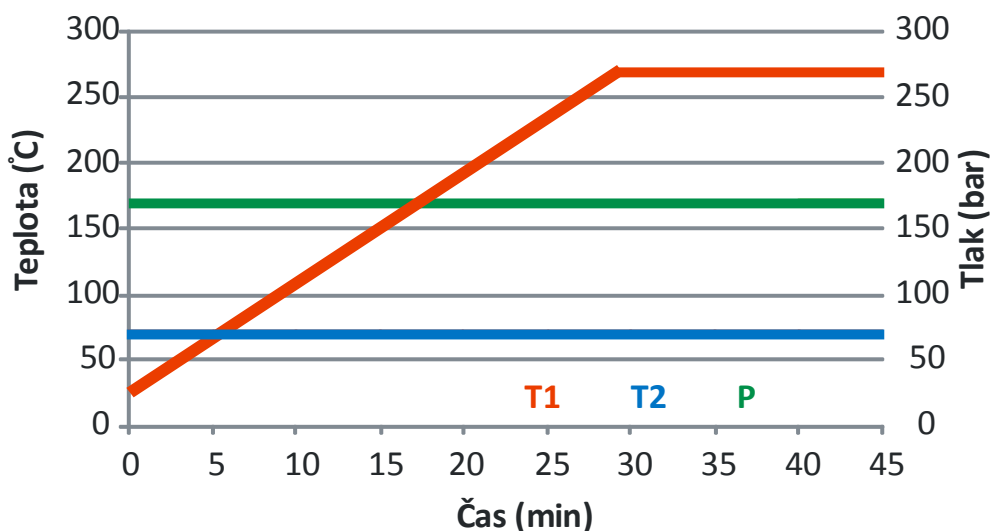
Přesně navážené množství 5,0 g sulfidu sodného se za horka rozpustilo ve směsi 10 ml deionizované vody a 30 ml glycerolu.

Zkoumadlo thioacetamidové R

0,2 ml thioacetamidu RS (roztok o koncentraci 40 g/l) se smíchalo s 1 ml směsí složené z 5 ml deionizované vody, 15 ml hydroxidu sodného (1 mol/l) a 20 ml glycerolu. Vzniklá směs se před vybarvovací reakcí zahřívala 20 s na vodní lázni. Zkoumadlo thioacetamidové R se připravilo vždy těsně před použitím.

3.2.2 Rozklady účinných farmaceutických látek

Rozklad účinných farmaceutických látek probíhal v mikrovlnném rozkladném systému UltraWave, jež umožňoval souběžný rozklad v 5 (Síranový popel) nebo až v 15 (Těžké kovy) křemenných zkumavkách uzavřených volnými teflonovými uzávěry. K přesně naváženým látkám v mineralizačních zkumavkách bylo dle navážky přidáno buď 5 ml (Těžké kovy) nebo 10 ml (Síranový popel) kyseliny dusičné a analyzované látky byly rozpuštěny za pomoci ultrazvukové lázně. Po zazátkování volnými uzávěry byly zkumavky seřazeny do vhodného teflonového držáku. Do teflonové vložky s těsněním byl připraven základní roztok tak, že se do ní nejprve vložila křemenná podložka (dilatace mezi teflonovým dnem a držákem zkumavek - nutná při rozkladu nad 260 °C) a předepsané množství 130 ml deionizované vody, 5 ml peroxidu vodíku a 2 ml koncentrované kyseliny dusičné. Následně byl držák se zkumavkami vložen do reakční komory, která byla po zajištění bezpečnostními svorkami natlakována dusíkem na počáteční tlak 40 bar. Vzorky byly mineralizovány pomocí dvoukrokového rozkladného programu (Obr. 3). Po odふうnutí tlaku a vychladnutí zkumavek na teplotu okolo 40 °C byly mineralizáty kvantitativně převedeny do 100 ml teflonových kádinek viz kapitoly 3.2.3 Limitní test Těžké kovy a 3.2.4 Limitní test Síranový popel.



Obr. 3 Použitý rozkladný program

Teplota T1 - vnitřní teplota tlakového reaktoru, Teplota T2 - teplota nádoby z nerezové oceli, P - maximální tlak

3.2.3 Limitní test Těžké kovy

Pro každou substanci byla připravena sada analyzovaných roztoků sestávající se z kontrolního roztoku, zkoušeného roztoku, porovnávacího roztoku a monitorovacího roztoku. Ke kontrolnímu a monitorovacímu roztoku byl přidán přídavek roztoku olova odpovídající povolenému množství těžkých kovů v substanci Tab. III. Zkoušený a monitorovací roztok byly připraveny pro každou testovanou šarži zvlášť. Do 15 ml křemenných zkumavek bylo naváženo 0,5 g substance (Silymarin 0,1 g) a k porovnávacímu a monitorovacím roztokům byl přidán vhodný přídavek roztoku standardu olova o koncentraci 1 mg Pb/ml. Rozklad byl proveden dle postupu popsaného v kap. 3.2.2 Rozklad účinných farmaceutických látek. Po vychladnutí mineralizačních zkumavek na teplotu okolo 40 °C byly mineralizáty kvantitativně převedeny do 100 ml teflonových kádinek. Nadbytečné množství kyseliny dusičné bylo odpařeno při teplotě 70 °C do "poslední kapky" na keramickém vařiči. Po ochlazení byla rezidua kvantitativně převedena vodou do 50 ml kádinek tak, aby objem nepřesáhl 25 ml. Následně se pH metrem s magnetickou míchačkou upravilo pH roztoků na hodnotu 3,0 až 4,0 pomocí roztoků amoniaku zředěného RS1 a kyseliny octové zředěné RS. Upravené roztoky se kvantitativně převedly do 50 ml zkumavek tak, aby objem nepřesáhl 40 ml, přidaly se 2 ml tlumivého roztoku o pH 3,5, promíchalo se a přidalo se buď 0,1 ml sulfidu sodného RS1 nebo 1,2 ml zkoumadla thioacetamidového R (připraveného těsně před použitím). Po promíchání se roztoky zředily deionizovanou vodou na objem 50 ml a po opětovném promíchání se roztoky nechaly 2 minuty stát. Jednotlivé roztoky se přefiltrovaly přes nylonový membránový filtr (velikost pórů 0,45 nebo 1 μm). Vyhodnocení limitního testu musí být provedeno bezprostředně po filtraci a je založeno na porovnání intenzity zbarvení jednotlivých skvrn na filtrech, získaných přefiltrováním jednotlivých roztoků. Hnědé zbarvení skvrny zkoušeného roztoku není intenzivnější než zbarvení skvrn monitorovacích roztoků.

Test způsobilosti:

- skvrna získaná filtrací porovnávacího roztoku vykazuje hnědé zbarvení srovnatelné se skvrnou získanou filtrací kontrolního roztoku.
- skvrna získaná filtrací monitorovacího roztoku je nejméně stejně intenzivní jako skvrna získaná filtrací porovnávacího roztoku.

3.2.4 Limitní test Síranový popel

Pro každou substanci byla připravena sada analyzovaných roztoků sestávající se z kontrolního roztoku, zkoušeného roztoku a monitorovacího roztoku, ke kterému byl přidán roztok síranu sodného odpovídající přídatku 0,5 % Na₂SO₄. Zkoušený a monitorovací roztok byly připraveny pro každou testovanou šarži zvlášť. Do 40 ml křemenných zkumavek bylo naváženo 1,0 g substance (Silymarin 0,5 g) a k monitorovacím roztokům byl přidán vhodný přídatok roztoku síranu sodného o koncentraci 0,1 g Na₂SO₄/ml. Rozklad byl proveden dle postupu uvedeného v kap. 3.2.2 Rozklad účinných farmaceutických látek. Po vychladnutí mineralizačních zkumavek na teplotu okolo 40 °C byly mineralizáty kvantitativně převedeny do 100 ml teflonových kádinek. Nadbytečné množství kyseliny dusičné bylo odpařeno při teplotě 125 °C do sucha na keramickém vařiči. Pro konečnou část limitního testu byly využity platinové kelímky, které byly žíhány při 600 ± 50 °C po dobu 30 min. v muflové peci a po jejich vychladnutí v exsikátoru nad silikagelem byly zváženy. Následně byly odparky kvantitativně převedeny destilovanou vodou (za horka) do platinových kelímků, kde bylo k roztokům přidáno 0,25 ml kyseliny sírové. Platinové kelímky byly zahřívány do ukončení vyvíjení bílých dýmů na keramickém vařiči, a to nejprve na 4. stupeň do "poslední kapky" (odpaření vody a zbytku kyseliny dusičné) a následně na 7.- 9. stupeň (odpaření nadbytečného množství kyseliny sírové). Zbylá rezidua byla žíhána při 600 ± 50 °C po dobu 30 min. v muflové peci. Vychladnuté platinové kelímky byly zváženy a z hmotností platinových kelímků před a po provedení limitního testu byl vypočten procentuální obsah síranového popela v 1 g substance podle rovnice:

$$\text{Síranový popel (\%)} = \Delta m \times \text{navážka} \times 100 \quad (2)$$

Δm rozdíl hmotnosti platinového kelímku po a před stanovením

3.2.5 Příprava modelových roztoků pro stanovení výtěžnosti kovů

Modelové vzorky byly připraveny z 5 ml kyseliny dusičné obsahující vhodné přídavky roztoků těžkých kovů (Pb, Hg, Bi, As, Sb, Sn, Cd, Ag, Mo, Cu, V, Pd, Pt, Ru, Au, Ir, Rh, Os, Ni, Cr, Mn, Fe, Zn) odpovídající množství 20 ppm v navážce 0,5 g substance. Po promíchání byla kyselina podrobena mikrovlnnému rozkladu viz. kap. 2.3.2 Rozklad účinných farmaceutických látek a po ochlazení byly vzorky kvantitativně převedeny do 100 ml teflonových kádinek. Nadbytečná kyselina byla odpařena při teplotě 70 °C do "poslední kapky" na keramickém vařiči a vzniklá rezidua byla kvantitativně převedena do 25 ml odměrných baněk. Po vhodném naředění byly ve vzorcích stanoveny koncentrace kovů, ze kterých byly vypočteny příslušné výtěžnosti. Na koncentrační hladině 20 ppm byly připraveny 3 repliky pro stanovení vybraných kovů. Spolu se vzorky byl stejnou cestou zpracováván i slepý pokus, který se sestával pouze z 5 ml kyseliny dusičné.

3.2.6 Příprava vodných kalibračních roztoků a interního standardu

Před vlastní přípravou kalibračních roztoků byl ze všech vodných kalibračních roztoků o koncentraci 1,000 g.l⁻¹, popřípadě 100 mg.l⁻¹ připraven směsný zásobní roztok o koncentraci 10 mg.l⁻¹, který byl dále dle potřeby ředěn. K přípravě směsného zásobního roztoku a všech kalibračních roztoků byly použity 25 ml skleněné odměrné baňky se zátkami, plastové kelímky a špičky předpřipravené pro stopovou analýzu. Maximální ředění použité v jednom ředícím kroku bylo 100 krát. Výsledné kalibrační roztoky byly okyseleny 1 ml 67 % kyseliny dusičné a důkladně promíchány. Ke kalibraci ORS-ICP-MS byla použita pětice roztoků o koncentraci 0,1; 1; 10; 100 a 300 μg.l⁻¹. Dále byl připraven do 25 ml odměrné baňky roztok interního standardu (Bi, Y, Tb, In) o výsledné koncentraci 100 μg.l⁻¹ ředěním základního roztoku interního standardu (INT MIX 1) o koncentraci 10 mg.l⁻¹ deionizovanou vodou.

3.3 Použité instrumentální techniky

3.3.1 ORS-ICP-MS

Ke stanovení koncentrací příslušných kovů v modelových vzorcích byl využit ORS-ICP-MS spektrometr vybavený oktapólovou kolizně-reakční celou a kvadrupólovým analyzátozem. Ke stanovení kovů bylo využito dvou měřících módů, prvním byl [No Gas] pro Os, Ir, Pt, Au, Hg, Pb, Bi a druhým [He] mód, využívající oktapólové kolizně-reakční cely pracující v héliovém módu k potlačení spektrální interferencí, pro stanovení V, Cr, Mn, Ni, Cu, As, Mo, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, Sn, Sb. Parametry použité pro kvantitativní stanovení těžkých kovů pomocí ORS-ICP-MS jsou uvedeny v Tab. IV.

Tab. IV Parametry měření ORS-ICP-MS, integrační čas a měřící mód

ORS-ICP-MS				
Plazmová hlavice		Izotop	Integrační čas (s)	Měřící mód
Příkon generátoru	1 550 W	⁵¹ V	0,10	[He]
Vnější plazmový plyn	14,95 l.min ⁻¹	⁵² Cr	0,30	[He]
Střední plazmový plyn	0,9 l.min ⁻¹	⁵⁵ Mn	0,10	[He]
Nosný plyn	1,09 l.min ⁻¹	⁵⁶ Fe	0,10	[He]
		⁶⁰ Ni	0,10	[He]
Iontová optika		⁶³ Cu	0,10	[He]
Extract 1	0 V	⁶⁶ Zn	0,10	[He]
Extract 2	- 195 V	⁷⁵ As	0,10	[He]
		⁹⁵ Mo	0,10	[He]
Mód [No Gas]		¹⁰¹ Ru	0,10	[He]
Kolizní cela		¹⁰³ Rh	0,10	[He]
Cela vstup	- 30 V	¹⁰⁵ Pd	0,10	[He]
Cela výstup	- 50 V	¹⁰⁷ Ag	0,10	[He]
		¹¹¹ Cd	0,10	[He]
Mód [He]		¹¹⁸ Sn	0,10	[He]
Cela vstup	- 40 V	¹²¹ Sb	0,10	[He]
Cela výstup	- 60 V	¹⁸⁹ Os	0,10	[No Gas]
Průtok helia	4,3 ml.min ⁻¹	¹⁹³ Ir	0,10	[No Gas]
Energetická diskriminace	3 V	¹⁹⁵ Pt	0,10	[No Gas]
		¹⁹⁷ Au	0,10	[No Gas]
Sběr dat		²⁰² Hg	0,10	[No Gas]
Akviziční mód	Spektrum	⁽²⁰⁶⁺²⁰⁷⁺²⁰⁸⁾ Pb	0,30	[No Gas]
Peak pattern	1 bod	²⁰⁹ Bi	0,10	[No Gas]
Repliky měření	3			

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Výtěžnosti těžkých kovů

K výpočtu výtěžností byly použity koncentrace kovů naměřené pomocí ORS-ICP-MS, podmínky měření jsou uvedeny v experimentální části (kap. 3.3.1 ORS-ICP-MS). Kvantifikace kovů byla provedena metodou kalibrační křivky vytvořené měřením pětice kalibračních roztoků o koncentraci 0,1; 1; 10; 100 a 300 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Kontrola kalibrace byla provedena měřením CR TM-15.2. Po celou dobu měření byl peristaltickou pumpou kontinuálně přiváděn roztok interního standardu sloužící k eliminaci nespektrálních interferencí. Všechny analyzované kovy byly softwarově navázány na ^{115}In jako interní standard. Vypočtené výtěžnosti jsou uvedeny v Tab. V. Výtěžnost a RSD byly vypočteny na základě dat získaných ze 3 nezávislých měření modelových vzorků.

Tab. V Výtěžnosti těžkých kovů

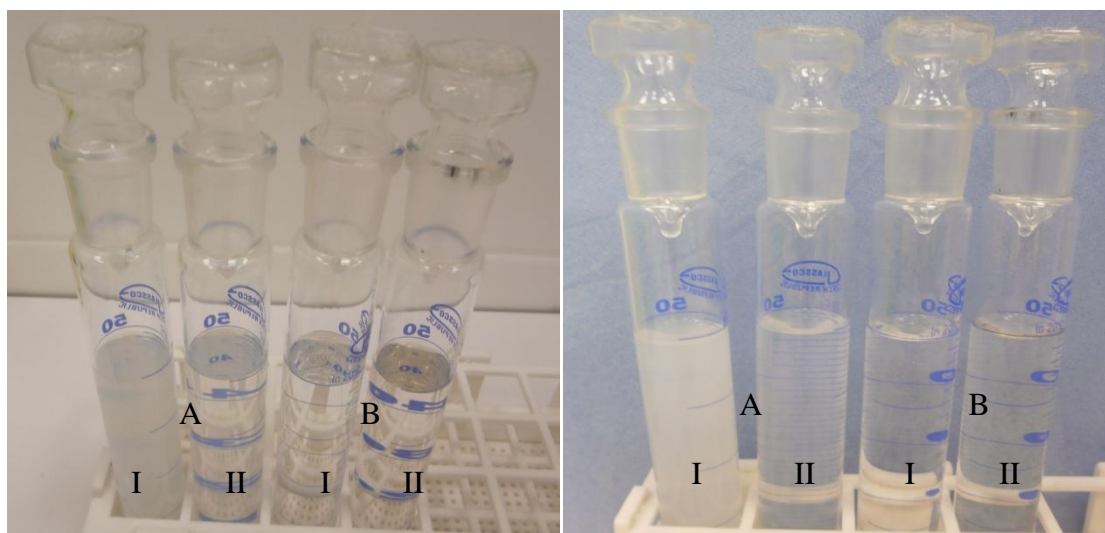
Izotop	Výtěžnost (%)	RSD (%)	Izotop	Výtěžnost (%)	RSD (%)
^{51}V	100,6	0,6	^{107}Ag	112,3	1,8
^{52}Cr	103,1	1,8	^{111}Cd	101,8	1,7
^{55}Mn	99,3	0,5	^{118}Sn	82,7	3,5
^{56}Fe	99,5	2,1	^{121}Sb	95,1	2,0
^{60}Ni	99,9	0,5	^{189}Os	32,0	13,2
^{63}Cu	103,2	0,8	^{193}Ir	96,8	1,6
^{66}Zn	98,1	2,2	^{195}Pt	95,9	2,6
^{75}As	84,5	3,2	^{197}Au	63,3	5,6
^{95}Mo	99,7	1,2	^{202}Hg	96,0	2,3
^{101}Ru	70,4	11,8	^{208}Pb	104,2	0,7
^{103}Rh	103,4	2,3	^{209}Bi	82,2	5,2
^{105}Pd	95,3	1,1			

n = 3

Vyhodnocením výsledků výtěžností kovů pohybujících se v rozmezí od 82,2 % pro ^{209}Bi do 112,3 % pro ^{107}Ag , lze vyvodit závěr, že postup založený na mikrovlnné mineralizaci v uzavřeném systému spolu s následným odpařením nadbytečné kyseliny dusičné je vhodný pro stanovení těžkých kovů ve farmaceutických substancích. Výjimku tvoří ^{189}Os (32,0 %), ^{197}Au (63,3 %) a ^{101}Ru (70,4 %), u nichž mohlo dojít ke ztrátě během přípravy vzorku odpařením nebo sorpcí na povrch teflonového kelímku (paměťový efekt). Přesnost stanovení na koncentrační hladině 20 ppm se pohybovala v rozmezí 0,5 - 13,2 %.

4.2 Těžké kovy - vyhodnocení a porovnání výsledků

První inovovanou metodou byl limitní test na Těžké kovy, kdy inovace zahrnovala aplikaci mikrovlnného rozkladu v uzavřeném systému k mineralizaci farmaceutických substancí. Prvotní experimenty byly provedeny dle postupu metody G uvedené v lékopisném článku 3.4.8. Těžké kovy (ČL, Ph. Eur)^{6, 8}. Metoda G popisuje provedení limitního testu těžkých kovů po předchozí dvoukrokové mineralizaci v uzavřeném mikrovlnném rozkladném systému. Po rozkladu a ochlazení mineralizačních kelímků byly mineralizáty kvantitativně převedeny do 50 ml kádinek vodou tak, aby objem nepřesáhl 25 ml, následně se hodnota pH upravila na 3,0 až 4,0 pH metrem s magnetickou míchačkou pomocí roztoků amoniaku zředěného RS1 a kyseliny octové zředěné RS. Upravené roztoky se kvantitativně převedly do 50 ml zkumavek tak, aby objem nepřesáhl 40 ml, přidaly se 2 ml tlumivého roztoku o pH 3,5, promíchalo se a přidalo se buď 0,1 ml sulfidu sodného RS1 nebo 1,2 ml zkoumadla thioacetamidového R (připraveného těsně před použitím). Po promíchání se roztoky zředily deionizovanou vodou na objem 50 ml a po opětovném promíchání se nechaly stát po dobu 2 min. Při použití předepsaného postupu nastala komplikace ve vyhodnocení limitního testu, jelikož po přidavku srážecího činidla (zkoumadlo thioacetamidové R nebo sulfid sodný RS1) se začal vytvářet zákal koloidní sraženiny síry pocházející ze srážecího činidla, který bránil jeho vyhodnocení (Obr. 4, sada zkumavek označených písmenem A). Proto byly hledány nové přístupy jak potlačit vliv oxidačních vlastností kyseliny dusičné nespotřebované pro rozklad účinných farmaceutických látek a přitom minimalizovat ztráty těžkých kovů během celého procesu. Jako vhodný nástroj bylo použito odpaření nadbytečného množství kyseliny dusičné ve 100 ml teflonových kádinkách při teplotě nepřesahující 70 °C. Vhodnost použitého postupu potvrzuje Tab. V, ze které vyplývá, že výtěžnost jednotlivých kovů se pohybuje v rozmezí od 82,2 % pro ²⁰⁹Bi do 112,3 % pro ¹⁰⁷Ag po provedení kompletního procesu mineralizace a následného odpaření (vyjimku tvoří ¹⁸⁹Os (32,0 %), ¹⁹⁷Au (63,3 %) a ¹⁰¹Ru (70,4 %)). Na Obr. 4 je uvedeno porovnání kontrolních a porovnávacích roztoků připravených pomocí obou postupů (před a po inovaci lékopisné metody G).

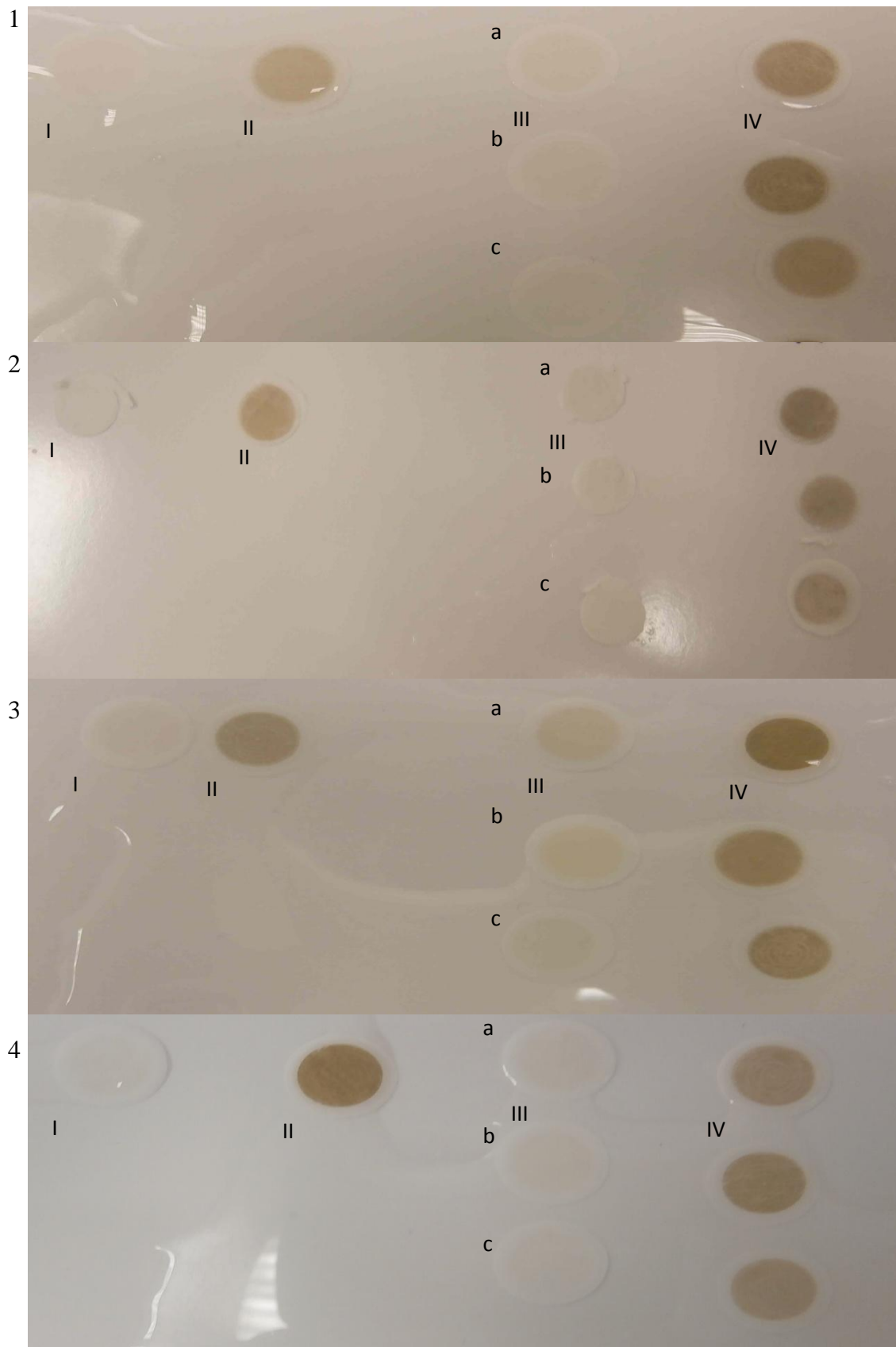


Obr. 4 Vybarvovací reakce se zkoumadlem thioacetamidovým R
 Dvojice zkumavek označená A (postup dle Metody G), Dvojice zkumavek označená B (postup dle inovované Metody G), I- kontrolní roztok, II- porovnávací roztok

Pro ověření vhodnosti inovované metody byly provedeny na třech šaržích příslušné limitní testy, jejichž výsledky byly porovnány s výsledky získanými buď Metodou C (dle Ph. Eur.)⁶ nebo Metodou II (dle USP)⁴. Dosažené výsledky jsou uvedeny v Tab. VI, přímé vizuální porovnání zabarvení skvrn získaných filtrací jednotlivých roztoků je prezentováno na Obr. 5.

Tab. VI Výsledky limitních testů

Substance	Šarže	Těžké kovy (ppm) S.M.	Těžké kovy (ppm) I.M.
Mykofenolát mofetil	744020-08014	< 20	< 20
	744020-08114	< 20	< 20
	744020-08214	< 20	< 20
Nicergolin	725110-03014	< 20	< 20
	725110-03114	< 20	< 20
	725110-03314	< 20	< 20
Silymarin	81315000514	< 100	< 100
	81315001014	< 100	< 100
	81315001214	< 100	< 100
Bromocriptin-mesilát	72221100314	< 20	< 20
	72221100414	< 20	< 20
	72221100514	< 20	< 20
Buprenorfin hydrochlorid	70121203314	< 20	< 20
	70121203414	< 20	< 20
	70121203514	< 20	< 20



Obr. 5 Vyhodnocení limitního testu

1-Mykofenolát mofetil, 2-Silymarin, 3-Bromocriptin-mesilát, 4-Buprenorfin HCl

I-kontrolní roztok, II-porovnávací roztok, III-zkoušený roztok, IV-monitorovací roztok
a,b,c - analyzované šarže

Výše uvedené výsledky výtěžností a zejména hodnoty uvedené v Tab. VI spolu s Obr. 5 prezentující vizuální vyhodnocení limitních testů potvrzují, že inovovaná Metoda G je vhodná pro využití v rutinní praxi, kde svými nespornými výhodami (vysoká výtěžnost, nižší analyzované navážky (0,1 - 0,25 g), simultánní mineralizace v jednom rozkladném cyklu) může konkurovat současně používaným lékopisným metodám. Další výhodou inovované metody je prevence proti ztrátám těkavých kovů během samotného rozkladu, k čemuž může docházet u rozkladu substancí žiháním při teplotě 800 °C (Ph. Eur., ČL 2.4.8 Těžké kovy Metoda C) nebo 600 °C (USP <231> Metoda II) v muflové peci.

4.3 Síranový popel - vyhodnocení a porovnání výsledků

Druhou inovovanou metodou byl limitní test pro vyhodnocení obsahu síranového popela, kdy inovace spočívala v nahrazení rozkladného kroku mikrovlnnou mineralizací v uzavřeném systému. Postup rozkladu popsáný v lékopisných člancích <281> Residue on ignition (USP)⁵, 2.4.14 Sulphated ash (Ph. Eur.)⁷ a 2.4.14 Síranový popel (ČL)⁹ zahrnuje kompletní dekompozici analyzovaných substancí malým množstvím kyseliny sírové při teplotě 600 ± 50 °C v muflové peci. Hlavním problémem aplikace mikrovlnného rozkladu bylo odstranění nadbytečné kyseliny dusičné, která by ve směsi se stopami chloridů (kyseliny chlorovodíkové) mohla vytvářet "lučavku královskou" reagující s povrchem platinových kelímků. K odstranění nadbytečné kyseliny dusičné bylo využito její nízké teploty varu (84 °C a 121,9 °C bezvodá kyselina a její vodný azeotrop)²⁶, ale i inertnosti a tepelné odolnosti teflonu. Nadbytečná kyselina dusičná byla odpařena do sucha ve 100 ml teflonových kádinkách při teplotě pod 125 °C na keramickém vařiči (viz kap. 3.2.4 Limitní test Síranový popel).

Pro ověření vhodnosti inovované metody byly provedeny na třech šaržích příslušné limitní testy, jejichž výsledky byly porovnány s výsledky získanými buď postupem dle článku 2.4.14 Sulphated ash/Síranový popel (Ph. Eur. a ČL)^{7, 9} nebo postupem dle článku <281> Residue on ignition (USP)⁵. Dosažené výsledky jsou uvedeny v Tab. VII., kde pro substance s obsahem síranového popela pod 0,05 % (nevážitelný zbytek po žihání) jsou uvedeny i výtěžností přídavku 0,5 % Na₂SO₄ přidaného ke každé šarži před vlastním mikrovlnným rozkladem.

Tab. VII Výsledky limitních testů

Substance	Šarže	Síranový popel (%) S.M.	Síranový popel (%) I.M.	Výtěžnost (%)
Mykofenolát mofetil	744020-08014	< 0,05	< 0,05	100
	744020-08114	< 0,05	< 0,05	99
	744020-08214	< 0,05	< 0,05	101
Nicergolin	725110-03014	< 0,05	< 0,05	99
	725110-03114	< 0,05	< 0,05	101
	725110-03314	< 0,05	< 0,05	100
Silymarin	81315000514	0,23	0,26	-
	81315001014	0,30	0,29	-
	81315001214	0,27	0,29	-
Bromocriptin-mesilát	72221100314	< 0,05	0,06	101
	72221100414	< 0,05	< 0,05	100
	72221100514	< 0,05	< 0,05	100
Buprenorfin hydrochlorid	70121203314	< 0,05	< 0,05	101
	70121203414	< 0,05	< 0,05	99
	70121203514	< 0,05	< 0,05	101

Porovnáním výsledků získaných lékopisnými metodami popsány v Ph. Eur., USP a ČL s inovovanou metodou lze konstatovat, že inovovaná metoda je vhodná pro rutinní analýzy Síranových popelů ve farmaceutických substancích. Mezi hlavní přednosti inovované metody patří nižší spotřeba kyseliny sírové pro rozklad a převedení netěkavých sloučenin na sírany, vysoká výtěžnost metody v rozmezí 99 - 101 %, možnost simultánní mineralizace farmaceutických substancí v jednom rozkladném kroku a v neposlední řadě nahrazení zdlouhavého rozkladu substancí kyselinou sírovou na vařiči a v muflové peci, při kterém může docházet ke ztrátám analytu ve formě malých částecek popela unášených proudem vznikajících zplodin (ovlivnění výsledku, snížení výtěžnosti).

5. ZÁVĚR

V teoretické části rigorózní práce byly přehledně shrnuty metody lékopisných limitních testů pro stanovení těžkých kovů a síranového popela ve farmaceutických substancích a jejich meziproduktech společně se základním principem, instrumentací ICP-MS a přehledem spektrálních a nespektrálních interferencí s možnostmi jejich eliminace.

Cílem experimentální práce byla inovace limitní lékopisné metody pro stanovení těžkých kovů (Metoda G) a metody pro stanovení obsahu síranového popela ve farmaceutických substancích. Inovace metod zahrnovala nahrazení rozkladného kroku mikrovláknou mineralizací v uzavřeném systému (UltraWave, Milestone) a následnou vhodnou úpravu mineralizátů před vlastním vyhodnocením limitních testů. Úprava mineralizátu pro stanovení těžkých kovů zahrnovala odpaření do poslední kapky při teplotě nepřesahující 70 °C v teflonových kádinkách, naředění s úpravou pH, naředění s přidáním pufru a následném vybarvení pomocí zkoumadla thioacetamidového R nebo glycerinového roztoku sulfidu sodného. Úprava mineralizátu pro provedení limitního testu pro stanovení množství síranového popela zahrnovala odpaření do sucha při teplotě nepřesahující 125 °C v teflonových kádinkách a následné převedení odparků do platinových kelímků, kde bylo provedeno vyhodnocení limitního testu po vyžihání obsahu s přidavkem kyseliny sírové. Součástí testování vhodnosti metod pro rutinní stanovení nečistot bylo jednak vyhodnocení výtěžností vybraných těžkých kovů (Pb, Hg, Bi, As, Sb, Sn, Cd, Ag, Mo, Cu, V, Pd, Pt, Ru, Au, Ir, Rh, Os, Ni, Cr, Mn, Fe, Zn), ale i přidavků Na₂SO₄ (Síranový popel). Stěžejní fází testování bylo porovnání výsledků inovovaných metod s výsledky získanými použitím stávajících lékopisných metod na pěti účinných farmaceutických substancích, a to mykofenolát mofetilu, nicergolinu, silymarinu, bromocriptin mesilátu a buprenorfin hydrochloridu vyráběných společností Teva Czech Industries s.r.o..

Závěrem lze konstatovat, že kladené cíle byly splněny, byla vypracována literární rešerše a úspěšně inovovány lékopisné limitní testy Těžké kovy a Síranový popel. Z dosažených výsledků, lze říci, že obě jsou vhodnou alternativou ke stávajícím používaným metodám, které některými parametry jako je výtěžnost, přesnost, rychlost, šetrnost k životnímu prostředí, nižší spotřeba chemikálií převyšují. Výsledkem experimentální práce bylo sepsání 10 výzkumných zpráv, které podstoupily schvalovací proces ve společnosti Teva Czech Industries, s.r.o.. Metodika inovovaných limitních lékopisných testů bude dále rozšiřována na další farmaceutické substance vyráběné v Teva Czech Industries, s.r.o..

6. LITERATURA

1. Rudovica V., Viksna A., Actins A.: *J. Pharmacuet. Biomed.* **91**, 119-122 (2014).
2. Raghuram P., Raju I. V. S., Sriramulu J.: *Pharmazine* **65**, 15-18 (2010).
3. Lewen N.: *J. Pharmacuet. Biomed.* **55**, 653-661 (2011).
4. United States Pharmacopeia, General chapter <231> Heavy metals, 37-NF32, 2014.
5. United States Pharmacopeia, General chapter <281> Residue on ignition, 37-NF32, 2014.
6. European Pharmacopeia, General chapter 2.4.8 Heavy metals, Volume 8.2, 2014.
7. European Pharmacopeia, General chapter 2.4.14 Sulphated ash, Volume 8.2, 2014.
8. Český lékopis (ČL 2009 - Dopl. 2014), kapitola 2.4.8 Těžké kovy, 2014.
9. Český lékopis (ČL 2009 - Dopl. 2014), kapitola 2.4.14 Síranový popel, 2014.
10. United States Pharmacopeia, General chapter <232> Elemental Impurities-Limits, 37-NF32, 2014.
11. United States Pharmacopeia, General chapter <232> Elemental Impurities-Procedures, 37-NF32, 2014.
12. EMEA Guidance, Guideline on the specification limits for residues of metal catalysts or metal reagents, 2008
13. Rao R. N., Talluri M. V. N. K.: *J. Pharmacuet. Biomed.* **43**, 1-13 (2007).
14. Huang J. Q., Hu X., Zhang J. R., Li K. X., Yan Y., Xu X. B.: *J. Pharmacuet. Biomed.* **40**, 227-234 (2006).
15. Lewen N., Mathew S., Schenkenberger M., Raglione T.: *J. Pharmacuet. Biomed.* **35**, 739-752 (2004).
16. Hoecke K. V., Catry C., Vanhaecke F.: *J. Anal. Atom. Spectrom.* **27**, 1909-1919 (2012).
17. Stoving C., Jensen H., Gammelgaard B., Sturup S.: *J. Pharmacuet. Biomed.* **84**, 209-214 (2013).
18. Wang T. B., Wu J., Hartman R., Jia X. J., Egan R. S.: *J. Pharmacuet. Biomed.* **23**, 867-890 (2000).
19. Barin J. S., Tischer B., Picoloto R. S., Antes F. G., da Silva F. E. B., Paula F. R., Flores E. M. M.: *J. Anal. Atom. Spectrom.* **29**, 352-358 (2014).
20. Murty A., Kulshresta U. C., Rao T. N., Talluri M.: *Indian J. Chem. Techn.* **12**, 229-231 (2005).

21. Food and H. H. S. Drug Administration, Federal register. **73**, 9576-9577 (2008).
22. Hill J. S.: *Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications*. Blackwell Publishing, Oxford 2007.
23. Nelms S. M.: *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Handbook*. Blackwell Publishing, Oxford 2005.
24. Thomas R.: *Practical Guide to ICP-MS A Tutorial for Beginners*. CRC Press, Boca Raton 2007.
25. Mihaljevic M., Strnad L., Sebek O.: Chem. Listy. **98**, 123-130 (2004).
26. Kameníček J., Šindelář Z., Pastorek R., Kašpárek F.: *Anorganická chemie*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2006.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CE	Kapilární elektroforéza
ČL	Český lékopis
DCP	Stejnoseměrně vázané plazma
EMEA	European Medicines Agency
FA-AAS	Atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací
GF-AAS	Atomová absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací
GC	Plynová chromatografie
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie
ICP	Indukčně vázané plazma
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-OES	Optická emisní spektrometrie s buzením v plazmatu
I.M.	Inovovaná metoda
KED	Diskriminace podle kinetické energie
LA-ICP-MS	ICP-MS ve spojení s laserovou ablací
LA-ICP-OES	ICP-OES ve spojení s laserovou ablací
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti
MIP	Mikrovlnně indukované plazma
ORS-ICP-MS	ICP-MS s oktapólovým reakčním systémem
Ph. Eur.	Evropský lékopis
Q-ICP-MS	ICP-MS s kvadrupólovým analyzátozem
SF	Sektorový analyzátoz
S.M.	Stávající metoda
TDS	Rozpuštěné pevné částice
TOF	Průletový analyzátoz
USP	Americký lékopis