

**VISOKA ŠOLA ZA VARSTVO OKOLJA**

DIPLOMSKO DELO  
**DOLOČANJE ŽELEZA Z ATOMSKO ABSORPCIJSKO  
SPEKTROMETRIJO (VALIDACIJA METODE)**

JANJA TRBOJEVIĆ

VELENJE, 2016

**VISOKA ŠOLA ZA VARSTVO OKOLJA**

DIPLOMSKO DELO  
**DOLOČANJE ŽELEZA Z ATOMSKO ABSORPCIJSKO  
SPEKTROMETRIJO (VALIDACIJA METODE)**

JANJA TRBOJEVIĆ  
Dodiplomski visokošolski  
strokovni študijski program 1. stopnje

Mentorica: viš. pred. dr. Nataša Kovačič  
Somentor: uni. dipl. inž. kem. Igor Kovšca

VELENJE, 2016

Na podlagi Diplomskega reda izdajam naslednji

### SKLEP O DIPLOMSKEM DELU

Študentka Visoke šole za varstvo okolja **Janja Trbojevič** lahko izdela diplomsko delo z naslovom v slovenskem jeziku:

**Določanje železa z atomsko absorpcijsko spektrometrijo (validacija metode).**

Naslov diplomskega dela v angleškem jeziku:

**Determination of iron with atomic absorption spectroscopy (method validation).**

Mentorica: **viš. pred. dr. Nataša Kovačič.**

Diplomsko delo mora biti izdelano v skladu z Navodili za izdelavo diplomskega dela.

Pouk o pravnem sredstvu: zoper ta sklep je dovoljena pritožba na Senat VŠVO v roku 8 delovnih dni od prejema sklepa.



Doc. dr. Boštjan Pokorny  
dekan



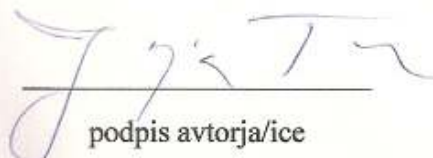
## Izjava o avtorstvu

Podpisani/a \_\_\_\_\_ Janja Trbojević \_\_\_\_\_, z vpisno številko \_\_\_\_\_ 34080110 \_\_\_\_\_, študent/ka dodiplomskega/podiplomskega (obkrožite) študijskega programa Varstvo okolja in ekotehnologije, sem avtor/ica diplomskega dela z naslovom  
**DOLOČANJE ŽELEZA Z ATOMSKO ABSORPCIJSKO SPEKTROMETRIJO (VALIDACIJA METODE),**  
ki sem ga izdelal/a pod mentorstvom \_\_\_\_\_ viš. pred. dr. Nataše Kovačić \_\_\_\_\_ in somentorstvom \_\_\_\_\_ uni. dipl. inž. kem. Igorja Kovšče \_\_\_\_\_.

S svojim podpisom zagotavljam, da:

- je predloženo delo moje avtorsko delo, torej rezultat mojega lastnega raziskovalnega dela;
- da oddano delo ni bilo predloženo za pridobitev drugih strokovnih nazivov v Sloveniji ali tujini;
- da so dela in mnenja drugih avtorjev, ki jih uporabljam v predloženem delu, navedena oz. citirana v skladu z navodili VŠVO;
- da so vsa dela in mnenja drugih avtorjev navedena v seznamu virov, ki je sestavni element predloženega dela in je zapisan v skladu z navodili VŠVO;
- se zavedam, da je plagiatorstvo kaznivo dejanje;
- se zavedam posledic, ki jih dokazano plagiatorstvo lahko predstavlja za predloženo delo in moj status na VŠVO;
- je diplomsko delo jezikovno korektno in da je delo lektorirala Ksenja Lorber (roj. Brezavšček, diploma Univerza v Ljubljani, PA, št. 7547/84-R, 28. 2. 1984);
- da dovoljujem objavo diplomskega dela v elektronski obliki na spletni strani VŠVO;
- da sta tiskana in elektronska verzija oddanega dela identični.

V Velenju, dne 14.10.2015



podpis avtorja/ice

## 1 IZVLEČEK IN KLJUČNE BESEDE

Varnost in učinkovitost zdravil sta dve temeljni vprašanji, pomembni za zdravljenje s farmacevtskimi izdelki. Da zagotovimo varnost farmacevtskega izdelka, je potrebno preveriti njegovo kakovost v vseh fazah proizvodnje, od surovine pa do končnega izdelka. Kontrola kakovosti je pomembna bodisi zato, da zagotovimo ustrezno vsebnost določene učinkovine v izdelku, ali pa da preverimo, da ta ne vsebuje ostalih »sestavin«, tako imenovanih nečistot, ki v izdelek ne sodijo. Nečistote imajo namreč lahko neželene farmakološke-toksikološke učinke. Zaradi vpliva teh je lahko terapevtska učinkovitost izdelka manjša. Zato je potrebno farmacevtske izdelke preveriti čim bolj popolno in v več fazah proizvodnje. S spremljanjem in nadzorom nečistot lahko damo določeno zagotovilo za kakovost in varnost izdelka, zato je laboratorijska kontrola kakovosti med pomembnimi področji v sodobni farmacevtski analitiki.

Toksičnost določenih elementov je dobro znana že vrsto let. Težke kovine, kot sta na primer svinec in kadmij, predstavljajo tveganje za resne nevarnosti za zdravje že pri zelo nizkih odmerkih, česar se danes zaveda že velika večina uporabnikov farmacevtskih izdelkov. Na drugi strani imamo elemente, kot je železo, ki so v normalnih količinah koristni za človeški organizem in pri katerih so primeri zastrupitve redki, oziroma se lahko pojavijo pri dolgotrajnem jemanju velikih odmerkov. Kljub temu pa lahko železo kot nečistota moti delovanje ostalih zdravil in zmanjša terapevtski učinek teh.

V farmacevtski analitiki se že vrsto let za testiranje zdravil na prisotnost železa kot nečistote uporabljajo standarde metode, opisane v farmakopejah (Ameriška, Evropska ...). Ti postopki so bili čez leta izpopolnjeni, z namenom zagotavljanja zanesljivejših informacij. Z uporabo bolj sodobnih instrumentalnih tehnik, kot je atomska absorpcijska spektroskopija (AAS), lahko namreč določimo vrsto elementa in točno količino tega tudi v zelo nizkih koncentracijah (npr. ppb). Ta omogoča, da pridemo do bolj podrobnih informacij o prisotnosti približno 70-ih elementov na vzorcih surovin in končnih izdelkov. Z uvajanjem novih tehnik pa pride seveda tudi iskanje in uvajanje novih metod, ki predpisujejo obdelavo vzorca do takšne faze, da lahko izvedemo meritve na atomskem absorpcijskem spektrofotometru. Največkrat uporabljamo metode predpisane v farmakopejah. Vse metode morajo biti najprej optimizirane, da dobimo optimalne pogoje za merjenje, in nato validirane, da preverimo in potrdimo njihovo ustreznost za uporabo v redni kontroli.

Ker imam možnost, da pri svojem delu sodelujem pri optimizaciji in validaciji metod, sem se odločila, da v diplomski nalogi opišem potek validacije metode, za določanje železa, po Evropski farmakopeji, z atomsko absorpcijsko spektrometrijo. Meritve sem izvedla na vzorcu surovine, in sicer na bakrovem sulfatu penta-hidratu, ki ga uporabljamo pri proizvodnji izdelkov za kozmetiko in kot oblogo za nekatere tablete.

### **Ključne besede:**

- farmacevtski izdelki,
- kontrola kakovosti,
- bakrov sulfat penta-hidrat,
- železo,
- nečistota,
- plamenska atomska absorpcijska spektrometrija,
- validacija metode.

## 2 ABSTRACT AND KEY WORDS

The efficiency and safety of medical drugs are two of the most fundamental questions when discussing medical treatment with pharmaceutical products. To ensure the safety of the later products, constant checks of quality are necessary during all of the manufacturing steps, from basic resource to the final product. Quality checks are necessary both to ensure the necessary levels of a specific compound in the drug as well as ensuring that no other resources, called impurities, that should not have been in the drug, are present. The later can have unwanted pharmaceutic-toxic effects which can diminish the efficiency of the drug. Due to this fact quality checks are maintained and thoroughly implemented in multiple steps of the drug production. Monitoring these unwanted resources provides a guarantee of both safety and quality of the product, which means laboratory conducted control of quality steps at the forefront of modern pharmaceutical analysis.

A toxic effect of certain elements is well documented. Heavy metals, such as lead or cadmium, represent a serious risk for one's health even in small dosage. On the other hand there are elements, such as iron, which are safe and beneficial for human organism in normal dosage. These also show very few cases of toxic damage or show such damages only when they are administered in large dosage through a prolonged period of time. Even though iron can be an unwanted element and can interrupt a proper effect of other drugs and diminish their beneficial effects.

In pharmaceutical analysis there are standardised methods to check for unwanted iron that have been present for many years. These methods have been described in pharmacopeia (American, European ...). These procedures have been improved through the years, primary goal of improvement being more accurate information. We can use modern instrumental methods such as atomic absorption spectroscopy (AAS), which can identify the element and its exact quantity even in very low values (such as in ppb). This allows us to access more accurate information regarding the presence of some seventy different elements in the samples of basic resources and final products. With the implementation of new techniques comes the search and implementation of new methods, which prescribe the treatment of samples to such a phase that a measurement on atomic absorption spectrophotometer is actually possible and valid. In most cases the criteria are described in pharmacopeia. All of these methods must be optimized and validated, both to ensure optimal measurement conditions and to check and confirm their usefulness in regular control procedures.

As I have a unique opportunity to participate in method optimization and validation I have decided to describe a process of validation I have conducted on flame atomic absorption spectrophotometer. The measurement was used to identify iron and the method is described in the European pharmacopeia. My measurement was conducted on the sample of basic resource, more accurately on copper sulphate penta-hydrate, which is used in the manufacture of cosmetically beneficial items and as a cover for certain pills.

### KEY WORDS

- pharmaceutical products,
- quality control,
- copper sulphate pentahydrate,
- iron,
- impurities,
- flame atomic absorption spectrometry,
- method validation.

**KAZALO VSEBINE**

1	IZVLEČEK IN KLJUČNE BESEDE.....	1
2	ABSTRACT AND KEY WORDS.....	2
3	UVOD.....	6
4	MATERIAL IN METODE DE LA.....	8
5	ŽELEZO.....	9
5.1	METODE ZA VIZUALNO DOLOČANJE PRISOTNOSTI ŽELEZA.....	9
5.1.1	Metoda po: European Pharmacopoeia 8.0, poglavje: 2.4.9. Iron (železo).....	9
5.1.2	Metoda po: US Pharmacopoeia 38 – poglavje: 241 Iron (železo).....	10
6	ATOMSKA ABSORPCIJSKA SPEKTROMetriJA – PLAMENSKA TEHNIKA.....	11
7	VALIDACIJA ANALIZNE METODE.....	16
7.1	PREDPISANA ANALIZNA METODA ZA DOLOČANJE ŽELEZA NA VZORCU BAKROV SULFAT PENTA-HIDRAT PO Ph. Eur. ....	18
7.2	EKSPERIMENTALNI POTEK VALIDACIJE METODE IN REZULTATI.....	20
7.2.1	MEJA ZAZNAVNOSTI (Detection limit – DL) in MEJA DOLOČITVE (Quantitation limit – QL).....	20
7.2.2	TOČNOST / IZKORISTEK (Accuracy / Recovery).....	23
7.2.3	NATANČNOST / PONOVLJIVOST METODE (Precision / Method precision).....	28
7.2.4	STABILNOST RAZTOPINE VZORCA (Stability of sample solution).....	30
7.2.5	LINEARNOST (Linearity).....	32
7.2.6	ROBUSTNOST / VPLIV RAHLO SPREMENJENIH ANALIZNIH POGOJEV (Robustness / Influence of slightly modified conditions).....	35
8	POVZETEK.....	39
9	SUMMARY.....	41
10	LITERATURA IN VIRI.....	43

**KAZALO SLIK**

Slika 1:	Primerjava barve raztopine vzorca in standardne raztopine železa; foto: J. Trbojević, 2015.....	10
Slika 2:	Plamenski atomski absorpcijski spektrofotometer; foto: J. Trbojević, 2015.....	11
Slika 3:	Pot raztopine vzorca od avtomatskega vzorčevalnika do plamena; foto: J. Trbojević, 2015.....	12
Slika 4:	Razpršilna komora; foto: J. Trbojević, 2015.....	12
Slika 5:	Razpršilna komora in gorilnik; foto: Seminar uporabe atomske spektroskopije v farmacevtski industriji E. Rajh, 2011.....	13
Slika 6:	Gorilnik in plamen, kamor razpršimo vzorec; foto: J. Trbojević, 2015.....	13
Slika 7:	Plini, ki se najpogosteje uporabljajo pri plamenski AAS (zrak, didušikov oksid in acetilen); foto: J. Trbojević, 2015.....	14
Slika 8:	Prostor kamor postavimo žarnico; foto: J. Trbojević, 2015.....	14
Slika 9:	Žarnica z votlo katodo; foto: Atomsko absorpcijska spektrometrija, Marjan Veber... ..	15
Slika 10:	Žarnica, z votlo katodo, za železo; foto: J. Trbojević, 2015.....	15
Slika 11:	Vzorec CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O; foto: J. Trbojević, 2015.....	18
Slika 12:	Prikaz računalniškega programa za meritve z AAS - optimizacija žarnice (Lamp - zelen stolpec) in signala; foto: J. Trbojević, 2015.....	21
Slika 13:	Priprava raztopin vzorca CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O; foto: J. Trbojević, 2015.....	23
Slika 14:	Raztopine vzorca v plastičnih epruveh, pripravljene za meritev; foto: J. Trbojević, 2015.....	23
Slika 15:	Prikaz računalniškega programa za meritve z AAS - izris umeritvene krivulje; foto: J. Trbojević, 2015.....	25
Slika 16:	Merjenje raztopin vzorcev (raztopina vzorca CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O, z dodatkom standardne raztopine železa, razpršena v plamenu; foto: J. Trbojević, 2015.....	25

**KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica 1:	Parametri, ki jih testiramo glede na tip metode; vir: Krka, d. d., Novo mesto – interno gradivo: SOP – Validacija analize metode.....	16
----------------	---	----

Preglednica 2: Rezultati določanja meje zaznavnosti; J. Trbojević, 2015 .....	22
Preglednica 3: Rezultati določanja meje določitve; J. Trbojević, 2015.....	22
Preglednica 4: Rezultati določanja točnosti; J. Trbojević, 2015 .....	26
Preglednica 5: Rezultati določanja ponovljivosti; J. Trbojević, 2015 .....	29
Preglednica 6: Rezultati določanja stabilnosti (na dan priprave raztopin vzorca); J. Trbojević, 2015.....	31
Preglednica 7: Rezultati določanja stabilnosti (po 24 urah od priprave raztopin vzorcev); J. Trbojević, 2015 .....	31
Preglednica 8: Rezultati določanja linearnosti; J. Trbojević, 2015 .....	34
Preglednica 9: Rezultati robustnosti - sprememba valovne dolžine (+ 0,1 nm); J. Trbojević, 2015.....	36
Preglednica 10: Rezultati robustnosti - sprememba časa izpiranja; J. Trbojević, 2015.....	37
Preglednica 11: Rezultati robustnosti - sprememba načina vzorčenja; J. Trbojević, 2015.....	37
Preglednica 12: Pregled kriterijev in ustreznosti kriterijev validirane metode; J. Trbojević, 2015.....	39
Chart 13: Criteria and result compliance of the validated method; J. Trbojević, 2015.....	41



## KRATICE IN POJMI

- **AAS:** atomska absorpcijska spektrometrija (Atomic Absorption Spectroscopy)
- **Analit:** je komponenta v raztopini vzorca ali standarda, ki jo vrednotimo.
- **Aspiriranje:** prenos raztopine iz epruvete do plamena, s pomočjo avtomatskega vzorčevalnika.
- **ETAAS:** elektrotermična atomska absorpcijska spektrometrija (Electrothermal Atomic Absorption Spectroscopy)
- **FAAS:** plamenska atomska absorpcijska spektrometrija (Flame Atomic Absorption Spectroscopy)
- **Generično zdravilo:** je zdravilo z isto količinsko in kakovostno sestavo učinkovine in iste farmacevtske oblike kot zdravilo originalnega proizvajalca.
- **ICP-AES:** atomska emisijska spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy)
- **ICP-MS:** masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy)
- **Kvantitativni testi:** so testi, ki jih izvajamo, da potrdimo ali ovržemo prisotnost določene snovi v raztopini vzorca (npr. določanje ionov). Njihov namen ni ugotavljati količino (npr. maso, koncentracijo).
- **Limitni testi:** so testi, katerih namen je potrditi, da določena snov v raztopini vzorca ne presega predpisane meje. Zato pri limitnih testih raztopine vzorcev primerjamo z enako pripravljenimi standardnimi raztopinami (z znano količino snovi, ki jo določamo).
- **Ph.Eur.:** Evropska farmakopeja (European Pharmacopoeia)
- **Povprečen vzorec:** je vzorec, ki je pripravljen tako, da iz več različnih embalaž istega materiala (npr. sodov, vreč, cistern) vzamemo predpisano manjšo količino materiala in jo združimo.
- **ppb:** parts-per-billion (delcev na milijardo delcev)
- **ppm:** parts-per-million (delcev na milijon delcev)
- **RSD:** relativni standardni odmik (Relative Standard Deviation)
- **Slepa raztopina vzorca** (slepi vzorec): raztopina, ki jo pripravimo na enak način kot raztopina vzorca, le da vzorca ne dodamo.
- **Substanca** (po Ph. Eur.: substanca za farmacevtsko uporabo): izraz vključuje vse zdravilne učinkovine, konzervanse in pomožne snovi ter spojine za sintezo učinkovin in detergente.
- **USP:** Ameriška farmakopeja (United States Pharmacopoeia)

### 3 UVOD

Krka, tovarna zdravil, je generično farmacevtsko podjetje. Njena osnovna dejavnost je proizvodnja in prodaja zdravil na recept, izdelkov za samozdravljenje, kozmetičnih in veterinarskih izdelkov. Kakovost v najširšem smislu ustvarjamo, ohranjamo in smo zanjo odgovorni vsi zaposleni. Posebej pa je za to zadolžen Sektor za upravljanje kakovosti, v katerem sem zaposlena. Zaposleni v Sektorju za upravljanje kakovosti (SUK), skupaj z ostalimi organizacijskimi enotami, skrbimo za ustrezno kakovost naših izdelkov. Naša glavna naloga je izvajanje laboratorijske kontrole vhodnih materialov in končnih izdelkov.

Pri proizvodnji farmacevtskih izdelkov se uporabljajo različne kovine in nekovine, ki imajo v izdelku vlogo aktivne farmacevtske učinkovine. Poleg teh pa se lahko v izdelku znajdejo tudi druge, tako imenovane nečistote, ki pridejo v farmacevtski izdelek bodisi zaradi prisotnosti v vhodnih surovinah, med sintezo ali morda ob stiku s proizvodno linijo in lahko potencialno ogrožajo zdravje uporabnikov. Proizvajalci učinkovin, surovin in polizdelkov, ki se uporabljajo v farmacevtski industriji, lahko pri procesu sinteze le teh uporabijo različne elemente, ki se nahajajo na periodnem sistemu. Prav tako lahko med samo pripravo surovine, ta pride v stik z različnimi materiali. Številne druge kovine in nekovine, ki sicer ne predstavljajo pomembnih elementov v farmacevtskem izdelku, se lahko uporabljajo pri sintezi farmacevtskega izdelka, in sicer kot reagenti in katalizatorji. Zaradi več možnih poti vstopa nečistot v farmacevtske izdelke je naš cilj spremljanje prisotnosti teh elementov v vseh fazah razvoja procesa proizvodnje.

Ko material oziroma surovina za izdelavo zdravila pride v tovarno, sledi sprejem materiala, nato pa skladiščenje. Od tam gre material na vzorčenje. Vse odvzete vzorce opremijo z ustreznimi podatki in dostavijo v kontrolne laboratorije Službe za laboratorijsko kontrolo kakovosti, ki opravljajo kontrolo tako, da izvedejo določene teste, na osnovi katerih določijo, ali je vzorec za proizvodnjo zdravil ustrezen ali ne. Končni izdelki, ki jih naredijo v proizvodnji, ponovno potujejo v Službo za laboratorijsko kontrolo kakovosti, kjer preverijo, ali je izdelek ustrezen za prodajo.

V sklopu Službe za laboratorijsko kontrolo kakovosti je tudi Oddelek za splošno fizikalno kemijsko analitiko, v katerem sem zaposlena. Na povprečnih vzorcih in posameznih embalažnih enotah surovin in končnih izdelkov izvajamo splošne fizikalno-kemijske teste (npr. določanje težkih kovin, vsebnosti, istovetnosti, optičnega zasuka). Mednje sodi tudi določanje železa. Vse teste izvajamo po predpisanih metodah. V preteklih letih smo za določanje železa uporabljali predvsem limitne teste predpisane v farmakopejah, s katerimi smo samo potrdili ali ovrgli prisotnost železa. Te metode so nespecifične, manj natančne in včasih tudi zamudne. Zato se v farmacevtski industriji razvijajo nove metode, ki predpisujejo uporabo visoko občutljivih in selektivnih tehnik, na primer plamenska atomska absorpcijska spektroskopija (FAAS), elektrotermična atomska absorpcijska spektroskopija (ETAAS), atomska emisijska spektroskopija z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-AES) in masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS). S temi tehnikami lahko namreč določimo vrsto elementa in točno količino le-tega tudi v zelo nizkih koncentracijah.

Ne le zaradi izpolnjevanja strogih zahtev, temveč tudi z vidika zagotavljanja varnosti in učinkovitosti farmacevtskih izdelkov tudi pri nas na Oddelku za splošno fizikalno kemijsko analitiko vse bolj uporabljamo metode za atomsko absorpcijsko spektrometrijo. Tako lahko dobimo bolj natančne podatke o prisotnosti različnih elementov v vzorcih.

Metode, ki jih uporabljamo na našem oddelku, nam določi Oddelek za razvoj in raziskave. Ta vse metode, tudi za atomsko absorpcijsko spektrometrijo, validira, preden gredo v uporabo. Z izvedbo validacije analizne metode je potrebno eksperimentalno preveriti sposobnost za uporabo v kontroli kakovosti.

Atomska absorpcijska spektrometrija je na našem oddelku nova tehnika, zato veliko sodelujemo z Oddelkom za razvoj in raziskave. Ker sem imela priložnost sodelovati tudi pri validaciji nekaterih metod za atomsko absorpcijsko spektrometrijo, sem se odločila, da to opišem v diplomski nalogi in po stopnjah prikažem, kaj vse je potrebno, da potrdimo ustreznost ene izmed metod, po katerih na našem oddelku zagotavljamo kakovost surovin in farmacevtskih izdelkov.

Izbrala sem si metodo za določanje železa (po Ph. Eur.) na surovini bakrov sulfat pentahidrat s plamensko atomsko absorpcijsko spektrometrijo. Od analitika, odgovornega za področje atomske absorpcijske spektrometrije, sem dobila protokol za validacijo metode. Tam so bili predpisani vsi parametri, ki sem jih morala testirati. Prav tako so bili predpisani načini vrednotenja rezultatov in sprejemljivi kriteriji. Obseg validacije je odvisen od narave analizne metode. Ta metoda se uporablja za določanje železa kot nečistote, zato so bili parametri, predpisani za testiranje, meja zaznavnosti, meja določitve, natančnost (ponovljivost metode), linearnost, točnost/izkoristek, stabilnost raztopine in robustnost (vpliv spremembe pogojev). Prikazala bom potek priprave raztopin vzorcev in raztopin standardov ter meritve na plamenskem atomskem absorpcijskem spektrofotometru. Na koncu bom prikazala tudi vse rezultate meritev in jih ovrednotila za vsak parameter posebej. Preverila bom tudi, če ustrezajo vsem predpisanim kriterijem, ter potrdila ustreznosti metode.

#### **4 MATERIALI IN METODE DE LA**

Pri svojem delu sem uporabila analizno metodo za določanje železa, za vzorec bakrov sulfat penta-hidrat, s plamensko atomsko absorpcijsko spektrometrijo, ki so jo napisali na Oddelku za razvoj in raziskave, po Evropski farmakopeji. Tam je predpisana priprava raztopin vzorcev in standardov. Prav tako so predpisane vse kemikalije, ki sem jih potrebovala pri pripravi raztopin, laboratorijska steklovina in pogoji za merjenje. Uporabila sem tudi interne standardne analizne postopke in standardne operative postope za atomsko absorpcijsko spektrometrijo in validacijo metode, ki predpisujejo izvedbo in vrednotenje rezultatov.

Moja raziskava je bila razdeljena na dva dela, in sicer na delo v analiznem laboratoriju in na obdelavo rezultatov z računalnikom. Prvi del je zajemal pripravo kemikalij in laboratorijske steklovine, pripravo raztopin vzorcev in raztopin standardov, kjer sem tehtala na analizni tehtnici in pipetirala z elektronskimi pipetami. Del laboratorijskega dela so bile tudi meritve raztopin vzorcev in standardnih raztopin na plamenskem atomskem absorpcijskem spektrofotometru (merjeni parametri: meja zaznavnosti, meja določitve, ponovljivost metode, linearnost, točnost/izkoristek, stabilnost raztopine, robustnost).

Drugi del raziskave je zajemal vnos vseh podatkov in rezultatov meritev v Excel tabele, ki so bile posebej narejene za validacijo metode. Sledili so še računalniška obdelava rezultatov in vrednotenje teh ter posredovanje analitiku odgovornemu za področje atomske absorpcijske spektrometrije.

## 5 ŽELEZO

Železo je po masi je najpogostejši element na Zemlji, saj tvori večino Zemljinega zunanjega in notranjega jedra. Igra zelo pomembno vlogo v biologiji, ker tvori v hemoglobinu in mioglobinu komplekse z molekularnim kisikom. Obe spojini prenašata kisik za celično dihanje. Človeški organizem ima to sposobnost, da se do določene mere lahko zavaruje pred preveliko absorpcijo železa. Primeri zastrupitev z železom so zato redki. Problemi lahko nastanejo, če je železo v veliki količini prisotno kot nečistota v določenem živilu ali zdravilu, ki ga redno uživamo in ga tako vnašamo v organizem nevede. Železo lahko vstopa v interakcije z mnogimi zdravili. Pri tem lahko pride do zmanjšane ali povečane absorpcije železa, kar lahko povzroči tudi toksičnost. Hkratna uporaba železa in določenih antibiotikov lahko povzroči klinično pomembno interakcijo in zmanjša terapevtsko koncentracijo antibiotika. Večji odmerki železa lahko katalizirajo oksidacijo in povečajo potrebe po vitaminu E. Da se izognemo takšnim neželenim učinkom in zagotovimo varnost farmacevtskega izdelka, moramo poskrbeti, da železo ni prisotno tam, kjer tega ne zahteva postopek proizvodnje. Zato je po predpisanih metodah potrebno preveriti njegovo kakovost, kar zajema tudi določanje železa, v vseh fazah proizvodnje.

Trenutno se za določanje prisotnosti železa uporabljajo predvsem metode predpisane v farmakopejah, katere temeljijo na vizualni primerjavi raztopine vzorca in raztopine standarda (spektroskopske metode). Te metode počasi opuščamo, saj ne dobimo nobenih številčnih rezultatov o tem, koliko je dejansko železa v vzorcu, ampak podamo zgolj vizualno oceno, glede na obarvanost raztopine vzorca in standarda, da količina železa ne presega meje, ki jo predpisuje zahteva.

### 5.1 METODE ZA VIZUALNO DOLOČANJE PRISOTNOSTI ŽELEZA

#### 5.1.1 Metoda po: European Pharmacopoeia 8.0, poglavje: 2.4.9. Iron (železo)

Določanje izvajamo vizualno s primerjavo raztopine vzorca s standardno raztopino železa

##### Reagenti:

- feri amonijev sulfat dodekahidrat  $[\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}]$ ; p.a.;
- standardna raztopina železa (1ppm Fe): v 500,0 mL merilno bučko natehtamo 863 mg  $[\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}]$  in ga raztopimo v vodi, razredčimo z vodo do 500,0 mL; 1 mL te raztopine odpipetiramo v 10 mL merilno bučko, razredčimo z vodo do oznake volumna in premešamo (1 mL = 20 ppm); 5 mL te raztopine odpipetiramo v 100 mL merilno bučko, razredčimo z vodo do oznake volumna in premešamo; ta raztopina vsebuje 0,001 mg železa v 1 mL (1 ppm);
- citronska kislina (200 g/L);
- tioglikolna kislina;
- raztopina amoniaka (175 g/L);
- voda: prečiščena.

##### Raztopina standarda:

Uporabimo 10 mL standardne raztopine železa 1ppm.

##### Raztopina vzorca:

Predpisano količino vzorca (g) raztopimo v vodi in razredčimo z vodo do 10 mL, oziroma uporabimo 10 mL raztopine vzorca, ki jo pripravimo po predpisani monografiji.

##### Postopek:

Raztopini standarda in raztopini vzorca dodamo po 2 mL raztopine citronske kisline (200 g/L) in 0,1 mL tioglikolne kisline. Naalkalimo z raztopino amoniaka (175 g/L) in pustimo stati 5 minut.

**Zahteva:**

Po 5 minutah kakršnakoli roza barva raztopine vzorca ne sme biti bolj intenzivna od barve raztopine standarda.

**5.1.2 Metoda po: US Pharmacopoeia 38 – poglavje 241 Iron (železo)**

Določanje izvajamo vizualno s primerjavo raztopine vzorca s standardno raztopino železa.

**Reagenti:**

- feri amonijev sulfat dodekahidrat [ $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ]; p.a.;
- $2\text{N H}_2\text{SO}_4$  (=  $1\text{M H}_2\text{SO}_4$ )
- standardna raztopina železa  $10 \mu\text{g/mL}$ : v  $100,0 \text{ mL}$  merilno bučko natehtamo  $863,4 \text{ mg}$  [ $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ] in ga raztopimo v vodi, dodamo  $10 \text{ mL}$   $1\text{M H}_2\text{SO}_4$  in razredčimo z vodo do  $100,0 \text{ mL}$ ;  $10 \text{ mL}$  te raztopine odpipetiramo v  $1000 \text{ mL}$  merilno bučko, dodamo  $10 \text{ mL}$   $1\text{M H}_2\text{SO}_4$ , razredčimo z vodo do oznake volumna in premešamo; ta raztopina vsebuje  $0,01 \text{ mg}$  ( $10 \mu\text{g}$ ) železa v  $1 \text{ mL}$ ;
- amonijev tiocianat ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ ); p.a.;
- raztopina amonijevega tiocianata: v  $100 \text{ mL}$  merilni bučki raztopimo  $30\text{g NH}_4\text{SCN}$  in dopolnimo z vodo do oznake volumna;
- klorovodikova kislina, koncentrirana  $\text{HCl}$  ( $36,5 \text{ \%}$ – $38,0 \text{ \% m/m}$ ); p.a.;
- kristali amonijevega peroksidisulfata ( $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ); p.a.;
- voda: prečiščena.

**Raztopina standarda:**

V  $50 \text{ mL}$  Nessler cilinder odpipetiramo  $1 \text{ mL}$  standardne raztopine železa ( $10 \mu\text{g Fe}^{3+}$ ), razredčimo z vodo do  $45 \text{ mL}$ , dodamo  $2 \text{ mL}$  koncentrirane  $\text{HCl}$  in premešamo.

**Raztopina vzorca:**

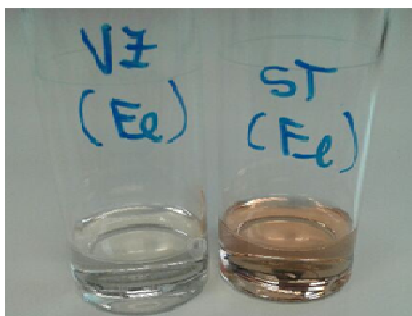
V  $50 \text{ mL}$  Nessler cilinder prenesemo raztopino vzorca, ki jo pripravimo po predpisani monografiji (če je potrebno, razredčimo z vodo do  $45 \text{ mL}$ ) ali preračunano količino vzorca ( $\text{g}$ ) raztopimo v vodi in razredčimo z vodo do  $45 \text{ mL}$ . Dodamo  $2 \text{ mL}$  koncentrirane  $\text{HCl}$  in premešamo.

Preračun količine vzorca v g:  $\frac{1,0}{1000 \times L}$  L = zahteva za železo v %

**Postopek:**

K raztopini standarda in raztopini vzorca dodamo  $50\text{mg}$  kristalov  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  in  $3 \text{ mL}$  raztopine  $\text{NH}_4\text{SCN}$  ter premešamo.

**Zahteva:** Barva raztopine vzorca ne sme biti močnejša od barve raztopine standarda.



Slika 1: Primerjava barve raztopine vzorca in standardne raztopine železa; foto: J. Trbojević, 2015

## 6 ATOMSKA ABSORPCIJSKA SPEKTROMETRIJA – PLAMENSKA TEHNIKA

Atomska absorpcijska spektrometrija je metoda, ki se uporablja za določanje okoli 70 kemijskih elementov, med katerimi je tudi železo. Pri tej tehniki prosti uparjeni atomi absorbirajo elektromagnetno valovanje pri specifični valovni dolžini. Rezultat je absorpcijski signal, ki je sorazmeren s koncentracijo prostih atomov na optični poti. Prednosti te tehnike sta visoka selektivnost, občutljivost (rezultate podajamo v ppm-ih in ppb-jih). Različne metode AAS se ločijo po načinu atomizacije, ta je lahko plamenska ali elektrotermična. Atomizacija je kritična faza tega procesa. Spektroskopska določitev atomskih vrst se lahko izvaja samo v plinskem mediju, v katerem so posamezni atomi ali njihovi ioni med seboj ločeni. Temperature atomizacije so v območju 1200–3150 °C. Fizikalni parameter, ki ga merimo pri AAS, je absorbanca, ki je posledica absorpcije svetlobe atomov v nevzbujenem stanju. Svetlobno vzbujeni atomi dajejo določeno število ozkih spektralnih vrhov in linij. Temperatura določa stopnjo atomizacije in razmerje vzbujenih, nevzbujenih, ioniziranih atomov.

(Vir: Uporaba atomske spektroskopije v farmacevtski industriji – seminar; Eva Rajh Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, doktorski študijski program kemijske znanosti; junij 2011.)



Slika 2: Plamenski atomski absorpcijski spektrofotometer; foto: J. Trbojević, 2015

Pri plamenski AAS (FAAS) uporabljamo atomski absorpcijski spektrometer s plamenom, kjer tekoče vzorce uvajamo v plamen preko razpršilnika, v katerem se vzorec pretvori v aerosol.



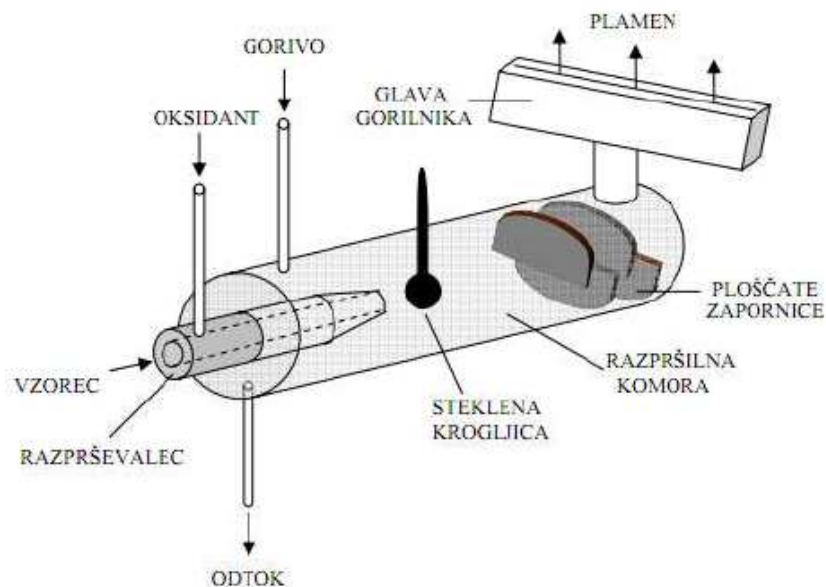
Slika 3: Pot raztopine vzorca od avtomatskega vzorčevalnika do plamena; foto: J. Trbojević, 2015

Aerosol uvajamo v razpršilno komoro, kjer se pomeša z oksidantom in gorilnim plinom. Vzorec nato kontinuirano uvajamo v plamen.



Slika 4: Razpršilna komora; foto: J. Trbojević, 2015





Slika 5: Razpršilna komora in gorilnik; foto: Seminar uporabe atomske spektroskopije v farmacevtski industriji E. Rajh, 2011



Slika 6: Gorilnik in plamen, kamor razpršimo vzorec; foto: J. Trbojević, 2015

Plamen predstavlja vir nevtralnih atomov ali molekul, ki absorbirajo energijo. Služi za izparevanje topila in atomizacijo vzorca. Plamen je najpogosteje mešanica acetilena ( $C_2H_2$ )/zraka, ki gori v temperaturnem območju 2120–2400 °C. Ko pa delamo s spojinami, ki tvorijo termično stabilne okside, pa je primernejši plamen iz mešanice acetilen/didušikov oksid ( $N_2O$ ), ki gori v temperaturnem območju 2600–2800 °C.

(Vir: Uporaba atomske spektroskopije v farmacevtski industriji – seminar; Eva Rajh Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, doktorski študijski program kemijske znanosti; junij 2011.)

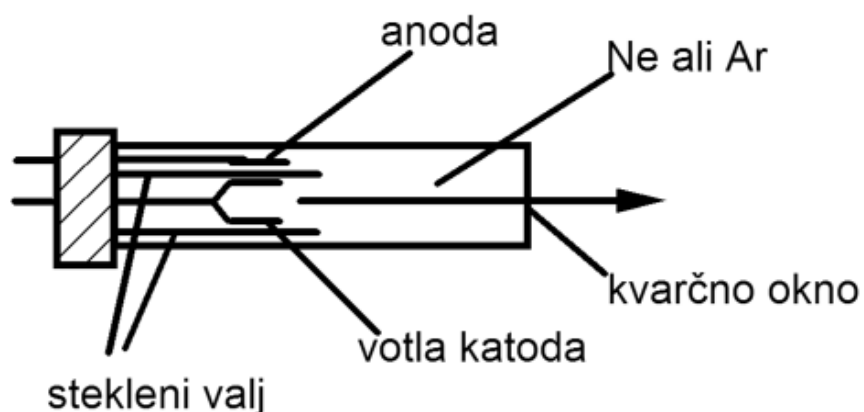


Slika 7: Plini, ki se najpogosteje uporabljajo pri plamenski AAS (zrak, didušikov oksid in acetilen); foto: J. Trbojević, 2015

Kot izvor svetlobe pri FAAS uporabljamo žarnico z votlo katodo (napolnjeno z žlahtnim plinom, in sicer argonom (Ar) ali neonom (Ne)) ali brezelektrodno visokofrekvenčno žarnico (sol, ki jo sestavlja izbrana kovina je zataljena v kvarčni cevki skupaj z inertnim plinom).



Slika 8: Prostor kamor postavimo žarnico; foto: J. Trbojević, 2015



Slika 9: Žarnica z votlo katodo; foto: Atomska absorpcijska spektrometrija, Marjan Veber



Slika 10: Žarnica, z votlo katodo, za železo; foto: J. Trbojević, 2015

Naloga izvora svetlobe je emitiranje ustreznih spektralnih črt za vzbujanje elektronov v atomih. Absorpcija emitirane svetlobe je sorazmerna z množino nevzbujenih atomov v vzorcu in posledično s koncentracijo analita. V primerjavi z elektrotermično atomsko absorpcijsko spektroskopijo je prednost FAAS predvsem enakomeren in miren signal. Slabosti pa so: občutljivost (mg/L), potrebne so relativno velike količine vzorca in pa kratek čas zadrževanja analita v plamenu, kar povečuje možnost nepopolne atomizacije. (Vir: Uporaba atomske spektroskopije v farmacevtski industriji – seminar; Eva Rajh Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, doktorski študijski program kemijske znanosti; junij 2011.)

## 7 VALIDACIJA ANALIZNE METODE

Cilj postopka je ovrednotenje analiznih metod. Z izvedbo validacije analizne metode je potrebno eksperimentalno preveriti sposobnost metode za uporabo v kontroli kakovosti. Obseg validacije je odvisen od narave analizne metode (opisano v tabeli 1).

Za substance velja: za teste, kjer je validacija analizne metode potrebna, je potrebno to storiti do prehoda substance iz razvoja v redno kontrolo (to velja za serije, ki so namenjene za na trg) oziroma ob obnovi registracije obstoječih substanc v redni kontroli, če je to potrebno.

Za ovrednotenje kvalitativnih in kvantitativnih fizikalno-kemijskih analiznih metod (vključno z limitnimi testi) testiramo glede na tip metode (A, B, C, D, E – glej tabelo 1) izbrane parametre izmed naštetih v preglednici 1.

Preglednica 1: Parametri, ki jih testiramo glede na tip metode; vir: Krka, d. d., Novo mesto – interno gradivo: SOP – Validacija analizne metode

Parametri	Metoda tipa A <sup>1)</sup>	Metoda tipa B <sup>1)</sup>		Metoda tipa C	Metoda tipa D	Metoda tipa E
		Kvantitativni testi	Limitni testi			
Natančnost	+ <sup>2)</sup>	+ <sup>2)</sup>			+	+
Točnost/izkoristek	+ <sup>2)</sup>	+ <sup>2)</sup>			+	
Linearnost	+ <sup>2)</sup>	+ <sup>2)</sup>			+	
Območje	+ <sup>2)</sup>	+ <sup>2)</sup>			+	
Specifičnost/Selektivnost	+ <sup>2**)</sup>	+ <sup>2**)</sup>	+	+	+	
Meja zaznavnosti		*	+		*	
Meja določanja		+ <sup>2)</sup>			*	
Robustnost	+ <sup>2*)</sup>	+ <sup>2*)</sup>	*		+	+
* Test je lahko zahtevan – odvisno od vrste testa. 1) Predpisani validacijski parametri so obvezni pri validaciji analiznih metod vrednotenja zdravilne učinkovine in končnega izdelka ter aktivnih pomožnih substanc v končnem izdelku (npr. konzervansov). 2), 2*), 2**) Priporočljiv obseg validacije analiznih metod za potrebe sproščanja serij za bioekvivalentne in klinične študije. 2*) Izvajamo stabilnost analiznih raztopin. 2**) Izvajamo selektivnost.						

Metoda tipa A:

Analizne metode za kvantitativno določevanje vsebnosti substanc (vsebnost v substanci in vsebnost substanc v končnih izdelkih).

Metoda tipa B:

Analizne metode za določevanje elementov v sledovih, nečistot, razpadnih produktov in rezidualnih topil v substancah in končnih izdelkih ter analizne metode za določanje ostankov učinkovin/intermediatov/detergentov pri validacijah čiščenja: kvantitativni testi, limitni testi.

Metoda tipa C:

Testi istovetnosti substanc.

Metoda tipa D:

Analizne metode, s katerimi dokazujemo lastnosti izdelka: vrednotenje raztapljanja učinkovin.

Metoda tipa E:

Specialni testi: na primer analizna metoda za določevanje velikosti delcev.

Postopek validacije analizne metode se začne z izdelavo protokola za validacijo analizne metode. V protokolu morajo biti navedeni vsi validacijski parametri, ki jih je potrebno testirati v okviru validacije analizne metode in opis poteka vsakega validacijskega parametra tako, da ga izvajalec lahko pravilno izvede. Navedeni morajo biti kriteriji za ustreznost testa. Odgovorni raziskovalec/analitik dostavi odobren protokol izvajalcu validacije. Sledi eksperimentalna izvedba validacije analizne metode skladno z odobrenim protokolom ter obdelava dobljenih podatkov validacije, ki jo izvaja izvajalec in/ali odgovorni raziskovalec/analitik. Pri tem se zagotavlja izvedba skladno s smernicami dobre proizvodne prakse. Dovoljeno je uporabiti le predhodno odobrene, glede na namen ustrezno okarakterizirane, referenčne substance. Obdelane podatke pregleda avtor protokola in/ali odgovorni raziskovalec/analitik področja ter jih primerno arhivira. Odgovorni raziskovalec/analitik izdela validacijsko poročilo s prenosom obdelanih validacijskih podatkov.

Kadar izvajamo teste skladno z uradnimi metodami (npr. nakup dokumentacije, farmakopejske metode) je priporočljivo metodo preveriti pod dejanskimi pogoji uporabe (jo izvesti tako, kot se bo izvajala v kontroli kakovosti). Pred odobritvijo metod za kontrolo kakovosti pri sproščanju izdelka je potrebno zagotoviti, da je k metodi povezano ustrezno odobreno validacijsko poročilo.

(Vir: Krka, d. d., Novo mesto – interno gradivo: SOP – Validacija analizne metode.)

## 7.1 PREDPISANA ANALIZNA METODA ZA DOLOČANJE ŽELEZA NA VZORCU BAKROV SULFAT PENTA-HIDRAT PO Ph. Eur.

Metoda, ki sem jo validirala, sodi v analize metode tipa B (določevanje nečistot v substancah). Protokol, ki so mi ga predpisali, je zahteval izvedbo naslednjih testov:

- meja zaznavnosti,
- meja določitve,
- natančnost (ponovljivost metode),
- linearnost,
- točnost/izkoristek,
- stabilnost raztopine,
- robustnost – vpliv spremembe pogojev.

**Zahteva** (najvišja dovoljena meja za železo, predpisana v Ph. Eur.): max. 100 ppm Fe (kar predstavlja 100 % zahteve). Iz tega sledi, da je najvišja dovoljena koncentracija železa v raztopini vzorca ( $C_{vz}$ ) 2  $\mu\text{gFe/mL}$ .

$$\text{železo (ppm)} = \frac{C_{vz} \times 25}{Z_{vz}} \rightarrow C_{vz} = \frac{\text{železo (ppm)} \times Z_{vz}}{25} = \frac{100 \text{ ppm} \times 0,5 \text{ g}}{25 \text{ mL}} = 2 \mu\text{gFe/mL}$$

**Metoda:** atomska absorpcijska spektrometrija (linearna krivulja standardnih raztopin).

**Aparatura:** atomski absorpcijski spektrometer (ustrezno kalibriran), tip: AAS Agilent Technologies 200 series AA

- plamenska tehnika (FAAS):  $\text{C}_2\text{H}_2$  (2,00 L/min) / ZRAK (13,50 L/min),
- valovna dolžina: 248,3 nm,

ustrezno kalibrirana elektronska pipeta (Brand – Transferpette, tip: 0,5 – 5,0 mL , 500  $\mu\text{L}$  in 100 – 1000  $\mu\text{L}$ ).

ustrezno kalibrirana analizna tehnica (Mettler Toledo, tip: XP205)

**Vzorec (substanca):**  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  (je sestavina za izdelavo nekaterih kapsul in oblog tablet).



Slika 11: Vzorec  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ; foto: J. Trbojević, 2015

### Reagenti:

- koncentrirana  $\text{HNO}_3$  (Merck suprapur kakovosti, brez svinca),
- voda (prečiščena za kromatografijo),
- referenčna standardna raztopina železa (1000 ppm); certificirana, komercialna raztopina standarda (proizvajalec: Inorganic Ventures; Iron for AAS, Lot: G2-FE04028)

**Laboratorijska posoda:**

- 25 mL merilna bučka,
- steklen lijak,
- 10 mL merilni valj,
- plastična epruveta.

**Razopina vzorca:**

Raztopimo 0,5 g vzorca v 10 mL vode. Dodamo 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> in dopolnimo do 25,0 mL z vodo.

**Slepa raztopina:**

Vzporedno z raztopino vzorca pripravimo tudi raztopino slepega vzorca (isti postopek kot za pripravo vzorca le, da vzorca ne dodamo):

10 mL vode dodamo 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> in dopolnimo do 25,0 mL z vodo.

**Standardne raztopine železa:**

(Pripravimo standardne raztopine železa za umeritveno krivuljo z uporabo standardne raztopine železa 20 ppm Fe).

V 100 mL merilno bučko odpipetiramo 2,0 mL referenčne standardne raztopine železa (1000 ppm) in dopolnimo z vodo do oznake volumna (20 ppm).

- 1,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> / 25,0 mL vode 0,8 ppm Fe
- 2,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> / 25,0 mL vode 1,6 ppm Fe
- 3,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> / 25,0 mL vode 2,4 ppm Fe

**Eksterna standardna raztopina železa:**

Pripravimo eksterno standardno raztopino železa z uporabo standardne raztopine železa 20 ppm (Fe).

V 100 mL merilno bučko odpipetiramo 2,0 mL referenčne standardne raztopine železa (1000 ppm) in dopolnimo z vodo do oznake volumna (20 ppm Fe).

- 3,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> / 25,0 mL vode 2,4 ppm Fe

**Merjenje:**

Za določitev bazne linije aspiriramo slepo raztopino, izmerimo absorbance delovnim standardnim raztopinam železa in raztopini vzorca. Na osnovi izmerjenih absorbanč delovnih standardnih raztopin izrišemo umeritveno krivuljo in določimo koncentracijo železa v vzorcih.

**Račun:**

$$\text{železo (ppm)} = \frac{C_{vz} \times 25}{Z_{vz}}$$

C<sub>vz</sub> koncentracija železa v raztopini vzorca (μg/mL)

Z<sub>vz</sub> natehta vzorca (g)

25 volumen raztopine vzorca (mL)

## 7.2 EKSPERIMENTALNI POTEK VALIDACIJE METODE IN REZULTATI

Po končanih meritvah sem zbrala vse podatke in rezultate meritev ter jih pregledala in vnesla v posebne Excel tabele narejene za validacijo metode. Da bi lahko potrdila ustreznost metode, sem morala vse rezultate primerjati in preveriti, ali ustrezajo kriterijem za posamezen parameter.

### 7.2.1 MEJA ZAZNAVNOSTI (Detection limit – DL) in MEJA DOLOČITVE (Quantitation limit – QL)

Meja zaznavnosti je najnižja koncentracija analita v vzorcu, katerega z določeno analizno metodo še zaznamo, ni pa nujno, da jo lahko tudi kvantitativno določimo. Določamo jo na osnovi standardnega odklona odgovora instrumenta (detektorja) (s) in naklona linearne regresijske premice (iz linearnosti ali umeritvene krivulje) (k).

Kriterij: meja zaznavnosti mora biti manjša od meje navedbe.

(Vir: Krka, d. d., Novo mesto – interno gradivo: SOP – Validacija analizne metode.)

$$\text{Mejo zaznavnosti (DL) izrazimo kot: } DL = \frac{3,3 \times s}{k}$$

Meja določitve je najnižja koncentracija analita v vzorcu, ki jo z določeno analizno metodo določimo s sprejemljivo natančnostjo in točnostjo. Meja določitve je parameter za kvantitativno določitev nizkih koncentracij analita in se uporablja predvsem za določitev nečistot in/ali razgradnih produktov. Prav tako kot meja zaznavnosti tudi mejo določitve določamo na osnovi standardnega odklona odgovora instrumenta (detektorja) (s) in naklona linearne regresijske premice (iz linearnosti ali umeritvene krivulje) (k).

Kriterij: meja določitve mora biti manjša ali enaka od meje navedbe.

(Vir: Krka, d. d., Novo mesto – interno gradivo: SOP – Validacija analizne metode.)

$$\text{Mejo določitve (QL) izrazimo kot: } QL = \frac{10 \times s}{k}$$

Mejo zaznavnosti in mejo določitve lahko določimo na slepih raztopinah vzorca, slepih raztopinah vzorca z dodano znano količino standardnega dodatka, raztopinah vzorca ali pa raztopinah vzorca z dodano znano količino standardnega dodatka. Določitev izvedemo na vsaj šestih paralelakah.

V protokolu, ki sem ga dobila, za validacijo te analizne metode, je bilo predpisano, da moram mejo zaznavnosti in mejo določitve določiti na slepih raztopinah vzorca. Raztopine sem pripravila enkrat saj sem določanje obeh parametrov izvedla hkrati in tako lahko uporabila iste raztopine.

#### Priprava raztopin:

##### Slepa raztopina:

10 mL prečiščene vode sem dodala 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> in dopolnila do 25,0 mL z vodo.

##### Raztopine standarda za umeritveno krivuljo:

V 100 mL merilno bučko sem odpipetirala 2,0 mL referenčne standardne raztopine železa (1000 ppm) in dopolnila z vodo do oznake volumna (20 ppm Fe).

- 1,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> / 25,0 mL vode 0,8 ppm Fe
- 2,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> / 25,0 mL vode 1,6 ppm Fe
- 3,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> / 25,0 mL vode 2,4 ppm Fe



### Eksterna standardna raztopina železa:

V 100 mL merilno bučko sem odpipetirala 2,0 mL referenčne standardne raztopine železa (1000 ppm) in dopolnila z vodo do oznake volumna (20 ppm Fe).

- 3,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> / 25,0 mL vode 2,4 ppm Fe

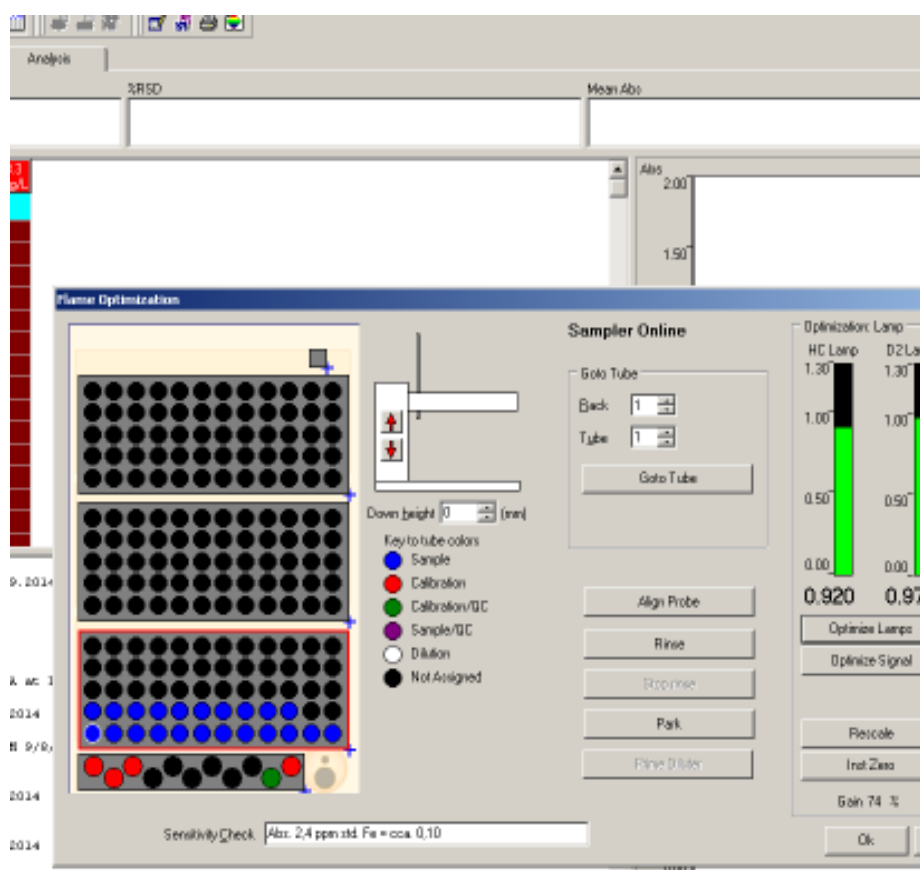
### Raztopina vzorca:

Pripravila sem 6 paralelk slepe raztopine vzorca.

10 mL vode sem dodala 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> in dopolnila do 25,0 mL z vodo.

### Merjenje:

Pred vsako meritvijo sem naredila optimizacijo žarnice in signala, da sem dobila najbolj optimalne pogoje za merjenje.



Slika 12: Prikaz računalniškega programa za meritve z AAS - optimizacija žarnice (Lamp - zelen stolpec) in signala; foto: J. Trbojevič, 2015

Za določitev bazne linije sem aspirirala slepo raztopino, izmerila absorbance delovnim standardnim raztopinam železa in slepim raztopinam vzorca. Na osnovi izmerjenih absorbanc delovnih standardnih raztopin sem izrisala umeritveno krivuljo in določila koncentracijo železa v slepih raztopinah vzorca.

**Meja zaznavnosti (DL)**

Preglednica 2: Rezultati določanja meje zaznavnosti; J. Trbojević, 2015

Vzorec	Odčitek (absorbanca)
1	-0,0004
2	-0,0011
3	-0,0005
4	-0,0008
5	-0,0013
6	-0,0011
<b>k premice</b>	<b>0,04741</b>
s	0,0004
<b>DL</b>	<b>0,0252</b>
<b>DL (ppm)</b>	<b>1,2580</b>

s (standardni odmik)

k (naklon premice)

Kriterij za mejo zaznavnosti je ta, da mora biti manjša od meje navedbe. Meja navedbe je tukaj 30 % zahteve, in sicer 30 ppm. Rezultat meritve je DL = 1,2580 ppm, kar je manjše od 30 ppm in ustreza kriteriju.

**Meja določitve (QL)**

Preglednica 3: Rezultati določanja meje določitve; J. Trbojević, 2015

Vzorec	Odčitek (absorbanca)
1	-0,0004
2	-0,0011
3	-0,0005
4	-0,0008
5	-0,0013
6	-0,0011
<b>k premice</b>	<b>0,04741</b>
s	0,0004
<b>QL</b>	<b>0,0762</b>
<b>QL (ppm)</b>	<b>3,8123</b>

s (standardni odmik)

k (naklon premice)

Kriterij za mejo določitve je ta, da mora biti manjša ali enaka od meje navedbe. Tudi tukaj je meja navedbe 30 % zahteve, in sicer 30 ppm. Rezultat meritve je QL = 3,8123 ppm, kar ustreza kriteriju.

### 7.2.2 TOČNOST / IZKORISTEK (Accuracy / Recovery)

Točnost analizne metode označuje odstopanje rezultata meritve od njegove resnične oziroma prave vrednosti. Točnost metode dokazujemo v specifičnem območju. Priporočljivo jo je izvesti z minimalno 9 ponovitvami, ki pokrivajo specifično območje (npr. 3 ponovitve na 3 koncentracijskih nivojih med QL ali 30 % in 150 %). Pripravimo jih tako, da odgovarjajoči količini natehte dodamo znano količino standardnega dodatka ter ga analiziramo po predpisani analizni metodi. 100 % koncentracijo pripravimo v šestih paralelkah, ostale koncentracije pa v treh paralelkah.

V protokolu, ki sem ga dobila, za validacijo te analizne metode, je bilo predpisano, da najprej pripravim tri paralelke raztopin vzorca in nato še raztopine vzorca z dodatkom znane količine standarda v območju 30 % in 150 % zahteve.

Vrednotenje: za vsak koncentracijski nivo izračunamo povprečni izkoristek (%), relativni standardni odmik RSD (%) izkoristkov (skladno z zahtevo) in podamo interval zaupanja pri 95% stopnji zaupanja.

Kriterij: sprejemljiv kriterij za RSD je  $\leq 20$  %, za izkoristek pa 70 %–150 %.



Slika 13: Priprava raztopin vzorca  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ; foto: J. Trbojevič, 2015



Slika 14: Raztopine vzorca v plastičnih epruvetah, pripravljene za meritev; foto: J. Trbojevič, 2015

### **Priprava raztopin:**

Pripravila sem raztopine vzorca brez dodatka standarda in raztopine vzorca z dodatkom standardne raztopine železa (20 ppm), ki predstavljajo 30 %, 60 %, 100 %, 125 % in 150 % zahteve.

### **Slepa raztopina:**

10 mL vode sem dodala 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> in dopolnila do 25,0 mL z vodo.

### **Raztopine standarda za umeritveno krivuljo:**

V 100 mL merilno bučko sem odpipetirala 2,0 mL referenčne standardne raztopine železa (1000 ppm) in dopolnila z vodo do oznake volumna (20 ppm Fe).

- 1,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> / 25,0 mL vode 0,8 ppm Fe
- 2,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> / 25,0 mL vode 1,6 ppm Fe
- 3,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> / 25,0 mL vode 2,4 ppm Fe

### **Eksterna standardna raztopina železa:**

V 100 mL merilno bučko sem odpipetirala 2,0 mL referenčne standardne raztopine železa (1000 ppm) in dopolnila z vodo do oznake volumna (20 ppm Fe).

- 3,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> / 25,0 mL vode 2,4 ppm Fe

### **Raztopina vzorca brez dodatka standarda:**

0,5 g vzorca sem raztopila v 10 mL vode. Dodala sem 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> in dopolnila do 25,0 mL z vodo. Pripravila sem 3 paralelke.

### **Raztopine vzorca z dodatkom standarda:**

#### **Standardni dodatek 30 % zahteve (0,6 ppm Fe):**

0,5 g vzorca sem raztopila v 10 mL vode. Dodala sem 0,75 mL standardne raztopine 20 ppm Fe in 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub>. Dopolnila sem do 25,0 mL z vodo. Pripravila sem 3 paralelke 0,6 ppm Fe.

#### **Standardni dodatek 60 % zahteve (1,2 ppm Fe):**

0,5 g vzorca sem raztopila v 10 mL vode. Dodala sem 1,5 mL standardne raztopine 20 ppm Fe in 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub>. Dopolnila sem do 25,0 mL z vodo. Pripravila sem 3 paralelke 1,2 ppm Fe.

#### **Standardni dodatek 100 % zahteve (2,0 ppm Fe):**

0,5 g vzorca sem raztopila v 10 mL vode. Dodala sem 2,5 mL standardne raztopine 20 ppm Fe in 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub>. Dopolnila sem do 25,0 mL z vodo. Pripravila sem 6 paralelke 2,0 ppm Fe.

#### **Standardni dodatek 125 % zahteve (2,5 ppm Fe):**

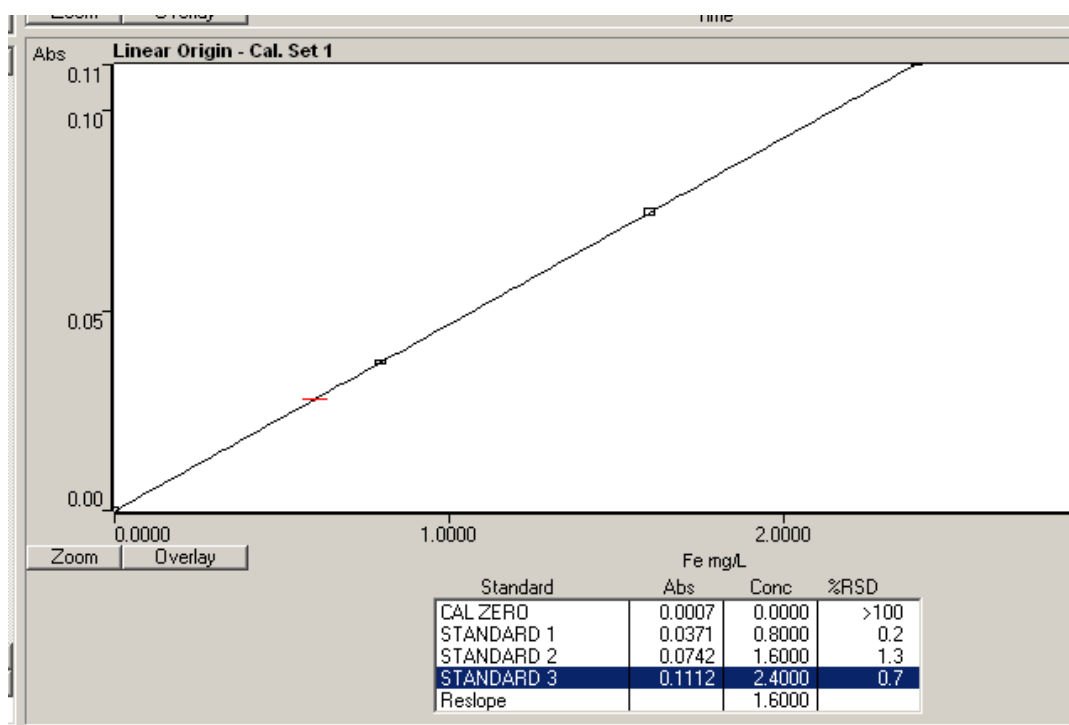
0,5 g vzorca sem raztopila v 10 mL vode. Dodala sem 3,125 mL standardne raztopine 20 ppm Fe in 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub>. Dopolnila sem do 25,0 mL z vodo. Pripravila sem 3 paralelke 2,5 ppm Fe.

#### **Standardni dodatek 150 % zahteve (3,0 ppm Fe):**

0,5 g vzorca sem raztopila v 10 mL vode. Dodala sem 3,75 mL standardne raztopine 20 ppm Fe in 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub>. Dopolnila sem do 25,0 mL z vodo. Pripravila sem 3 paralelke 3,0 ppm Fe.

### **Merjenje:**

Za določitev bazne linije sem aspirirala slepo raztopino, izmerila absorbance delovnim standardnim raztopinam železa in raztopini vzorca.



Slika 15: Prikaz računalniškega programa za meritve z AAS - izris umeritvene krivulje; foto: J. Trbojević, 2015

Na osnovi izmerjenih absorbanc delovnih standardnih raztopin sem izrisala umeritveno krivuljo in določila koncentracijo železa v vzorcih.



Slika 16: Merjenje raztopin vzorcev (raztopina vzorca  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , z dodatkom standardne raztopine železa, razpršena v plamenu; foto: J. Trbojević, 2015

**a) Izkoristek**

$$\text{Izkoristek (\%)} = \frac{\text{določena koncentracija}}{\text{dodana koncentracija}} \times 100$$

**b) Interval zaupanja povprečne vrednosti ( $n \geq 6$ ;  $\alpha = 0,05$  ali  $P = 95 \%$ )**

$$\Delta \bar{x} = \frac{t(P, f) \cdot s}{\sqrt{n}} \cdot 100$$

$$\text{Interval zaupanja} = \bar{x} \pm \Delta \bar{x}$$

$\Delta \bar{x}$  limita zaupanja

$t(P, f)$  t-vrednost za statistično zaupanje P (navadno 95%) in prostostno stopnjo  $f = n-1$  zaupanja

P stopnja zaupanja (običajno 95 %)

f število prostostnih stopenj

n število določitev

Za vsak koncentracijski nivo sem izračunala povprečni izkoristek (%), relativni standardni odklik RSD izkoristkov (%) in podala interval zaupanja pri 95 % stopnji zaupanja. Sprejemljiv kriterij za RSD je  $\leq 20\%$ , za izkoristek pa 70 %–150 %.

Preglednica 4: Rezultati določanja točnosti; J. Trbojević, 2015

Vzorec	Natehta (g)	Odčitek (mg/L)	Fe (ppm)
1	0,5013	-0,0165	-0,8
2	0,5016	-0,0216	-1,1
3	0,5033	-0,0313	-1,6
<b>X<sub>povp</sub></b>			<b>-1,2</b>

Vzorec	Natehta (g)	Standardni dodatek (ppm)	Zahteva (%)	Odčitek (mg/L)	Fe (ppm) z odšteto vsebnostjo vzorca	% doblj.	Napaka (%)	Izkoristek (%)
1	0,5023	30,0	30	0,6289	32,4524	108,2	-8,2	108,2
2	0,5020	30,0	30	0,6138	31,7191	105,7	-5,7	105,7
3	0,5029	30,0	30	0,5822	30,0935	100,3	-0,3	100,3
						Povp. Bias (%) =		- 4,7
						<b>Povp. izkoristek (%) =</b>		<b>104,7</b>
						<b>RSD (%) =</b>		<b>3,8</b>
						Interval zaupanja =		10,0

Vzorec	Natehta (g)	Standardni dodatek (ppm)	Zahteva (%)	Odčitek (mg/L)	Fe (ppm) z odšteto vsebnostjo vzorca	% doblj.	Napaka (%)	Izkoristek (%)
1	0,5002	60,0	60	1,1702	59,6380	99,4	0,6	99,4
2	0,5031	60,0	60	1,1645	59,0176	98,4	1,6	98,4
3	0,5018	60,0	60	1,1648	59,1825	98,6	1,4	98,6
						Povp. Bias (%) =		1,2
						<b>Povp. izkoristek (%) =</b>		<b>98,8</b>
						<b>RSD (%) =</b>		<b>0,5</b>
						Interval zaupanja =		1,3

Vzorec	Natehta (g)	Standardni dodatek (ppm)	Zahteva (%)	Odčitek (mg/L)	Fe (ppm) z odšteto vsebnostjo vzorca	% doblj.	Napaka (%)	Izkoristek (%)
1	0,5025	100,0	100	1,9346	97,4001	97,4	2,6	97,4
2	0,5024	100,0	100	1,9282	97,1008	97,1	2,9	97,1
3	0,5003	100,0	100	1,9355	97,8684	97,9	2,1	97,9
4	0,5002	100,0	100	1,9068	96,4533	96,5	3,5	96,5
5	0,5013	100,0	100	1,8976	95,7853	95,8	4,2	95,8
6	0,5013	100,0	100	1,9056	96,1843	96,2	3,8	96,2
							Povp. Bias (%) = <b>Povp. izkoristek (%) =</b> <b>RSD (%) =</b> Interval zaupanja =	3,2 <b>96,8</b> <b>0,8</b> 2,0
Vzorec	Natehta (g)	Standardni dodatek (ppm)	Zahteva (%)	Odčitek (mg/L)	Fe (ppm) z odšteto vsebnostjo vzorca	% doblj.	Napaka (%)	Izkoristek (%)
1	0,5023	125,0	125	2,3770	119,4572	95,6	4,4	95,6
2	0,5026	125,0	125	2,3921	120,1377	96,1	3,9	96,1
3	0,5005	125,0	125	2,3754	119,8027	95,8	4,2	95,8
							Povp. Bias (%) = <b>Povp. izkoristek (%) =</b> <b>RSD (%) =</b> Interval zaupanja =	4,2 <b>95,8</b> <b>0,3</b> 0,7
Vzorec	Natehta (g)	Standardni dodatek (ppm)	Zahteva (%)	Odčitek (mg/L)	Fe (ppm) z odšteto vsebnostjo vzorca	% doblj.	Napaka (%)	Izkoristek (%)
1	0,5006	150,0	150	2,8352	142,7415	95,2	4,8	95,2
2	0,5021	150,0	150	2,8447	142,7915	95,2	4,8	95,2
3	0,5000	150,0	150	2,8125	141,7764	94,5	5,5	94,5
							Povp. Bias (%) = <b>Povp. izkoristek (%) =</b> <b>RSD (%) =</b> Interval zaupanja =	5,0 <b>95,0</b> <b>0,4</b> 0,9

Prvi koncentracijski nivo predstavlja 30 % zahteve. RSD izkoristkov je tukaj 4 %, povprečni izkoristek pa 105 %. Drugi koncentracijski nivo je bil 60 % zahteve. RSD je tukaj 1 % in povprečni izkoristek 99 %. Pri tretjem koncentracijskem nivoju, 100 % zahteve, je RSD tudi 1 %, izkoristek pa je 97 %. Četrty koncentracijski nivo je bil 125 % zahteve. RSD je 0 % in izkoristek 96 %. Pri zadnjem koncentracijskem nivoju, ta je bil 150 % zahteve, je RSD 0 % in povprečni izkoristek 95 %. RSD pri vseh koncentracijskih nivojih ustreza kriteriju  $RSD \leq 20$  %. Tudi povprečni izkoristek pri vseh koncentracijskih nivojih ustreza kriteriju 70 %–150 %, saj so vsi izkoristki v tem območju.

### 7.2.3 NATANČNOST / PONOVLJIVOST METODE (Precision / Method precision)

Natančnost metode izraža stopnjo ujemanja rezultatov serije meritev istega homogenega vzorca pod predpisanimi analiznimi pogoji. Ovrednotimo jo lahko na tri načine, s ponovljivostjo sistema / metode, s ponovljivostjo znotraj laboratorija in s ponovljivostjo med laboratoriji. Po protokolu, za validacijo te analizne metode, sem natančnost metode ovrednotila s ponovljivostjo metode, in sicer s pripravo raztopin vzorca z dodatkom standarda.

Ponovljivost metode je izražena kot stopnja ujemanja rezultatov analize, če je analiza opravljena po predpisanih analiznih pogojih na več paralelkah istega homogenega vzorca v istem laboratoriju in kratkem časovnem intervalu (znotraj iste analize). S testom ponovljivost metode pridobimo informacijo, ki vključuje variabilnost analiznega sistema in variabilnost zaradi priprave vzorca (npr. tehtanje, pipetiranje, ekstrakcija, homogenizacija ipd.).

Ponovljivost metode lahko ocenimo z minimalno 6 določitvami.

Skladno z analiznim postopkom najmanj šestkrat pripravimo raztopino homogenega reprezentativnega vzorca ter ga analiziramo po predpisani analizni metodi v čim krajšem času (znotraj iste analize).

V primeru homogenega vzorca, ki ne vsebuje specifičnih nečistot in imamo na razpolago standardne substance, izvedemo ponovljivost metode z analizo določitev (nateht oziroma priprav) istega homogenega vzorca, kateremu dodamo ustrezne standarde ali raztopine standardov določenih substanc (npr. z dodanimi mejnimi koncentracijami posameznih nečistot) ter pripravimo vzorec po predpisani analizni metodi.

Vrednotenje: določimo povprečno vrednost rezultatov ( $\bar{x}$  povprečna). Določimo relativni standardni odmik RSD (%) – skladno z zahtevo.

Kriteriji: za določevanje nečistot je sprejemljiv kriterij za  $RSD \leq 20\%$ .

#### Priprava raztopin:

Pripravila sem raztopine vzorca z dodatkom standardne raztopine železa (20 ppm), ki predstavlja 100 % zahteve.

#### Slepa raztopina:

10 mL vode sem dodala 2,5 mL koncentrirane  $HNO_3$  in dopolnila do 25,0 mL z vodo.

#### Raztopine standarda za umeritveno krivuljo:

V 100 mL merilno bučko sem odpipetirala 2,0 mL referenčne standardne raztopine železa (1000 ppm) in dopolnila z vodo do oznake volumna (20 ppm Fe).

- 1,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane  $HNO_3$  / 25,0 mL vode 0,8 ppm Fe
- 2,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane  $HNO_3$  / 25,0 mL vode 1,6 ppm Fe
- 3,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane  $HNO_3$  / 25,0 mL vode 2,4 ppm Fe

#### Eksterna standardna raztopina železa:

V 100 mL merilno bučko sem odpipetirala 2,0 mL referenčne standardne raztopine železa (1000 ppm) in dopolnila z vodo do oznake volumna (20 ppm Fe).

- 3,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane  $HNO_3$  / 25,0 mL vode 2,4 ppm Fe

#### Raztopina vzorca z dodatkom standarda:

Standardni dodatek 100% zahteve (2,0 ppm Fe):

0,5 g vzorca sem raztopila v 10 mL vode. Dodala sem 2,5 mL standardne raztopine 20 ppm Fe in 2,5 mL koncentrirane  $HNO_3$ . Dopolnila sem do 25,0 mL z vodo. Pripravila sem 6 paralelk 2,0 ppm Fe.

#### Merjenje:

Za določitev bazne linije sem aspirirala slepo raztopino, izmerila absorbance delovnim standardnim raztopinam železa in raztopini vzorca. Na osnovi izmerjenih absorbanc



delovnih standardnih raztopin sem izrisala umeritveno krivuljo in določila koncentracijo železa v vzorcih.

**a) Standardni odmik (s)**

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

**b) Relativni standardni odmik (RSD)**

$$RSD (\%) = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}}$$

$x_i$  vrednost posamezne meritve

$\bar{x}$  povprečna vrednost meritev

n število meritev

s standardni odmik

RSD relativni standardni odmik (%)

Preglednica 5: Rezultati določanja ponovljivosti; J. Trbojević, 2015

Vzorec	Natehta (g)	Odčitek (mg/L)	Vsebnost Fe (ppm)
1	0,5025	1,9346	96,2488
2	0,5024	1,9282	95,9494
3	0,5003	1,9355	96,7170
4	0,5002	1,9068	95,3019
5	0,5013	1,8976	94,6340
6	0,5013	1,9056	95,0329
<b>X<sub>povp</sub></b>			<b>95,6473</b>
<b>s</b>			<b>0,79005</b>
<b>RSD (%)</b>			<b>0,8</b>

$x_{povp}$  (povprečna vrednost)

s (standardni odmik)

Pri parametru ponovljivost sem izračunala povprečno vrednost rezultatov in RSD. Kriterij za ta parameter je  $RSD \leq 20 \%$ . Rezultati ustrezajo kriteriju, saj je izračunan RSD 0,8 %.

#### 7.2.4 STABILNOST RAZTOPINE VZORCA (Stability of sample solution)

Stabilnost analiznih raztopin je parameter, ki ni naveden v tabeli validacijskih parametrov in tudi ni obvezen, lahko pa nam olajša delo pri redni kontroli vzorcev. Stabilnost določamo 24 ur ali več po pripravi raztopine vzorca. Pripravimo raztopine, izvedemo meritve nato pa pustimo raztopine stati pri normalnih laboratorijskih pogojih (npr. predpisana temperatura v analinem postopku) in jih ponovno ovrednotimo v primernih časovnih intervalih. Če rezultati padejo izven meja, je potrebno test ponoviti s krajšim časom shranjevanja, dokler ne dobimo ustreznih rezultatov.

S tem parametrom dokazujemo, da lastnosti raztopine ostanejo iste kot na dan priprave raztopine vzorca. Tako se izognemo temu, da bi morali vsak dan pripravljati nove raztopine vzorcev. To nam olajša delo in prihrani veliko časa. Predvsem, ko moramo pri kakšnem vzorcu določiti prisotnost več različnih elementov ali pa, ko nam sama priprava raztopine vzorca vzame skoraj cel dan. V takšnem primeru lahko, če imamo narejeno 24 urno stabilnost vzorca, en dan pripravimo raztopine in naslednji dan izvedemo meritve.

Ko določamo stabilnost, lahko pripravimo sveže raztopine vzorca ali pa vzamemo raztopine iz testa ponovljivost. Jaz sem pripravila sveže raztopine vzorca, saj je bilo tako predpisano v protokolu, ki sem ga dobila za validacijo te analizne metode.

Vrednotenje: izračunamo relativno razliko med začetnim merjenjem in merjenjem po določenem času.

Kriterij: sprejemljiv čas stabilnosti analizne raztopine je tisti čas, pri katerem je relativna razlika rezultatov (%) glede na začetni čas v predpisanih mejah, in sicer  $\leq \pm 20\%$  za nečistote.

##### Priprava raztopin

Pripravila sem raztopine vzorca z dodatkom standardne raztopine železa (20 ppm), ki predstavlja 100 % zahteve.

##### Slepa raztopina:

10 mL vode sem dodala 2,5 mL koncentrirane  $\text{HNO}_3$  in dopolnila do 25,0 mL z vodo.

##### Raztopine standarda za umeritveno krivuljo:

V 100 mL merilno bučko sem odpipetirala 2,0 mL referenčne standardne raztopine železa (1000 ppm) in dopolnila z vodo do oznake volumna (20 ppm Fe).

- 1,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane  $\text{HNO}_3$  / 25,0 mL vode 0,8 ppm Fe
- 2,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane  $\text{HNO}_3$  / 25,0 mL vode 1,6 ppm Fe
- 3,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane  $\text{HNO}_3$  / 25,0 mL vode 2,4 ppm Fe

##### Eksterna standardna raztopina železa:

V 100 mL merilno bučko sem odpipetirala 2,0 mL referenčne standardne raztopine železa (1000 ppm) in dopolnila z vodo do oznake volumna (20 ppm Fe).

- 3,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane  $\text{HNO}_3$  / 25,0 mL vode 2,4 ppm Fe

##### Raztopina vzorca z dodatkom standarda:

Standardni dodatek 100 % zahteve (2,0 ppm Fe):

0,5 g vzorca sem raztopila v 10 mL vode. Dodala sem 2,5 mL standardne raztopine 20 ppm Fe in 2,5 mL koncentrirane  $\text{HNO}_3$ . Dopolnila sem do 25,0 mL z vodo. Pripravila sem 6 paralelk 2,0 ppm Fe.

##### Merjenje:

Za določitev bazne linije sem aspirirala slepo raztopino, izmerila absorbance delovnim standardnim raztopinam železa in raztopini vzorca. Na osnovi izmerjenih absorbanc delovnih standardnih raztopin sem izrisala umeritveno krivuljo in določila koncentracijo železa v vzorcih.

V protokolu, ki sem ga dobila za validacijo te analizne metode, je bila predpisana stabilnost po 24 urah. Raztopine vzorca sem zato pustila stati 24 ur in ponovno izvedla meritve. Po 24 urah sem pripravila samo sveže raztopine standarda za umeritveno krivuljo.

Preglednica 6: Rezultati določanja stabilnosti (na dan priprave raztopin vzorca); J. Trbojevič, 2015

Vzorec (tako po pripravi)	Natehta (g)	Odčitek (mg/L)	Vsebnost Fe (ppm)
1	0,5006	1,9285	96,3094
2	0,5005	1,9824	99,0210
3	0,5005	1,8888	94,3457
4	0,5000	1,9347	96,7350
5	0,5001	1,9367	96,8156
6	0,5004	1,9203	95,9382
<b>X<sub>povp</sub> (ppm)</b>			<b>96,5275</b>
<b>s</b>			<b>1,51649</b>
<b>RSD (%)</b>			<b>1,6</b>

x<sub>povp</sub> (povprečna vrednost)  
s (standardni odmik)

Preglednica 7: Rezultati določanja stabilnosti (po 24 urah od priprave raztopin vzorcev); J. Trbojevič, 2015

Vzorec (čas: po 24 urah)	Natehta (g)	Odčitek (mg/L)	Vsebnost Fe (ppm)
1	0,5006	1,8649	93,1332
2	0,5005	1,8416	91,9880
3	0,5005	1,8404	91,9281
4	0,5000	1,8251	91,2550
5	0,5001	1,7959	89,7770
6	0,5004	1,7909	89,4734
<b>X<sub>povp</sub> (ppm)</b>			<b>91,2591</b>
<b>s</b>			<b>1,40545</b>
<b>RSD (%)</b>			<b>1,5</b>
	Čas (h)	Vsebnost Ni (ppm)	Relativna razlika (%)
	<b>0</b>	<b>96,5275</b>	<b>5,5</b>
	<b>24</b>	<b>91,2591</b>	

Izračunala sem povprečni rezultat prve meritve (na dan priprave raztopin vzorcev) in druge meritve (24 ur od priprave raztopin vzorcev). Kriterij za ta parameter določa, da je sprejemljiv čas stabilnosti analizne raztopine tisti, pri katerem je relativna razlika rezultatov v predpisanih mejah  $\leq \pm 20\%$ . Po 24 urah je bila ta razlika 5,5 % kar pomeni, da rezultat ustreza kriteriju in da je raztopina vzorca stabilna 24 ur.

### 7.2.5 LINEARNOST (Linearity)

Linearnost analizne metode je lastnost, ki nam pove, ali so merjeni signali v delovnem koncentracijskem območju sorazmerni koncentraciji analizirane snovi v vzorcih. Linearnost izvajamo v območju analizne metode. Izvajamo jo lahko na seriji raztopin standarda in/ali neposredno s substanco. Potrebno je izvesti meritve vsaj petih različnih koncentracij v delovnem območju.

Potrebno je paziti na določitev pravilnega območja za izvajanje linearnosti. Nepravilno območje bi lahko bil vzrok za napačno ocenitev analizne metode.

Vizualno ocenimo grafični prikaz odvisnosti signala instrumenta od koncentracije analita. Z ustrežno statistično metodo (npr. linearno regresijo:  $y = kx + b$ ) ovrednotimo rezultate testa.

Priporočljivo območje določevanja linearnosti je za določanje nečistot 30 % – 150 % delovne koncentracije.

V protokolu, ki sem ga dobila za validacijo te analizne metode, je bilo predpisano, da moram pripraviti serijo raztopin standardov (brez vzorca), ki predstavljajo območje 30 % – 150 % zahteve.

Vrednotenje: grafični prikaz odvisnosti signala instrumenta ( $y$ ) od koncentracije analita ( $x$ ), korelacijski koeficient ( $R$ ), naklon regresijske premice ( $k$ ) in odsek na osi  $y$  ( $b$ ).

Kriteriji: vizualna ocena grafa – graf mora biti linearen, korelacijski koeficient  $R \geq 0,99$ , odsek na osi  $y$  ( $b$ ) pa  $\leq 10$  % za nečistote.

#### Priprava raztopin:

Pripravila sem raztopine standardov, z dodatkom standardne raztopine železa (20 ppm), ki predstavljajo 30 %, 60 %, 100 %, 125 % in 150 % zahteve.

#### Slepa raztopina:

10 mL vode sem dodala 2,5 mL koncentrirane  $\text{HNO}_3$  in dopolnila do 25,0 mL z vodo.

#### Raztopine standarda za umeritveno krivuljo:

V 100 mL merilno bučko sem odpipetirala 2,0 mL referenčne standardne raztopine železa (1000 ppm) in dopolnila z vodo do oznake volumna (20 ppm Fe).

- 1,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane  $\text{HNO}_3$  / 25,0 mL vode 0,8 ppm Fe
- 2,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane  $\text{HNO}_3$  / 25,0 mL vode 1,6 ppm Fe
- 3,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane  $\text{HNO}_3$  / 25,0 mL vode 2,4 ppm Fe

#### Eksterna standardna raztopina železa:

V 100 mL merilno bučko sem odpipetirala 2,0 mL referenčne standardne raztopine železa (1000 ppm) in dopolnila z vodo do oznake volumna (20 ppm Fe).

- 3,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane  $\text{HNO}_3$  / 25,0 mL vode 2,4 ppm Fe

#### Serija raztopin standarda:

##### Standardni dodatek 30 % zahteve (0,6 ppm Fe):

0,75 mL standardne raztopine 20 ppm Fe sem dodala 10 mL vode in 2,5 mL koncentrirane  $\text{HNO}_3$ . Dopolnila sem do 25,0 mL z vodo (0,6 ppm Fe).

##### Standardni dodatek 60 % zahteve (1,2 ppm Fe):

1,5 mL standardne raztopine 20 ppm Fe sem dodala 10 mL vode in 2,5 mL koncentrirane  $\text{HNO}_3$ . Dopolnila sem do 25,0 mL z vodo (1,2 ppm Fe).

##### Standardni dodatek 100 % zahteve (2,0 ppm Fe):

2,5 mL standardne raztopine 20 ppm Fe sem dodala 10 mL vode in 2,5 mL koncentrirane  $\text{HNO}_3$ . Dopolnila sem do 25,0 mL z vodo (2,0 ppm Fe).

**Standardni dodatek 125 % zahteve (2,5 ppm Fe):**

3,125 mL standardne raztopine 20 ppm Fe sem dodala 10 mL vode in 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub>. Dopolnila sem do 25,0 mL z vodo (2,5 ppm Fe).

**Standardni dodatek 150 % zahteve (3,0 ppm Fe):**

3,75 mL standardne raztopine 20 ppm Fe sem dodala 10 mL vode in 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub>. Dopolnila sem do 25,0 mL z vodo (3,0 ppm Fe).

**Merjenje:**

Za določitev bazne linije sem aspirirala slepo raztopino, izmerila absorbance delovnim standardnim raztopinam železa in raztopini vzorca. Na osnovi izmerjenih absorbanč delovnih standardnih raztopin sem izrisala umeritveno krivuljo in določila koncentracijo železa v vzorcih.

**a) Korelacijski koeficient, R:**

$$R = \frac{\left( \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y}) \right)}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})}$$

**b) Naklon regresijske premice, k:**

$$k = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

**c) Odsek na osi y, b:**

$$b = \bar{y} - k \cdot \bar{x}$$

**d) Odsek na osi y (b) v % - bias**

$$\text{bias} = \frac{b}{b_1} \cdot 100$$

$x_i$  posamezne vrednosti koncentracije analita

$\bar{x}$  povprečna vrednost koncentracije analita

$y_i$  posamezne vrednosti signala instrumenta

$\bar{y}$  povprečna vrednost signala instrumenta

$b$  odsek na osi y

$b_1$  signal instrumenta pri ciljnani vrednosti

100 % zahteve = 2 µg/mL; absorbanca slepe raztopine vzorca = - 0,0024

R = 1,0000

k = 0,04288 +/- 0,00052

b = - 0,00104 +/- 0,00106

bias (%) = 1,2

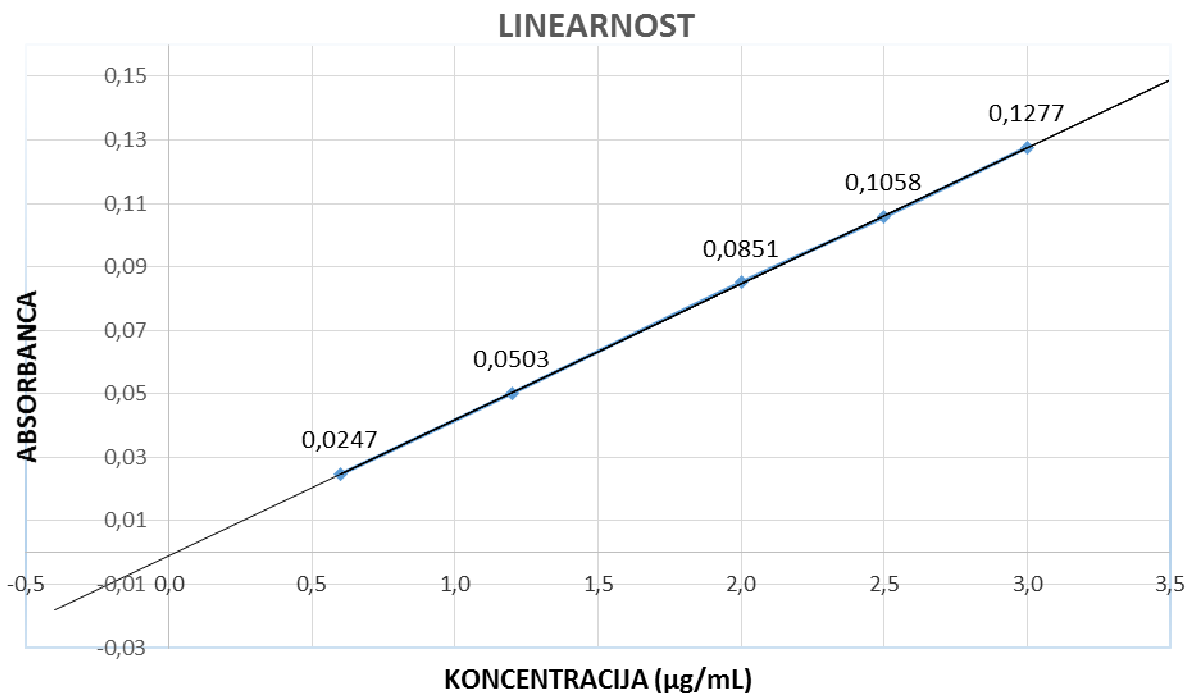
Preglednica 8: Rezultati določanja linearnosti; J. Trbojević, 2015

Koncentracija (µg/mL)	Zahteva (%)	Izmerjena absorbanca	Izmerjena abs. + Abs. sl. razt. vz.	Izračunana absorbanca vzorca
0	/	/	/	-0,0010
0,6	30	0,0271	0,0247	0,0247
1,2	60	0,0527	0,0503	0,0504
2,0	100	0,0875	0,0851	0,0847
2,5	125	0,1082	0,1058	0,1062
3,0	150	0,1301	0,1277	0,1276

Naredila sem grafični prikaz odvisnosti signala instrumenta (absorbance) (y) od koncentracije analita (x) ter izračunala korelacijski koeficient (R) in odsek na osi y (b).

Prva zahteva za ustreznost linearnosti je vizualna ocena grafa (graf mora biti linearen). Iz spodnjega grafikona je razvidno, da je graf linearen, to pomeni, da ustreza zahtevi.

Drug kriterij za ustreznost je ta, da mora biti korelacijski koeficient  $R \geq 0,99$ . Tudi ta kriterij je ustrezen, saj je bil korelacijski koeficient mojih meritev  $R = 1,00$ . Zadnja zahteva, ki mora biti izpolnjena, pa je ta, da mora biti odsek na osi y (b)  $\leq 10\%$ . Odsek na y osi (b) mojih meritev je bil 1,2 %, kar pomeni, da ustreza zahtevi.



Grafikon: Odvisnost signala instrumenta od koncentracije analita; J. Trbojević, 2015

### 7.2.6 ROBUSTNOST / VPLIV RAHLO SPREMENJENIH ANALIZNIH POGOJEV (Robustness / Influence of slightly modified conditions)

Robustnost analizne metode je sposobnost ohranjanja kakovosti rezultata pri majhnih, toda preišljenih spremembah parametrov analizne metode in zagotavlja njeno zanesljivo uporabo. Analizo izvajamo po rahlo spremenjenih analiznih pogojih znotraj dovoljenih odstopanj. Spremljamo vpliv sprememb na kritične parametre ustreznosti sistema predpisane v analiznem postopku in/ali rezultate analiz.

Pri preverjanju vpliva sprememb metode na analizni rezultat moramo zagotoviti ustreznost sistema, predpisanega v analiznem postopku. Robustnost izražamo kot absolutno in/ali relativno razliko povprečnih vrednosti rezultatov, dobljenih pri različnih analiznih pogojih. Obseg potrebnih parametrov je predpisan v protokolu.

V protokolu, ki sem ga dobila za validacijo te analizne metode, je bilo predpisano, da so parametri, ki jih moram spremeniti, valovna dolžina (+ 0,1 nm) in čas spiranja cevke na vzorčevalniku ter na koncu uporabiti še napravo za avtomatsko redčenje standardnih raztopin za umeritveno krivuljo (SIPS – Sample Introduction Pump System). Tako sem najprej izvedla meritve pri valovni dolžini, predpisani v analiznem postopku, in sicer 248,3 nm. Nato sem valovno dolžino spremenila na 248,4 nm in ponovno merila. Za tem sem spremenila čas spiranja cevke za doziranje vzorca iz 30 s na 40 s in na koncu še izvedla meritve brez uporabe naprave za avtomatsko redčenje standardnih raztopin in nato še z uporabo naprave za avtomatsko redčenje standardnih raztopin (SIPS). Po končanih meritvah sem medsebojno primerjala rezultate analiz.

Pri vseh meritvah sem uporabila iste raztopine.

Vrednotenje: izračunamo relativno razliko rezultatov med rezultati analize po analiznem postopku in po rahlo spremenjenih analiznih pogojih.

Kriteriji: relativna razlika rezultatov med rezultati analize po analiznem postopku in po rahlo spremenjenih analiznih pogojih mora biti  $\leq \pm 20 \%$  (relativna razlika med povprečji) za nečistote

#### **Priprava raztopin:**

Pripravila sem raztopine vzorca z dodatkom standardne raztopine železa (20 ppm), ki predstavljajo 100 % zahteve (2 ppm).

#### **Slepa raztopina:**

10 mL vode sem dodala 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> in dopolnila do 25,0 mL z vodo.

#### **Raztopine standarda za umeritveno krivuljo:**

V 100 mL merilno bučko sem odpipetirala 2,0 mL standardne raztopine železa (1000 ppm) in dopolnila z vodo do oznake volumna (20 ppm Fe).

- 1,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> / 25,0 mL vode 0,8 ppm Fe
- 2,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> / 25,0 mL vode 1,6 ppm Fe
- 3,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> / 25,0 mL vode 2,4 ppm Fe

#### **Eksterna standardna raztopina železa:**

V 100 mL merilno bučko sem odpipetirala 2,0 mL standardne raztopine železa (1000 ppm) in dopolnila z vodo do oznake volumna (20 ppm Fe).

- 3,0 mL st. razt. Fe 20 ppm + 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub> / 25,0 mL vode 2,4 ppm Fe

#### **Raztopina vzorca z dodatkom standarda:**

##### **Standardni dodatek 100 % zahteve (2,0 ppm Fe):**

0,5 g vzorca sem raztopila v 10 mL vode. Dodala sem 2,5 mL standardne raztopine 20 ppm Fe in 2,5 mL koncentrirane HNO<sub>3</sub>. Razredčila sem do 25,0 mL z vodo (2,0 ppm Fe).

Pripravila sem 6 paralelk.

**Merjenje:**

Za določitev bazne linije sem aspirirala slepo raztopino, izmerila absorbance delovnim standardnim raztopinam železa in raztopini vzorca. Na osnovi izmerjenih absorbanc delovnih standardnih raztopin sem izrisala umeritveno krivuljo in določila koncentracijo železa v vzorcih.

$$\text{relativna razlika} = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

- A povprečni rezultat prve meritve  
B povprečni rezultat druge meritve

Izračunala sem relativno razliko rezultatov med rezultati analize po analiznem postopku in po rahlo spremenjenih analiznih pogojih. Kriterij za ustreznost je ta, da mora biti relativna razlika med povprečnimi rezultati prve meritve in povprečnimi rezultati druge meritve  $\leq \pm 20\%$ .

Preglednica 9: Rezultati robustnosti - sprememba valovne dolžine (+ 0,1 nm); J. Trbojević, 2015

Vzorec <b>248,3 nm</b>	Natehta (g)	Odčitek (mg/L)	Vsebnost Fe (ppm)
1	0,5006	1,9285	96,3094
2	0,5005	1,9824	99,0210
3	0,5005	1,8888	94,3457
4	0,5000	1,9347	96,7350
5	0,5001	1,9367	96,8156
6	0,5004	1,9203	95,9382
<b>X<sub>povp</sub></b>			<b>96,5275</b>
<b>s</b>			<b>1,51649</b>
<b>RSD (%)</b>			<b>1,6</b>

Vzorec <b>248,4 nm</b>	Natehta (g)	Odčitek (mg/L)	Vsebnost Fe (ppm)
1	0,5006	1,9368	96,7239
2	0,5005	1,9572	97,7622
3	0,5005	1,9349	96,6484
4	0,5000	1,9425	97,1250
5	0,5001	1,9119	95,5759
6	0,5004	1,9150	95,6735
<b>X<sub>povp</sub></b>			<b>96,5848</b>
<b>s</b>			<b>0,84262</b>
<b>RSD (%)</b>			<b>0,9</b>

Valovna dolžina	Vsebnost Fe (ppm)	Relativna razlika (%)
<b>213,9 nm</b>	<b>96,5275</b>	<b>- 0,1</b>
<b>214,0 nm</b>	<b>96,5848</b>	

X<sub>povp</sub> (povprečna vrednost)  
s (standardni odmik)

Izračunala sem povprečno vrednost meritev pred spremembo valovne dolžine in po spremembi valovne dolžine. Relativna razlika med prvo in drugo meritvijo je - 0,1 % kar ustreza zahtevi  $\leq \pm 20\%$ .



Preglednica 10: Rezultati robustnosti - sprememba časa izpiranja; J. Trbojević, 2015

Vzorec (30 s)	Natehta (g)	Odčitek (mg/L)	Vsebnost Fe (ppm)
1	0,5006	1,9285	96,3094
2	0,5005	1,9824	99,0210
3	0,5005	1,8888	94,3457
4	0,5000	1,9347	96,7350
5	0,5001	1,9367	96,8156
6	0,5004	1,9203	95,9382
<b>X<sub>povp</sub></b>			<b>96,5275</b>
<b>s</b>			<b>1,51649</b>
<b>RSD (%)</b>			<b>1,6</b>

Vzorec (40s)	Natehta (g)	Odčitek (mg/L)	Vsebnost Fe (ppm)
1	0,5006	1,9446	97,1135
2	0,5005	1,9366	96,7333
3	0,5005	1,9173	95,7692
4	0,5000	1,9125	95,6250
5	0,5001	1,9126	95,6109
6	0,5004	1,9062	95,2338
<b>X<sub>povp</sub></b>			<b>96,0143</b>
<b>s</b>			<b>0,73602</b>
<b>RSD (%)</b>			<b>0,8</b>

Čas izpiranja	Vsebnost Fe (ppm)	Relativna razlika (%)
<b>30 s</b>	<b>96,5275</b>	<b>0,5</b>
<b>40 s</b>	<b>96,0143</b>	

Izračunala sem povprečno vrednost meritev pred spremembo časa spiranja cevke za doziranje vzorca in po spremembi časa spiranja. Relativna razlika med prvo in drugo meritvijo je 0,5 % kar ustreza zahtevi  $\leq \pm 20$  %.

Preglednica 11: Rezultati robustnosti - sprememba načina vzorčenja; J. Trbojević, 2015

Vzorec (brez uporabe SIPSa)	Natehta (g)	Odčitek (mg/L)	Vsebnost Fe (ppm)
1	0,5006	1,9285	96,3094
2	0,5005	1,9824	99,0210
3	0,5005	1,8888	94,3457
4	0,5000	1,9347	96,7350
5	0,5001	1,9367	96,8156
6	0,5004	1,9203	95,9382
<b>X<sub>povp</sub></b>			<b>96,5275</b>
<b>s</b>			<b>1,51649</b>
<b>RSD (%)</b>			<b>1,6</b>

Vzorec (z uporabo SIPSa)	Natehta (g)	Odčitek (mg/L)	Vsebnost Fe (ppm)
1	0,5006	1,9522	97,4930
2	0,5005	1,9350	96,6533
3	0,5005	1,8483	92,3227
4	0,5000	1,8267	91,3350
5	0,5001	1,8111	90,5369
6	0,5004	1,7898	89,4185
<b>X<sub>povp</sub></b>			<b>92,9599</b>
<b>s</b>			<b>3,33616</b>
<b>RSD (%)</b>			<b>3,6</b>

Priprava standardov	Vsebnost Fe (ppm)	Relativna razlika (%)
<b>Ročno</b>	<b>96,5275</b>	<b>3,7</b>
<b>Vzorčevalnik</b>	<b>92,9599</b>	

Izračunala sem povprečno vrednost meritev pred uporabo avtomatskega redčenja standardnih raztopin in po uporabi avtomatskega redčenja standardnih raztopin. Tukaj je bila relativna razlika med prvo in drugo meritvijo nekoliko večja, in sicer 3,7 %, a kljub temu še vedno ustreza zahtevi  $\leq \pm 20$  %.

Od treh spremenjenih pogojev je imela najmanjši vpliv na rezultat meritev sprememba valovne dolžine, največji pa uporaba avtomatskega redčenja standardnih raztopin za umeritveno krivuljo.

Rezultati meritev pri vseh parametrih ustrezajo kriterijem, kar pomeni, da je celotna validacija ustrezna in metoda pripravljena za uporabo v redni kontroli.

Vse podatke iz validacije sem posredovala odgovorni osebi za področje atomske absorpcijske spektrometrije, ki ima nalogo, da napiše validacijsko poročilo, ga arhivira in s tem zaključi validacijo.

## 8 POVZETEK

Varnost in učinkovitost zdravil sta dve temeljni vprašanji, pomembni za zdravljenje ljudi s farmacevtskimi izdelki. Da zagotovimo varnost farmacevtskega izdelka, je potrebno preveriti njegovo kakovost v vseh fazah proizvodnje. Kontrola kakovosti je pomembna bodisi zato, da zagotovimo ustrezno vsebnost določene učinkovine v izdelku ali pa da preverimo, da ta ne vsebuje ostalih »sestavlin«, tako imenovanih nečistot, ki v izdelek ne sodijo.

Zato se v farmacevtski industriji za določanje sledi železa ter tudi ostalih kovin in nekovin razvijajo nove metode, ki predpisujejo uporabo visoko občutljivih in selektivnih tehnik, in sicer ne le za izpolnjevanje strogih zahtev, temveč tudi z vidika zagotavljanja varnosti in učinkovitosti farmacevtskih izdelkov za uporabnike. Z razvojem sodobnejših instrumentalnih tehnik, kot je plamenska atomska absorpcijska spektroskopija, lahko namreč določimo vrsto elementa in točno količino tega, tudi v zelo nizkih koncentracijah. Za uporabo teh pa potrebujemo ustrezno preverjene oziroma validirane analizne metode, po katerih izvajamo meritve na vzorcih.

V diplomski nalogi sem opisala potek validacije metode za določanje železa na vzorcu bakrovega sulfata penta-hidrata, s plamensko atomsko absorpcijsko spektrometrijo. Testirala sem parametre, ki so bili predpisani v validacijskem protokolu, in sicer mejo zaznavnosti, mejo določitve, ponovljivost metode, linearnost, točnost, stabilnost raztopine in robustnost (vpliv spremembe pogojev). Vse rezultate meritev sem nato primerjala s predpisanimi zahtevami in kriteriji za ustreznost metode. Vsi rezultati so ustrezali kriterijem, kar pomeni, da je metoda ustreza za uporabo v redni kontroli.

Preglednica 12: Pregled kriterijev in ustreznosti kriterijev validirane metode; J. Trbojevič, 2015

Validacijski parameter	Kriterij	Rezultat
Meja zaznavnosti (DL)	$3,3 \times s$ ----- k < 30 ppm	DL = 0,0252 DL (ppm) = 1,2580 <b>ustreza</b>
Meja določitve (QL)	$10 \times s$ ----- k < 30 ppm	QL = 0,0762 QL (ppm) = 3,8123 <b>ustreza</b>
Točnost / Izkoristek	(v območju: 30 % - 150 %) RSD ≤ 20 % Izkoristek 70 % - 150 %	Pri 30% zahteve: <b>ustreza</b> RSD = 3,8 % izkoristek = 104,7 %  Pri 60% zahteve: <b>ustreza</b> RSD = 0,5 % izkoristek = 98,8 %  Pri 100% zahteve: <b>ustreza</b> RSD = 0,8 % izkoristek = 96,8 %  Pri 125% zahteve: <b>ustreza</b> RSD = 0,3 % izkoristek = 95,8 %  Pri 150% zahteve: <b>ustreza</b> RSD = 0,4 % izkoristek = 95,0 %
Ponovljivost metode	RSD ≤ 20 %	RSD = 0,8 % <b>ustreza</b>

<b>Stabilnost raztopine vzorca</b>	Relativna razlika $\leq \pm 20 \%$	Relativna razlika = 5,5 % (24 h) <b>ustreza</b>
<b>Linearnost</b>	Korelacijski koeficient $R \geq 0,99$ Odsek na y osi (b) $\leq 10 \%$	R = 1,00 <b>ustreza</b> b = - 1,2 % <b>ustreza</b>
<b>Robustnost</b>	Relativna razlika $\leq \pm 20 \%$	Valovna dolžina (+ 0,1 nm): relativna razlika = - 0,1 % <b>ustreza</b>  Čas spiranja (iz 30 s na 40 s): relativna razlika = 0,5 % <b>ustreza</b>  Uporaba SIPSa: relativna razlika = 3,7 % <b>ustreza</b>

## 9 SUMMARY

Safety and efficiency of medical drugs are two fundamental questions, which are relevant for proper treatments of patients with pharmaceutical products. To ensure the safety of pharmaceutical products, there is a need to establish quality checks in all of the production steps. Quality control is important to ensure a prescribed amount of certain resource in the product, or to prevent any impurities in it.

To this end there is a fast paced advance in the development of new methods to recognize iron, other metals and non-metal elements in the pharmaceutical products. Not only to increase in safety demands, but to ensure a higher level of safety and efficiency of these products for the patient. The development of more modern instrumental methods, such as flammable atomic absorption spectroscopy, allows us to recognize these elements in their lowest concentrations. To properly use these methods, we need to apply them alongside properly checked or validated analysis methods to recognize iron in a sample of copper sulphate penta-hydrate with the former described method of flammable atomic absorption spectrometry. I have tested the parameters described in the validation protocols, these being the borderline recognition, method repeatability, linearity, accuracy, stability of the compound and its robustness (the effect on the sample if the conditions change). All of the results were compared with prescribed demands and criteria to ensure the method adequacy. All of the fore mentioned results were in the allowable range, which leads to a conclusion that the method is adequate to be used in regular quality control.

Chart 13: Criteria and result compliance of the validated method; J. Trbojević, 2015

Validation parameter	Criterion	Result
Detection limit (DL)	$\frac{3,3 \times s}{k} < 30 \text{ ppm}$	DL = 0,0252 DL (ppm) = 1,2580 <b>complies</b>
Quantitation limit (QL)	$\frac{10 \times s}{k} < 30 \text{ ppm}$	QL = 0,0762 QL (ppm) = 3,8123 <b>complies</b>
Accuracy / Recovery	(In the range: 30 % - 150 %) RSD $\leq$ 20 % Recovery 70 % - 150 %	At 30% of limit concentration: <b>complies</b> RSD = 3,8 % recovery = 104,7 %  At 60% of limit concentration: <b>complies</b> RSD = 0,5 % recovery = 98,8 %  At 100% of limit concentration: <b>complies</b> RSD = 0,8 % recovery = 96,8 %  At 125% of limit concentration: <b>complies</b> RSD = 0,3 % recovery = 95,8 %  At 150% of limit concentration: <b>complies</b> RSD = 0,4 % recovery = 95,0 %
Method precision	RSD $\leq$ 20 %	RSD = 0,8 % <b>complies</b>

<b>Stability of sample solution</b>	Relative difference $\leq \pm 20 \%$	Relative difference = 5,5 % (24 h) <b>complies</b>
<b>Linearity</b>	Correlation coefficient $R \geq 0,99$ Y – intercept (b) $\leq 10 \%$	R = 1,00 <b>complies</b> b = - 1,2 % <b>complies</b>
<b>Robustness</b>	Relative difference $\leq \pm 20 \%$	Wavelength (+ 0,1 nm): relative difference = - 0,1 % <b>complies</b>  Time of rinsing (from 30 s to 40 s): relative difference = 0,5 % <b>complies</b>  Using SIPS (Sample Introduction Pump System): relative difference = 3,7 % <b>complies</b>

## 10 LITERATURA IN VIRI

1. Krka, d. d., Novo mesto – interno gradivo: SOP - Izvajanje meritev z atomsko absorpcijsko tehniko; 22. 05. 2013.
2. Krka, d. d., Novo mesto – interno gradivo: SOP - Delo z atomskim absorpcijskim spektrometrom s plamensko atomizacijo (FAAS 240FSAA); 29. 10. 2014.
3. Krka, d. d., Novo mesto – interno gradivo: SOP – Validacija analizne metode.
4. Krka, d. d., Novo mesto – interno gradivo: priloga SOP-a Validacija analizne metode: AAS, ICP-MS in ICP-AES.
5. European Pharmacopoeia 8.0 Copper sulfate pentahydrate; 01/2008:0894 CORRECTED 7.0.
6. European Pharmacopoeia 8.0, 2.4.9. Iron; 01/2008:20409.
7. US Pharmacopoeia 38 – (241) Iron; official from May 1, 2015.
8. Adele Clare Longworth, B.S.c. Chemistry trainee Research Project 2013-2014; Verification of the Method for the Identification of Lead, Cadmium and Nickel in Magnesium Stearate using the Analytical Technique, Atomic Absorption Spectroscopy.
9. Uporaba atomske spektroskopije v farmacevtski industriji – seminar; Eva Rajh Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, doktorski študijski program kemijske znanosti; junij 2011.
10. Atomska spektrometrija; Anja Pajer Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, katedra za analizno kemijo 14. 04. 2010.
11. Atomic absorption spectrometry; Bernhard Welz, Michael Sperling; Germany 2005.
12. Atomic Absorption Spectroscopy: International Atomic Absorption Spectroscopy Conference; R. M. Dagnall, G. F. Kirkbright Butterworth-Heinemann, 22. 10. 2013.
13. Analytical Atomic Absorption Spectroscopy, selected methods; Jon C. Van Loon, New York 1980.
14. Vovk, Tomaž, Obreza, Aleš. Prehranska dopolnila I: minerali in vitamini. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2009.