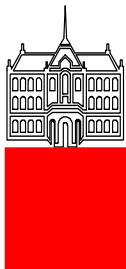


Univerza v Ljubljani

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo



Doktorski študijski program Kemija

Nova področja v analizni kemiji

Seminar 2011

Nosilec predmeta: prof. dr. Boris Pihlar

Seminarska naloga je izdelana v okviru študijskih obvez podiplomskega predmeta *Nova področja v analizni kemiji*. Delo ni lektorirano ali vsebinsko korigirano s strani predavateljev ali drugih univerzitetnih institucij. Avtor in institucija ne jamčita za pravilnost podatkov in navedb v objavljenem gradivu.

Gradivo predstavljeno v tem delu je avtorska lastnina, oziroma last navedenih virov, iz katerih je bilo povzeto.



Univerza v Ljubljani
Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Doktorski študijski program kemijske znanosti

Uporaba atomske spektroskopije v farmacevtski industriji

Seminar

Mentor:

Prof. dr. Aleksandra Lobnik

Avtor:

Eva Rajh

Junij, 2011

Kazalo

1	Uvod	2
2	Prisotnost kovin in nekovin v farmacevtskih izdelkih.....	2
3	Vir neželenih kovin in nekovin v farmacevtskih izdelkih	4
4	Atomska absorpcijska spektroskopija.....	5
5	Tehnike atomske spektroskopije	7
5.1	<i>Plamenska atomska absorpcijska spektroskopija (FAAS).....</i>	<i>8</i>
5.1.1	Prednosti in slabosti FAAS	10
5.2	<i>Elektrotermična atomska absorpcijska spektroskopija (ETAAS).....</i>	<i>10</i>
5.2.1	Prednosti in slabosti ETAAS.....	11
5.3	<i>Atomska emisijska spektroskopija z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-AES)</i>	<i>12</i>
5.3.1	Atomska emisijska spektroskopija (AES)	12
5.3.2	Induktivno sklopljena plazma (ICP)	14
5.3.3	ICP – AES	16
5.3.4	Princip delovanja ICP – AES.....	17
5.3.5	Prednosti ICP – AES:	18
5.3.6	Tipi inštrumentov ICP-AES	18
5.4	<i>Masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS).....</i>	<i>20</i>
5.4.1	Masna spektrometrija (MS).....	20
5.4.2	ICP-MS	21
5.4.3	Prednosti in slabosti ICP-MS.....	22
5.5	<i>Analizne tehnike za trdne vzorce.....</i>	<i>22</i>
5.5.1	Spektrometrija lasersko vzbujene plazme (LIBS).....	23
5.5.2	Masna spektroskopija z vzorčevanjem z lasersko ablacijo (LA-ICP-MS)	30
6	Primeri uporabe AAS v farmacevtski industriji	36
7	Zaključek.....	38
8	Literatura	39

1 Uvod

Pomembnost analize različnih elementov, vključno s kovinami in polkovinami, v farmacevtski industriji je v zadnjih 10-15 letih močno narasla, saj moderne analitske metode dajejo analitikom možnost zagotavljanja specifičnih, natančnih in pomembnih informacij na elementarni ravni, povezanih s farmacevtskimi izdelki. Analitiki so za potrebe v farmacevtski industriji tako začeli uporabljati tehnike atomske spektroskopije, kot so 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). V analitiki elementov v farmacevtski industriji se zadnja leta poslužujejo tudi novejših tehnik, kot sta spektroskopija lasersko inducirane plazme (LIBS) in masna spektroskopija z vzorčevanjem z lasersko ablacijo (LA-ICP-MS).

V tej seminarski nalogi je prikazan vidik uporabe različnih aplikacij atomske spektroskopije v analizi kovin in polkovin v farmacevtski industriji, aktivnih farmacevtskih učinkovin, surovin in polizdelkov.

2 Prisotnost kovin in nekovin v farmacevtskih izdelkih

Varnost in učinkovitost zdravil sta dva temeljna vprašanja, pomembna za zdravljenje z ljudi z farmacevtskimi izdelki. Varnost farmacevtskega izdelka je določena z njegovega farmakološko-toksikološkega profila kot tudi škodljive posledice, ki jih povzročajo prisotne nečistoče, tako kovine kot nekovine. Nečistoče imajo namreč pogosto nezaželene farmakološke-toksikološke učinke in posledično je lahko terapevtska učinkovitost izdelka veliko manjša od možnih vplivov nečistoč. Zato je očitno, da je potrebno farmacevtske izdelke okarakterizirati čim bolj popolno in v več fazah proizvodnje. Spremljanje in nadzor

nečistoč na splošno daje zagotovilo za kakovost in varnost zdravil, zato je med najbolj pomembnimi področji v sodobni farmacevtski analitiki [1].

Toksičnost različnih elementov je dobro znana že vrsto let. Že v drugem stoletju pred našim štetjem, je bilo jasno, da je izpostavljenost svincu (Pb) škodljiva. Znano je, da je kitajski cesar Ying Zhen umrl zaradi zastrupitve z živim srebrom (Hg), ko je užil tablete, ki so vsebovale Hg in ki bi ga naj naredile nesmrtnega [2]. Težke kovine, kot sta svinec in kadmij, v farmacevtskih izdelkih predstavljata tveganje za resne nevarnosti za zdravje tudi pri zelo nizkih odmerkih [3]. Pri daljši izpostavljenosti škodljivo vplivata tako na psihološke kot tudi na vedenjske vzorce pri živih bitjih. Dnevni vnos 0,06 mg svınca v obdobju enega meseca zadošča za kronično zastrupitev, ki povzroči okvaro ledvic, osteomalacijo in obstruktivne pljučne bolezni. Kadmij je rakotvorna snov [4], ki povzroča resne nevarnosti za zdravje. Ta se kopiči v človeškem telesu in ima biološko razpolovno dobo 30 let. Toksikologi še vedno preučujejo učinke različnih elementov na ljudi in spreminjajo dovoljene mejne vrednosti na podlagi podatkov o varnosti, kar pa vodi do potrebe po testiranju farmacevtskih izdelkov na različne elemente [2].

V farmacevtski analitiki se že več kot 100 let za testiranje zdravil na težke kovine uporabljajo standarde opisane v farmakopejah (ameriški (USP), evropski (PhEur),...). Prvotno je bil test na težke kovine namenjen le kot presejalno orodje za omejeno število elementov. Ta postopek je bil čez čas izpopolnjen, z namenom zagotavljanja zanesljivejših informacij. Vendar pa nam tudi v sedANJI ponovitvi poglavja o testu na težke kovine metoda ne omogoča specifične informacije niti o identiteti niti o količini elementa, zato rezultati veljajo le kot mejni preizkus [2]. Farmakopeje namreč predlagajo spremljanje celotne vsebnosti kovin v farmacevtskih izdelkih. Metode vključujejo obarvanje kovinskih sulfidov iz vodne raztopine. Te metode so nespecifične, manj občutljive, zamudne in manj natančne. Zato obstaja velika potreba po razvoju visoko občutljivih in selektivnih tehnik za določanje sledi kovin in nekovin v farmacevtskih izdelkih, ki niso le za izpolnjevanje strogih zahtev, temveč tudi z vidika zagotavljanja varnosti in učinkovitosti farmacevtskih izdelkov za ljudi [1].

Z razvojem modernih instrumentalnih tehnik pa je postalo mogoče zagotoviti element-specifične in kvantitativne informacije glede vsebine kovine (vključno s prehodnimi kovinami, alkalijskimi in zemljoalkalijskimi kovinami,...) in nekovine (bor (B), silicij (Si), germanij (Ge), arzen (As), antimon (Sb), telur (Te), polonij (Po)) v farmacevtskih izdelkih. Z

naraščanjem zahtev po bolj specifičnih informacijah glede vsebnosti kovin in nekovin v farmacevtskih izdelkih, se analitiki vse pogosteje poslužujejo tehnik atomske spektroskopije za zagotovitev ključnih informacij v zvezi z vsebino kovin in / ali nekovin na vseh stopnjah postopka razvoja zdravil [2].

3 Vir neželenih kovin in nekovin v farmacevtskih izdelkih

V proizvodnji farmacevtskih izdelkov se uporabljajo različne kovine in nekovine in nekatere imajo v farmacevtskem izdelku vlogo aktivne farmacevtske učinkovine. Poleg kovin ali nekovin, ki nastopajo v farmacevtskem izdelku v vlogi aktivne učinkovine, pa se lahko v izdelku znajdejo tudi druge kovine ali nekovine, ki pridejo v farmacevtski izdelek zaradi prisotnosti v vhodnih surovinah, med sintezo ali ob stiku z proizvodno linijo in lahko potencialno ogrožajo zdravje uporabnikov [5].

Proizvajalci učinkovin, surovin in polizdelkov, ki se uporabljajo v farmacevtski industriji, lahko pri procesu sinteze uporabijo katerikoli element, ki se nahaja na periodnem sistemu elementov, prav tako lahko surovine, ki se uporabljajo za njihovo pripravo pridejo med pripravo 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, kot reagenti in katalizatorji. Tako je v primeru Pb, Hg, As in Cd, ki so ostanki kovinskih katalizatorjev [5]. Pogosto rabljena katalizatorja v farmacevtski industriji sta tudi paladij (Pd) in platina (Pt) [6].

Zaradi več možnosti poti vstopa kovin in nekovin v farmacevtske izdelke, je farmacevtska industrija zainteresirana za spremljanje elementov v vseh fazah razvoja procesa.

4 Atomska absorpcijska spektroskopija

Atomska spektroskopija se uporablja za kvalitativno in kvantitativno določanje okoli 70 kemijskih elementov. Je tehnika, pri kateri prosti uparjeni atomi absorbirajo elektromagnetno valovanje pri specifični valovni dolžini. Rezultat je absorpcijski signal, ki je sorazmeren s koncentracijo prostih atomov na optični poti. Občutljivost AAS metod je reda velikosti od 10^{-6} (ppm) do 10^{-9} (ppb). Dodatne prednosti so še hitrost, relativna enostavnost, visoka selektivnost, občutljivost, ponovljivost, pravilnost, dostopnost in zmerni stroški. Spektroskopska določitev atomskih vrst se lahko izvaja samo v plinskem mediju, v katerem so posamezni atomi ali njihovi ioni ločeni med seboj. Zato je atomizacija kritična faza v procesu. Temperature atomizacije so v območju 1200-3150 °C. Različne metode AAS se ločijo po načinu atomizacije, ta je lahko plamenska ali elektrotermična.

Merjeni fizikalni parameter pri AAS je absorbanca, ki je posledica svetlobne absorpcije atomov v nevzbujenem stanju. Svetlobno vzbujeni atomi dajejo omejeno število ozkih spektralnih vrhov in linij [7]. Temperatura določa stopnjo atomizacije in razmerje vzbujenih, nevzbujenih, ioniziranih atomov. Ti parametri vplivajo na moč opazovanega signala. Razmerje med vzbujenimi in nevzbujenimi atomi opisuje Boltzmannova razporeditvena enačba.

$$\frac{N^*}{N^0} = \frac{g^*}{g^0} \cdot e^{-\Delta E / kT}, \quad (1)$$

kjer je:

N^*/N^0	razmerje atomov višjega in nižjega energijskega nivoja,
g^0	število deformiranih stanj nižjega energijskega nivoja,
g^*	število deformiranih stanj višjega energijskega nivoja,
ΔE	energija, potrebna da atom preide na višji energijski nivo [J/atom],

k	Boltzmannova konstanta ($1,381 \times 10^{-23}$ J/K),
T	temperatura plamena [K].

Določen energijski nivo atoma lahko absorbira samo točno določeno količino svetlobe s točno določeno valovno dolžino. Ko je atom izpostavljen svetlobi določene valovne dolžine (frekvenca ustreza enačbi 2), njegovi elektroni del te svetlobe absorbirajo in prehajajo iz nižjih na višje energijske nivoje. Princip je prikazan na sliki 1.

$$\nu = \frac{E_1 - E_2}{h}, \quad (2)$$

kjer je:

E_t energija višjega (vzbujenega) energijskega nivoja [J/atom],

E_0 energija nižjega (osnovnega) energijskega nivoja [J/atom],

h Planckova konstanta [$6,626 \times 10^{-34}$ Js].

Intenzivnost vpadne svetlobe (I_0) se ob prehodu skozi absorpcijski medij zmanjša (I), kar je posledica absorpcije nevzbujenih atomov. Iz izmerjenih parametrov I_0 in I se določi absorbanca (A), ki je sorazmerna koncentraciji prostih in nevzbujenih atomov analita v plamenu/kiveti. Ta dogodek opisuje Beer - Lambertov zakon enačbe 3:

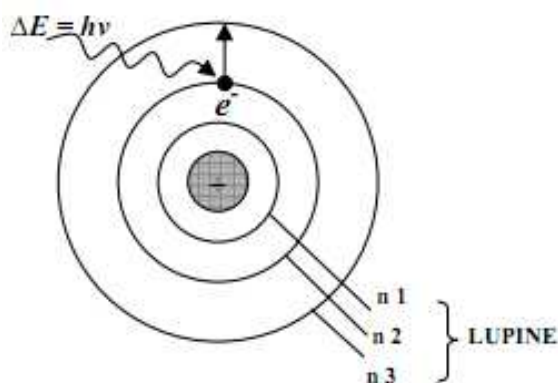
$$I = I_0 \cdot e^{-k l c},$$

$$T = \frac{I}{I_0} = e^{-k l c},$$

$$A = -\log_{10}(T) = \frac{k}{2,3} l c = \alpha l c, \quad (3)$$

kjer je:

- T propustnost,
- k absorpcijski koeficient analita pri specifični valovni dolžini [cm^{-1}],
- α koeficient molarne absorptivnosti [cm^{-1}],
- l dolžina plamena/kivete,
- c koncentracija analita.



Slika 1: Princip absorpcijskega procesa.

5 Tehnike atomske spektroskopije

Več različnih tehnik s področja atomske spektroskopije - plamensko atomsko absorpcijsko spektroskopijo (FAAS), elektrotermično atomsko absorpcijsko spektroskopijo (ETAAS), atomsko emisijsko spektroskopijo z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-AES) in masno spektrometrijo z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS) - uporabljajo že vrsto let za analizo kovin, polkovin in nekovin v različnih vrstah vzorcev, vključno s farmacevtskimi izdelki. Od teh tehnik sta v farmacevtski industriji najbolj pogosti FAAS in ETAAS, ki temeljita na Beer-Lambertovem zakonu. Za FAAS velja, da je manj občutljiva metoda od ETAAS. Za FAAS metodo se pričakuje, da ima občutljivost reda velikosti 10^{-6} (ppm), medtem ko ETAAS zazna koncentracije reda velikosti 10^{-9} (ppb). Prav tako se metodi razlikujeta v količini potrebnega vzorca za analizo. Medtem ko, v primeru FAAS metode potrebujemo mililiter

vzorca, je pri ETAAS dovolj le mikroliter vzorca. FAAS je na splošno cenejša in hitrejša izmed obeh tehnik, obenem pa zahteva tudi manjšo raven usposobljenosti analitika kot ETAAS [2].

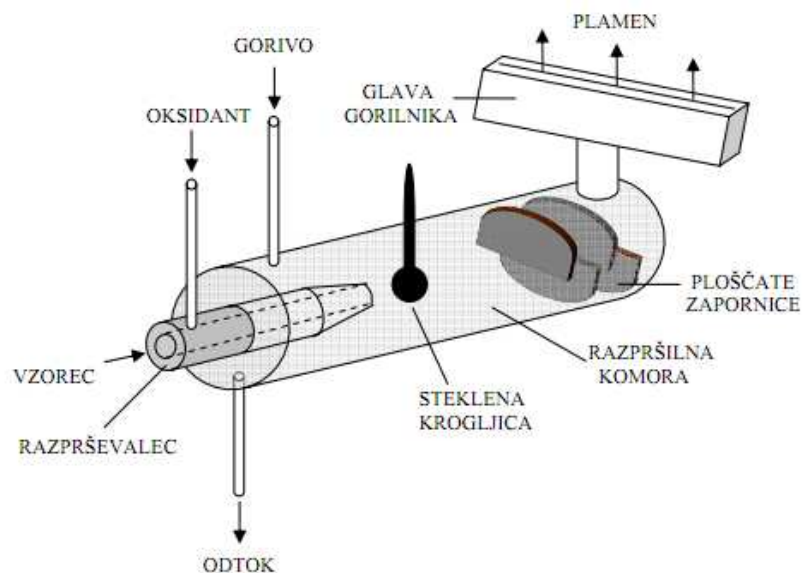
ICP-AES in ICP-MS, ki se uporabljata za različne vrste vzorcev, se v zadnjih letih v večji meri uporabljata tudi v farmacevtski industriji [2]. Obe tehniki sta sposobni hitre, večelementne analize, vendar pa ima ICP-MS veliko večjo občutljivost – reda velikosti 10^{-12} (ppt) – kot ICP-AES, ki omogoča zaznavanje koncentracij reda velikosti 10^{-9} (ppb), vendar pa ima več možnosti spektralnih interferenc. ICP-AES in ICP-MS metodi od analitika, v nasprotju z FAAS ali ETAAS, zahtevata dosti večje spretnosti, predvsem ICP-MS, ki zahteva najvišjo raven znanja izmed teh štirih tehnik. Seveda pa je pomembno tudi dejstvo, da je ICP-MS idealen za sklopitev s separacijskimi tehnikami, kot sta plinska (GC) in tekočinska kromatografija (LC), pri čemer je separacijska tehnika kot del sistema za vnos vzorca. ICP-MS je najdražja od omenjenih instrumentalnih tehnik, prav tako pa je tudi potrošni material za ICP-MS najdražji.

Poleg teh, bolj pogosto uporabljenih tehnik atomske spektroskopije, pa je vidna tudi vedno večja uporabnost masne spektroskopije z vzorčevanjem z lasersko ablacijo (LA-ICP-MS) in spektroskopije lasersko inducirane plazme (LIBS) [2]. Obe tehniki sta primerni za vzorčenje trdnih vzorcev in zahtevata malo ali nikakršne priprave vzorca. Težave z omenjenima tehnikama pa se pojavljajo predvsem zaradi pomanjkanja dostopnosti ustreznih standardov v trdnem agregatnem stanju in pa v primeru LIBS-a, omejena razpoložljivost nespecializirane, standardizirane LIBS instrumentacije.

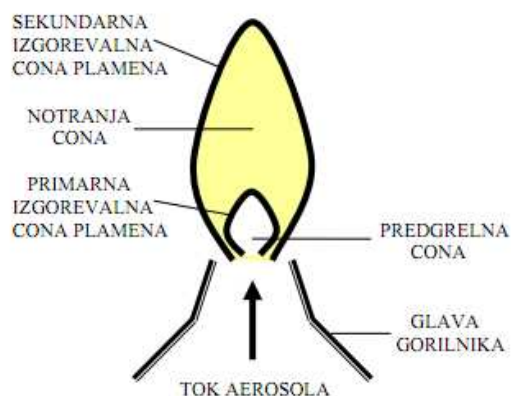
5.1 Plamenska atomska absorpcijska spektroskopija (FAAS)

V plamenski AAS (FAAS) tekoče vzorce uvajamo v plamen preko razpršilnika, v katerem se vzorec pretvori v aerosol. Aerosol uvajamo v razpršilno komoro, kjer se pomeša z oksidantom in gorilnim plinom. Vzorec nato kontinuirno uvajamo v plamen. Plamen predstavlja vir nevtrálnih atomov ali molekul, ki absorbirajo energijo in služi za izparevanje topila in atomizacijo vzorca. Za plamen se najpogosteje uporablja mešanica acetilen/zrak, ki gori v temperaturnem območju 2120-2400 °C. V primeru spojin, ki tvorijo termično stabilne

oksida, pa je primernejši plamen iz mešanice acetilen/didušikov oksid, ki gori v temperaturnem območju 260-2800 °C [2,8].



Slika 2: Razpršilna komora.



Slika 3: Shema prečnega prereza plamena pri FAAS.

Kot izvor svetlobe se pri FAAS uporabljata žarnica z votlo katodo (*angl.* hollow cathode lamp, HCL) ali brezelektrodna visokofrekvenčna žarnica (*angl.* electrodeless discharge lamp, EDL). 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 [7,8].

5.1.1 Prednosti in slabosti FAAS

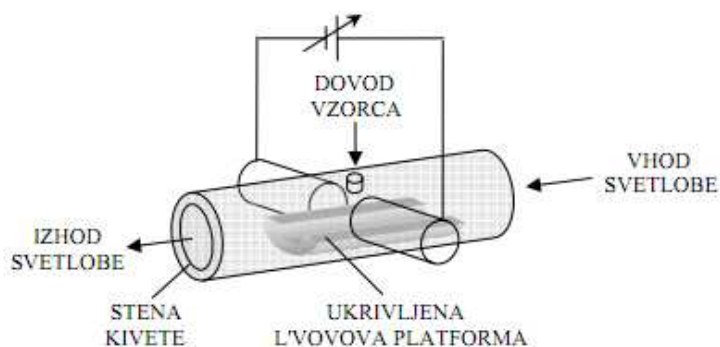
Prednost FAAS je predvsem enakomeren in miren signal [9].

Slabosti FAAS:

- občutljivost (mg/l),
- potrebne relativno velike količine vzorca,
- kratek čas zadrževanja analita v plamenu, kar povečuje možnost nepopolne atomizacije [9].

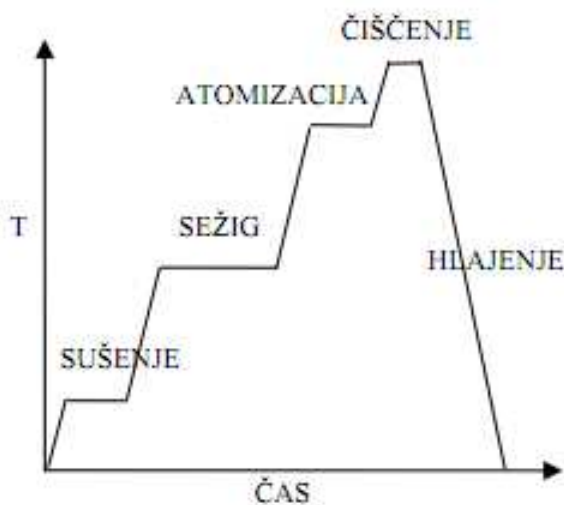
5.2 Elektrotermična atomska absorpcijska spektroskopija (ETAAS)

Tehnika elektrotermične AAS (ETAAS) ima v primerjavi s FAAS tehniko nekatere prednosti. Pri tej tehniki nadomestimo plamen z razpršilnikom z grafitno cevko, ki je v aparatu nameščena tako, da prehaja žarek svetlobe iz izvora skozi sredino cevke. V notranjosti cevke je nameščena ukrivljena ali ploščata platforma (L'vovova platforma). Vzorec vnašamo v cevko na platformo skozi odprtino za vnos, ki se nahaja v zgornjem delu cevke.



Slika 4: Shema bočno grete kivete z ukrivljeno L'vovovo platformo [8].

Grafitna cevka se nahaja v večji cevi, ki jo prepihujemo z argonom, s katerim odstranimo presežni material med sežigom in po atomizaciji, preprečimo oksidacijo grafita in reakcije med ogljikom ter dušikom (nastanek cianogena). Grafitno cevko uporovno grejemo, pri čemer lahko temperaturni program poljubno uravnavamo ter s tem kontroliramo procese, ki vodijo do nastanka prostih atomov. Uporabljamo večstopenjske temperaturne programe. V prvi stopnji (100 °C) vneseni vzorec posušimo. Nato sledi stopnja razkroja (300-900 °C), v kateri odstranimo del analizirane snovi. Sledi stopnja atomizacije, pri kateri v zelo kratkem času segrejemo cevko na temperaturo, ki zadošča za atomizacijo določenega elementa (2500-2700 °C). Kot pri FAAS, se prav tako tudi pri ETAAS za zvezo med koncentracijo preiskovane snovi in absorbirane svetlobe uporablja Beer-Lambertov zakon. Pri ETAAS lahko pride do spektralnih interferenc, vendar jih lahko zmanjšamo ali celo odstranimo z različnimi korekcijami [2,7].



Slika 5: Grafični prikaz segrevanja grafitne cevke.

5.2.1 Prednosti in slabosti ETAAS

Prednosti ETAAS:

- velika občutljivost,

- majhni volumni vzorca,
- nirektna analiza trdnih vzorcev,
- nizka cena delovanja,
- avtomatizacija.

Slabosti ETAAS:

- Čas analize,
- slabša natančnost,
- motnje,
- cena aparature,
- zahtevno optimiranje določitve,
- enoelementnost,
- majhna množina vzorca, kar je problem v primeru nehomogenosti vzorca.

5.3 Atomska emisijska spektroskopija z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-AES)

5.3.1 Atomska emisijska spektroskopija (AES)

Metode emisijske spektroskopske analize temeljijo na lastnosti atomov, da le-ti pri določenih pogojih prehajajo zunaj orbital v energetske višje nivoje. Ta vzbujena stanja so za atome nestabilna in so zato kratkotrajna (10^{-8} s). Pri spontanem prehodu v nižja (osnovna) energetska stanja se sprošča energija v obliki elektromagnetnega valovanja. Valovna dolžina sevanja svetlobe je odvisna od razlike energij osnovnega in vzbujenega stanja [7,10].

$$E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda}, \quad (4)$$

kjer je:

- h Planckova konstanta,
- c hitrost elektromagnetnega valovanja [m/s],
- ν frekvenca elektromagnetnega valovanja [s^{-1}],
- λ valovna dolžina [nm].

Atomi imajo lahko več vzbujenih stanj, ki so odvisna predvsem od dovedene energije pri vzbujanju. Možne prehode med posameznimi stanji opisujejo pravila kvantne mehanike.

Vsak element ima značilna energetska stanja oziroma karakteristične elektronske prehode, zato je tudi spekter emitirane svetlobe za vsak element značilen in ga lahko uporabljamo za identifikacijo elementov v vzorcu (kvalitativna analiza).

Intenziteta sevane svetlobe je odvisna od števila vzbujenih atomov in je v neposredni zvezi z množino elementa v vzorcu in pogojev pri vzbujanju. Za čim večjo občutljivost emisijske spektroskopije mora biti razmerje med številom atomov v vzbujenem stanju in številom atomov v osnovnem stanju čim večje [10].

$$\frac{N^*}{N^0} = \frac{g^*}{g^0} \cdot e^{-\Delta E / kT} \quad (5)$$

Kjer je:

- N^* število atomov v vzbujenem stanju,
- N^0 število atomov v osnovnem stanju,
- g^0 število deformiranih stanj nižjega energijskega nivoja,
- g^* število deformiranih stanj višjega energijskega nivoja,

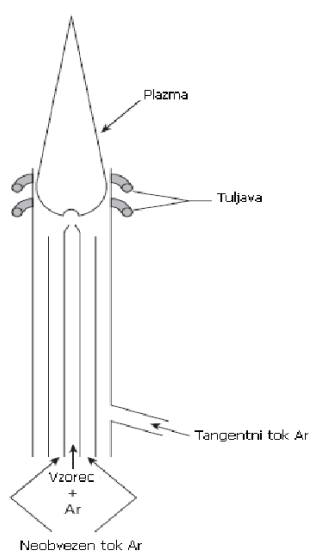
ΔE	energije, potrebna da atom preide v višji energijski nivo [J/atom],
k	Boltzmannova konstanta ($1,381 \times 10^{-23}$ J/K),
T	temperatura plamena [°K].

Število vzbujenih atomov je odvisno predvsem od temperature, zato moramo pri emisijskih spektroskopskih metodah uporabljati izvore z visoko temperaturo. Uporabljamo lahko istosmerni ali izmenični električni lok, visokonapetostno iskro ali različne plazemske izvore [7,10].

Izvor ima dvojno nalogo: v prvi stopnji mora pretvoriti komponente vzorca v atomarno obliko (atomizacija), v drugi stopnji pa vzbuditi elektrone v atomih (ekscitacija). Obe stopnji vključujeta številne mehanizme, ki so odvisni predvsem od vrste izvora in narave vzorca.

5.3.2 Induktivno sklopljena plazma (ICP)

Induktivno sklopljena plazma ICP je najpogosteje uporabljen plazemski izvor v emisijski in masni spektrometriji.



Slika 6: Shema ICP bakle. Temperatura v jedru plamena je okrog 10.000 K, 15-20 mm nad tuljavo pa okrog 6000-8000 K. Tangentni tok Ar je namenjen termični izolaciji cevk [10].

ICP izvor je sestavljen iz treh koncentričnih kvarčnih cevi, skozi katere teče tok argona, katerega skupni pretok znaša 5 l/min do 20 l/min. Argon se uporablja za generiranje plazme, kot izolator in kot nosilec vzorca.

Aerosol vzorca vstopa v plamen s tokom argona od 0,3 l/min do 1,5 l/min skozi osrednjo cev. Ionizacijo argona za generiranje plazme iniciiramo z iskro iz Teslove tuljave.

Okrog vrha zunanje cevi premera 2,5 cm je ovita vodno hlajena RF indukcijska tuljava, ki jo napaja radiofrekvenčni generator. Ta proizvaja od 0,5 kW do 2 kW moči od 27 MHz do 41 MHz. Na nastale ione in elektrone vpliva fluktujuče magnetno polje (H), ki izhaja iz RF indukcijske tuljave. Ioni in elektroni znotraj tuljave krožijo po zaključeni poti. Ioni in elektroni se upirajo temu gibanju in posledica tega je ohmsko gretje. Temperatura plazme je 10000 K in je tako visoka, da zahteva termično izolacijo zunanjega kvarčnega cilindra. To dosežemo s tangencialnim tokom argona okoli sten, ki nam hladi notranje stene osrednje cevi in usmeri plazmo radialno.

Plazma ima intenzivno briljantno belo netransparentno jedro s plamenastim repom, ki izhaja iz plamena nekaj mm nad osrednjo cevjo. V območju 10 mm do 30 mm nad jedrom je plazma optično transparentna. Emisijska spektroskopska opazovanja se navadno izvajajo 15 mm do 20 mm nad indukcijsko tuljavo, kjer je sevanje ozadja skoraj brez argonovih črt, kar je primerno za emisijsko spektroskopsko analizo.



Slika 7: Plazma.

Preden pridejo atomi vzorca do točke opazovanja za emisijsko spektroskopsko analizo, se 2 ms nahajajo pri temperaturi od 4000 do 8000 K. Čas in temperatura sta približno 2 do 3 - krat višja kot v najbolj vročem plamenu acetilen/ N_2O . Posledica tega je bolj

popolna atomizacija vzorca. Zaradi tega imamo manj težav s kemijskimi interferencami. Majhen je tudi učinek ionizacijskih interferenc pri masni analizi, kajti koncentracija elektronov je velika v primerjavi s koncentracijo ionov vzorca.

Plazma ima še več prednosti kot izvor za spektroskopsko analizo. Atomizacija namreč poteka v kemijsko inertni atmosferi argona, ki preprečuje tvorbo oksidov. Temperaturni profil plazme je enoten, zato pravimo, da je plazma optično tanek izvor. Posledica tega je linearnost umeritvene krivulje v območju šestih velikostnih redov.

Kljub visoki temperaturi ni nevarnosti eksplozij, ker nimamo opravka s kemijskim procesom, v primeru težav se elektromagnetno polje samodejno izključi [11,12].

5.3.3 ICP – AES

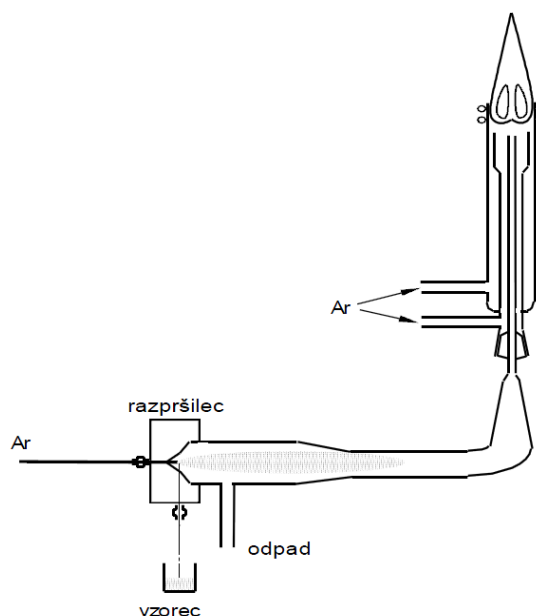
ICP AES – atomska emisijska spektroskopija, imenovana tudi ICP OES - optična emisijska spektroskopija, je analitska tehnika, ki se uporablja za določitev kovin v sledovih. Je vrsta emisijske spektroskopije, ki uporablja induktivno sklopljeno plazmo za vzbujanje atomov in ionov, ki emitirajo elektromagnetno sevanje pri valovnih dolžinah, karakterističnih za posamezen element. Intenziteta te emisije je odvisna od koncentracije elementa v vzorcu [13].

ICP-AES uporablja za vzbujanje in ionizacijo elementarnih vrst v vzorcu argonsko plazmo s temperaturo med 6000 in 10.000 °C. Vzorci se uvajajo v plazmo z razpršilnikom, ki ustvarja majhne kapljice, te pa potekajo skozi razpršilno komoro in nato skozi centralno cev koncentričnega torch-a. Procesi desolvacije, uparjanja, atomizacije in ionizacije vzorca se pojavijo v visokih temperaturah plazme, trki ionov in elektronov argona v plazmi ionizirajo in vzbujajo atome analita. Vzbujeni atomi nato oddajajo različne frekvence svetlobe, ki so značilne za energijo prehoda za dani analit. Jakost svetlobe je sorazmerna s koncentracijo analita. Ker je na tisoče potencialnih emisijskih črt, je izbor valovne dolžine analita bistvenega pomena za analizo [2,7].

5.3.4 Princip delovanja ICP – AES

Tehnika ICP – AES je vrsta atomske emisijske spektroskopije, kjer kot izvor svetlobe uporabljamo induktivno sklopljeno plazmo. Metoda temelji na vzbujanju atomov in/ali ionov v plazmi in merjenju intenzitete emitirane svetlobe. Vzbujevalna temperatura je v ICP izvoru v primerjavi z ostalimi izvori (plamen, iskra, lok,..) precej višja in znaša med 5000 K in 10000 K. Zaradi tako visoke temperature je veliko število različnih atomov oziroma ionov v vzbujenem stanju, kar omogoča istočasno detekcijo intenzitete emitirane svetlobe velikega števila spektralnih črt preiskovanih elementov. To je za elementno analizo pomembno, saj lahko iz istega vzorca kvalitativno in kvantitativno določimo večje število elementov, kar je prednost zlasti pri majhni količini vzorca.

Na sliki 8 je shematski prikaz vnosa vzorca pri ICP – AES. Vzorec uvajamo v plazemski izvor s pomočjo razpršilca. Tekoči vzorec in tok argona prideta v stik pravokotno druga na drugega in vzorec se razprši v obliki aerosola. Aerosol vzorca nato pride v plamen s tokom argona skozi osrednjo cev [10].



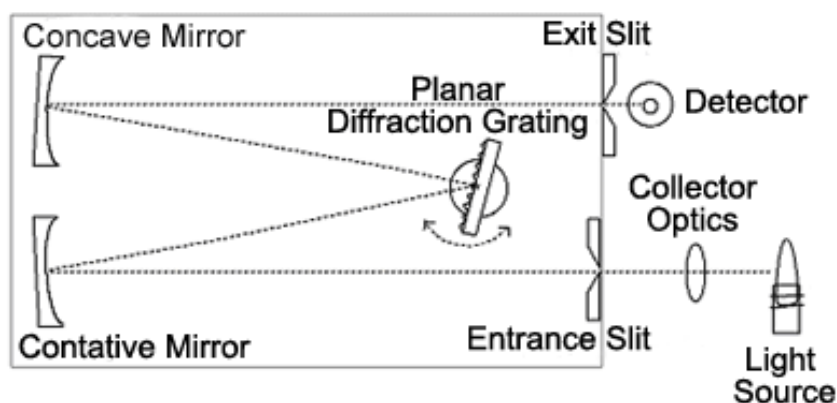
Slika 8: Shema vnosa vzorca pri ICP atomski emisijski spektrometriji.

5.3.5 Prednosti ICP – AES:

- dobra ponovljivost,
- nizke meje zaznavnosti,
- primerna je za široko koncentracijsko območje, kar omogoča veliko natančnost (0,5 – 5%),
- uporabna je za analizo trdnih in tekočih vzorcev [10].

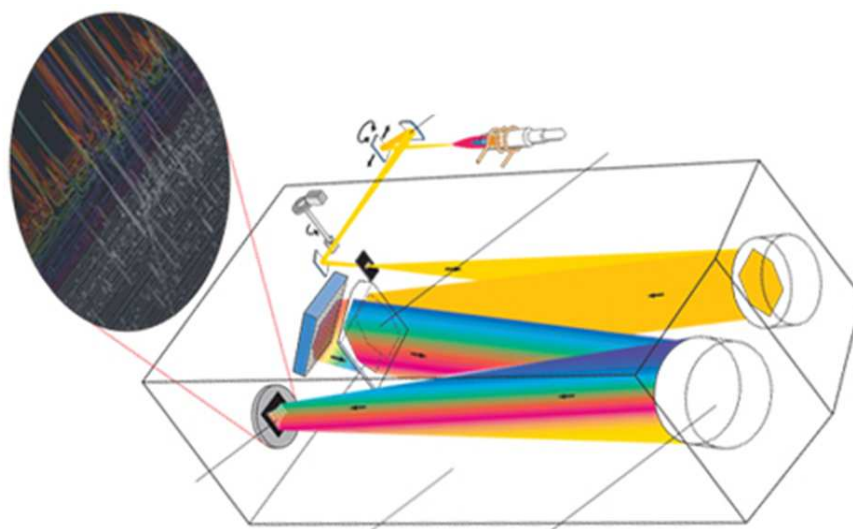
5.3.6 Tipi inštrumentov ICP-AES

Obstaja več tipov inštrumentov, ki se ločujejo po naravi spektrometra in detektorja. Starejši tipi ICP-AES sistemi so za detekcijo predhodno izbranih valovnih dolžin uporabljali fotopomnoževalke. To je omejevalo število elementov, ki jih je bilo mogoče določiti, saj so valovne dolžine fiksne, ko je inštrument enkrat narejen. Sekvenčni tip (slika 9) lahko izbere katero koli valovno dolžino in jo fokusira na detektor. Vendar pa je to možno samo za posamezen element hkrati, kar lahko vodi do dolgih analiznih postopkov.



Slika 9: Sekvenčni tip ICP-AES.

V današnjih modernih ICP-AES sistemih se uporabljajo simultani tipi (slika 10), ki uporabljajo Echelovo uklonsko mrežico kot disperzijski element in detektorje trdne faze, ki slonijo na CCD (angl. *charge-coupled*) napravah ter tako predstavljajo fleksibilen sistem in izločijo potrebo po velikem številu posameznih fotopomnoževalnih detektorjev. Ta kombinacija omogoča večelementne meritve katerekoli valovne dolžine. Najpomembnejša lastnost simultane tipa je visoka hitrost, saj nam posreduje informacijo o vseh 72 izmerjenih elementih v 1 do 2 minutah.



Slika 10: Simultani tip ICP-AES.

Karakteristika ICP nam prav tako omogoča vnos vzorca v ozkem območju in zagotavlja optično tanek emisijski izvor in kemijsko inertno atmosfero. Pri visoki temperaturi je povečana učinkovitost vzbujanja, zato je ICP emisijska spektrometrija mnogo bolj občutljiva kot ostale emisijske tehnike. Posledica tega sta široko dinamično območje in minimalne kemijske interakcije v samem analiznem postopku, širše je tudi linearno območje, prav tako je mogoča tudi večelementna analiza. Zaradi temperaturne stabilnosti izvora, je natančnost meritev s to tehniko velika.

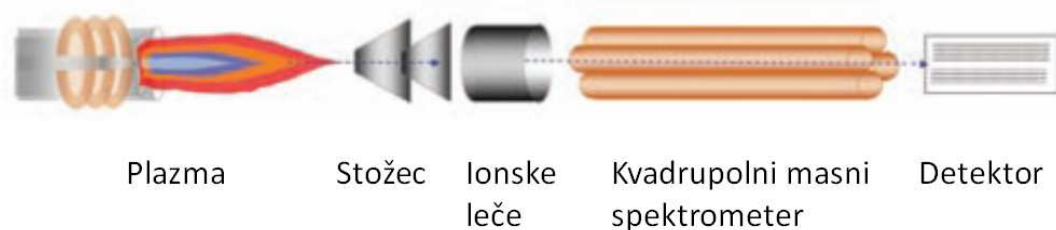
Na sliki 11 so prikazani elementi, ki jih lahko določamo z ICP-AES in tipične meje zaznave.

Bistveni sestavni deli masnega spektrometra so: ionski izvor, analizator, detektor in procesor za obdelavo podatkov.

V ionskem izvoru se molekule ionizirajo, nastale ione pospeši posebno električno polje. Tako dobimo curek pozitivnih ionov, ki ga analizator loči v posamezne komponente z različnimi vrednostmi razmerja m/z . Ioni, ki nastanejo iz molekul v plinastem agregatnem stanju v ionizacijski komori, imajo veliko energijo, so zelo nestabilni in razpadejo na značilne fragmente. Fragmentni ioni se zaradi razlike npr. v hitrosti in v vrednosti m/z v magnetnem ali električnem polju (analizator) različno odklonijo. Posledica tega je serija signalov, ki jo imenujemo masni spekter. Pri tej metodi molekule ioniziramo in nastali ioni dalje razpadejo na fragmentne ione, ki jih zaznamo kot signale v masnem spektru. Na osnovi signalov v spektru in njihove relativne jakosti lahko sklepamo na strukturo molekul.

5.4.2 ICP-MS

Kot prikazuje že ime, je ICP masna spektrometrija (ICP-MS) kombinacija induktivno sklopljene plazme in masnega spektrometra. ICP-MS izrablja zmožnost ICP izvora iz argona za učinkovito tvorbo enojno nabitih ionov iz elementarnih snovi v vzorcu. Ti ioni so nato usmerjeni v masni spektrometer. Funkcija masnega spektrometra je podobna tisti, ki jo ima monokromator pri ICP-AES sistemu. Vendar pa separacija ionov na masnem spektrometru ne poteka s separacijo svetlobe glede na posamezne valovne dolžine, ampak z ločevanjem glede na njihova razmerja mase z nabojem (m/z). Ioni izbranega razmerja m/z so usmerjeni k detektorju, ki določi število prisotnih ionov (slika 12). Po navadi se uporablja kvadrupolni masni spektrometer, saj je le-ta enostaven za uporabo, robusten in hiter. Glede na podobnost tehnike uvajanja vzorca in obdelave podatkov, je uporaba ICP-MS sistema podobna uporabi ICP-AES [7,14,15,16].



Slika 12: Poenostavljen prikaz osnovnega ICP-MS sistema.

5.4.3 Prednosti in slabosti ICP-MS

ICP-MS združuje različne sposobnosti ICP tehnike z izjemnimi mejami zaznavami, ki so primerljive ali celo boljše od tistih pri ETAAS. Ta tehnika je tudi ena izmed redkih, ki omogoča kvantifikacijo koncentracij in izotopskih razmerij elementov. Vendar pri ICP-MS obstajajo omejitve v količini vzorca, ki ga lahko uvedemo. Metoda zahteva povečane vzdrževalne ukrepe v primerjavi z ICP-AES. Med ICP torch-em in masnim spektrometrom je postavljen še vmesni stožec, ki zagotavlja visok vakuum zahtevan za delovanje masnega spektrometra, in ionske leče, ki potrebujejo redno čiščenje za sprejemljivo delovanje inštrumenta.

5.5 Analizne tehnike za trdne vzorce

Spektroskopija lasersko vzbujene plazme (LIBS) in masna spektroskopija z vzorčevanjem z lasersko ablacijo (LA-ICP-MS) sta koristni tehniki pri analizi trdnih vzorcev, z malo ali brez priprave vzorca, in se uporabljata že vrsto let, vendar v omejenem obsegu [2]. Za obe tehniki so na voljo različni laserji, in izbira laserja je odvisna od analitične potrebe. V farmaciji so se le-ti izkazali kot potencialno orodje za vzorčenje pri analizi tablet.

Pri LIBS-u, je laser usmerjen na površino trdnega vzorca, in ko je energija laserja zadostna, se vzorec upari in proizvaja nevtralne in ionske zvrsti v vzbujenem stanju. V sklopu ICP-AES, je LIBS tudi tehnika, ki temelji na emisiji in ker je LIBS trdna tehnika vzorčenja, se lahko uporablja za globinsko profiliranje in določanje karakterističnih elementov v vzorcu.

LA-ICP-MS je zelo podobna tehnika kot LIBS in se prav tako lahko uporablja v sklopitvi z ICP-AES. Laserski žarek je usmerjen na površino trdnega vzorca in povzroči, da material iz vzorca izhlapi ali se tankoplastno razprši. Nosilni plin argon te delce prenese v plazmo, kjer se atomizirajo in ionizirajo. Kot LIBS, se tudi LA-ICP-MS lahko uporablja za globinsko profiliranje in določanje karakterističnih elementov v vzorcu.

Obe tehniki zagotavljata dobro občutljivost (ppm do ppb), vendar za kvantitativno določitev potrebujemo trdne standarde. Če standardov ni mogoče kupiti, jih lahko tudi pripravimo, pri čemer je bistveno temeljito mešanje.

Teoretično naj bi imela LA-ICP-MS več prednosti pred LIBS tehniko. Pri LA-ICP-MS sta ablacija in atomizacija med seboj neodvisna procesa, zato lahko instrumentalne parametre optimiziramo za vsakega posebej. Pri LIBS-u, kjer obstaja samo en vir energije, obstaja konkurenca med procesoma ablacije in vzbujanja, saj se pojavljata na istem mestu in v približno enakem časovnem okviru. Posledično je LIBS bolj občutljiv na vplive matriksa. To pri LA-ICP-MS ni problem, saj lahko učinek procesa ablacije zmanjšamo z uporabo internega standarda in izračunamo koncentracijo iz razmerja signalov analita in standarda [17]. Pri LIBS tehniki pa lahko vpliv matriksa zmanjšamo ali celo izničimo nekoliko drugače. Čeprav tablete vsebujejo organske sestavine, v večini primerov zdravilna učinkovina vsebuje neki element, ki se razlikuje od drugih sestavin tablete (matriksa). Količino zdravilne učinkovine torej lahko določimo na podlagi izmerjene količine tega elementa [18].

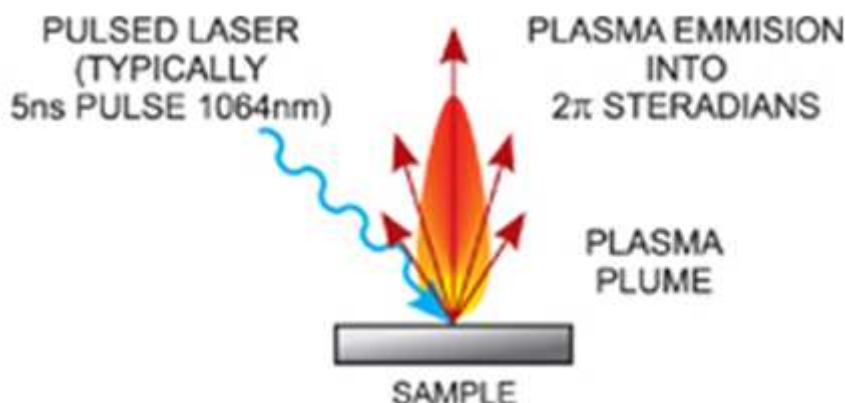
5.5.1 Spektrometrija lasersko vzbujene plazme (LIBS)

Tehnika, ki se uporablja za večino analitskih postopkov v farmacevtski industriji je visokotlačna tekočinska kromatografija (HPLC). Vendar pa je neuporabna pri analizi maziv in merjenju debeline obloge tablet. Poleg tega, zahteva tehnika HPLC pripravo vzorca, zato ta ni primerna za hitre analize na mestu proizvodnje. Pripravo (razklop) vzorca prav tako zahtevajo tudi druge analitske tehnike, kot so ICP-AES ali ETAAS. Pri tehnikah, ki zahtevajo pripravo vzorcev, je lahko čas analize dolgotrajen. Nasprotno tem tehnikam, LIBS ne zahteva pripravo vzorca in zato je čas analize občutno krajši. Analiza vzorcev lahko poteka na mestu izdelave, kar zagotavlja dragocene podatke v nekaj minutah [18].

Spektrometrija lasersko vzbujene plazme (LIBS) je uporabna metoda za določanje elementne sestave različnih trdnih snovi, tekočin in plinov. Temelji na analizi atomskih emisijskih črt, nastalih blizu površine vzorca. Ta tehnika uporablja veliko moč laserja, ki je usmerjen v vzorec, kjer polje visoke intenzivnosti sproži plaz ionizacije elementov vzorca in ustvari se plazma. Emisija atomov in ionov v plazmi se zbere na leči ali optičnemu vlaknu, ki jo analizira spektrografski detektor. Elementarno sestavo vzorca in koncentracijo posameznih elementov se določi na podlagi atomskih spektralnih črt. Analiza je podobna tisti, ki se uporablja v primeru ICP analize. Velika prednost LIBS tehnike je v tem, da je potrebno malo ali nikakršne priprave vzorca, kar v prihodnosti omogoča uporabo le te na terenu ali znotraj industrijskega obrata.

5.5.1.1 Tehnične podrobnosti LIBS tehnike

Kratek laserski pulz je usmerjen na površino vzorca, pri čemer ustvari plazmo. Laser z dobrim Gaussovimi profilom omogoča usmeritev blizu točke loma žarka. Ožja je usmeritev, manj energije je potrebne za laserski razklop. Potrebna energija je le deset mJ.



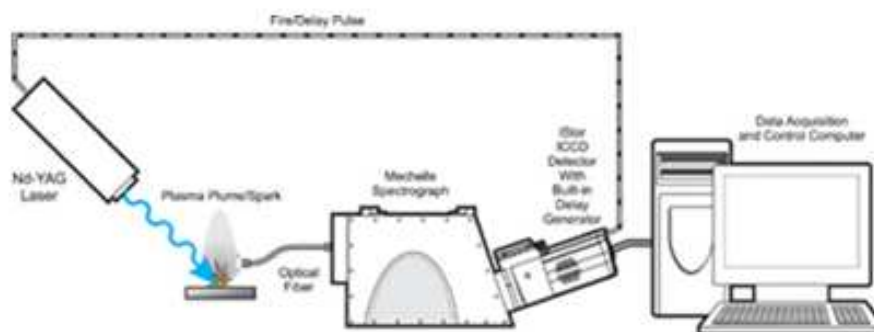
Slika 13: Plazemski oblak, ki ga inducira laserski pulz.

Visoko intenziven laserski pulz vpliva na vzorec in proizvede plazemski oblak. Laserski pulz navadno traja 5-20 ns. Emisija iz plazemskega oblaka se zbere in analizira z detekcijskim sistemom. Emisija se zbere na neki razdalji od vzorca, s čimer se zmanjša površinski vpliv ali vpliv samo-adsorpcije. Plazma v vzorcu uniči kemijske vezi in ionizira sestavne elemente.

Spektralna emisija nastane, kot rezultat nadaljnjih sprostitvev vzbujenih sestavnih zvrsti. V spektru, opazovanem prvih 100 ns, prevladuje nenehno, intenzivno, belo svetlobno sevanje in posledično ni opaznih diskretnih linij. Plazemski oblak se širi s časom, zato se vzbujene zvrsti sprostijo kasneje. Po približno 1 μ s postanejo vidne diskretne spektralne črte, ki izvirajo iz različnih ionskih zvrsti. Ta čas se razlikuje glede na vrsto vzorca, oddaljenost od centra plazme in od valovne dolžine laserske svetlobe, vendar ostaja znotraj milisekundne skale.

Plazma je emitirana pod kotom 2π steradianov, tako da hitra $f/1$ leča zbere čim več svetlobe. Včasih se uporabi zadrževalni filter, da odstrani razpršenost vpadne laserske svetlobe – vendar pa sta vpadni laserski žarek in signal časovno ločena, zato se filter redko uporablja. Zbrano lasersko svetlobo analizira detektor, pritrjen na spektrograf.

Za analizo raznolikih vzorcev je priporočljiva uporaba spektrografa, ki omogoča kombinacijo visoke resolucije z širokim obsegom valovnih dolžin. Intenzivnost plazemske emisije je običajno dovolj velika, da lahko posnamemo dober spekter. Shematičen prikaz tipične LIBS aparature je prikazan na spodnji sliki.



Slika 14: Shematičen prikaz LIBS aparature.

5.5.1.2 Prednosti in slabosti LIBS tehnike:

Prednosti

- omogoča vsestransko vzorčenje trdnih snovi, plinov ali tekočin,
- zahteva malo ali nikakršne priprave vzorca,

- spada med nedestruktivne tehnike, saj potrebuje za analizo minimalno količino vzorca (od 0.1 µg do 1 mg),
- omogoča analizo izredno trdih materialov, ki jih je težko raztopiti, npr. keramika in superprevodniki,
- omogoča hkratno večelementno analizo,
- omogoča neposredno analizo v aerosolih (trdnih ali tekočih delcev v plinastem mediju),
- omogoča enostavno in hitro analizo.

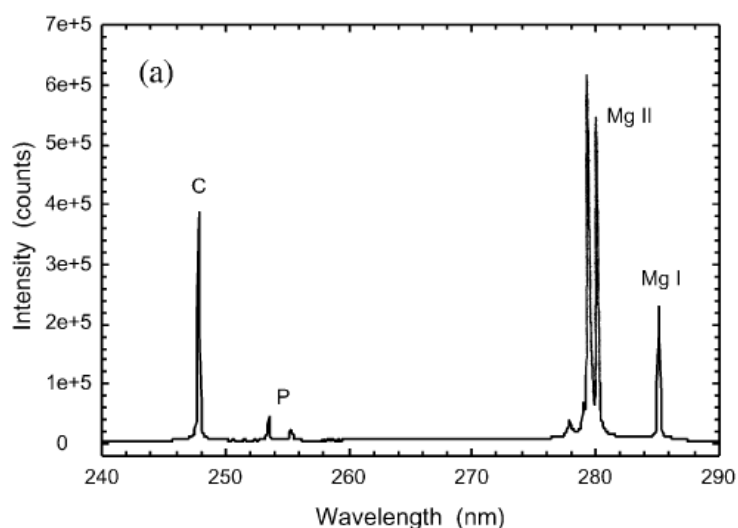
Slabosti LIBS tehnike:

- večja cena in kompleksnost sistema,
- težave pri pridobivanju ustreznih standardov,
- velike interference (vpliv matriksa, v primeru analize v aerosolih pa je možna interferenca velikost delcev),
- meje zaznave običajno niso tako dobre, kot jih zagotavljajo tekočinske tehnike,
- slabša natančnost (5-10 %, odvisno od homogenosti vzorca, vzorčnega matriksa in eksitacijskih lastnosti laserja),
- možnost očesnih poškodb, zaradi visokih energij laserskih pulzov.

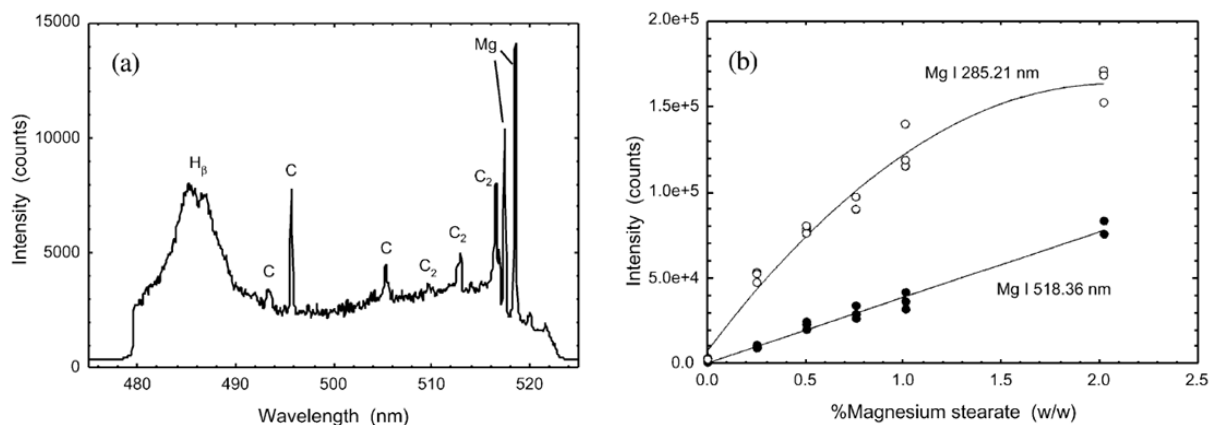
5.5.1.3 Analiza maziva (magnezijev stearat) z uporabo LIBS tehnike

Magnezij (Mg) je mogoče uporabiti kot ciljni element, saj ta običajno ni prisoten v matrici ali oblogi tablete. Magnezijev stearat je navadno prisoten v koncentraciji 0,5-1 %, tako da je elementarna koncentracija Mg dokaj majhna (približno 0,02 % v tem primeru). V spektru na sliki 15 sta vidna dva vrhova za Mg, in sicer pri 285,21 nm in 518,36 nm, na sliki 16 pa je prikazan spekter magnezijevega stearata z koncentracijo pod 2 %. Ker je vrh pri 285,21

nm resonančna linija, je pripadajoči odziv nasičen zaradi samo-adsorpcije. Za ne-resonančno linijo pri 518,36 nm, ni opaziti takšne nasičenosti. Torej se ta linija lahko uporabi za določitev vsebnosti magnezijevega stearata v tem delovnem območju [18].



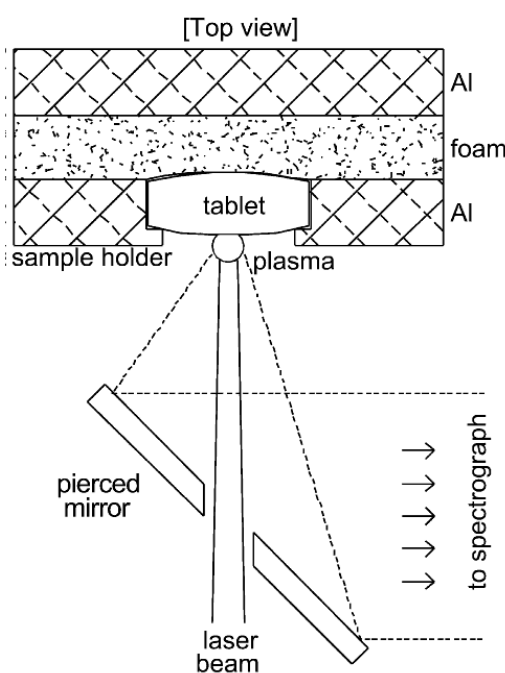
Slika 15: Spekter na katerem sta vidna tipična vrhova za magnezij (Mg) pri 285,21 nm in 518,36 nm.



Slika 16: Spektra, ki prikazujeta Mg vrh pri 518,36 nm (a) in krivulji intenzivnosti vrhov za Mg v odvisnosti od koncentracije magnezijevega stearata (b).

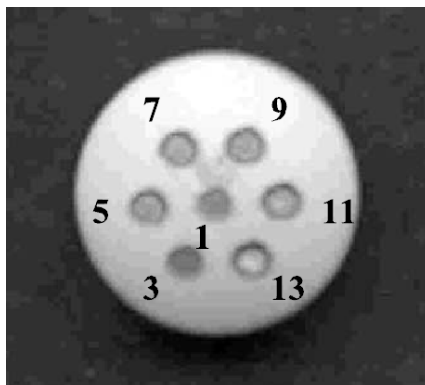
5.5.1.4 Hitra analiza enotnosti in debeline obloge tablet z uporabo LIBS tehnike

V tem primeru [19] so LIBS prvič uporabili kot hitro tehniko za sočasno določanje enotnosti in debeline oblog stisnjenih tablet. Jedro tablet vsebuje visoko koncentracijo kalcija (Ca), obloga pa titan (Ti), silicij (Si) in magnezij (Mg). Vsi izmed naštetih elementov so odlični za določanje z LIBS-om. Emisijske spektre vseh štirih elementov so hkrati spremljali v odvisnosti od števila laserskih pulzov na isti lokaciji, ob »vrtanju« skozi oblogo in v jedro tablete. Ugotovili so, da je ta tehnika vsekakor primerna za hitro sočasno določanje enotnosti in debeline oblog tablet, saj so za analizo 10-ih tablet potrebovali 15 minut.



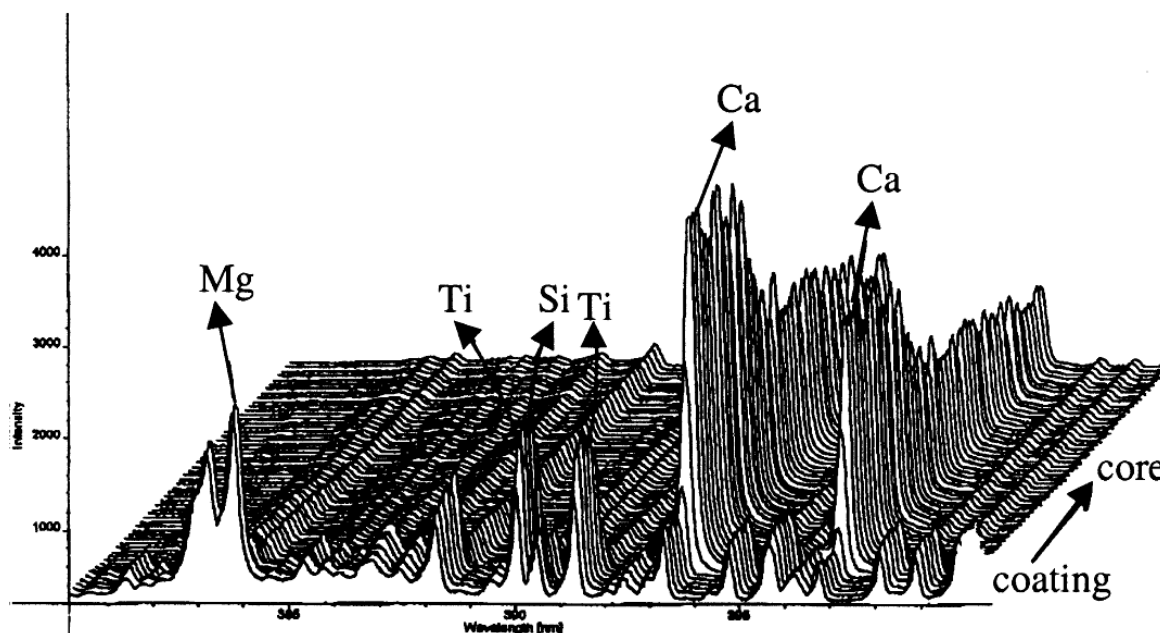
Slika 17: Tlorisni prikaz postavitve tablete v držalo za vzorec in pot laserskega žarka.

Slika 18 prikazuje podobo tablete, v katero je bilo na več mest izstreljeno različno število laserskih pulzov. Na sliki je vidno, da je izgled kraterjev odvisen od števila laserskih pulzov.



Slika 18: Slika tablete prikazuje tipičen heksagonalni vzorec, ki nastane ob vzorčenju. Številke označujejo število laserskih pulzov.

Z večjim številom laserskih pulzov se lahko doseže učinek »vrtanja« skozi oblogo tablete. Ko laser prebija oz. odstranjuje oblogo, ta zoogleni in postane črne barve, ko pa laser odstranjuje (vzorči) jedro tablete, pa je ta pretežno bele barve. Na sliki 19 je emisijski spekter, ki je nastal ob prodiranju laserja skozi oblogo do jedra tablete. Ko laser vzorči oblogo tablete so najbolj intenzivni signali Mg, Si in Ti. Ko pa laser prodre v jedro tablete pa ti signali postanejo manj intenzivni, poveča pa se intenzivnost signala Ca.



Slika 19: LIBS emisijski spekter v odvisnosti od števila laserskih pulzov.

Spremembe v emisijskem spektru med Ti, Si, Mg in Ca, označujejo prehod preko obloge v jedro tablete. Na ta način se lahko poleg določitve koncentracije zdravilne komponente, določi tudi debelina obloge.

5.5.2 Masna spektroskopija z vzorčevanjem z lasersko ablacijo (LA-ICP-MS)

Z masno spektroskopijo z vzorčevanjem z lasersko ablacijo (LA-ICP-MS) lahko izvajamo direktno trdno vzorčenje raznovrstnih anorganskih ali organskih materialov s pomočjo laserskega mikro-žarka (s premerom v območju od 4 do 250 nm) s takojšnjo elementno detekcijo z ICP-MS. Zmožnosti sistema LA-ICP-MS nam omogočajo izvajanje praktično nedestruktivnih mikroanaliz z visoko prostorsko ločljivostjo (za površinsko in globinsko profiliranje) v nizkem koncentracijskem območju večine elementov periodnega sistema.

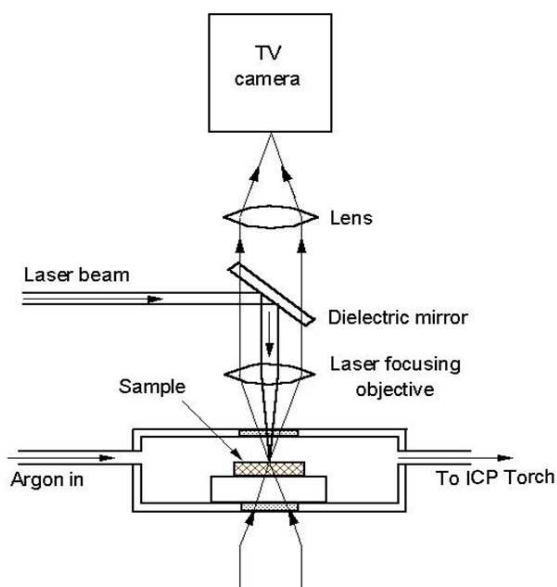
V farmaciji se lahko ta tehnika uporablja za elementarno analizo farmacevtskih izdelkov, prav tako pa lahko z izotopsko analizo preverjajo kvaliteto embalaže za farmacevtske izdelke. Izotopsko analizo z masno spektroskopijo z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS) so namreč uporabili tudi pri forenzičnih študijah, v katerih so npr. vzorce traku, stekla, plastike, itd, analizirali in na ta način povezali s kriminalnimi dejavnostmi. V takšnih primerih, se lahko izotopske razlike med vzorci uporabljajo za razlago izvora ali za vzpostavitev povezave med obdolžencem in zločinom. V zadnjem času, pa so LA-ICP-MS uporabili tudi za zagotavljanje visoke natančnosti meritev razmerja žveplovega izotopa v prepoznavanju ponarejenih farmacevtskih zdravil [20].

5.5.2.1 Tehnične podrobnosti LA-ICP-MS tehnike

Pri LA-ICP-MS tehniki, vstavimo vzorec v držalo ali lasersko ablacijsko celico, kjer je nameščena tudi kamera (slika 20). S pomočjo kamere, lahko analitik poveča interesna področja na zaslonu računalnika, in na vzorcu natančno določi ciljno mesto za ablacijo z laserjem. Z uporabo računalniške programske opreme integrirane v sistem laserske ablacije,

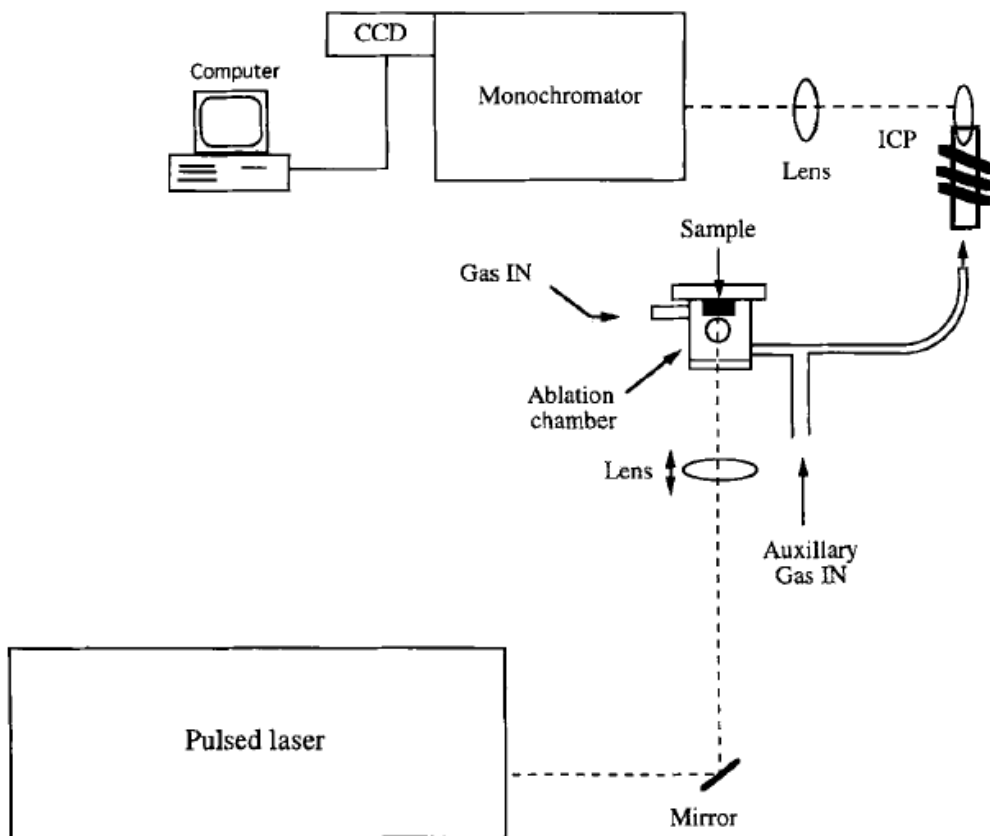
lahko analitik določi niz točk, ki naj bodo cilj laserju med ablacijo. Za optimalno analizo mora analitik glede na lastnosti vzorca določiti tudi lasersko energijo in število pulzov laserja. Velikost ablatiranega območja se razlikuje glede na matrico vzorca, vendar je premer kraterja navadno manjši od 500 μm in globina pod 20 μm [21].

1. Vzorec v ablacijski komori (5 x 5 cm),
2. UV laser zadane površino vzorca,
3. pretvorba energije v toploto,
4. taljenje, vrenje, izmet delcev,
5. nosilni plin odnese nastale pare in aerosol v ICP-MS.



Slika 20: Shematični prikaz vzorčevanja z lasersko ablacijo.

Med analizo, usmerimo laser z visoko energijo na vzorec in ablatirani delci vzorca se sprostijo kot fini gosti aerosol z delci premera 1mm. Te delce nato odnese argon ali mešanica argona in nosilnega plina (npr. helij ali dušik) v torch ICP-MS. Shematični prikaz delovanja sistema LA-ICP-MS je opisan na sliki 21.



Slika 21: Shematični prikaz delovanja sistema LA-ICP-MS.

5.5.2.2 Prednosti in slabosti LA-ICP-MS:

Prednosti LA-ICP-MS:

- večelementnost,
- hitrost analize,
- široko linearno delovno območje,
- možnost sklopitve s separacijskimi tehnikami (npr. z ionsko kromatografijo pri določevanju zvrsti elementov),
- možnost analize sledov, mikro, makro komponent iz iste raztopine (ICP-AES),
- velika občutljivost oz. nizke meje zaznavnosti (10-1 ppb pri ICP-AES in 1-0,01 ppb pri ICP-MS za večino elementov),

- možnost uvajanja organskih in anorganskih topil v plazmo.

Slabosti LA-ICP-MS:

- težave pri pridobivanju ustreznih standardov,
- meje zaznave običajno niso tako dobre, kot jih zagotavljajo tekočinske tehnike.

5.5.2.3 Analiza farmacevtskih tablet z uporabo LA-ICP-MS tehnike

Pogosto so v tabletah kovinski elementi (npr. K, Mg, Fe), vendar so prisotni samo v zdravilni učinkovini in ne v matrici ali oblogi tablete, kar omogoča selektivno detekcijo z atomsko spektroskopijo.

Ekipa Salina in sodelavcev [17] je analizirala neobložene tablete, ki vsebujejo magnezij aluminijev silikat v mikrokristalni celulozni (MCC) matrici. Za določitev ponovljivosti sistema laserske ablacije so uporabili povezavo z ICP-AES in ablatirali polirani kos kovine čistega bakra. Laserska ablacija čistih kovin je na splošno ponovljiva in se lahko uporablja kot kazalnik natančnosti laserske moči. Izstreljenih je bilo petdeset laserskih pulzov s hitrostjo 10 Hz, pri čemer so nastali kraterji s premerom približno 100 μm . Za devet naključno izbranih mest so pri primerjavi vrhov Cu ($\lambda=327,4\text{ nm}$) dobili relativni standardni odklon (RSD) 3%.

Rezultati z detektorjem ICP-MS so prikazani v preglednici 1. Detektor je zaznaval le signale za Al ($m/z=27$) in Mg ($m/z=24$). Enako analizo so izvedli tudi z AES detektorskim sistemom, vendar so primeru MS detektorja potrebovali manj laserskih pulzov (namesto 50, le 2) in z manjšo energijo (0,5 mJ). Vendar pa se vizualno krater kljub manjšemu številu pulzov in manjši energiji ni bistveno razlikoval od kraterjev, ki so nastali pri analizi z AES detektorskim sistemom. Imel je le manjši zunanji rob in bil je nekoliko bolj krožne oblike.

Relativni standardni odklon (RSD) za Al in Mg je bil 47 % in 61 %, medtem ko je se je RSD pri primerjavi razmerja signalov Mg:Al izboljšal na 29 %. Za bolj natančno LA-ICP-MS analizo tablet bi potrebovali nižje koncentracije ali spremljanje manj zastopanih izotopov.

Preglednica 1: Rezultati analize tablet z LA-ICP-MS metodo.

Laser pulses (at 1 Hz)	Laser power	Sites sampled on tablet	Laser focus	RSD ²⁷ Al	RSD ²⁴ Mg	RSD ratio (Mg : Al)
2	0.5 mJ	6	2 mm below surface	47%	61%	29%

5.5.2.4 Analiza embalaže z uporabo LA-ICP-MS tehnike

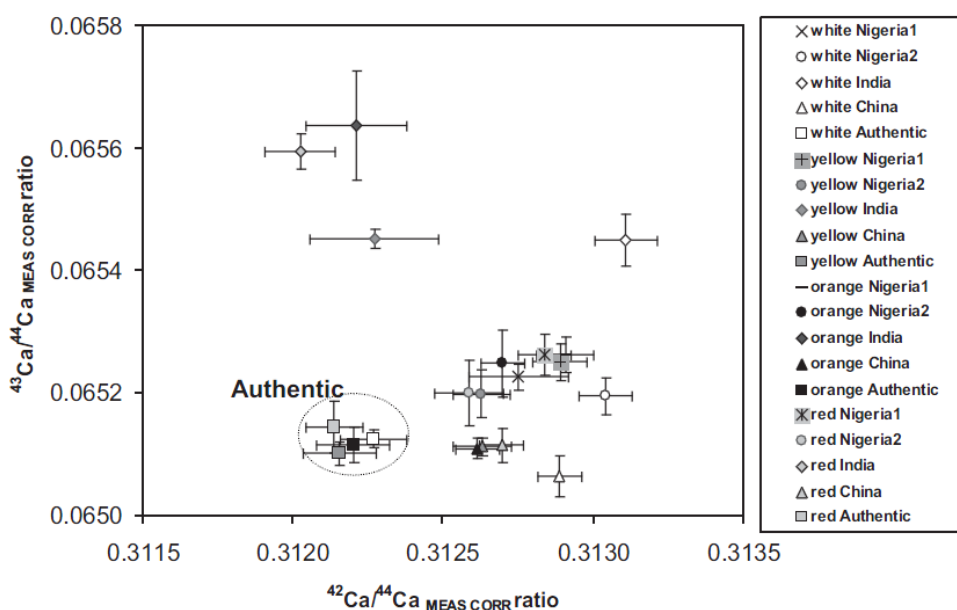
Premazan karton papirja se pogosto uporablja kot embalaža za vse vrste proizvodov, vključno s farmacevtskimi izdelki. Spojine, ki se uporabljajo za kakovost premaza embalaže omogočajo na površini embalaže sijaj, gladkost in vpojnost črnila. Na primer kaolinit in kalcijev karbonat se pogosto uporabljata za premaz embalaže v komercialnem tiskanju, kar pojasnjuje prisotnost relativno visokih koncentracij kalcija v embalaži. Pričakuje se, da je poleg kalcija (Ca) v embalaži prisoten tudi svinec (Pb). Možnost določitve natančnega razmerja kalcijevih in svinčevih izotopov z lasersko ablacijo (LA-ICP-MS) omogoča razlikovanje med pristno in ponarejeno farmacevtsko embalažo [20].



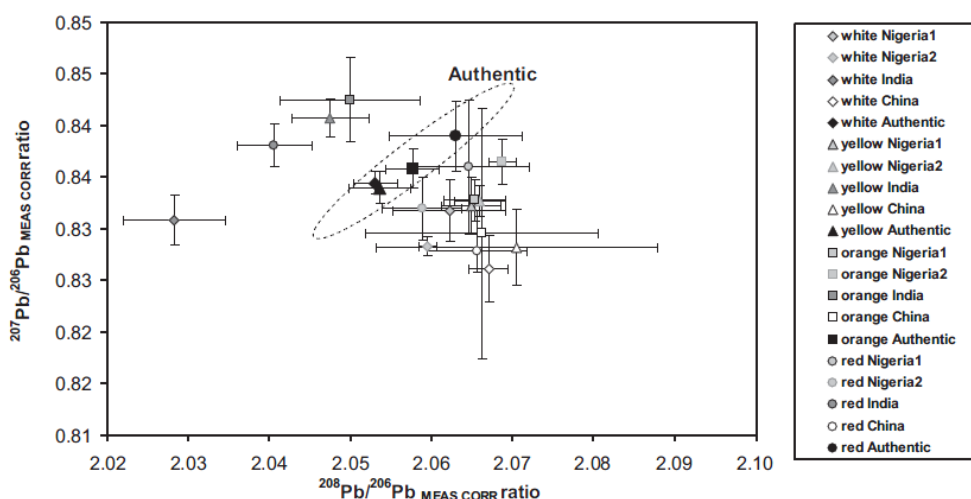
Slika 22: Primerjava pristne Zentel™ kartonske embalaže z ponarejeno embalažo kitajskega in nigerijskega izvora.

Dokazana je bila možnost preciznega merjenja razmerja Ca in Pb izotopov, kar omogoča odkrivanje ponarejene embalaže in nadaljnje razvrščanje le-te. Problem pri tej metodi predstavlja pomanjkanje trdnih referenčnih standardov za merjenje izotopskega razmerja. Ker trenutno ni komercialno dostopnega nobenega standarda za merjenje Ca in Pb izotopskega razmerja, so v tem primeru uporabili NIST SRM610 (3 mm steklen vafelj, certificiran za vsebnost Pb, $426 \pm 1 \text{ mg kg}^{-1}$), NIST SRM915a in NIST SRM915b. Kljub temu, da

ti materiali niso certificirani za Pb in Ca izotopsko sestavo, lahko najdemo v literaturi zanesljive vrednosti izotopske sestave za Pb v NIST SRM610 in za Ca v NIST SRM915a. Standard za Ca izotopsko sestavo so pripravili s stiskanjem kroglic iz kalcijevega karbonata NIST SRM915a in NIST SRM915b. V obeh primerih so ocenili inter- in intra-variabilnost avtentičnih vzorcev in tako našli občutne razlike med pristnimi in ponarejenimi vzorci (slika 23 in 24). S primerjanjem Ca in Pb izotopskih podatkov so dobili odlično korelacijo med vzorci nigerijskega in kitajskega izvora. Za indijski (pristni) vzorec se je izkazalo, da prihaja iz popolnoma drugačnega vira.



Slika 23: Vrednosti $^{43}\text{Ca}/^{44}\text{Ca}$ izotopskega razmerja napram vrednostim $^{42}\text{Ca}/^{44}\text{Ca}$ izotopskega razmerja za vse vzorce embalaže v beli, oranžni in rdeči tiskarski barvi.



Slika 24: Vrednosti $^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ izotopskega razmerja napram vrednostim $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ izotopskega razmerja za vse vzorce embalaže v beli, oranžni in rdeči tiskarski barvi.

Ugotovljene so bile pomembne razlike med pristinimi in ponarejenimi vzorci. Torej metoda omogoča odkrivanje ponaredkov in se lahko uporablja kot pripomoček pri razvrščanju embalaže. Čeprav je ta primer potrjuje potencial LA-ICP-MS kot pomoč pri pakiranju za odkrivanje ponaredkov, prav tako poudarja potrebo po izotopskih referenčnih standardih.

6 Primeri uporabe AAS v farmacevtski industriji

V preglednici 2 je zajetih nekaj primerov priprave vzorcev in uporabe različnih AAS tehnik v farmacevtski industriji.

Preglednica2: Priprava vzorcev in postopki za analizo farmacevtskih izdelkov z uporabo AAS tehnik [2].

Farm. izdelek ali aplikacija	analit	tehnika	Priprava vzorca	Ref.
Potrjevanje čistosti	Li	ICP-AES	Razklop v dušikovi kislini	[22]

Uporaba atomske spektroskopije v farmacevtski industriji

ICP-MS preiskava na težke kovine	14 elementov: As, Sb, Sn, Cd, Pt, Pd, Pb, Hg, Ru, Mo, Se, Bi, In, Ag	ICP-MS	Raztopitev v 25 % vodni raztopini 2-butoksistanola	[23]
ICP-MS preiskava na težke kovine	69 elementov: 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, 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, U	ICP-MS	Raztopitev v 1 % ali 80 % vodni raztopini dušikove kisline	[24]
Natrijev fosinopril	Pd	ICP-MS	raztopitev v 25 % vodni raztopini 2-butoksistanola	[25]
Tablete, ki vsebujejo P, F, Cl	P, F, Cl	LA-ICP-MS	-	[26]
Potrjevanje čistosti (voda za splakovanje)	Pt	ETAAS	Ekstrakcija vzorca z klorometilenom in acetonitrilom	[27]
Obloga tablet	Fe, Ti	LIBS	-	[28]
Tablete in magnezijev stearat	Mg	LIBS	-	[29]
Mazilo in magnezijev stearat	Mg	LIBS	-	[19]

Neusilin tablete	Al, Mg	LA-ICP-MS in LA-ICP-AES	-	[17]
Atropin, difenhidramin, tolazolin, levamisol	Posredno določanje z Hg	FAAS	Dodatek Hgl ₄	[30]
Obloga tablet	Mg, Ti, Si, Ca	LIBS	-	[19]
Analiza embalaže	Ca, Pb	LA-ICP-MS	-	[20]

7 Zaključek

Potreba po analizi elementov v farmacevtskih izdelkih postaja vse bolj pomembna, tako zaradi kakovosti proizvodov, kot s perspektive varnosti pacientov. Veliko analitičnih izzivov je povezanih z matrico vzorca, pri čemer je pravilna izbira priprave vzorca ključ do uspeha analize. Na voljo je veliko različnih instrumentalnih tehnik, od že dolgo poznanih AA tehnik do novejših tehnologij, kot je ICP-MS, ki omogočajo spremljanje vseh elementov tudi do koncentracij pod ppb. V prihodnosti se bodo sprejemljive mejne vrednosti za elemente v farmacevtskih izdelkih še zmanjšale, zato bodo v farmacevtski analitiki začele igrati vse večjo vlogo novejša tehnika, kot so ICP-MS,... Poleg tega pa bodo tehnike vzorčenja trdnih vzorcev prav tako igrale v prihodnosti elementne analize vedno večjo vlogo. Vsestranskost različnih tehnik, analitiku omogoča, da se spopade z izzivi, ki jih predstavljata matrika vzorca in nizke meje zaznavanja, ter tako zagotovi večjo varnost in kakovost proizvodov.

Tako LIBS kot LA-ICP-MS sta relativno novi diagnostični orodji in vztrajno pridobivata velik pomen v raziskovalni skupnosti. Vendar pa je potrebno preden postaneta LIBS in LA-ICP-MS del vsakdana v analizni kemiji odpraviti nekaj pomanjkljivosti, kot je npr. ponovljivost rezultatov. Seveda pa je eden večjih problemov tudi pomanjkanje trdnih standardov, ki bi omogočali uporabo teh tehnik v analizni kemiji in industriji.

8 Literatura

- [1] R. Rao, M.V.N. Kumar Talluri, An overview of recent applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in determination of inorganic impurities in drugs and pharmaceuticals, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45 (2007) 1–13.
- [2] N. Lewen, *The use of atomic spectroscopy in the pharmaceutical industry for the determination of trace elements in pharmaceuticals*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55 (2011) 653–661.
- [3] M.M. Guzman, A.j. Garcian-Fernandez, M. Gomenz-Zapata, A. Luna, D. Romero, J.A. Sanchez-Garcia, Effects of dietary chronic cadmium and lead exposure: structural and ultrastructural changes, *Toxicol. Lett.* 88 (1996) 60.
- [4] International Agency for Research on Cancer (IARC), and World Health Organization (WHO), IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry, Vol. 58, 1994, p. 444.
- [5] European Medicines Agency, Guideline on the specification limits for residues of metal catalysts or metal reagents, Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/4446/2000, London, 21 February 2008.
- [6] W.H. Jones, Platinum, Palladium in the pharmaceutical industry, *Platinum Metals Rev.* 2 (1958) 86–89.

- [7] D.A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, Principles of instrumental analysis, 5th ed., Hartcourt Brace & Company, Philadelphia 1998.
- [8] D.C. Harris, Quantitative chemical analysis, 5th ed, New York, W.H. Freeman and Company, 1999.
- [9] S.J. Hill, Atomic absorption spectroscopy – flame, V: P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole, Encyclopedia of analytical science, 2nd ed., Vol. 1, Oxford, Elsevier Ltd, 2005.
- [10] Marjan Veber, Atomska emisijska spektrometrija, http://www.farmadrustvo.si/gradivo_p/Analizna%20kemija/PREDAVANJA/Emisija.ppt.
- [11] D. Brodnjak Vončina, Analizna kemija II; Zbrano gradivo, Maribor, 2007.
- [12] <http://www.miplaza.com/materialsanalysis/projects/technicalnoteschemicalanalysis/icpaesan.pdf>
- [13] Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications, Second Edition, Edited by Steve J. Hill, 2006.
- [14] <http://www.scribd.com/doc/10514028/ATOMIC-Spectroscopy-a-Guide-to-Selecting-the-Appropriate-Technique-and-System>
- [15] http://las.perkinelmer.com/content/Manuals/GDE_InorganicAnalysis.pdf

[16] http://www.chem.agilent.com/Library/primers/Public/ICP-MS_Primer-Web.pdf

[17] R. Lam, E.D. Salin, *Analysis of pharmaceutical tablets by laser ablation inductively coupled plasma atomic emission spectrometry and mass spectrometry (LA-ICP-AES and LA-ICP-MS)*, J. Anal. At. Spectrom., 19 (2004) 938–940.

[18] L. St-Ongea, E. Kwongb, M. Sabsabia, E.B. Vadasb, *Quantitative analysis of pharmaceutical products by laser-induced breakdown spectroscopy*, Spectrochimica Acta Part B 57 (2002) 1131–1140.

[19] M.D. Mowery, R. Sing, J. Kirsch, A. Razaghi, S. Béchar, R.A. Reed, *Rapid at-line analysis of coating thickness and uniformity on tablets using laser induced breakdown spectroscopy*, J. Pharm. Biomed. Anal. 28 (2002) 935–943.

[20] R. Santamaria-Fernandez, J.-C. Wolff, *Application of laser ablation multicollector inductively coupled plasma mass spectrometry for the measurement of calcium and lead isotope ratios in packaging for discriminatory purposes*, Rapid Commun. Mass Spectrom 24 (2010) 1993–1999.

[21] J.C. Miller, R.F. Haglund, *Laser ablation and desorption*, Academic Press, 1998.

[22] N. Lewen, D. Nugent, *The use of inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy (ICP-AES) in the determination of lithium in cleaning validation swabs*, J. Pharm. Biomed. Anal. 52 (2010) 652–655.

[23] N. Lewen, S. Mathew, M. Schenkenberger, T. Raglione, A rapid ICP-MS screen for heavy elements in pharmaceutical compounds, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 739–752.

[24] T. Wang, J. Wu, R. Hartman, X. Jia, R. Eagan, A multi-element ICP-MS survey method as an alternative to the heavy elements limit test for pharmaceutical materials, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000) 867–890.

[25] N. Lewen, M. Schenkenberger, T. Larkin, S. Conder, H. Brittain, The determination of palladium in fosinopril sodium (monopril) by ICP-MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 879–883.

[26] L. St-Onge, E. Kwong, M. Sabsabi, E.B. Vadas, Quantitative analysis of pharmaceutical products by laser-induced breakdown spectroscopy, *Spectrochim. Acta B* 57 (2002) 1131–1140.

[27] R. Raghavan, J.A. Mulligan, Low-level (ppb) determination of cisplatin in cleaning validations (rinse water) samples. I. An atomic absorption spectrophotometric method, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 26 (2000) 423–428.

[28] M.C. Madamba, W.M. Mullett, S. Debnath, E. Kwong, Characterization of tablet film coatings using a laser-induced breakdown spectroscopic technique, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 8 (2007), Article No. 103.

[29] L. St-Onge, J.-F. Archambault, E. Kwong, M. Sabsabi, E.B. Vadas, Rapid quantitative analysis of magnesium stearate in tablets using laser-induced breakdown spectroscopy, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 8 (2005) 272–288.

[30] M.A. El Ries, S. Khalil, Indirect atomic absorption determination of atropine, diphenhydramine, tolazoline, levamisole based on formation of ion-associates with potassium tetraiodomercurate, J. Pharm. Biomed. Anal. 25 (2001) 3–7.