Razvoj i validacija metode za određivanje elementarnih onečišćenja u eritromicinu

Brzović, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:517152

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Ana Brzović

Razvoj i validacija metode za određivanje elementarnih onečišćenja u eritromicinu

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitika lijekova 2 (Zavod za analitiku i kontrolu lijekova) Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, a izrađen u PLIVA – TAPI Istraživanje i razvoj (organizacijska jedinica Analitika) pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Biljane Nigović, prof. dr. sc. Ernesta Meštrovića i Matije Vukovinskog, mag. chem.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Biljani Nigović, prof. dr. sc Ernestu Meštroviću i Matiji Vukovinskom, mag. chem. na stručnom vodstvu, prenesenom znanju i velikoj pomoći u izradi ovog diplomskog rada. Veliko hvala na strpljenju i podršci mojoj obitelji i Ivanu.

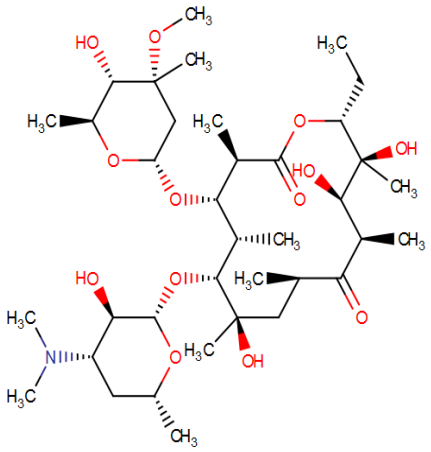
Sadržaj

1. UVOD 1
1.1 ERITROMICIN 1
1.2 ONEČIŠĆENJA U FARMACEUTSKIM PROIZVODIMA 3
1.3 REGULATORNI ZAHTJEVI ZA ELEMENTARNA ONEČIŠĆENJA 4
1.4 INDUKTIVNO SPREGNUTA PLAZMA S MASENOM SPEKTROMETRIJOM 7
1.4.1 NAČELA RADA ICP-MS 8
1.4.2 PREDNOSTI I NEDOSTATCI ICP-MS 10
1.5 VALIDACIJA ANALITIČKOG POSTUPKA 10
2. OBRAZLOŽENJE TEME 12
3. MATERIJALI I METODE 13
3.1. MATERIJALI 13
3.2 RAZVOJ METODE 19
3.2.1 ISPITIVANJE TOPLJIVOSTI 19
3.2.2 PRELIMINARNA ISPITIVANJA 19
3.2.3 VALIDACIJA METODE 19
4. REZULTATI I RASPRAVA 25
4.1 ISPITIVANJE TOPLJIVOSTI 25
4.2 VALIDACIJA ANALITIČKE METODE 29
4.2.1 KADMIJ 29
4.2.2 OLOVO 31
4.2.3 ARSEN 34
4.2.4 ŽIVA 36
4.2.5 KOBALT 39
4.2.6 VANADIJ 41
4.2.7 NIKAL 44
4.2.8 TALIJ 46
4.2.9 SREBRO 49

4.2.10 SELENIJ 51
4.2.11 ZLATO 54
4.2.12 RUTENIJ 56
4.2.13 RODIJ 59
4.2.14 PALADIJ 61
4.2.15 IRIDIJ 64
4.2.16 PLATINA 66
4.2.17 OSMIJ 69
4.2.18 ANTIMON 71
4.2.19 LITIJ 74
4.2.20 BARIJ 76
4.2.21 BAKAR 79
4.2.22 MOLIBDEN 81
4.2.23 KOSITAR 84
4.2.24 KROM 86
4.3 ANALIZA ELEMENTARNIH ONEČIŠĆENJA U UZORKU ERITROMICINA 89
6. LITERATURA 91
7. SAŽETAK/SUMMARY 92
7.1 SAŽETAK 92
7.2 SUMMARY 92

1. UVOD

1.1 ERITROMICIN



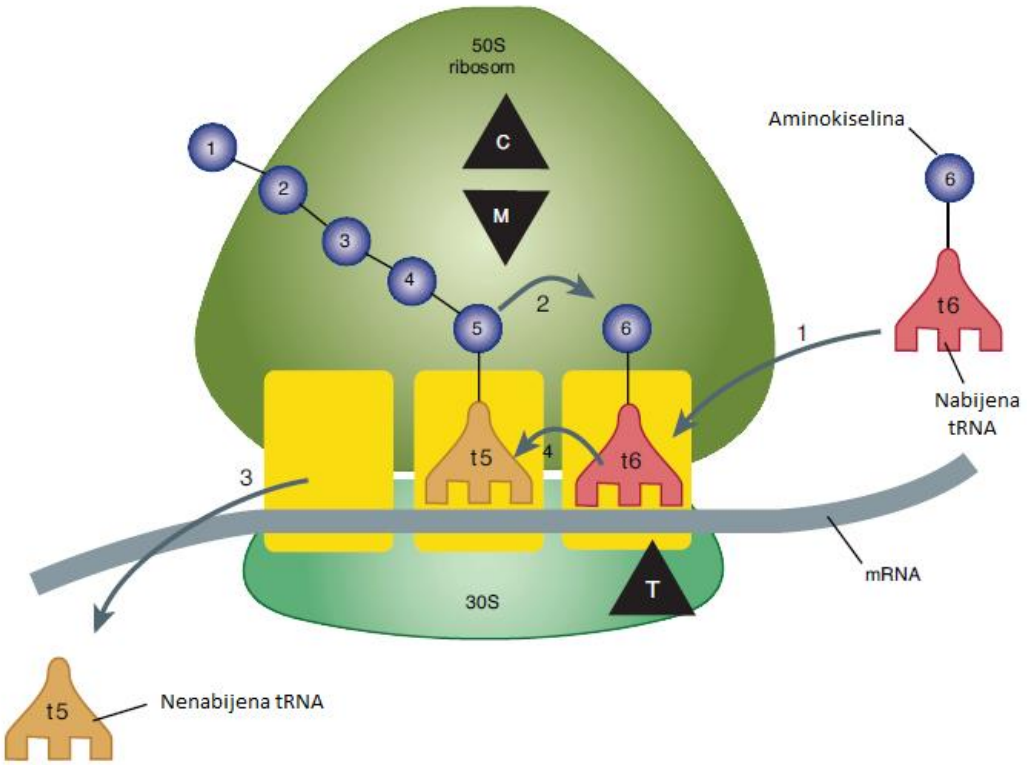
Slika 1: Struktura molekule eritromicina

Makrolidi su klasa strukturno sličnih spojeva koje karakterizira makrociklični prsten (najčešće od 14 ili 16 atoma) na kojima se nalaze deoksi šećeri. Eritromicin, kao predstavnik grupe makrolida izoliran je 1952. godine iz Streptomyces erythreus. Klaritromicin i azitromicin su semisintetski derivati eritromicina.

Struktura eritromicina se sastoji od makrolidnog prstena na koji su vezani šećeri dezosamin i kladinoza. (Slika 1.) Slabo je topljiv u vodi, a dobro se otapa u organskim otapalima. (Katzung, 2012)

Eritromicin je djelotvoran protiv gram pozitivnih organizama, posebice pneumococci, streptococci, staphylococci i corynebacteria. Gram negativni organizmi: Neisseria, Bordetella pertussis, Bartonella henselae, Treponema pallidum i Campylobacter vrste su osjetljive. Indiciran je kod infekcija gram pozitivnim bakterijama koje su rezistentne na penicilin i tetracikline i kod pacijenata koji su alergični na penicilin. Za Mikoplazme i Legionellu pneumoniu eritromicin je lijek prvog izbora. (Mutschler, Derendorf, 1995)

Antibakterijska aktivnost eritromicina može biti bakteriostatska ili baktericidna pri višim koncentracijama za osjetljive organizme. Aktivnost je povećana pri alkalnom pH. Inhibicija sinteze proteina se postiže reverzibilnim vezanjem na bakterijsku 50S podjedinicu ribosoma što blokira translokaciju aminoacila. (Slika 2.) Rezistencija na eritromicin nastaje zbog promjena na mjestu vezanja eritromicina na bakterijski ribosom koje su posredovane plazmidima.



Slika 2: Koraci u sintezi proteina i mete nekoliko antibiotika. Aminokiseline su prikazane kao numerirani krugovi. Nabijena tRNA koja nosi aminokiselinu 6 veže se na akceptorsko mjesto ribosoma 70S (korak 1). Peptidil tRNA na donorskom mjestu s aminokiselinama od 1 do 5 veže rastući aminokiselinski lanac na aminokiselinu 6 (transpeptidacija, korak 2). Nenabijena tRNA na donorskom mjestu se oslobađa (korak 3) i novi 6 aminokiselinski lanac sa svojom tRNA se prebacuje na peptidilno mjesto (translokacija, korak 4). Makrolidi se vežu na 50S podjedinicu i blokiraju transpeptidaciju (korak 2). (Prilagođeno iz Katzung, Masters i Trevor, 2012)

Najčešće nuspojave vezane uz eritromicin su gastrointestinalne (anoreksija, dijareja, mučnina, povraćanje) i upravo su one jedan od najčešćih razloga odustajanja od terapije eritromicinom i zamjene s drugim antibiotikom. Postoji i mogućnost nastanka kožnog osipa.

Eritromicin može inhibirati citokrom P450 i zato ulazi u interakciju s drugim lijekovima. Zbog inhibicije citokroma može uzrokovati povećanje koncentracije nekih lijekova kao što su: varfarin, statini, kafein, teofilin, karbamazepin, ciklosporin, digoksin, triazolam, midazolam, alfentanil, kinidin, takrolimus, valproat, fenitoin i dr. Ne smije se koristiti s terfenadinom, astemisolom ili cisapridom jer kombinacija može uzrokovati opasne nepravilnosti otkucaja srca i iznenadnu smrt.

1.2 ONEČIŠĆENJA U FARMACEUTSKIM PROIZVODIMA

Onečišćenja su u aktivnim farmaceutskim supstancijama definirana kao tvari koje nemaju ljekoviti učinak, a imaju potencijal izazvati neželjene učinke. Stoga, količina onečišćenja u lijeku, ljekovitoj tvari i pomoćnim tvarima mora biti kontrolirana kako bi osigurali sigurnost. Prema ICH smjernici Q3A "Onečišćenja u novoj ljekovitoj tvari" onečišćenje se definira kao bilo koji sastojak nove ljekovite tvari koji nije kemijski definiran kao nova ljekovita tvar. (ICH Harmonised tripartite Guideline, Q3A, 2006) Prema ICH smjernici Q3B "Onečišćenja u novom gotovom lijeku" onečišćenja su definirana kao bilo koji sastojak novog gotovog lijeka koji nije ljekovita tvar ili ekscipijens u gotovom lijeku. (ICH Harmonised Tripartite Guideline, Q3B, 2006)

U farmaceutskom proizvodu onečišćenje izaziva probleme u kvaliteti s obzirom da može utjecati na djelotvornost lijeka ili na sigurnost primjene. Stoga, svako onečišćenje mora biti u potpunosti poznato, kvalitativno i kvantitativno, te ako je potrebno provedeno kroz toksikološku procjenu. (Qiu, Norwood, 2007) Ponekad onečišćenja mogu imati teratogene, mutagene ili karcinogene efekte. (Rama Rao i sur., 2010) S kemijske perspektive, farmaceutska onečišćenja su neizbježna jer nijedna kemijska reakcija nije 100% selektivna i nijedan kemijski spoj nije potpuno stabilan. (Qiu, Norwood, 2007)

Kod većine lijekova nepoželjne su primjese malih molekula poput *vode* (može hidrolizirati neke lijekove ili utjecati na djelotvornost), *malih elektrofila* (na primjer, aldehidi i derivati karboksilnih kiselina), peroksida (mogu oksidirati neke lijekove) i metala (mogu katalizirati oksidaciju i druge razgradne puteve lijekova). (Pilaniya i sur., 2010)

Onečišćenja mogu potjecati iz različitih izvora. Potencijalni izvor onečišćenja su svi polazni materijali (reagensi, katalizatori, ligandi, otapala) koji se koriste u sintezi aktivne ljekovite tvari ali i pomoćne tvari koje se koriste u oblikovanju formulacije. Između ostaloga, onečišćenja mogu potjeći i tijekom procesa sinteze aktivne ljekovite tvari zbog pojave različitih intermedijera ili nusprodukta u sintezi. Izvor onečišćenja može biti i korištena proizvodna oprema ili pakiranje a mogu nastati i nakon završetka proizvodnje kao razgradni produkti samog lijeka u uvjetima čuvanja. (Qiu, Norwood, 2007; Pilaniya i sur., 2010)

1.3 REGULATORNI ZAHTJEVI ZA ELEMENTARNA ONEČIŠĆENJA

Proizvođači lijekova su u potrazi za nabavljačima ljekovitih tvari koji im mogu omogućiti što jeftiniju djelatnu tvar (API) koja je uz to u skladu s trenutnim regulatornim zahtjevima, ali i onim zahtjevima koji će u skoro vrijeme biti implementirani. Kontrola elementarnih onečišćenja je postala jedna od najbrže rastućih područja unutar istraživanja, razvoja i kontrole kvalitete ljekovite tvari, pomoćnih tvari i lijekova. Postoje četiri izvora elementarnih onečišćenja u gotovom ljekovitom obliku: ljekovita tvar, pomoćna sredstva, proizvodnja i spremnici. Metali u farmaceutskim proizvodima su štetni iz nekoliko razloga: same toksičnosti metala, stvaranja netopljivih metalnih kompleksa i oksidacijske i hidrolitičke katalize. (Waterman i sur., 2003) Proizvođači lijekova se trude što više smanjiti kontaminaciju lijeka s metalima iz svog proizvodnog procesa i pakiranja te isto tako dobiti ljekovitu tvar i pomoćne tvari s što manjim količinama elementarnih onečišćenja. S obzirom da nije vjerojatno da se može povećati količina elementarnih onečišćenja koja dolaze od proizvodnog procesa ili pakiranja ako se oni ne mijenjaju, proizvođači lijekova mogu kontrolirati elementarna onečišćenja kontrolom nabavljača ljekovite stvari i pomoćnih tvari. Elementarna onečišćenja u ljekovitoj tvari mogu biti prisutna ukoliko su preostali katalizatori koji se namjerno dodaju u proces sinteze ili ako su prisutni kao onečišćenje.

Toksikološke studije su pokazale da su kadmij, živa, krom, olovo, nikal i arsen najtoksičniji metali, (Waterman i sur., 2003) međutim ne treba se zanemariti toksičnost niti ostalih metala.

Trenutno postoje nekoliko regulatornih zahtjeva koje se tiču kontrole elementarnih onečišćenja u farmaceutskom proizvodu. Najznačajnije su: Guideline for elemental impurities Q3D koje je izdala Internacionalna konvencija za harmonizaciju (International Conference on Harmonisation – ICH) i dva poglavlja 232 i 233 iz Američke farmakopeje (The United States Pharmacopeia USP).

Prije izlaska gore spomenutih poglavlja često su se koristila i poglavlja iz Europske farmakopeje (Ph. Eur.), kao i Američke i Britanske farmakopeje koja za ispitivanje ukupnog sadržaj metala u farmaceutskim materijalima koriste načelo reakcija između metala u uzorku i tioacetamidnog reagensa kojim se talože metali u obliku obojenih sulfida. Boja nastalog taloga uspoređuje se s paralelno tretiranom standardnom otopinom olova poznate koncentracije. Boja sulfida različitih teških metala varira od bijele do žute, narančaste, smeđe

i crne što otežava vizualnu usporedbu sa tamno smeđom bojom otopine olovovog sulfida. Ukupni sadržaj teških metala izražava se u odnosu na standardnu otopinu olova kao limit test. Iako je još u upotrebi ova metoda je nespecifična, neosjetljiva, zahtijeva puno vremena i vrlo često ima mali analitički prinos. Nespecifičnost znači da s ovom metodom nemamo informaciju koji teški metal daje pozitivni rezultat što je veliki nedostatak metode. (Wang i sur., 2000.)

ICH vodič za elementarna onečišćenja Q3D odnosi se na nove gotove lijekove i nove lijekove koji sadrže postojeće djelatne tvari. Implementacija Q3D smjernica na postojeće lijekove očekuje se nakon isteka 36 mjeseci od objave ICH vodiča. Ove smjernice uvedene su kako bi se ispunile potrebe pacijenata, farmaceutske industrije i regulatornih vlasti i kako bi se postavilo dopušteno dnevno izlaganje (Permitted Daily Exposure – PDE) za svaki metal od toksikološkog značaja. Q3D klasificira teške metale u tri skupine s obzirom na njihovu toksičnost i vjerojatnost pojavljivanja u ljekovitom proizvodu.

1) Elementi As, Cd, Hg i Pb su toksični i imaju ograničenu ili nikakvu primjenu u proizvodnji farmaceutika.

2) Elementi u ovoj skupini su podijeljeni u dvije podskupine 2A i 2B s obzirom na vjerojatnost pojavljivanja u ljekovitom obliku.

2A) Elementi u ovoj skupini imaju relativno visoku vjerojatnost pojavljivanja u ljekovitom obliku i zbog toga zahtijevaju procjenu rizika iz svih potencijalnih izvora elementarnih onečišćenja. Ovdje ubrajamo sljedeće elemente: Co, Ni i V.

2B) Elementi u ovoj skupini imaju smanjenu vjerojatnost pojavljivanja u ljekovitom obliku, a oni su: Ag, Au, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Se i Tl.

3) Elementi u ovoj skupini su relativno male toksičnosti kada su oralno primjenjeni ali zahtijevaju procjenu rizika kada se primjenjuju parenteralno ili inhalacijski. Tu ubrajamo: Li, Sb, Ba, Mo, Cu, Sn, Cr. (Wang i sur., 2010.)

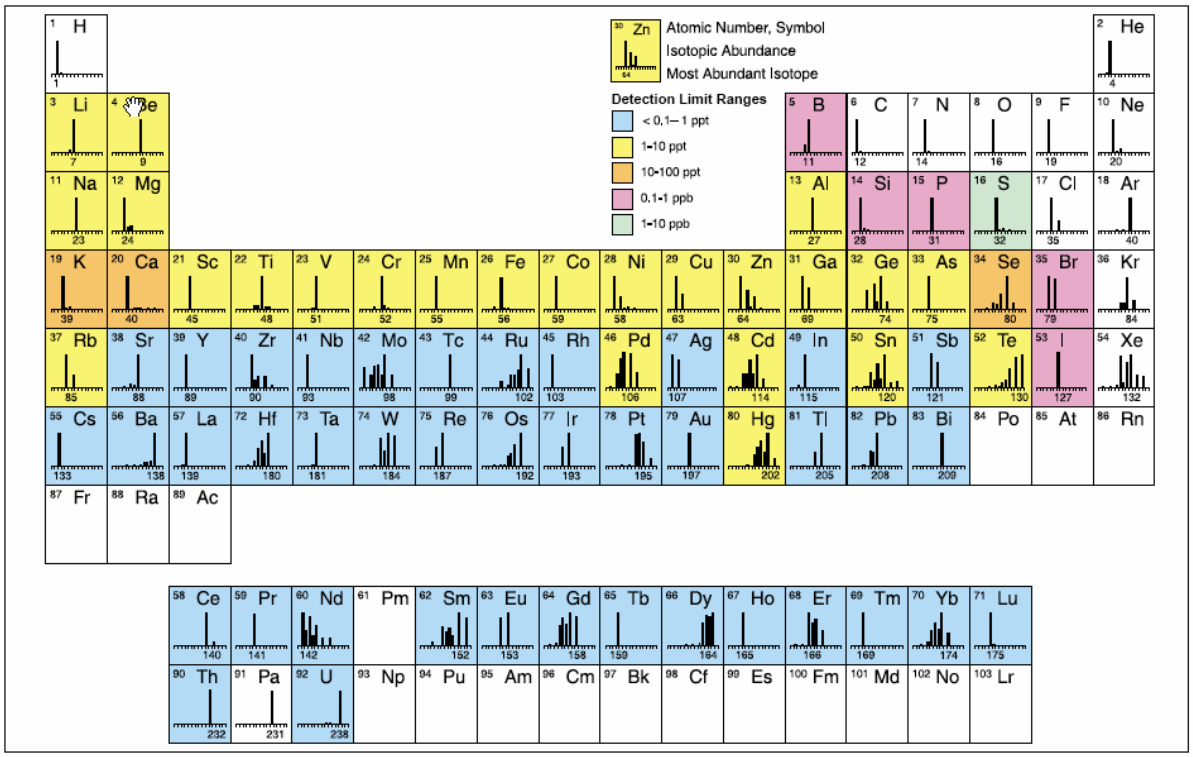
Tijekom razvoja svi namjerno dodani elementi kao i nenamjerno dodani elementi koje je potrebno testirati u skladu sa smjernicom moraju se analizirati. U ICH smjernici Q3D nalazi se tablica s dopuštenim koncentracijama elementarnih onečišćenja za procjenu sadržaja onečišćenja teškim metalima kod ljekovitih oblika s dozom ne višom od 10g/dan (Tablica 1). Čimbenici koji su razmatrani u procjeni sigurnosti za utvrđivanje PDE su: oksidacijsko stanje elementa u kojem će se nalaziti u lijeku, ljudska izloženost, najrelevantnija studija na životinjama, put primjene i relevantne završne točke. (Wang i sur., 2010.)

ELEMENT	SKUPINA	Oralni PDE µg/dan	Parenteralni PDE µg/dan	Inhalacijski PDE µg/dan
Cd	1	5	2	2
Pb	1	5	5	5
As	1	15	15	2
Hg	1	30	3	1
Co	2A	50	5	3
V	2A	100	10	1
Ni	2A	200	20	5
Tl	2B	8	8	8
Au	2B	100	100	1
Pd	2B	100	10	1
Ir	2B	100	10	1
Os	2B	100	10	1
Rh	2B	100	10	1
Ru	2B	100	10	1
Se	2B	150	80	130
Ag	2B	150	10	7
Pt	2B	100	10	1
Li	3	550	250	25
Sb	3	1200	90	20
Ba	3	1400	700	300
Mo	3	3000	1500	10
Cu	3	3000	300	30
Sn	3	6000	600	60
Cr	3	11000	1100	3

Tablica 1: Dopušteno dnevno izlaganje za elementarna onečišćenja (ICH Harmonised Guideline, Guideline for Elemental Impurities, Q3D, 2014)

1.4 INDUKTIVNO SPREGNUTA PLAZMA S MASENOM SPEKTROMETRIJOM (ICP-MS)

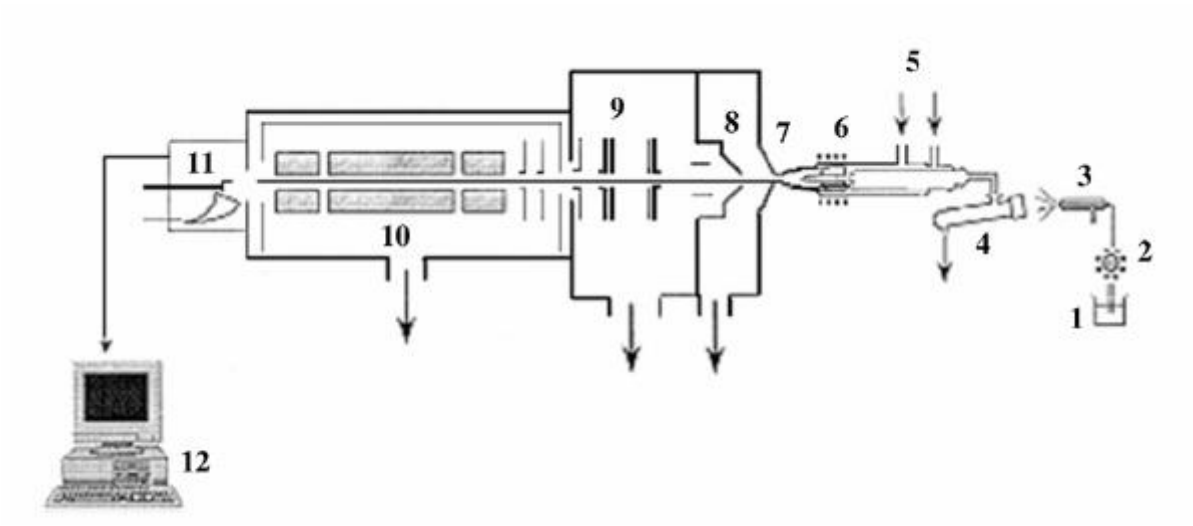
ICP-MS je najbrže razvijajuća tehnika za analizu elemenata u tragovima. Od svoje komercijalizacije 1983. godine koristi se u različitim poljima od kojih su najčešći biomedicina, ekologija i geologija. Iako može odrediti iste elemente kao i ostale atomske spektroskopske tehnike kao što su FAA (Flame Atomic Absorption), ETA (Electrothermal atomization i ICP-OES (Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy, ICP-MS ima veliku prednost u svojoj multielementarnoj analizi, brzini analize, limitu detekcije i sposobnosti mjerenju izotopa. ICP-MS može provoditi kvalitativne, polukvantitativne i kvantitativne analize. Slika 3 prikazuje elemente koje se pomoću ICP-MS može kvantitavno analizirati (obojeni elementi). (Thomas, 2004; Bazilio, Weinrich, 2012)



Slika 3. Približan limit detekcije s ICP-MS (preuzeto od PerkinElmer, Inc.)

1.4.1 NAČELA RADA ICP-MS

ICP-MS je tehnika u kojoj se kao ionizacijski izvor koristi induktivno spregnuta plazma, a za detekciju nastalih iona koristi se maseni spektrometar. Danas su dostupni ICP-MS instrumenti različitog dizajna koji imaju slične komponente: raspršivač, komora za sprejanje, baklja i detektor, ali mogu se značajno razlikovati u dizajnu sučelja, instrumentu za odvajanje masa i vakuumskoj komori. Slika 4. prikazuje shematski dijagram ICP-MS instrumenta s osnovnim dijelovima.



Slika 4. Shematski prikaz ICP-MS instrumenta: 1 – tekući uzorak, 2 – pumpa, 3 – raspršivač, 4 – komora za sprejanje, 5 – ulazi za plin argon u baklju, 6 – baklja, 7 – prvi konus (sampler cone), 8 – drugi konus (skimmer cone), 9 – ionske leće, 10 – kvadrupolni maseni analizator, 11 – detektor multiplikator elektrona, 12 – skupljanje podataka. (Waterman i sur.,)

Uglavnom korišteni plin za plazmu je argon uz temperaturu plazme od 6000 do 10000K, prikladno za ionizaciju i ekscitaciju većine elemenata. Kvarcna baklja se sastoji od tri koncentrične cijevi u koje se uvode različiti protoci argona. Kada se uzorci uvode u plazmu prolaze faze desolvacije, isparavanja, atomizacije i ionizacije prije nego uđu u maseni spektrometar. Nastali ioni se ekstrahiraju u sučelje masenog spektrometra kroz prvi i drugi konus koji su najčešće načinjeni od nikla. Nakon toga ioni se fokusiraju pomoću niza ionskih leća u maseni analizator. Pozitivno nabijeni ioni se razdvajaju na temelju njihovih omjera masa/naboj, a detektiraju se upotrebom multiplikatora elektrona. (Rama Rao i sur., 2010.)

Rad ICP-MS instrumenta možemo podijeliti u nekoliko faza:

1) Uvođenje uzorka

   Mehanizam uvođenja uzorka u plazmu možemo promatrati kao dva odvojena koraka, stvaranje aerosola s raspršivačem i razdvajanje kapljica s komorom za sprejanje. Uzorak koji je najčešće u tekućem stanju uvodi se u pneumatski raspršivač gdje se pretvara u aerosol. Male kapljice aerosola, koje predstavljaju 1-2% uzorka se razdvajaju od većih kapljica pomoću komore za sprejanje. Male kapljice aerosola izlaze iz komore za sprejanje i uvode se u baklju.

2) Stvaranje iona

   Kako aerosol putuje kroz različite temperaturne zone u baklji, uzorak prolazi faze desolvacije, isparavanja, atomizacije i ionizacije. Tijekom toga, uzorak se pretvara iz tekućeg aerosola u čvrste čestice a potom u plin. Svrha plazme je da formira pozitivno nabijene ione iz uzorka aerosola.

3) Regija sučelja

   Uloga regije sučelja (međusklop) je učinkoviti i konzistentni prijenos nastalih iona iz plazme koja je pri atmosferskom tlaku u područje masenog analizatora koje je na puno nižem tlatku (vakuum). Sučelje se sastoji od dva metalna konusa s vrlo malim otvorima koji su u vakuumu. Oba konusa su najčešće od nikla ali mogu biti i od drugih materijala kao što je platina.

4) Usmjeravanje iona

   Ionske leće nalaze se između konusa sučelja i masenog spektrometra, a sastoje se od elektrostatskih ploča. Funkcija ionskih leća je da učinkovito usmjere i prenesu ione u maseni spektrometar. Druga, također vrlo važna uloga ionskih leća je zaustaviti neutralne čestice i fotone do masenog analizatora i detektora jer te čestice uzrokuju nestabilnost signala i povećaju pozadinski šum

5) Razdvajanje iona i detekcija

   Ioni prolaze iz sustava ionskih leća u vakuum fazu analizatora gdje se razdvajaju na temelju omjera mase i naboja. Koriste se 4 različite vrste masenih analizatora od kojih je najčešći kvadrupolni maseni analizator. Kvadrupolni maseni analizator koristi kombinaciju električnih polja istosmjerne i izmjenične struje iona. Najčešći detektor koji se koristi je multiplikator elektrona. Kada ion izlazi iz kvadrupolnog analizatora udara u dinodu i oslobađa nekoliko sekundarnih elektrona. Ti sekundarni elektroni

udaraju u sljedeću dinodu i na taj način se stvara još elektrona. Multiplikator elektrona detektira svaki ion koji izlazi iz analizatora. Detektor računa i pohranjuje ukupni signal za svaki omjer masa/naboj stvarajući maseni spektar. (Thomas, 2004)

1.4.2 PREDNOSTI I NEDOSTATCI ICP-MS

Brza i učinkovita multielementarna analiza čini ovu tehniku poželjnom za analizu metalnih onečišćenja. U odnosu na ICP- AES, ICP-MS daje informaciju i o izotopima što je bitno jer je ponekad nužna potpuna karakterizacija elemenata. Za razliku od ICP-AES rezultati ispitivanja ICP-MS se lako analiziraju i daju jednostavniji spektar. Brzina analize je također prednost ove metode, s obzirom da mjerenje cijelog skupa elemenata traje nekoliko minuta. Prednost je vrlo niska granica detekcije i pokrivanje širokog raspona elemenata.

Nedostatak ICP-MS u usporedbi s ICP-AES je ta da ne može detektirati neutralne čestice. Glavni nedostatak ICP-MS je visoka cijena uređaja, kao i potrebno veliko znanje za korištenje zbog kojeg još nije u rutinskoj uporabi. ICP-MS zahtijeva vakuumsku pumpu i ionske leće s kojima analitičari često ne znaju baratati. (Hill, 2007)

1.5 VALIDACIJA ANALITIČKOG POSTUPKA

Analitičke metode trebaju biti validirane kako bi se osigurala pouzdanost i točnost analitičkih podataka. Validacija analitičkog postupka je postupak kojim dokazujemo da naša metoda služi svrsi koju smo joj namijenili. Njome se jamči da će se u propisanim uvjetima njegove primjene dobiti točni, precizni i reproducibilni rezultati tijekom dugoročnog korištenja metode.

Osnovni validacijski parametri koji se određuju tijekom validacije analitičke metode su: točnost, preciznost, selektivnost, granica dokazivanja, granica određivanja, linearnost, radno područje i robusnost. Koji parametri će se ispitivati u postupku validacije ovisi o namjeni metode. U metodi koja se koristi u ovom radu ispitivali smo iduće parametre: linearnost, točnost, preciznost, specifičnost, robustnost, ponovljivost te granica određivanja.

Linearnost analitičke metode je mogućnost metode da unutar danog područja daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Za potvrdu linearnosti odabira se najmanje pet različitih koncentracija analita.

Točnost metode definira se kao stupanj podudaranja između stvarne, odnosno prihvaćene referentne vrijednosti i srednje vrijednosti dobivene primjenom analitičkog postupka. Eksperimenti se provode najmanje tri puta za najmanje tri koncentracijske razine unutar radnog područja metode.

Preciznost se određuje kao izraz slaganja između niza mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Može se iskazati kao ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost. Ponovljivost izražava slaganje rezultata koji su dobiveni u istim radnim uvjetima, istom metodom i u kratkom vremenskom razdoblju. Srednja preciznost označava podudaranje rezultata dobivenih u istom laboratoriju pod propisanim različitim uvjetima u opravdanim vremenskim razmacima. Obnovljivost izražava odstupanje rezultata dobivenih uzastopnim mjerenjem nekoliko istih uzoraka, istom metodom u različitim laboratorijima provedenih od različitih analitičara koristeći različitu opremu.

Specifičnost je svojstvo metode da točno i specifično odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenata u matrici uzorka pod utvrđenim uvjetima ispitivanja. Specifična metoda je ona kojom se može odrediti samo jedan specifični analit.

Robustnost se određuje kao mjera otpornosti analitičkog postupka na male, namjerne promjene radnih uvjeta metode. Provodi se da bi se odredilo kako male promjene radnih uvjeta i provedbe utječu na rezultat analize.

Granica određivanja je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost pri propisanim uvjetima metode. Određuje se razrjeđivanjem osnovne otopine. (Lazarić; Nigović, 2013/2014)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kontrola elementarnih onečišćenja je samo jedan dio sveukupne kontrole u gotovom lijeku koja osigurava da onečišćenja ne prelaze dopušteni dnevni unos (PDE), ali u skoroj budućnosti morat će se primijeniti za sve farmaceutske proizvode. Zbog toga je to područje jedno od najbrže rastućih područja ne samo u kontroli kvalitete lijekova već i u cijeloj industriji, a to podrazumijeva investiranje u laboratorije, instrumente i stručnjake. Potreba za kontrolom elementarnih onečišćenja vodi do proboja ICP-MS i ICP-AES tehnika u farmaceutskoj industriji. Pacijent ne unosi elementarna onečišćenja samo lijekovima, već i iz vode, zraka i hrane. To je razlog zašto bi se svi trebali uključiti u smanjivanje količine elementarnih onečišćenja u svojim proizvodima. Kako bi se što efikasnije kontrolirala elementarna onečišćenja potrebno je imati veliko znanje o regulatornim zahtjevima, sintezi i proizvodnom procesu kako bi se mogao razviti najbolji pristup kontroli elementarnih onečišćenja.

Cilj ovog rada bio je ispitati može li se razviti brza i učinkovita metoda s kojom se mogu odrediti, u jednom snimanju, sva elementarna onečišćenja propisana ICH Q3D smjernicom u eritromicinu koristeći ICP-MS.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

Mjere opreza:

Pri izvođenju potrebno je koristiti zaštitnu odjeću, rukavice, naočale i masku za lice.

U izradi ovog rada korišteni su sljedeće supstancije, kemikalije i instrumenti:

Instrumenti:

Vaga: Metler Toledo AT261

ICP-MS: Agilent Technologies 7700x s autosamplerom: Agilent Technologies ASX-500

ICP-MS: Agilent Technologies 7900 s autosamplerom I-AS

Mikrovalna pećnica: Milestone Ultrawave Single Reaction Chamber Microwave

Aparat za ultračistu vodu: SG ULTRA CLEAR

Ispitivana supstancija:

Eritromicin, AbbVie Inc.

Kemikalije:

Deionizirana voda

Nitratna kiselina (69,0-70,0%), For Trace Metal Analysis, J. T.

Kloridna kiselina (36,5-38%), For Trace Metal Analysis, J. T. Baker

Perklorna kiselina (69,0-72,0%), For Trace Metal Analysis, J. T. Baker

Vodikov peroksid (30%), Suprapur, Merck, 30%

Popis korištenih standardnih otopina metala dana je u tablici 2.

STANDARDNA OTOPINA	TIP	PRODUCT NO/LOT	KONC (mg/L)	PROIZVOĐAČ
Litij	CRS	CGLI1/G2-LI03006	1000	Inorganic Ventures
Vanadij		CGV1/J2-V02106	996	
Krom		CGCR(3)10/J2-CR03078R	9970	
Kobalt		CGCO1/H2-CO02063	998	
Nikal		CGNI1/J2-NI02103	1003	
Bakar		CGCU10/J2-CU03024	10028	
Arsen		MSAS-10PPM/H2-AS02113	10,007	
Selenij		CGSE(4)1/J2-SE02058	1002	
Molibden		CGMO1/M2-MO02073	1000	
Rutenij		CGRU1/G2-RU01069	998	
Rodij		CGRHN1/G2-RH01125	1006	
Paladij		CGPD1/J2-PD02087	1000	
Srebro		CGAG1/J2-AG03048	999	
Kadmij		MSCH-10PPM/H2-CD02057	10,000	
Kositar		CGSN10/H2-SN02056R	10039	
Antimon		CGSB1/J2-SB03037	999	
Barij		SGBA10/H2-BA02081R	9984	
Osmij		CGOS1/J2-OS01106	1000	
Iridij		CGIR1/J2-IR01072	999	
Platina		CGPT1/J2-PT02016	998	
Zlato		CGAUN1/J2-AU04053	1000	
Živa		CGHG1/J2-HG02133	1002	
Talij		MSTL-10PPM/J2-TL02024	10,000	
Olovo		MSPB-10PPM/H2-PB03061	9,997	
Skandij		CGSC1/H2-SC02123	996	
Germanij		CGGE1/H2-GE01110	1000	
Disprozij		CGDY1/J2_DY01042	1001	
Niobij		CGNB1/J2-NB01082	999	

Tablica 2: Popis korištenih standardnih otopina

Izračun sadržaja metala

Sadržaj svakog metala: Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl, V, Os u ppm računa se prema formuli:

$$\text{ppm metala u uzorku} = \frac{c\left(\frac{ng}{mL}\right) \times V(mL)}{m(mg)}$$

gdje je: c (ng/mL) – koncentracija metala u uzorku koju je instrument izmjerio

V (mL) – konačni volumen otopljenog uzorka

m (mg) – masa uzorka

Izračun analitičkog prinosa

Analitički prinos (Recovery) računa se prema formuli:

$$\text{Analitički prinos (\%)} = \left(\frac{\left(\frac{C_s}{DF_s}\right) - \left(\frac{C_{us}}{DF_{us}}\right)}{C_A} \right) \times 100$$

gdje je: C_s – koncentracija analita u Spiked sample solution (ppm)

C_{us} – koncentracija analita u Unspiked sample solution (ppm)

DF_s – faktor razrjeđenja of Spiked sample solution (DF_s =1)

DF_{us} – faktor razrjeđenja of unspiked sample solution (DF_{us} =1)

C_A – koncentracija Spike amount (ppm)

Priprema standardnih otopina teških metala

Standardne otopine teških metala pripremaju se u dvije odmjerne tikvice, prva u kojoj je otapalo HNO_3 i druga u kojoj je otapalo HCl. Razlog je taj jer se teški metali najčešće zbog stabilnosti čuvaju ili u jednoj kiselini ili u drugoj. Kod računanja volumena standardne otopine pojedinog teškog metala koji se dodaje u jednu od dvije standardne otopine uvjet je da na 200% specifikacije dodajemo najviše 1 mL pripremljene standardne otopine jer kod volumena većih od 1mL povećava se mogućnost pogreške.

Priprema standardne otopine 1 (Stock solution, SS-1)

U odmjernu tikvicu od 50 mL ulije se 500 µL koncentrirane nitratne kiseline, po 500 µL standardne otopine kadmija i olova, 800 µL standardne otopine talija, 1500 µL standardne otopine arsena, po 150 µL standardne otopine selenija i srebra, 200 µL standardne otopine

nikla, 550 µL standardne otopine litija, 1200 µL standardne otopine antimona, 3000 µL standardne otopine molibdena, 140 µL standardne otopine barija, 300 µL standardne otopine bakra, 600 µL standardne otopine kositra i 1100 µL standardne otopine kroma. Nadopuni se deioniziranom vodom do oznake.

Priprema standardne otopine 2 (Stock solution, SS-2)

U odmjernu tikvicu od 50 ml ulije se 500 µL koncentrirane klorne kiseline, 30 µL standardne otopine žive, 50 µL standardne otopine kobalta i po 100 µL standardnih otopina paladija, platine, rodija, rutenija, iridija, osmija, vanadija i zlata. Nadopuni se deioniziranom vodom do oznake.

Priprema otopine internog standarda (Stock solution of internal standard, ISTD)

U odmjernu tikvicu od 10 mL ulije se 100 µL nitratne kiseline, te 250 µL standardne otopine germanija. Nadopuni se deioniziranom vodom do oznake.

Priprema radnih otopina

U odmjernu tikvicu uliju se otopine H_2O_2, HCl, ISTD, SS-1 i SS-2 u količini prikazanoj u tablici. Nadopuni se deioniziranom vodom do oznake.

0%	30%	50%	100%	150%	200%
Level 0	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
BLK/50mL	STD-1/50mL	STD-2/50mL	STD-3/50mL	STD-4/50mL	STD-5/50mL
1mL H_2O_2	1mL H_2O_2	1mL H_2O_2	1mL H_2O_2	1mL H_2O_2	1mL H_2O_2
1mL HCl	1mL HCl	1mL HCl	1mL HCl	1mL HCl	1mL HCl
100µL ISTD	100µL ISTD	100µL ISTD	100µL ISTD	100µL ISTD	100µL ISTD
	150µL SS-1	250µL SS-1	500µL SS-1	750µL SS-1	1000µL SS-1
	150µL SS-2	250µL SS-2	500µL SS-2	750µL SS-2	1000µL SS-2

Tablica 3: Priprema radnih otopina BLK, STD-1, STD-2, STD-3, STD-4, STD-5

Specifikacija	0%	30%	50%	100%	150%	200%
	Blank	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
Li	0	33	55	110	165	220
V	0	6	10	20	30	40
Cr	0	660	1100	2200	3300	4400
Co	0	3	5	10	15	20
Ni	0	12	20	40	60	80
Cu	0	180	300	600	900	1200
As	0	0,9	1,5	3	4,5	6
Se	0	9	15	30	45	60
Mo	0	180	300	600	900	1200
Ru	0	6	10	20	30	40
Rh	0	6	10	20	30	40
Pd	0	9	15	30	45	60
Ag	0	0,3	0,5	1	1,5	2
Cd	0	360	600	1200	1800	2400
Sn	0	72	120	240	360	480
Sb	0	84	140	280	420	560
Ba	0	6	10	20	30	40
Os	0	6	10	20	30	40
Ir	0	6	10	20	30	40
Pt	0	6	10	20	30	40
Au	0	6	10	20	30	40
Hg	0	1,8	3	6	9	12
Tl	0	0,48	0,8	1,6	2,4	3,2
Pb	0	0,3	0,5	1	1,5	2

Tablica 4: Koncentracije analiziranih teških metala (ppb) u pojedinoj radnoj otopini

Analiti	*Skupina 1*				*Skupina 2A*		
	Cd	Pb	As	Hg	Co	V	Ni
Predloženi specifikacijski limit u skladu s ICH Q3D smjernicama	0.5	0.5	1.5	3	5	10	20

Analiti	*Skupina 2B*									
	Tl	Au	Ag	Se	Ru	Rh	Pd	Ir	Pt	Os
Predloženi specifikacijski limit u skladu s ICH Q3D smjernicama	0.8	10	15	15	10					

Analiti	*Skupina 3*						
	Li	Sb	Ba	Cu	Mo	Sn	Cr
Predloženi specifikacijski limit u skladu s ICH Q3D smjernicama	55	120	140	300	300	600	1100

Tablica 5: Predloženi specifikacijski limit u skladu s ICH Q3D smjernicama

3.2 RAZVOJ METODE

3.2.1 ISPITIVANJE TOPLJIVOSTI

Prvi korak ovog rada bio je pronalazak načina na koji će se uzorak pripremati za samo snimanje pomoću ICP-MS metode. Uzorak se mora u potpunosti otopiti a rezultati ispitivanja topljivosti su prikazani u poglavlju 4.1. Zaključak je da ćemo u metodi otapati eritromicin u 1mLH_2O_2 + 1mL HCl bez mikrovalne digestije.

3.2.2 PRELIMINARNA ISPITIVANJA

Preliminarni testovi su rađeni na Agilent Technologies 7700x (ICP-MS instrument). S obzirom da je instrument imao određene nepravilnosti s dovodom helija sve testove smo napravili i na Agilent Technologies 7900 i te podatke smo prikazali iako su podaci bili podudarni.

U predvalidacijskom ispitivanju ispitalo se koji interni standard je pogodan za metodu. Koristili smo germanij, disprozij, skandij i niobij, a pokazalo se da je najbolje korištenje germanija kao internog standarda. Također, u predvalidacijskom ispitivanju ispitivali smo i koji izotopi su prikladni za metodu. Na kraju se odlučilo da je najbolje raditi s izotopima koje preporučuje kompanija Agilent. Ispitivana je granica određivanja na 10% specifikacije, na 20% specifikacije i na 30% specifikacije. Pri koncentracijama od 10% i 20% specifikacije primijećen je prenizak analitički prinos zlata (ispod 70%) i prevelik RSD kod talija. Zaključak je da je najbolje postaviti granicu određivanja na 30% specifikacije.

3.2.3 VALIDACIJA METODE

Ovo je protokol za validaciju metode određivanja elementarnih onečišćenja u eritromicinu. Sadržaj Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl, V i Os s Ge kao internim standardom bit će određen s ICP-MS.

PARAMETAR	KRITERIJ PRIHVATLJIVOSTI
Linearnost	
Koeficijent korelacije	≥0.990
Granica određivanja (QL)	≤ 0.5 J
Analitički prinos	70-150%
RSD	≤ 20%
Točnost	
Analitički prinos	70-150%
Ponovljivost	
RSD	≤ 20%
Preciznost	
RSD	≤ 20%

Tablica 6: Kriteriji prihvatljivosti

Podatci o ICP-MS instrumentu:

Plin nositelj: Argon

Collision Gas: Helij

Make Up Gas: Argon

Baklja: Kvarc

Podatci o metodi:

Acq mode: spectrum

Peak pattern: 1 point

Replikati: 3

Sweeps/Replicate: 50

Prije mjerenja			
	Vrijeme/sekunda	Brzina/okretaja u sekundi (peristaltička pumpa)	Bočica za uzorak
uzimanje uzorka	40	0.3	uzorak
stabiliziranje	60	0.3	uzorak
Poslije mjerenja			
	Vrijeme/sekunda	Brzina/okretaja u sekundi (peristaltička pumpa)	Bočica za uzorak
Proba ispiranje (uzorak)	5	0.3	Otopina za ispiranje
Proba ispiranje (standard)	0		Otopina za ispiranje
Ispiranje 1	50	0.3	Bočica 1
Proba ispiranje 1	0		Otopina za ispiranje
Ispiranje 2	50	0.3	Bočica 2
Proba ispiranje 2	0		Otopina za ispiranje

Bočica 1: 1% v/vHCl; Bočica 2: 2% v/vHCl + 2% v/v H_2O_2, Otopina za ispiranje: 1% v/v HNO_3

Tablica 7: Parametri peristaltičke pumpe

			Standardni mod	He mod		
Element	Masa	Oznak	Vrijeme integracije / s		Tip	Interni
Li	7	^{7}Li	5	N/A	Analit	^{72}Ge
V	51	^{51}V	N/A	0.3	Analit	^{72}Ge
Cr	52	^{52}Cr	N/A	0.3	Analit	^{72}Ge
Co	59	^{59}Co	N/A	0.3	Analit	^{72}Ge
Ni	60	^{60}Ni	N/A	0.3	Analit	^{72}Ge
Cu	63	^{63}Cu	N/A	0.3	Analit	^{72}Ge
As	75	^{75}As	N/A	1.5	Analit	^{72}Ge
Se	78	^{78}Se	N/A	1.5	Analit	^{72}Ge
Mo	95	^{95}Mo	0.1	N/A	Analit	^{72}Ge
Ru	101	^{101}Ru	0.1	N/A	Analit	^{72}Ge
Rh	103	^{103}Rh	0.1	N/A	Analit	^{72}Ge
Pd	105	^{105}Pd	0.1	N/A	Analit	^{72}Ge
Ag	107	^{107}Ag	1	N/A	Analit	^{72}Ge
Cd	111	^{111}Cd	0.1	N/A	Analit	^{72}Ge
Sn	120	^{120}Sn	0.1	N/A	Analit	^{72}Ge
Sb	121	^{121}Sb	0.1	N/A	Analit	^{72}Ge
Ba	138	^{138}Ba	1	N/A	Analit	^{72}Ge
Os	189	^{189}Os	0.1	N/A	Analit	^{72}Ge
Ir	193	^{193}Ir	0.1	N/A	Analit	^{72}Ge
Pt	195	^{195}Pt	0.1	N/A	Analit	^{72}Ge
Au	197	^{197}Au	1.5	N/A	Analit	^{72}Ge
Hg	202	^{202}Hg	1.5	N/A	Analit	^{72}Ge
Tl	205	^{205}Tl	1.5	N/A	Analit	^{72}Ge
Pb	208	^{208}Pb	1	N/A	Analit	^{72}Ge
Ge	72	^{72}Ge	0.1	0.3	Interni standard	N/A

Tablica 8: Akvizicijski parametri

LINEARNOST

Za mjerenje linearnosti treba se pripremiti slijepa proba (BLK) i pet otopina s koncentracijama elementarnih onečišćenja od granice određivanja (0,3J) do 2J (STD-1,STD-2, STD-3, STD-4, STD-5). J je oznaka za specifikaciju, 1J je koncentracija pri 100% specifikacije. Rezultati se prikazuju grafom u ovisnosti omjera (vrijednost koju izbacuje ICP-MS instrument) i koncentracije pojedinog elementarnog onečišćenja. Parametar prihvatljivosti koji se promatra je koeficijent korelacije regresijskog pravca.

TOČNOST

Za mjerenje točnosti priprema se otopina uzorka bez dodavanja metala (ACC1-3) i otopine s dodanim elementarnim onečišćenjima s koncentracijom od 0,5J (ACC4-6), 1,0J (ACC7-9) i 1,5J (ACC10-12). Svaki koncentracijski nivo se priprema po tri puta. Rezultat se izražava s RSD vrijednosti i analitičkim prinosom.

PRECIZNOST

Za mjerenje preciznosti priprema se šest otopina s dodanim elementarnim onečišćenjima u koncentraciji od 1J. Rezultat se izražava s RSD vrijednosti.

GRANICA ODREĐIVANJA

Za mjerenje granice određivanja priprema se šest otopina s dodanim metalima s koncetracijom od 0,3J. Ta je razina određena prilikom prevalidacijskih ispitivanja. Na 0,1J i 0,2J analitički prinos i RSD nije bio zadovoljavajuć. Rezultat se izražava s RSD vrijednosti.

PONOVLJIVOST

Za mjerenje ponovljivosti koristili smo podatke iz mjerenja točnosti i preciznosti. Iz mjerenja točnosti koristi se samo podatak kod otopine s koncentracijom elementarnih onečišćenja 1J. Rezultat se izražava s RSD vrijednosti.

ROBUSTNOST

Robustnost analitičke procedure je mjera njenog kapaciteta da ostane nepromjenjena neovisno o malim promjenama parametara navedenih u dokumentaciji i da pokaže prikladnost za normalnu upotrebu. Robustnost procedure će se dokazati kroz zadovoljavanje kriterija ponovljivosti te kroz slične rezultate validacije onima u predvalidaciji.

SPECIFIČNOST

Specifičnost je svojstvo analitičke procedure da mjeri točno traženi analit u prisutnosti drugih potencijalnih onečišćenja (interferencija). Specifičnost metode dokazat će se zadovoljavanjem svih prije navedenih kriterija jer će se u svim prije spomenutim testovima nalaziti i sva druga potencijalna onečišćenja (interferencija).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 ISPITIVANJE TOPLJIVOSTI

Prvi korak ovog rada bio je ispitati topljivost eritromicina u matrici koja je pogodna za daljnje ispitivanje. Uzorak se mora u potpunosti otopiti, a rezultati ispitivanja topljivosti su:

1. Otapanje s mikrovalnom digestijom na 270°C

Uzorak eritromicina (približno 100 mg) otapan je u epruveti u različitim vrstama otapala i različitim količinama tih otapala. Pripremljene otopine podvrgnute su mikrovalnoj digestiji prema programu:

t/min	E/W	T_1/°C	T_2/°C	p/bar
25	1500	270	70	130
20	1500	270	70	130

Tablica 9: Program mikrovalne digestije (270°C)

Nakon mikrovalne digestije otopine se prebace u odmjerne tikvice od 50 mL, nadopunjene do oznake s vodom te se provjeri da li se uzorak otopio. Volumeni i vrste korištenog otapala te rezultati testa topljivosti prikazani su u tablici 10.

m(uzorka)/mg	otapalo	otapanje
100,92	5 mL HNO_3	otopljeno
104,55	4 mL HNO_3 + 0,25 mL $HClO_4$	otopljeno
101,96	5 mL HCl	nije otopljeno
101,30	5 mL H_2O_2	otopljeno
100,68	2 mL HNO_3	otopljeno
97,32	2 mL HNO_3 + 0,25 mL $HClO_4$	otopljeno
96,35	2 mL H_2O_2	otopljeno
95,83	2 mL H_2O_2 + 2 mL H_2O	otopljeno
101,45	4 mL H_2O_2 + 0,5 mL HCl	nije otopljeno
103,46	4,5 mL HCl + 1,5 mL HNO_3	otopljeno
99,13	4,5 mL HNO_3 + 1,5 mL HCl	otopljeno
97,90	1,5 mL HCl + 4,5 mL H_2O	nije otopljeno

Tablica 10: Rezultati otapanja uzorka u različitim otapalima nakon mikrovalne digestije (270°C)

2. Otapanje s mikrovalnom digestijom na 200°C

Otapala u kojima se u prvom programu eritromicin otopio ponovno su korištena uz temperaturu mikrovalne digestije od 200°C. Otopine su pripremljene na isti način te su podvrgnute mikrovalnoj digestiji prema programu:

t/min	E/W	T_1/°C	T_2/°C	p/bar
25	1500	200	70	130
20	1500	200	70	130

Tablica 11: Program mikrovalne digestije (200°C)

Nakon mikrovalne digestije otopine su prebačene u odmjerne tikvice od 50 mL, nadopunjene do oznake s vodom te je provjereno je li se uzorak otopio. Otapala i rezultati prikazani u tablici 12.

m(uzorka)/mg	otapalo	otapanje
97,70	5 mL HNO_3	otopljeno
104,81	4 mL HNO_3 + 0,25 mL $HClO_4$	otopljeno
104,92	5 mL H_2O_2	otopljeno
101,83	2 mL HNO_3	otopljeno
104,82	2 mL HNO_3 + 0,25 mL $HClO_4$	otopljeno
96,05	2 mL H_2O_2	otopljeno
103,91	2 mL H_2O_2 + 2 mL H_2O	otopljeno
99,37	4,5 mL HCl + 1,5 mL HNO_3	nije otopljeno
100,66	4,5 mL HNO_3 + 1,5 mL HCl	otopljeno

Tablica 12: Rezultati otapanja uzorka u različitim otapalima nakon mikrovalne digestije (200°C)

3. Otapanje s mikrovalnom digestijom na 150°C

Testirana je mikrovalna digestija na 150°C. Otopine su pripremljene na isti način a pripremljene otopine podvrgnute su mikrovalnoj digestiji prema programu:

t/min	E/W	T_1/°C	T_2/°C	p/bar
25	1500	150	70	130
20	1500	150	70	130

Tablica 13: Program mikrovalne digestije (150°C)

Nakon mikrovalne digestije otopine su prebačene u odmjerne tikvice od 50 mL, nadopunjene do oznake s vodom te je provjereno je li se uzorak otopio. Otapala i rezultati prikazani u tablici 14.

m(uzorka)/mg	otapalo	otapanje
103,98	5 mL HNO_3	otopljeno
103,66	4 mL HNO_3 + 0,25 mL $HClO_4$	otopljeno
102,41	5 mL H_2O_2	otopljeno
97,62	2 mL HNO_3	otopljeno
99,87	2 mL HNO_3 + 0,25 mL $HClO_4$	otopljeno
96,87	2 mL H_2O_2	otopljeno
100,77	2 mL H_2O_2 + 2 mL H_2O	otopljeno
97,03	4,5 mL HNO_3 + 1,5 mL HCl	nije otopljeno

Tablica 14: Rezultati otapanja uzorka u različitim otapalima nakon mikrovalne digestije (150°C)

4. Otapanje bez mikrovalne digestije

S obzirom da je cilj svake metode da između ostalog bude brza, provjereno je može li se eritromicin otopiti bez korištenja mikrovalne digestije. Uzorci eritromicina mase oko 200 mg odvagani su u odmjerne tikvice od 100 mL, dodani su različiti volumeni otapala, dobro promiješani te nadopunjeni s vodom do oznake. Rezultati otapanja su prikazani u tablici 15.

m(uzorka)/mg	otapalo	otapanje
202,87	5 mL HNO_3	nije otopljeno
199,24	5 mL HCl	nije otopljeno
198,98	2,5 mL HNO_3 +2,5 mL HCl	nije otopljeno
200,24	2,5 mL H_2O_2 + 2,5 mL HCl	otopljeno

Tablica 15: Rezultati otapanja uzorka u otapalima pri sobnoj temperaturi

5. Otapanje bez mikrovalne digestije

U prethodnom ispitivanju primijećeno je da se eritromicin dobro otopio u smjesi H_2O_2 i HCl te se krenulo u ispitivanje topljivosti bez mikrovalne digestije sa smjesom različitih volumena H_2O_2 i HCl. Uzorci eritromicina mase oko 200 mg odvagani su u odmjerne tikvice

od 100 mL, dodani su različiti volumeni otapala, dobro promiješani te nadopunjeni s vodom do oznake. Rezultati otapanja su prikazani u tablici 16.

m(uzorka)/mg	otapalo	otapanje
197,15	10 mL H_2O_2	nije otopljeno
198,69	8 mL H_2O_2 + 1 mL HCl	otopljeno
204,15	5 mL H_2O_2 +1 mL HCl	otopljeno
201,70	2 mL H_2O_2 + 1 mL HCl	otopljeno
197,12	1 mL H_2O_2 + 1 mL HCl	otopljeno
203,63	1 mL H_2O_2 + 0,5 mL HCl	otopljeno

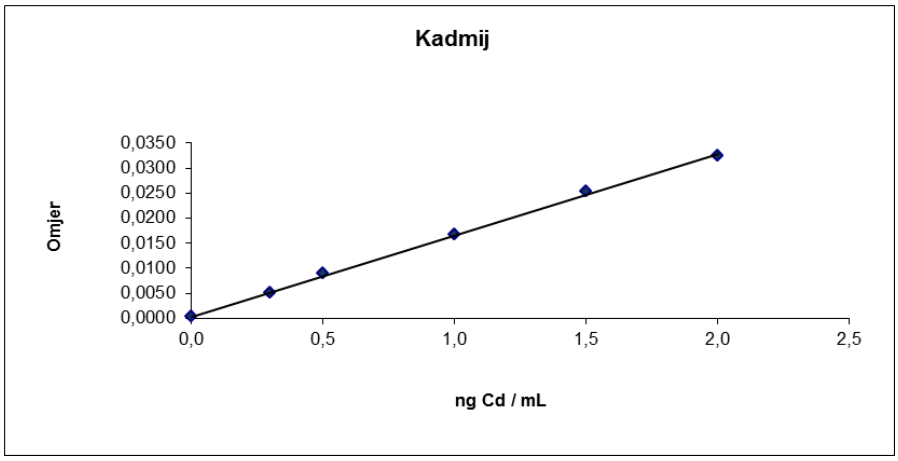
Tablica 16: Rezultati otapanja uzorka u otapalima pri sobnoj temperaturi

Nakon ispitivanja zaključak je da je 200 mg eritromicina najbolje otapati u smjesi 2 mL H_2O_2 i 2 mL HCl. U otopinu je na kraju dodano još i 2 mL pripremljenih standardnih otopina analiziranih elementarnih onečišćenja, SS-1 i SS-2. S obzirom da se ništa nije istaložilo smjesa 2 mL H_2O_2 i 2 mL HCl je izvrsna za metodu određivanja elementarnih onečišćenja u eritromicinu. Budući da je poželjno da metoda bude brza zaključili smo da ćemo u idućim ispitivanjima otapati 100 mg eritromicina u 1 mL H_2O_2 + 1 mL HCl bez mikrovalne digestije u odmjernoj tikvici od 50 mL.

4.2 VALIDACIJA ANALITIČKE METODE

4.2.1 KADMIJ

LINEARNOST



c (ng/mL)	Omjer
0,00	0,0001
0,30	0,0050
0,50	0,0089
1,00	0,0166
1,50	0,0252
2,00	0,0322

Nagib (a)	0,0164
Odsjek (b)	0,0001
Koeficijent korelacije	0,9994

Slika 5: Rezultati mjerenja linearnosti za kadmij

TOČNOST

Level	Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*c* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)	RSD (%)
Level 0	ACC-1	99,73	0,00	0,000	0,00	0,00	-	-
	ACC-2	100,74		0,000	0,00			
	ACC-3	100,55		0,000	0,00			
Level 1	ACC-4	99,04	0,25	0,518	0,26	0,26	102	2
	ACC-5	99,12		0,513	0,26			
	ACC-6	99,83		0,502	0,25			
Level 2	ACC-7	100,99	0,50	0,975	0,49	0,51	101	3
	ACC-8	99,41		1,031	0,52			
	ACC-9	101,79		1,035	0,52			
Level 3	ACC-10	98,99	0,75	1,472	0,74	0,74	99	1
	ACC-11	100,25		1,484	0,74			
	ACC-12	99,42		1,505	0,75			

Tablica 17: Rezultati mjerenja točnosti za kadmij

GRANICA ODREĐIVANJA

Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*C* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)			
ACC-1	99,73	0,00	0,000	0,00	0,00	-			
ACC-2	100,74		0,000	0,00		-			
ACC-3	100,55		0,000	0,00		-			
							Prosječna vrijednost	SD	RSD (%)
QL-1	100,53	0,15	0,318	0,16	0,16	106	105	0,0	2
QL-2	99,93		0,310	0,16		103			
QL-3	98,83		0,316	0,16		105			
QL-4	102,70		0,318	0,16		106			
QL-5	99,84		0,305	0,15		102			
QL-6	100,27		0,322	0,16		107			

Tablica 18: Rezultati mjerenja granica određivanja za kadmij

PRECIZNOST

Oznaka	*m* (mg)	*c* (ng/mL)	ppm	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)
PRE-1	100,38	0,989	0,49	0,50	0	2
PRE-2	100,44	0,995	0,50			
PRE-3	99,93	0,997	0,50			
PRE-4	99,54	1,034	0,52			
PRE-5	99,84	1,015	0,51			
PRE-6	100,53	1,011	0,51			

Tablica 19: Rezultati mjerenja preciznost za kadmij

PONOVLJIVOST

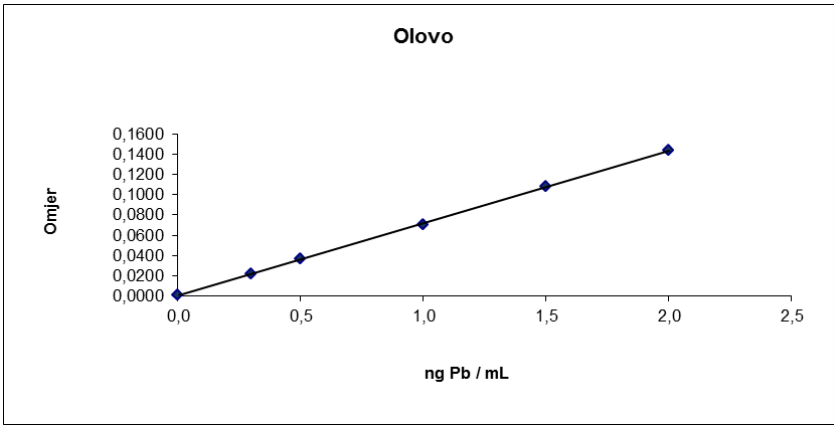
Srednja vrijednost	0,51
SD	0
RSD(%)	**2**

Tablica 20: Rezultati mjerenja ponovljivosti za kadmij

Koeficijent korelacije za kadmij iznosi 0,9994 što zadovoljava kriterij prihvatljivosti za linearnost. Analitički prinos i RSD vrijednost zadovoljavaju kriterije za granica određivanja i točnost. RSD vrijednost zadovoljava kriterij prihvatljivosti za preciznost i ponovljivost. Svi kriteriji su zadovoljeni stoga je metoda izvrsna za određivanje kadmija.

4.2.2 OLOVO

LINEARNOST



c (ng/mL)	Omjer
0,00	0,0011
0,30	0,0218
0,50	0,0363
1,00	0,0704
1,50	0,1079
2,00	0,1442

Nagib (a)	0,0711
Odsjek (b)	0,0011
Koeficijent korelacije	0,9999

Slika 6: Rezultati mjerenja linearnosti za olovo

TOČNOST

Level	Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*c* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)	RSD (%)
Level 0	ACC-1	99,73	0	0,000	0,00	0,00	-	-
	ACC-2	100,74		0,000	0,00			
	ACC-3	100,55		0,011	0,01			
Level 1	ACC-4	99,04	0,25	0,527	0,26	0,25	99	5
	ACC-5	99,12		0,485	0,24			
	ACC-6	99,83		0,486	0,24			
Level 2	ACC-7	100,99	0,50	0,986	0,49	0,50	100	1
	ACC-8	99,41		1,009	0,50			
	ACC-9	101,79		1,005	0,50			
Level 3	ACC-10	98,99	0,75	1,503	0,75	0,75	100	0
	ACC-11	100,25		1,498	0,75			
	ACC-12	99,42		1,512	0,76			

Tablica 21: Rezultati mjerenja točnosti za olovo

GRANICA ODREĐIVANJA

Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*C* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)			
ACC-1	99,73	0,00	0,000	0,00	0,00	-			
ACC-2	100,74		0,000	0,00		-			
ACC-3	100,55		0,011	0,01		-			
							Prosječna vrijednost	SD	RSD (%)
QL-1	100,53	0,15	0,314	0,16	0,16	104	105	0,0	3
QL-2	99,93		0,314	0,16		103			
QL-3	98,83		0,340	0,17		112			
QL-4	102,70		0,320	0,16		105			
QL-5	99,84		0,309	0,15		102			
QL-6	100,27		0,320	0,16		105			

Tablica 22: Rezultati mjerenja granica određivanja za olovo

PRECIZNOST

Oznaka	*m* (mg)	*c* (ng/mL)	ppm	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)
PRE-1	100,38	1,004	0,50	0,50	0	0
PRE-2	100,44	0,996	0,50			
PRE-3	99,93	0,999	0,50			
PRE-4	99,54	1,004	0,50			
PRE-5	99,84	1,002	0,50			
PRE-6	100,53	1,009	0,50			

Tablica 23: Rezultati mjerenja preciznosti za olovo

PONOVLJIVOST

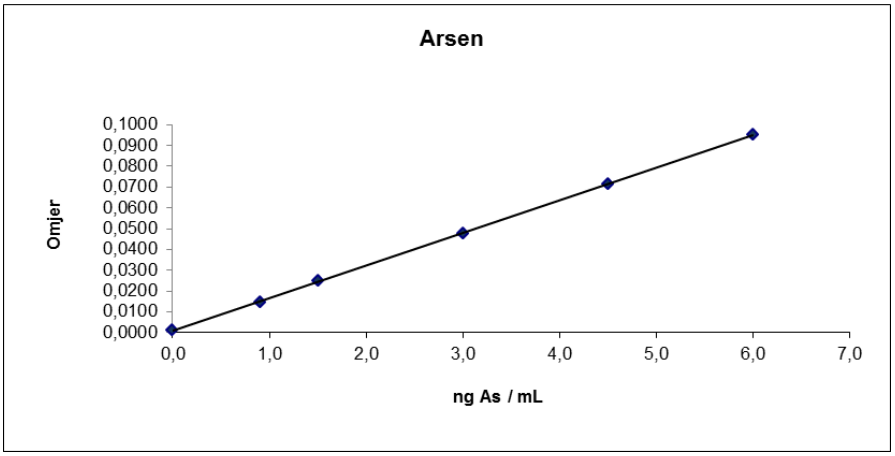
Srednja vrijednost	0,50
SD	0
RSD(%)	**1**

Tablica 24: Rezultati mjerenja ponovljivosti za olovo

Koeficijent korelacije za olovo iznosi 0,9999 što zadovoljava kriterij prihvatljivosti za linearnost. Analitički prinos i RSD vrijednost zadovoljavaju kriterije za granica određivanja i točnost. RSD vrijednost zadovoljava kriterij prihvatljivosti za preciznost i ponovljivost. Svi kriteriji su zadovoljeni stoga je metoda izvrsna za određivanje olovo.

4.2.3 ARSEN

LINEARNOST



c (ng/mL)	Omjer
0,00	0,0011
0,90	0,0145
1,50	0,0248
3,00	0,0475
4,50	0,0713
6,00	0,0951

Nagib (a)	0,0156
Odsjek (b)	0,0011
Koeficijent korelacije	1,0000

Slika 7: Rezultati mjerenja linearnosti za arsen

TOČNOST

Level	Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*c* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)	RSD (%)
Level 0	ACC-1	99,73	0	0,000	0,00	0,00	-	-
	ACC-2	100,74		0,000	0,00			
	ACC-3	100,55		0,005	0,00			
Level 1	ACC-4	99,04	0,75	1,493	0,75	0,75	100	2
	ACC-5	99,12		1,489	0,74			
	ACC-6	99,83		1,531	0,77			
Level 2	ACC-7	100,99	1,50	2,996	1,50	1,51	101	2
	ACC-8	99,41		3,077	1,54			
	ACC-9	101,79		2,997	1,50			
Level 3	ACC-10	98,99	2,25	4,485	2,24	2,25	100	0
	ACC-11	100,25		4,503	2,25			
	ACC-12	99,42		4,518	2,26			

Tablica 25: Rezultati mjerenja točnosti za arsen

GRANICA ODREĐIVANJA

Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*C* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)			
ACC-1	99,73	0,00	0,000	0,00	0,00	-			
ACC-2	100,74		0,000	0,00		-			
ACC-3	100,55		0,005	0,00		-			
							Prosječna vrijednost	SD	RSD (%)
QL-1	100,53	0,45	0,937	0,47	0,47	104	105	0,0	2
QL-2	99,93		0,968	0,48		107			
QL-3	98,83		0,953	0,48		106			
QL-4	102,70		0,944	0,47		105			
QL-5	99,84		0,924	0,46		103			
QL-6	100,27		0,944	0,47		105			

Tablica 26: Rezultati mjerenja granica određivanja za arsen

PRECIZNOST

Oznaka	*m* (mg)	*c* (ng/mL)	ppm	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)
PRE-1	100,38	3,062	1,53	1,53	0	1
PRE-2	100,44	3,032	1,52			
PRE-3	99,93	3,091	1,55			
PRE-4	99,54	3,088	1,54			
PRE-5	99,84	3,018	1,51			
PRE-6	100,53	3,044	1,52			

Tablica 27: Rezultati mjerenja preciznosti za arsen

PONOVLJIVOST

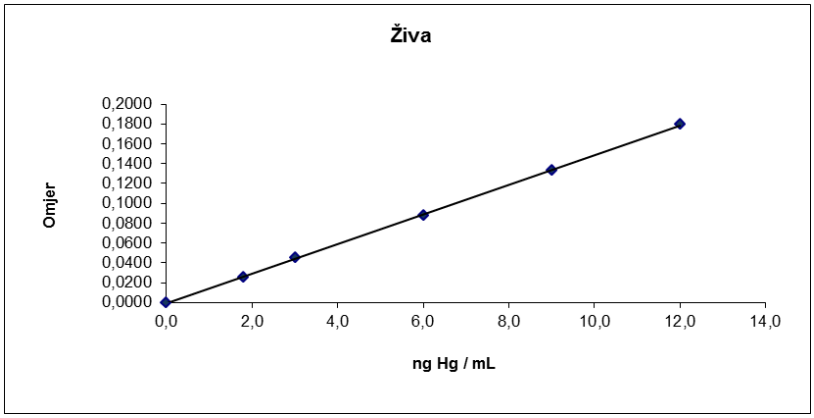
Srednja vrijednost	1,52
SD	0
RSD(%)	**1**

Tablica 28: Rezultati mjerenja ponovljivosti za arsen

Koeficijent korelacije za arsen iznosi 1,0000 što zadovoljava kriterij prihvatljivosti za linearnost. Analitički prinos i RSD vrijednost zadovoljavaju kriterije za granica određivanja i točnost. RSD vrijednost zadovoljava kriterij prihvatljivosti za preciznost i ponovljivost. Svi kriteriji su zadovoljeni stoga je metoda izvrsna za određivanje arsena.

4.2.4 ŽIVA

LINEARNOST



c (ng/mL)	Omjer
0,0	0,0002
1,8	0,0258
3,0	0,0455
6,0	0,0876
9,0	0,1334
12,0	0,1797

Nagib (a)	0,0149
Odsjek (b)	0,0002
Koeficijent korelacije	0,9999

Slika 8: Rezultati mjerenja linearnosti za živu

TOČNOST

Level	Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*c* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)	RSD (%)
Level 0	ACC-1	99,73	0,0	0,000	0,0	0,0	-	-
	ACC-2	100,74		0,000	0,0			
	ACC-3	100,55		0,000	0,0			
Level 1	ACC-4	99,04	1,5	2,921	1,5	1,5	98	0
	ACC-5	99,12		2,942	1,5			
	ACC-6	99,83		2,948	1,5			
Level 2	ACC-7	100,99	3,0	5,869	2,9	3,0	100	2
	ACC-8	99,41		6,098	3,0			
	ACC-9	101,79		6,004	3,0			
Level 3	ACC-10	98,99	4,5	9,006	4,5	4,5	100	1
	ACC-11	100,25		8,989	4,5			
	ACC-12	99,42		9,108	4,6			

Tablica 29: Rezultati mjerenja točnosti za živu

GRANICA ODREĐIVANJA

Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*C* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)			
ACC-1	99,73	0,00	0,000	0,00	0,00	-			
ACC-2	100,74		0,000	0,00		-			
ACC-3	100,55		0,000	0,00		-			
							Prosječna vrijednost	SD	RSD (%)
QL-1	100,53	0,9	1,912	1,0	0,9	106	104	0,0	2
QL-2	99,93		1,887	0,9		105			
QL-3	98,83		1,923	1,0		107			
QL-4	102,70		1,881	0,9		104			
QL-5	99,84		1,837	0,9		102			
QL-6	100,27		1,827	0,9		101			

Tablica 30: Rezultati mjerenja granice određivanja za živu

PRECIZNOST

Oznaka	*m* (mg)	*c*(ng/mL)	ppm	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)
PRE-1	100,38	6,048	3,0	3,0	0	1
PRE-2	100,44	6,012	3,0			
PRE-3	99,93	6,007	3,0			
PRE-4	99,54	6,088	3,0			
PRE-5	99,84	6,078	3,0			
PRE-6	100,53	6,069	3,0			

Tablica 31: Rezultati mjerenja preciznosti za živu

PONOVLJIVOST

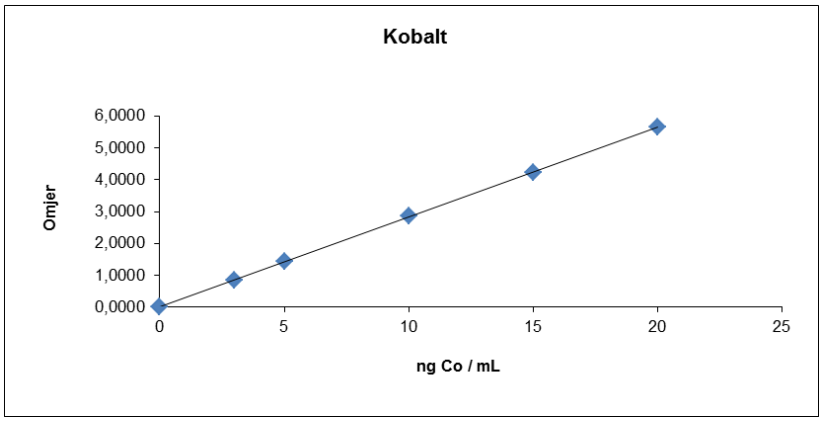
Srednja vrijednost	3,0
SD	0
RSD(%)	**1**

Tablica 32: Rezultati mjerenja ponovljivosti za živu

Koeficijent korelacije za živu iznosi 0,9999 što zadovoljava kriterij prihvatljivosti za linearnost. Analitički prinos i RSD vrijednost zadovoljavaju kriterije za granica određivanja i točnost. RSD vrijednost zadovoljava kriterij prihvatljivosti za preciznost i ponovljivost. Svi kriteriji su zadovoljeni stoga je metoda izvrsna za određivanje žive

4.2.5 KOBALT

LINEARNOST



c (ng/mL)	Omjer
0,0	0,0006
3,0	0,8335
5,0	1,4459
10,0	2,8599
15,0	4,2169
20,0	5,6614

Nagib (a)	0,2830
Odsjek (b)	0,0006
Koeficijent korelacije	0,9999

Slika 9: Rezultati mjerenja linearnosti za kobalt

TOČNOST

Level	Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*c* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)	RSD (%)
Level 0	ACC-1	99,73	0,0	0,000	0,0	0,0	-	-
	ACC-2	100,74		0,000	0,0			
	ACC-3	100,55		0,000	0,0			
Level 1	ACC-4	99,04	2,5	5,074	2,5	2,5	102	1
	ACC-5	99,12		5,129	2,6			
	ACC-6	99,83		5,060	2,5			
Level 2	ACC-7	100,99	5,0	10,161	5,1	5,1	101	0
	ACC-8	99,41		10,168	5,1			
	ACC-9	101,79		10,081	5,0			
Level 3	ACC-10	98,99	7,5	15,058	7,5	7,5	100	1
	ACC-11	100,25		14,842	7,4			
	ACC-12	99,42		15,107	7,6			

Tablica 33: Rezultati mjerenja točnosti za kobalt

GRANICA ODREĐIVANJA

Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*C* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)			
ACC-1	99,73	0,00	0,000	0,00	0,00	-			
ACC-2	100,74		0,000	0,00		-			
ACC-3	100,55		0,000	0,00		-			
							Prosječna vrijednost	SD	RSD (%)
QL-1	100,53	1,5	3,250	1,6	1,6	108	107	0,0	2
QL-2	99,93		3,252	1,6		108			
QL-3	98,83		3,261	1,6		109			
QL-4	102,70		3,213	1,6		107			
QL-5	99,84		3,124	1,6		104			
QL-6	100,27		3,174	1,6		106			

Tablica 34: Rezultati mjerenja granice određivanja za kobalt

PRECIZNOST

Oznaka	*m* (mg)	*c* (ng/mL)	ppm	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)
PRE-1	100,38	10,252	5,1	5,1	0	1
PRE-2	100,44	10,134	5,1			
PRE-3	99,93	9,992	5,0			
PRE-4	99,54	10,205	5,1			
PRE-5	99,84	10,174	5,1			
PRE-6	100,53	10,191	5,1			

Tablica 35: Rezultati mjerenja preciznosti za kobalt

PONOVLJIVOST

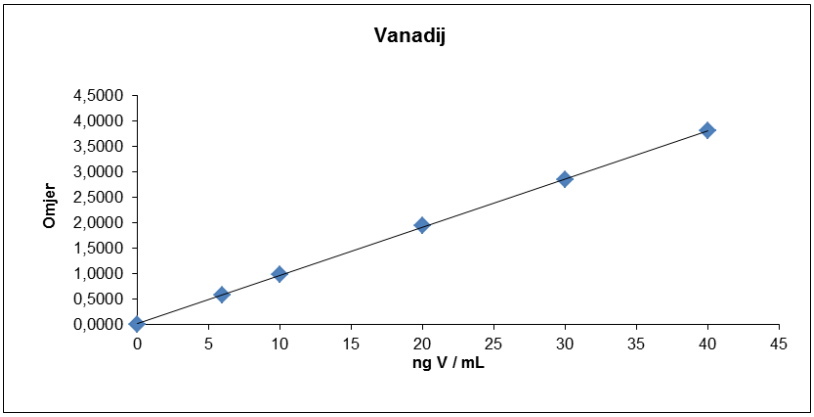
Srednja vrijednost	5,1
SD	0
RSD(%)	**1**

Tablica 36: Rezultati mjerenja ponovljivosti za kobalt

Koeficijent korelacije za kobalt iznosi 0,9999 što zadovoljava kriterij prihvatljivosti za linearnost. Analitički prinos i RSD vrijednost zadovoljavaju kriterije za granica određivanja i točnost. RSD vrijednost zadovoljava kriterij prihvatljivosti za preciznost i ponovljivost. Svi kriteriji su zadovoljeni stoga je metoda izvrsna za određivanje kobalta.

4.2.6 VANADIJ

LINEARNOST



Nagib (a)	0,0954
Odsjek (b)	0,0060
Koeficijent korelacije	1,0000

c (ng/mL)	Omjer
0	0,0060
6	0,5826
10	0,9800
20	1,9377
30	2,8497
40	3,8179

Slika 10: Rezultati mjerenja linearnosti za vanadij

TOČNOST

Level	Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*c* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)	RSD (%)
Level 0	ACC-1	99,73	0	0,003	0	0	-	-
	ACC-2	100,74		0,017	0			
	ACC-3	100,55		0,034	0			
Level 1	ACC-4	99,04	5	10,008	5	5	100	0
	ACC-5	99,12		9,984	5			
	ACC-6	99,83		10,040	5			
Level 2	ACC-7	100,99	10	19,926	10	10	100	0
	ACC-8	99,41		20,055	10			
	ACC-9	101,79		19,922	10			
Level 3	ACC-10	98,99	15	29,477	15	15	99	1
	ACC-11	100,25		30,119	15			
	ACC-12	99,42		30,005	15			

Tablica 37: Rezultati mjerenja točnosti za vanadij

GRANICA ODREĐIVANJA

Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*C*(ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)			
ACC-1	99,73	0,00	0,003	0,00	0,00	-			
ACC-2	100,74		0,017	0,00		-			
ACC-3	100,55		0,034	0,00		-			
							Prosječna vrijednost	SD	RSD (%)
QL-1	100,53	3	6,296	3	3	105	105	0,1	2
QL-2	99,93		6,444	3		107			
QL-3	98,83		6,412	3		107			
QL-4	102,70		6,299	3		105			
QL-5	99,84		6,191	3		103			
QL-6	100,27		6,218	3		103			

Tablica 38: Rezultati mjerenja granice određivanja za vanadij

PRECIZNOST

Oznaka	*m* (mg)	*c* (ng/mL)	ppm	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)
PRE-1	100,38	20,284	10	10	0	1
PRE-2	100,44	20,147	10			
PRE-3	99,93	20,264	10			
PRE-4	99,54	20,199	10			
PRE-5	99,84	20,117	10			
PRE-6	100,53	19,809	10			

Tablica 39: Rezultati mjerenja preciznost za vanadij

PONOVLJIVOST

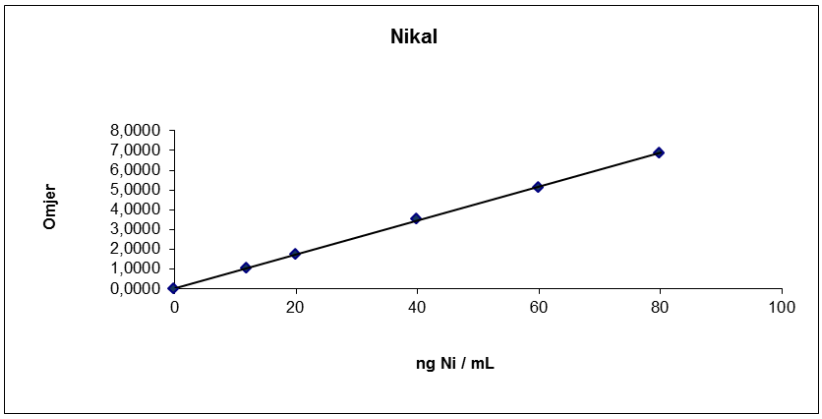
Srednja vrijednost	10
SD	0
RSD(%)	**1**

Tablica 40: Rezultati mjerenja ponovljivosti za vanadij

Koeficijent korelacije za vanadij iznosi 1,000 što zadovoljava kriterij prihvatljivosti za linearnost. Analitički prinos i RSD vrijednost zadovoljavaju kriterije za granica određivanja i točnost. RSD vrijednost zadovoljava kriterij prihvatljivosti za preciznost i ponovljivost. Svi kriteriji su zadovoljeni stoga je metoda izvrsna za određivanje vanadija.

4.2.7 NIKAL

LINEARNOST



c (ng/mL)	Omjer
0	0,0027
12	1,0311
20	1,7231
40	3,5211
60	5,1389
80	6,8934

Nagib (a)	0,0862
Odsjek (b)	0,0027
Koeficijent korelacije	0,9999

Slika 11: Rezultati mjerenja linearnosti za nikal

TOČNOST

Level	Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*c* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)	RSD (%)
Level 0	ACC-1	99,73	0	0,000	0	0	-	-
	ACC-2	100,74		0,000	0			
	ACC-3	100,55		1,070	1			
Level 1	ACC-4	99,04	10	23,109	12	11	103	9
	ACC-5	99,12		20,038	10			
	ACC-6	99,83		19,942	10			
Level 2	ACC-7	100,99	20	40,256	20	20	99	1
	ACC-8	99,41		40,050	20			
	ACC-9	101,79		39,418	20			
Level 3	ACC-10	98,99	30	59,326	30	30	99	0
	ACC-11	100,25		59,526	30			
	ACC-12	99,42		59,749	30			

Tablica 41: Rezultati mjerenja točnosti za nikal

GRANICA ODREĐIVANJA

Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*C* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)			
ACC-1	99,73	0,00	0,000	0	0,00	-			
ACC-2	100,74		0,000	0		-			
ACC-3	100,55		1,070	1		-			
							Prosječna vrijednost	SD	RSD (%)
QL-1	100,53	6	12,963	6	7	105	105	0,2	4
QL-2	99,93		12,930	6		105			
QL-3	98,83		13,740	7		112			
QL-4	102,70		12,753	6		103			
QL-5	99,84		12,385	6		100			
QL-6	100,27		12,963	6		105			

Tablica 42: Rezultati mjerenja granice određivanja za nikal

PRECIZNOST

Oznaka	*m* (mg)	*c* (ng/mL)	ppm	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)
PRE-1	100,38	40,177	20	20	0	1
PRE-2	100,44	39,859	20			
PRE-3	99,93	40,308	20			
PRE-4	99,54	40,363	20			
PRE-5	99,84	39,392	20			
PRE-6	100,53	40,023	20			

Tablica 43: Rezultati mjerenja preciznosti za nikal

PONOVLJIVOST

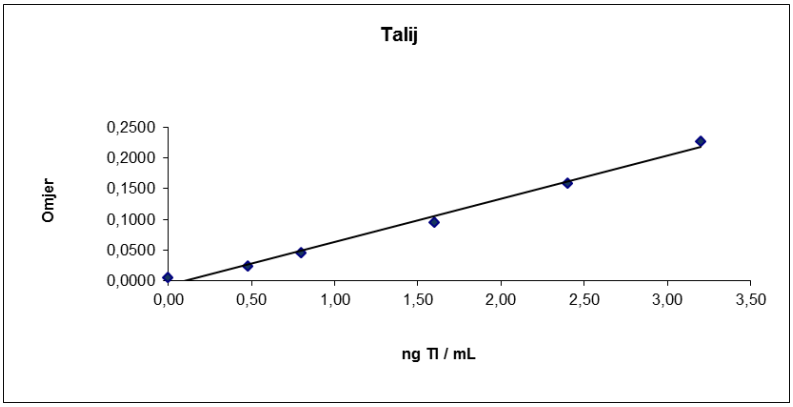
Srednja vrijednost	20
SD	0
RSD(%)	**1**

Tablica 44: Rezultati mjerenja ponovljivosti za nikal

Koeficijent korelacije za nikal iznosi 0,9999 što zadovoljava kriterij prihvatljivosti za linearnost. Analitički prinos i RSD vrijednost zadovoljavaju kriterije za granica određivanja i točnost. RSD vrijednost zadovoljava kriterij prihvatljivosti za preciznost i ponovljivost. Svi kriteriji su zadovoljeni stoga je metoda izvrsna za određivanje nikla.

4.2.8 TALIJ

LINEARNOST



c (ng/mL)	Omjer
0,00	0,0047
0,48	0,0234
0,80	0,0448
1,60	0,0953
2,40	0,1591
3,20	0,2272

Nagib (a)	0,0653
Odsjek (b)	0,0047
Koeficijent korelacije	0,9952

Slika 12: Rezultati mjerenja linearnosti za talij

TOČNOST

Level	Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*c* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)	RSD (%)
Level 0	ACC-1	99,73	0,00	0,000	0,00	0,00	-	-
	ACC-2	100,74		0,000	0,00			
	ACC-3	100,55		0,000	0,00			
Level 1	ACC-4	99,04	0,40	0,737	0,37	0,37	93	1
	ACC-5	99,12		0,748	0,37			
	ACC-6	99,83		0,756	0,38			
Level 2	ACC-7	100,99	0,80	1,521	0,76	0,78	98	2
	ACC-8	99,41		1,590	0,79			
	ACC-9	101,79		1,576	0,79			
Level 3	ACC-10	98,99	1,20	2,368	1,18	1,19	99	1
	ACC-11	100,25		2,383	1,19			
	ACC-12	99,42		2,396	1,20			

Tablica 45: Rezultati mjerenja točnosti za talij

GRANICA ODREĐIVANJA

Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*C* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)			
ACC-1	99,73	0,00	0,000	0,00	0,00	-			
ACC-2	100,74		0,000	0,00		-			
ACC-3	100,55		0,000	0,00		-			
							Prosječna vrijednost	SD	RSD (%)
QL-1	100,53	0,24	0,495	0,25	0,24	103	101	0,0	3
QL-2	99,93		0,486	0,24		101			
QL-3	98,83		0,495	0,25		103			
QL-4	102,70		0,488	0,24		102			
QL-5	99,84		0,470	0,24		98			
QL-6	100,27		0,462	0,23		96			

Tablica 46: Rezultati mjerenja granice određivanja za talij

PRECIZNOST

Oznaka	*m* (mg)	*c* (ng/mL)	ppm	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)
PRE-1	100,38	1,581	0,79	0,80	0	1
PRE-2	100,44	1,588	0,79			
PRE-3	99,93	1,608	0,80			
PRE-4	99,54	1,609	0,80			
PRE-5	99,84	1,584	0,79			
PRE-6	100,53	1,586	0,79			

Tablica 47: Rezultati mjerenja preciznosti za talij

PONOVLJIVOST

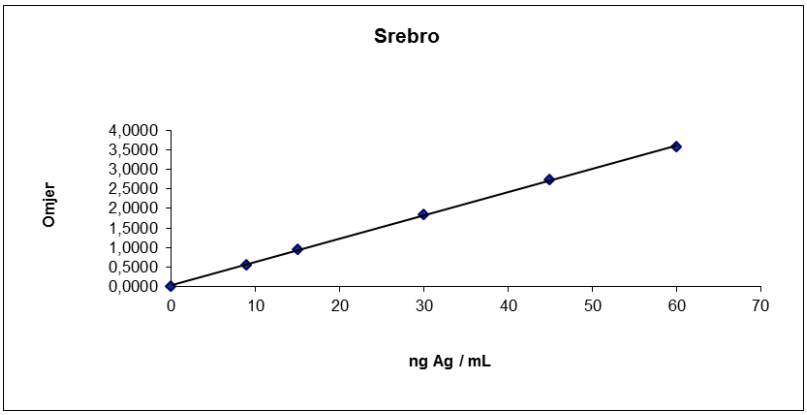
Srednja vrijednost	0,79
SD	0
RSD(%)	**2**

Tablica 48: Rezultati mjerenja ponovljivosti za talij

Koeficijent korelacije za talij iznosi 0,9952 što je nešto lošija vrijednost ali zadovoljava kriterij prihvatljivosti za linearnost. Analitički prinos i RSD vrijednost zadovoljavaju kriterije za granica određivanja i točnost. RSD vrijednost zadovoljava kriterij prihvatljivosti za preciznost i ponovljivost. Svi kriteriji su zadovoljeni stoga je metoda pogodna za određivanje talija.

4.2.9 SREBRO

LINEARNOST



c (ng/mL)	Omjer
0,0	0,0001
9,0	0,5458
15,0	0,9387
30,0	1,8461
45,0	2,7439
60,0	3,5812

Nagib (a)	0,0604
Odsjek (b)	0,0001
Koeficijent korelacije	0,9998

Slika 13: Rezultati mjerenja linearnosti za srebro

TOČNOST

Level	Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*c* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)	RSD (%)
Level 0	ACC-1	99,73	0,0	0,000	0,0	0,0	-	-
	ACC-2	100,74		0,000	0,0			
	ACC-3	100,55		0,000	0,0			
Level 1	ACC-4	99,04	7,5	14,496	7,2	7,3	97	1
	ACC-5	99,12		14,640	7,3			
	ACC-6	99,83		14,732	7,4			
Level 2	ACC-7	100,99	15,0	29,862	14,9	15,2	101	2
	ACC-8	99,41		30,979	15,5			
	ACC-9	101,79		30,274	15,1			
Level 3	ACC-10	98,99	22,5	44,700	22,4	22,4	100	1
	ACC-11	100,25		44,375	22,2			
	ACC-12	99,42		45,407	22,7			

Tablica 49: Rezultati mjerenja točnosti za srebro

GRANICA ODREĐIVANJA

Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*C* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)			
ACC-1	99,73	0,00	0,000	0,00	0,00	-			
ACC-2	100,74		0,000	0,00		-			
ACC-3	100,55		0,000	0,00		-			
							Prosječna vrijednost	SD	RSD (%)
QL-1	100,53	4,5	9,440	4,7	4,7	105	104	0,1	1
QL-2	99,93		9,368	4,7		104			
QL-3	98,83		9,414	4,7		105			
QL-4	102,70		9,441	4,7		105			
QL-5	99,84		9,204	4,6		102			
QL-6	100,27		9,118	4,6		101			

Tablica 50: Rezultati mjerenja granice određivanja za srebro

PRECIZNOST

Oznaka	*m* (mg)	*c* (ng/mL)	ppm	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)
PRE-1	100,38	30,387	15,2	15,2	0	1
PRE-2	100,44	29,811	14,9			
PRE-3	99,93	30,194	15,1			
PRE-4	99,54	30,808	15,4			
PRE-5	99,84	30,747	15,4			
PRE-6	100,53	30,356	15,2			

Tablica 51: Rezultati mjerenja preciznosti za srebro

PONOVLJIVOST

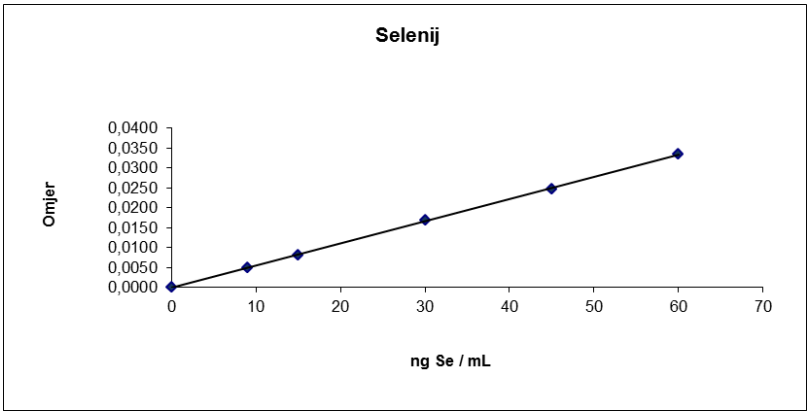
Srednja vrijednost	15,2
SD	0
RSD(%)	**1**

Tablica 52: Rezultati mjerenja ponovljivosti za srebro

Koeficijent korelacije za srebro iznosi 0,9998 što zadovoljava kriterij prihvatljivosti za linearnost. Analitički prinos i RSD vrijednost zadovoljavaju kriterije za granica određivanja i točnost. RSD vrijednost zadovoljava kriterij prihvatljivosti za preciznost i ponovljivost. Svi kriteriji su zadovoljeni stoga je metoda izvrsna za određivanje srebra.

4.2.10 SELENIJ

LINEARNOST



c (ng/mL)	Omjer
0,0	0,0002
9,0	0,0051
15,0	0,0082
30,0	0,0169
45,0	0,0247
60,0	0,0335

Nagib (a)	0,0006
Odsjek (b)	0,0002
Koeficijent korelacije	0,9999

Slika 14: Rezultati mjerenja linearnosti za selenij

TOČNOST

Level	Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*c* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)	RSD (%)
Level 0	ACC-1	99,73	0,0	0,000	0,0	0,0	-	-
	ACC-2	100,74		0,000	0,0			
	ACC-3	100,55		0,000	0,0			
Level 1	ACC-4	99,04	7,5	15,199	7,6	7,4	99	2
	ACC-5	99,12		14,482	7,2			
	ACC-6	99,83		14,901	7,5			
Level 2	ACC-7	100,99	15,0	30,503	15,3	15,0	100	2
	ACC-8	99,41		30,045	15,0			
	ACC-9	101,79		29,515	14,8			
Level 3	ACC-10	98,99	22,5	44,258	22,1	22,4	100	1
	ACC-11	100,25		45,240	22,6			
	ACC-12	99,42		45,089	22,5			

Tablica 53: Rezultati mjerenja točnosti za selenij

GRANICA ODREĐIVANJA

Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*C* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)			
ACC-1	99,73	0,00	0,000	0,00	0,00	-			
ACC-2	100,74		0,000	0,00		-			
ACC-3	100,55		0,000	0,00		-			
							Prosječna vrijednost	SD	RSD (%)
QL-1	100,53	4,5	9,036	4,5	4,7	100	103	0,2	5
QL-2	99,93		9,896	4,9		110			
QL-3	98,83		9,148	4,6		102			
QL-4	102,70		8,677	4,3		96			
QL-5	99,84		9,579	4,8		106			
QL-6	100,27		9,468	4,7		105			

Tablica 54: Rezultati mjerenja granice određivanja za selenij

PRECIZNOST

Oznaka	*m* (mg)	*c* (ng/mL)	ppm	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)
PRE-1	100,38	30,193	15,1	15,3	0	1
PRE-2	100,44	30,863	15,4			
PRE-3	99,93	30,654	15,3			
PRE-4	99,54	30,441	15,2			
PRE-5	99,84	30,434	15,2			
PRE-6	100,53	30,745	15,4			

Tablica 55: Rezultati mjerenja preciznosti za selenij

PONOVLJIVOST

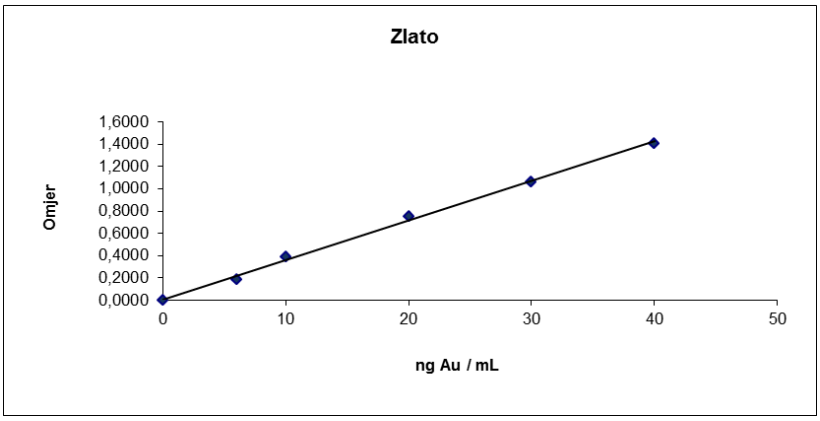
Srednja vrijednost	15,1
SD	0
RSD(%)	**1**

Tablica 56: Rezultati mjerenja ponovljivosti za selenij

Koeficijent korelacije za selenij iznosi 0,9999 što zadovoljava kriterij prihvatljivosti za linearnost. Analitički prinos i RSD vrijednost zadovoljavaju kriterije za granica određivanja i točnost. RSD vrijednost zadovoljava kriterij prihvatljivosti za preciznost i ponovljivost. Svi kriteriji su zadovoljeni stoga je metoda izvrsna za određivanje selenija.

4.2.11 ZLATO

LINEARNOST



c (ng/mL)	Omjer
0	0,0002
6	0,1870
10	0,3886
20	0,7525
30	1,0645
40	1,4102

Nagib (a)	0,0357
Odsjek (b)	0,0002
Koeficijent korelacije	0,9988

Slika 15: Rezultati mjerenja linearnosti za zlato

TOČNOST

Level	Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*c* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)	RSD (%)
Level 0	ACC-1	99,73	0	0,000	0	0	-	-
	ACC-2	100,74		0,000	0			
	ACC-3	100,55		0,000	0			
Level 1	ACC-4	99,04	5	8,131	4	4	84	3
	ACC-5	99,12		8,453	4			
	ACC-6	99,83		8,628	4			
Level 2	ACC-7	100,99	10	17,249	9	9	90	4
	ACC-8	99,41		18,454	9			
	ACC-9	101,79		18,549	9			
Level 3	ACC-10	98,99	15	21,622	11	11	73	4
	ACC-11	100,25		21,280	11			
	ACC-12	99,42		22,915	11			

Tablic 57: Rezultati mjerenja točnosti za zlato

GRANICA ODREĐIVANJA

Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*C* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)			
ACC-1	99,73	0,00	0,000	0,00	0,00	-			
ACC-2	100,74		0,000	0,00		-			
ACC-3	100,55		0,000	0,00		-			
							Prosječna vrijednost	SD	RSD (%)
QL-1	100,53	3	6,103	3	3	102	98	0,2	7
QL-2	99,93		6,122	3		102			
QL-3	98,83		6,208	3		103			
QL-4	102,70		6,140	3		102			
QL-5	99,84		5,232	3		87			
QL-6	100,27		5,505	3		92			

Tablica 58: Rezultati mjerenja granice određivanja za zlato

PRECIZNOST

Oznaka	*m* (mg)	*c* (ng/mL)	ppm	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)
PRE-1	100,38	14,699	7	9	1	9
PRE-2	100,44	18,400	9			
PRE-3	99,93	17,357	9			
PRE-4	99,54	17,681	9			
PRE-5	99,84	18,671	9			
PRE-6	100,53	18,841	9			

Tablica59: Rezultati mjerenja preciznosti za zlato

PONOVLJIVOST

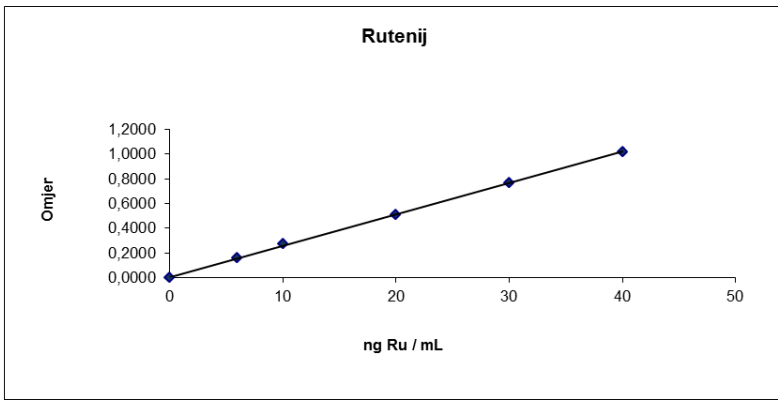
Srednja vrijednost	9
SD	1
RSD(%)	**7**

Tablica 60: Rezultati mjerenja ponovljivosti za zlato

Koeficijent korelacije za zlato iznosi 0,9988 što zadovoljava kriterij prihvatljivosti za linearnost. Analitički prinos i RSD vrijednost zadovoljavaju kriterije za granica određivanja. Analitički prinos kod mjerenja točnosti je na granici prihvatljivosti. RSD vrijednost zadovoljava kriterij prihvatljivosti za preciznost i ponovljivost. Svi kriteriji su zadovoljeni stoga je metoda pogodna za određivanje zlata.

4.2.12 RUTENIJ

LINEARNOST



c (ng/mL)	Omjer
0	0,0000
6	0,1563
10	0,2696
20	0,5046
30	0,7689
40	1,0205

Nagib (a)	0,0256
Odsjek (b)	0,0000
Koeficijent korelacije	0,9999

Slika 16: Rezultati mjerenja linearnosti za rutenij

TOČNOST

Level	Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*c* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)	RSD (%)
Level 0	ACC-1	99,73	0	0,000	0	0	-	-
	ACC-2	100,74		0,000	0			
	ACC-3	100,55		0,000	0			
Level 1	ACC-4	99,04	5	9,936	5	5	100	1
	ACC-5	99,12		9,939	5			
	ACC-6	99,83		10,195	5			
Level 2	ACC-7	100,99	10	20,428	10	10	103	1
	ACC-8	99,41		20,652	10			
	ACC-9	101,79		20,427	10			
Level 3	ACC-10	98,99	15	30,524	15	15	101	1
	ACC-11	100,25		30,138	15			
	ACC-12	99,42		30,271	15			

Tablica 61: Rezultati mjerenja točnosti za rutenij

GRANICA ODREĐIVANJA

Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*C* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)			
ACC-1	99,73	0,00	0,000	0,00	0,00	-			
ACC-2	100,74		0,000	0,00		-			
ACC-3	100,55		0,000	0,00		-			
							Prosječna vrijednost	SD	RSD (%)
QL-1	100,53	3	6,346	3	3	106	105	0,1	2
QL-2	99,93		6,292	3		105			
QL-3	98,83		6,411	3		107			
QL-4	102,70		6,435	3		107			
QL-5	99,84		6,184	3		103			
QL-6	100,27		6,112	3		102			

Tablica 62: Rezultati mjerenja granice određivanja za rutenij

PRECIZNOST

Oznaka	*m* (mg)	*c* (ng/mL)	ppm	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)
PRE-1	100,38	20,123	10	10	0	0
PRE-2	100,44	20,330	10			
PRE-3	99,93	20,185	10			
PRE-4	99,54	20,325	10			
PRE-5	99,84	20,284	10			
PRE-6	100,53	20,227	10			

Tablica 63: Rezultati mjerenja preciznosti za rutenij

PONOVLJIVOST

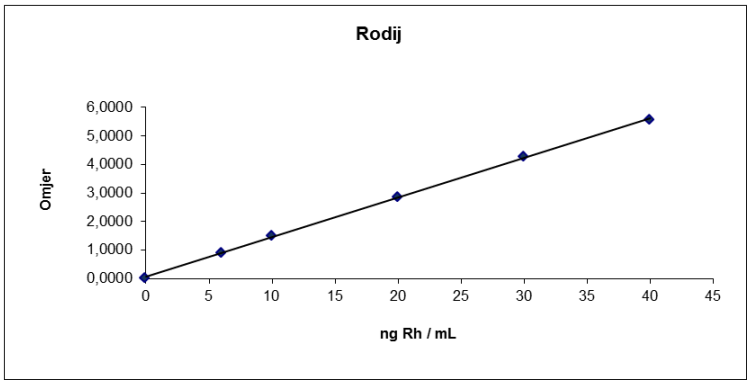
Srednja vrijednost	10
SD	0
RSD(%)	**1**

Tablica 64: Rezultati mjerenja ponovljivosti za rutenij

Koeficijent korelacije za rutenij iznosi 0,9999 što zadovoljava kriterij prihvatljivosti za linearnost. Analitički prinos i RSD vrijednost zadovoljavaju kriterije za granica određivanja i točnost. RSD vrijednost zadovoljava kriterij prihvatljivosti za preciznost i ponovljivost. Svi kriteriji su zadovoljeni stoga je metoda izvrsna za određivanje rutenija.

4.2.13 RODIJ

LINEARNOST



c (ng/mL)	Omjer
0	0,0088
6	0,8892
10	1,5041
20	2,8501
30	4,2758
40	5,5670

Nagib (a)	0,1408
Odsjek (b)	0,0088
Koeficijent korelacije	0,9998

Slika 17: Rezultati mjerenja linearnosti za rodij

TOČNOST

Level	Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*c* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)	RSD (%)
Level 0	ACC-1	99,73	0	0,000	0,0	0	-	-
	ACC-2	100,74		0,000	0,0			
	ACC-3	100,55		0,000	0,0			
Level 1	ACC-4	99,04	5	10,230	1,5	5	102	0
	ACC-5	99,12		10,219	1,5			
	ACC-6	99,83		10,256	1,5			
Level 2	ACC-7	100,99	10	20,417	2,9	10	103	1
	ACC-8	99,41		20,894	3,0			
	ACC-9	101,79		20,596	3,0			
Level 3	ACC-10	98,99	15	30,480	4,5	15	101	0
	ACC-11	100,25		30,217	4,5			
	ACC-12	99,42		30,372	4,6			

Tablica 65: Rezultati mjerenja točnosti za rodij

GRANICA ODREĐIVANJA

Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*C* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)			
ACC-1	99,73	0,00	0,000	0,00	0,00	-			
ACC-2	100,74		0,000	0,00		-			
ACC-3	100,55		0,000	0,00		-			
							Prosječna vrijednost	SD	RSD (%)
QL-1	100,53	3	6,301	3	3	105	104	0,0	1
QL-2	99,93		6,287	3		105			
QL-3	98,83		6,323	3		105			
QL-4	102,70		6,302	3		105			
QL-5	99,84		6,154	3		103			
QL-6	100,27		6,104	3		102			

Tablica 66: Rezultati mjerenja granice određivanja za rodij

PRECIZNOST

Oznaka	*m* (mg)	*c* (ng/mL)	ppm	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)
PRE-1	100,38	20,256	10	10	0	1
PRE-2	100,44	20,270	10			
PRE-3	99,93	20,394	10			
PRE-4	99,54	20,604	10			
PRE-5	99,84	20,584	10			
PRE-6	100,53	20,360	10			

Tablica 67: Rezultati mjerenja preciznosti za rodij

PONOVLJIVOST

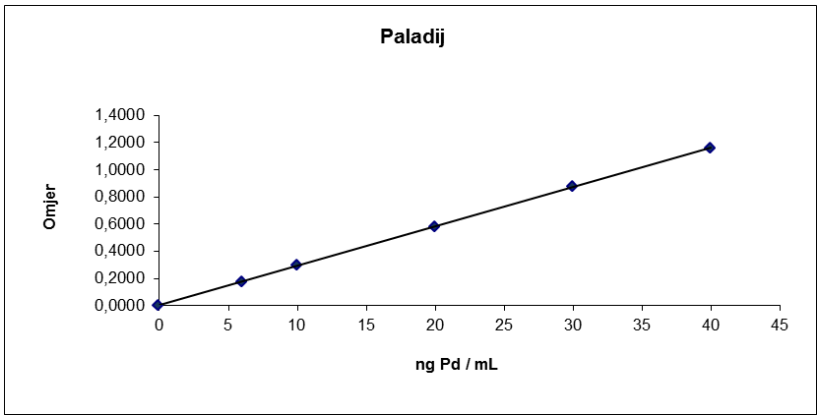
Srednja vrijednost	10
SD	0
RSD(%)	**1**

Tablica 68: Rezultati mjerenja ponovljivosti za rodij

Koeficijent korelacije za rodij iznosi 0,9998 što zadovoljava kriterij prihvatljivosti za linearnost. Analitički prinos i RSD vrijednost zadovoljavaju kriterije za granica određivanja i točnost. RSD vrijednost zadovoljava kriterij prihvatljivosti za preciznost i ponovljivost. Svi kriteriji su zadovoljeni stoga je metoda izvrsna za određivanje rodija.

4.2.14 PALADIJ

LINEARNOST



Slika 18: Rezultati mjerenja linearnosti za paladij

c (ng/mL)	Omjer
0	0,0001
6	0,1765
10	0,2954
20	0,5841
30	0,8763
40	1,1599

Nagib (a)	0,0291
Odsjek (b)	0,0001
Koeficijent korelacije	1,0000

TOČNOST

Level	Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*c* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)	RSD (%)
Level 0	ACC-1	99,73	0	0,000	0	0	-	-
	ACC-2	100,74		0,000	0			
	ACC-3	100,55		0,000	0			
Level 1	ACC-4	99,04	5	9,774	5	5	99	1
	ACC-5	99,12		9,929	5			
	ACC-6	99,83		9,949	5			
Level 2	ACC-7	100,99	10	19,697	10	10	100	2
	ACC-8	99,41		20,399	10			
	ACC-9	101,79		20,116	10			
Level 3	ACC-10	98,99	15	29,647	15	15	99	1
	ACC-11	100,25		29,541	15			
	ACC-12	99,42		30,086	15			

Tablica 69: Rezultati mjerenja točnosti za paladij

GRANICA ODREĐIVANJA

Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*C* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)			
ACC-1	99,73	0,00	0,000	0,00	0,00	-			
ACC-2	100,74		0,000	0,00		-			
ACC-3	100,55		0,000	0,00		-			
							Prosječna vrijednost	SD	RSD (%)
QL-1	100,53	3	6,364	3	3	106	105	0,0	1
QL-2	99,93		6,369	3		106			
QL-3	98,83		6,358	3		106			
QL-4	102,70		6,282	3		105			
QL-5	99,84		6,182	3		103			
QL-6	100,27		6,283	3		105			

Tablica 70: Rezultati mjerenja granice određivanja za paladij

PRECIZNOST

Oznaka	*m* (mg)	*c* (ng/mL)	ppm	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)
PRE-1	100,38	20,164	10	10	0	1
PRE-2	100,44	19,950	10			
PRE-3	99,93	20,121	10			
PRE-4	99,54	20,395	10			
PRE-5	99,84	20,293	10			
PRE-6	100,53	19,968	10			

Tablica 71: Rezultati mjerenja preciznosti za paladij

PONOVLJIVOST

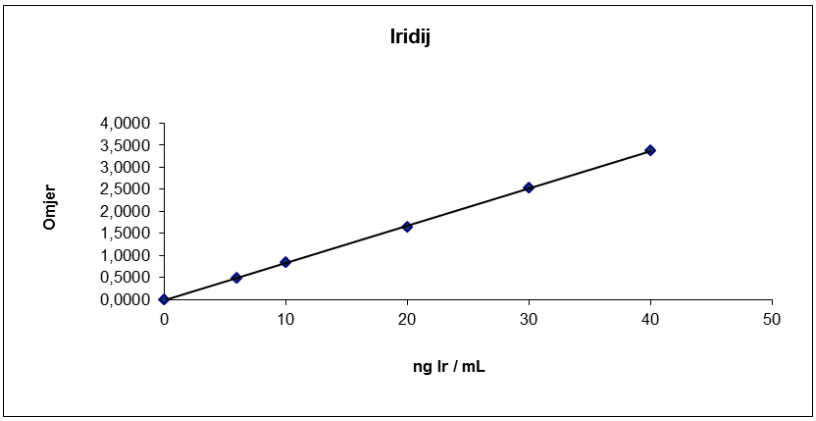
Srednja vrijednost	10
SD	0
RSD(%)	**1**

Tablica 72: Rezultati mjerenja ponovljivosti za paladij

Koeficijent korelacije za paladij iznosi 1,0000 što zadovoljava kriterij prihvatljivosti za linearnost. Analitički prinos i RSD vrijednost zadovoljavaju kriterije za granica određivanja i točnost. RSD vrijednost zadovoljava kriterij prihvatljivosti za preciznost i ponovljivost. Svi kriteriji su zadovoljeni stoga je metoda izvrsna za određivanje paladija.

4.2.15 IRIDIJ

LINEARNOST



c (ng/mL)	Omjer
0	0,0005
6	0,4838
10	0,8340
20	1,6498
30	2,5367
40	3,3821

Nagib (a)	0,0842
Odsjek (b)	0,0005
Koeficijent korelacije	0,9999

Slika 19: Rezultati mjerenja linearnosti za iridij

TOČNOST

Level	Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*c* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)	RSD (%)
Level 0	ACC-1	99,73	0	0,000	0	0	-	-
	ACC-2	100,74		0,000	0			
	ACC-3	100,55		0,000	0			
Level 1	ACC-4	99,04	5	9,518	5	5	96	1
	ACC-5	99,12		9,693	5			
	ACC-6	99,83		9,509	5			
Level 2	ACC-7	100,99	10	19,844	10	10	101	2
	ACC-8	99,41		20,662	10			
	ACC-9	101,79		20,284	10			
Level 3	ACC-10	98,99	15	30,072	15	15	102	1
	ACC-11	100,25		30,506	15			
	ACC-12	99,42		30,839	15			

Tablica 73: Rezultati mjerenja točnosti za iridij

GRANICA ODREĐIVANJA

Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*C* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)			
ACC-1	99,73	0,00	0,000	0,00	0,00	-			
ACC-2	100,74		0,000	0,00		-			
ACC-3	100,55		0,000	0,00		-			
							Prosječna vrijednost	SD	RSD (%)
QL-1	100,53	3	6,218	3	3	104	103	0,0	1
QL-2	99,93		6,206	3		103			
QL-3	98,83		6,260	3		104			
QL-4	102,70		6,145	3		102			
QL-5	99,84		6,095	3		102			
QL-6	100,27		6,031	3		101			

Tablica 74: Rezultati mjerenja granice određivanja za iridij

PRECIZNOST

Oznaka	*m* (mg)	*c* (ng/mL)	ppm	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)
PRE-1	100,38	20,292	10	10	0	1
PRE-2	100,44	19,833	10			
PRE-3	99,93	20,131	10			
PRE-4	99,54	20,296	10			
PRE-5	99,84	20,106	10			
PRE-6	100,53	20,150	10			

Tablica 75: Rezultati mjerenja preciznosti za iridij

PONOVLJIVOST

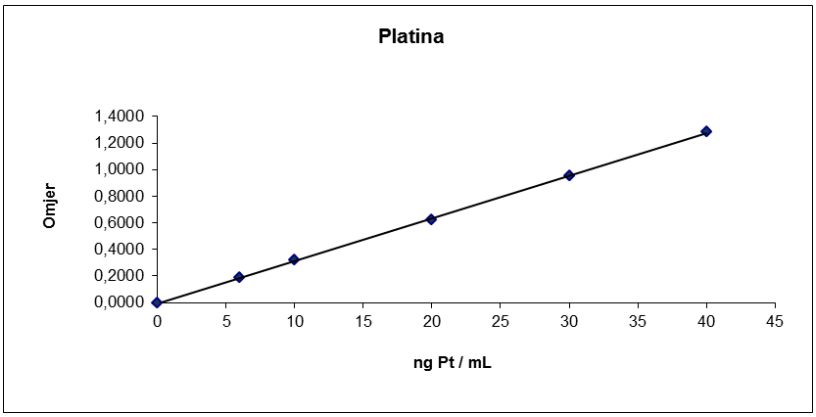
Srednja vrijednost	10
SD	0
RSD(%)	**1**

Tablica 76: Rezultati mjerenja ponovljivosti za iridij

Koeficijent korelacije za iridij iznosi 0,9999 što zadovoljava kriterij prihvatljivosti za linearnost. Analitički prinos i RSD vrijednost zadovoljavaju kriterije za granica određivanja i točnost. RSD vrijednost zadovoljava kriterij prihvatljivosti za preciznost i ponovljivost. Svi kriteriji su zadovoljeni stoga je metoda izvrsna za određivanje iridij.

4.2.16 PLATINA

LINEARNOST



c (ng/mL)	Omjer
0	0,0001
6	0,1853
10	0,3177
20	0,6257
30	0,9540
40	1,2835

Nagib (a)	0,0319
Odsjek (b)	0,0001
Koeficijent korelacije	0,9999

Slika 20: Rezultati mjerenja linearnosti za platinu

TOČNOST

Level	Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*c* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)	RSD (%)
Level 0	ACC-1	99,73	0	0,002	0	0	-	-
	ACC-2	100,74		0,000	0			
	ACC-3	100,55		0,000	0			
Level 1	ACC-4	99,04	5	9,796	5	5	99	1
	ACC-5	99,12		9,968	5			
	ACC-6	99,83		9,877	5			
Level 2	ACC-7	100,99	10	19,670	10	10	100	2
	ACC-8	99,41		20,244	10			
	ACC-9	101,79		20,111	10			
Level 3	ACC-10	98,99	15	29,698	15	15	100	1
	ACC-11	100,25		30,025	15			
	ACC-12	99,42		30,066	15			

Tablica 77: Rezultati mjerenja točnosti za platinu

GRANICA ODREĐIVANJA

Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*C* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)			
ACC-1	99,73	0,00	0,002	0,00	0,00	-			
ACC-2	100,74		0,000	0,00		-			
ACC-3	100,55		0,000	0,00		-			
							Prosječna vrijednost	SD	RSD (%)
QL-1	100,53	3	6,345	3	3	106	105	1,9	2
QL-2	99,93		6,353	3		106			
QL-3	98,83		6,434	3		107			
QL-4	102,70		6,301	3		105			
QL-5	99,84		6,135	3		102			
QL-6	100,27		6,163	3		103			

Tablica 78: Rezultati mjerenja granice određivanja za platinu

PRECIZNOST

Oznaka	*m* (mg)	*c* (ng/mL)	ppm	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)
PRE-1	100,38	19,900	10	10	0	0
PRE-2	100,44	19,833	10			
PRE-3	99,93	19,896	10			
PRE-4	99,54	20,123	10			
PRE-5	99,84	19,951	10			
PRE-6	100,53	19,948	10			

Tablica 79: Rezultati mjerenja preciznosti za platinu

PONOVLJIVOST

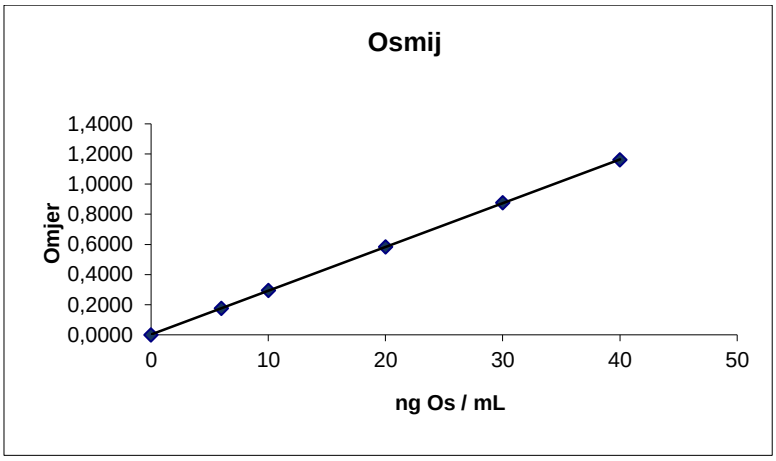
Srednja vrijednost	10
SD	0
RSD(%)	**1**

Tablica 80: Rezultati mjerenja ponovljivosti za platinu

Koeficijent korelacije za platinu iznosi 0,9999 što zadovoljava kriterij prihvatljivosti za linearnost. Analitički prinos i RSD vrijednost zadovoljavaju kriterije za granica određivanja i točnost. RSD vrijednost zadovoljava kriterij prihvatljivosti za preciznost i ponovljivost. Svi kriteriji su zadovoljeni stoga je metoda izvrsna za određivanje platine.

4.2.17 OSMIJ

LINEARNOST



c (ng/mL)	Omjer
0	0,0037
6	0,1481
10	0,2498
20	0,4832
30	0,7579
40	1,0133

Nagib (a)	0,0250
Odsjek (b)	0,0037
Koeficijent korelacije	0,9997

Slika 21: Rezultati mjerenja linearnosti za osmij

TOČNOST

Level	Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*c* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)	RSD (%)
Level 0	ACC-1	99,73	0	0,000	0	0	-	-
	ACC-2	100,74		0,000	0			
	ACC-3	100,55		0,000	0			
Level 1	ACC-4	99,04	5	9,086	5	5	92	2
	ACC-5	99,12		9,403	5			
	ACC-6	99,83		9,156	5			
Level 2	ACC-7	100,99	10	19,420	10	10	99	1
	ACC-8	99,41		19,967	10			
	ACC-9	101,79		19,804	10			
Level 3	ACC-10	98,99	15	28,616	14	14	94	1
	ACC-11	100,25		28,190	14			
	ACC-12	99,42		27,946	14			

Tablica 81: Rezultati mjerenja točnosti za osmij

GRANICA ODREĐIVANJA

Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*C* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)			
ACC-1	99,73	0,00	0,000	0,00	0,00	-			
ACC-2	100,74		0,000	0,00		-			
ACC-3	100,55		0,000	0,00		-			
							Prosječna vrijednost	SD	RSD (%)
QL-1	100,53	3	6,149	3	3	102	102	0,1	2
QL-2	99,93		6,179	3		103			
QL-3	98,83		6,226	3		104			
QL-4	102,70		6,181	3		103			
QL-5	99,84		6,076	3		101			
QL-6	100,27		5,948	3		99			

Tablica 82: Rezultati mjerenja granice određivanja za osmij

PRECIZNOST

Oznaka	*m* (mg)	*c* (ng/mL)	ppm	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)
PRE-1	100,38	19,304	10	10	0	2
PRE-2	100,44	19,551	10			
PRE-3	99,93	19,673	10			
PRE-4	99,54	19,743	10			
PRE-5	99,84	19,268	10			
PRE-6	100,53	18,956	9			

Tablica 83: Rezultati mjerenja preciznosti za osmij

PONOVLJIVOST

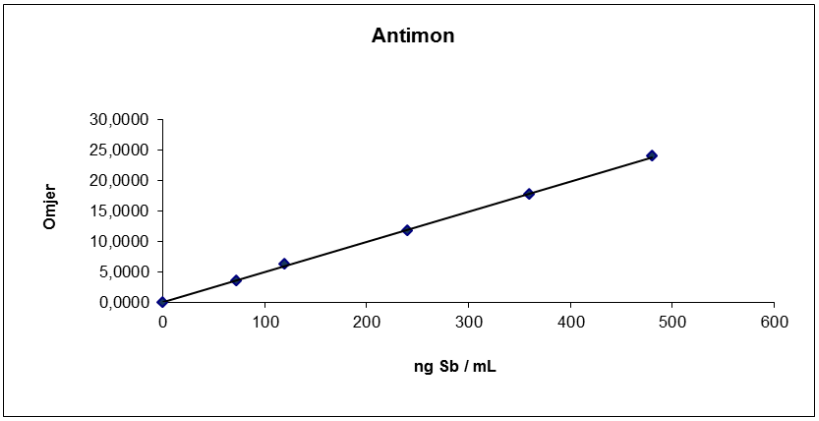
Srednja vrijednost	10
SD	0
RSD(%)	**2**

Tablica 84: Rezultati mjerenja ponovljivosti za osmij

Koeficijent korelacije za osmij iznosi 0,9997 što zadovoljava kriterij prihvatljivosti za linearnost. Analitički prinos i RSD vrijednost zadovoljavaju kriterije za granica određivanja i točnost. RSD vrijednost zadovoljava kriterij prihvatljivosti za preciznost i ponovljivost. Svi kriteriji su zadovoljeni stoga je metoda izvrsna za određivanje osmija.

4.2.18 ANTIMON

LINEARNOST



c (ng/mL)	Omjer
0	0,0137
72	3,5977
120	6,2370
240	11,6818
360	17,7081
480	23,9760

Nagib (a)	0,0496
Odsjek (b)	0,0137
Koeficijent korelacije	0,9998

Slika 22: Rezultati mjerenja linearnosti za antimon

TOČNOST

Level	Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*c* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)	RSD (%)
Level 0	ACC-1	99,73	0	0,000	0	0	-	-
	ACC-2	100,74		0,000	0			
	ACC-3	100,55		0,000	0			
Level 1	ACC-4	99,04	60	122,464	61	62	103	1
	ACC-5	99,12		122,825	61			
	ACC-6	99,83		124,615	62			
Level 2	ACC-7	100,99	120	240,525	120	123	102	2
	ACC-8	99,41		249,490	125			
	ACC-9	101,79		247,345	124			
Level 3	ACC-10	98,99	180	365,679	183	183	102	1
	ACC-11	100,25		363,536	182			
	ACC-12	99,42		368,153	184			

Tablica 85: Rezultati mjerenja točnosti za antimon

GRANICA ODREĐIVANJA

Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*C* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)			
ACC-1	99,73	0,00	0,000	0,00	0,00	-			
ACC-2	100,74		0,000	0,00		-			
ACC-3	100,55		0,000	0,00		-			
							Prosječna vrijednost	SD	RSD (%)
QL-1	100,53	36	81,236	41	40	113	112	1,0	3
QL-2	99,93		82,046	41		114			
QL-3	98,83		81,952	41		114			
QL-4	102,70		82,171	41		114			
QL-5	99,84		77,841	39		108			
QL-6	100,27		78,133	39		109			

Tablica 86: Rezultati mjerenja granice određivanja za antimon

PRECIZNOST

Oznaka	*m* (mg)	*c* (ng/mL)	ppm	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)
PRE-1	100,38	242,606	121	123	1	1
PRE-2	100,44	243,135	122			
PRE-3	99,93	245,060	123			
PRE-4	99,54	246,885	123			
PRE-5	99,84	247,424	124			
PRE-6	100,53	246,210	123			

Tablica 87: Rezultati mjerenja preciznosti za antimon

PONOVLJIVOST

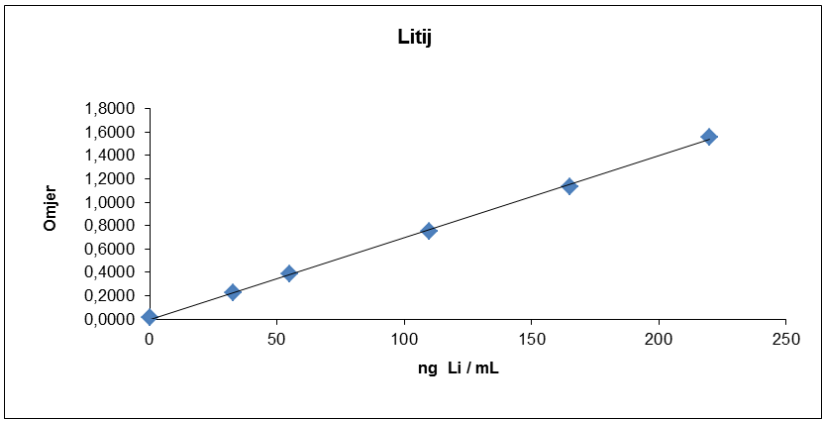
Srednja vrijednost	123
SD	1
RSD(%)	**1**

Tablica 88: Rezultati mjerenja ponovljivosti za antimon

Koeficijent korelacije za antimon iznosi 0,9998 što zadovoljava kriterij prihvatljivosti za linearnost. Analitički prinos i RSD vrijednost zadovoljavaju kriterije za granica određivanja i točnost. RSD vrijednost zadovoljava kriterij prihvatljivosti za preciznost i ponovljivost. Svi kriteriji su zadovoljeni stoga je metoda izvrsna za određivanje antimona.

4.2.19 LITIJ

LINEARNOST



c (ng/mL)	Omjer
0,0	0,0135
33,0	0,2278
55,0	0,3840
110,0	0,7479
165,0	1,1341
220,0	1,5567

Nagib (a)	0,0069
Odsjek (b)	0,0135
Koeficijent korelacije	0,9996

Slika 23: Rezultati mjerenja linearnosti za litij

TOČNOST

Level	Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*c* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)	RSD (%)
Level 0	ACC-1	99,73	0,0	0,000	0,0	0,0	-	-
	ACC-2	100,74		0,000	0,0			
	ACC-3	100,55		0,000	0,0			
Level 1	ACC-4	99,04	27,5	53,560	26,8	26,5	96	1
	ACC-5	99,12		53,080	26,5			
	ACC-6	99,83		52,185	26,1			
Level 2	ACC-7	100,99	55,0	106,664	53,3	54,4	99	2
	ACC-8	99,41		109,750	54,9			
	ACC-9	101,79		110,088	55,0			
Level 3	ACC-10	98,99	82,5	167,660	83,8	86,1	104	3
	ACC-11	100,25		171,169	85,6			
	ACC-12	99,42		177,809	88,9			

Tablica 89: Rezultati mjerenja točnosti za litij

GRANICA ODREĐIVANJA

Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*C* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)			
ACC-1	99,73	0,00	0,000	0,00	0,00	-			
ACC-2	100,74		0,000	0,00		-			
ACC-3	100,55		0,000	0,00		-			
							Prosječna vrijednost	SD	RSD (%)
QL-1	100,53	16,5	35,920	18,0	17,5	109	106	0,6	3
QL-2	99,93		35,814	17,9		109			
QL-3	98,83		36,314	18,2		110			
QL-4	102,70		34,918	17,5		106			
QL-5	99,84		33,718	16,9		102			
QL-6	100,27		33,610	16,8		102			

Tablica 90: Rezultati mjerenja granice određivanja za litij

PRECIZNOST

Oznaka	*m* (mg)	*c* (ng/mL)	ppm	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)
PRE-1	100,38	108,055	54,0	55,0	1	2
PRE-2	100,44	106,437	53,2			
PRE-3	99,93	111,877	55,9			
PRE-4	99,54	109,989	55,0			
PRE-5	99,84	111,502	55,8			
PRE-6	100,53	112,335	56,2			

Tablica 91: Rezultati mjerenja preciznosti za litij

PONOVLJIVOST

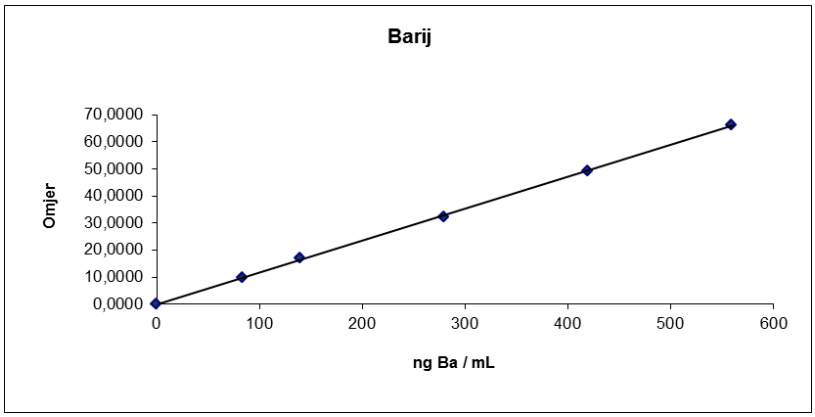
Srednja vrijednost	54,7
SD	1
RSD(%)	**2**

Tablica 92: Rezultati mjerenja ponovljivosti za litij

Koeficijent korelacije za litij iznosi 0,9996 što zadovoljava kriterij prihvatljivosti za linearnost. Analitički prinos i RSD vrijednost zadovoljavaju kriterije za granica određivanja i točnost. RSD vrijednost zadovoljava kriterij prihvatljivosti za preciznost i ponovljivost. Svi kriteriji su zadovoljeni stoga je metoda izvrsna za određivanje litija.

4.2.20 BARIJ

LINEARNOST



c (ng/mL)	Omjer
0	0,0023
84	9,9244
140	16,9570
280	32,2665
420	49,2527
560	66,4489

Nagib (a)	0,1179
Odsjek (b)	0,0023
Koeficijent korelacije	0,9998

Slika 24: Rezultati mjerenja linearnosti za barij

TOČNOST

Level	Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*c* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)	RSD (%)
Level 0	ACC-1	99,73	0	0,017	0	0	-	-
	ACC-2	100,74		0,000	0			
	ACC-3	100,55		0,121	0			
Level 1	ACC-4	99,04	70	137,397	69	69	99	1
	ACC-5	99,12		139,623	70			
	ACC-6	99,83		138,770	69			
Level 2	ACC-7	100,99	140	277,262	139	141	101	1
	ACC-8	99,41		285,156	143			
	ACC-9	101,79		283,678	142			
Level 3	ACC-10	98,99	210	419,876	210	209	100	1
	ACC-11	100,25		411,764	206			
	ACC-12	99,42		422,943	211			

Tablica 93: Rezultati mjerenja točnosti za barij

GRANICA ODREĐIVANJA

Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*C* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)			
ACC-1	99,73	0,00	0,017	0,00	0,00	-			
ACC-2	100,74		0,000	0,00		-			
ACC-3	100,55		0,121	0,00		-			
							Prosječna vrijednost	SD	RSD (%)
QL-1	100,53	42	89,252	45	44	106	105	0,8	2
QL-2	99,93		89,165	45		106			
QL-3	98,83		88,834	44		106			
QL-4	102,70		90,550	45		108			
QL-5	99,84		86,376	43		103			
QL-6	100,27		86,461	43		103			

Tablica 94: Rezultati mjerenja granice određivanja za barij

PRECIZNOST

Oznaka	*m* (mg)	*c* (ng/mL)	ppm	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)
PRE-1	100,38	280,119	140	141	1	1
PRE-2	100,44	281,200	141			
PRE-3	99,93	281,657	141			
PRE-4	99,54	284,544	142			
PRE-5	99,84	284,481	142			
PRE-6	100,53	279,617	140			

Tablica 95: Rezultati mjerenja preciznosti za barij

PONOVLJIVOST

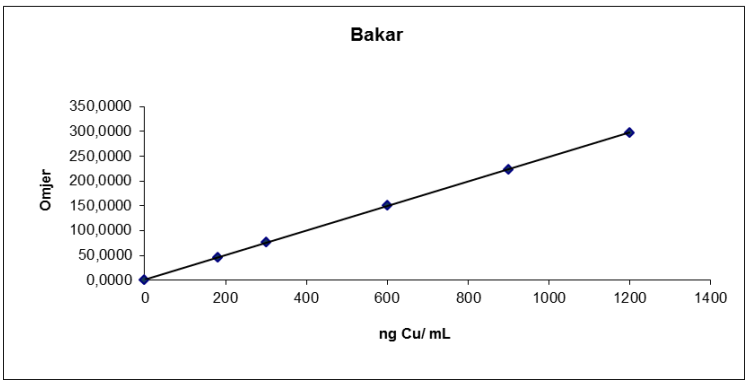
Srednja vrijednost	141
SD	1
RSD(%)	**1**

Tablica 96: Rezultati mjerenja ponovljivosti za barij

Koeficijent korelacije za barij iznosi 0,9998 što zadovoljava kriterij prihvatljivosti za linearnost. Analitički prinos i RSD vrijednost zadovoljavaju kriterije za granica određivanja i točnost. RSD vrijednost zadovoljava kriterij prihvatljivosti za preciznost i ponovljivost. Svi kriteriji su zadovoljeni stoga je metoda izvrsna za određivanje barija.

4.2.21 BAKAR

LINEARNOST



c (ng/mL)	Omjer
0	0,0616
180	45,9559
300	76,5992
600	150,3832
900	223,1751
1200	297,2489

Nagib (a)	0,2484
Odsjek (b)	0,0616
Koeficijent korelacije	1,0000

Slika 25: Rezultati mjerenja linearnosti za bakar

TOČNOST

Level	Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*c* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)	RSD (%)
Level 0	ACC-1	99,73	0	0,000	0	0	-	-
	ACC-2	100,74		0,000	0			
	ACC-3	100,55		0,125	0			
Level 1	ACC-4	99,04	150	300,210	150	150	100	1
	ACC-5	99,12		297,545	149			
	ACC-6	99,83		300,566	150			
Level 2	ACC-7	100,99	300	604,333	302	301	100	0
	ACC-8	99,41		598,547	299			
	ACC-9	101,79		600,488	300			
Level 3	ACC-10	98,99	450	884,084	442	447	99	1
	ACC-11	100,25		901,094	451			
	ACC-12	99,42		899,060	450			

Tablica 97: Rezultati mjerenja točnosti za bakar

GRANICA ODREĐIVANJA

Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*C* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)			
ACC-1	99,73	0,00	0,000	0,00	0,00	-			
ACC-2	100,74		0,000	0,00		-			
ACC-3	100,55		0,125	0,00		-			
							Prosječna vrijednost	SD	RSD (%)
QL-1	100,53	90	194,652	97	97	108	108	1,8	2
QL-2	99,93		195,068	98		108			
QL-3	98,83		199,217	100		111			
QL-4	102,70		193,299	97		107			
QL-5	99,84		190,067	95		106			
QL-6	100,27		189,511	95		105			

Tablica 98: Rezultati mjerenja granice određivanja za bakar

PRECIZNOST

Oznaka	*m* (mg)	*c* (ng/mL)	ppm	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)
PRE-1	100,38	604,547	302	303	3	1
PRE-2	100,44	607,336	304			
PRE-3	99,93	613,826	307			
PRE-4	99,54	611,254	306			
PRE-5	99,84	602,447	301			
PRE-6	100,53	599,660	300			

Tablica 99: Rezultati mjerenja preciznosti za bakar

PONOVLJIVOST

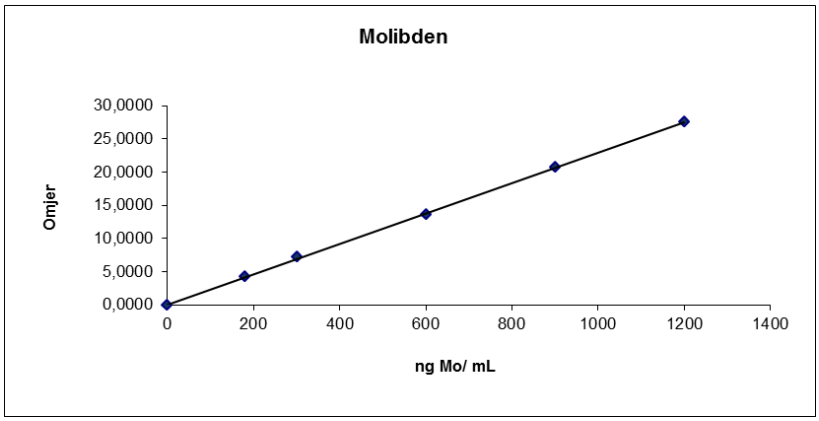
Srednja vrijednost	302
SD	3
RSD(%)	**1**

Tablica 100: Rezultati mjerenja ponovljivosti za bakar

Koeficijent korelacije za bakar iznosi 1,0000 što zadovoljava kriterij prihvatljivosti za linearnost. Analitički prinos i RSD vrijednost zadovoljavaju kriterije za granica određivanja i točnost. RSD vrijednost zadovoljava kriterij prihvatljivosti za preciznost i ponovljivost. Svi kriteriji su zadovoljeni stoga je metoda izvrsna za određivanje bakra.

4.2.22 MOLIBDEN

LINEARNOST



c (ng/mL)	Omjer
0	0,0042
180	4,2243
300	7,1881
600	13,6095
900	20,6821
1200	27,5265

Nagib (a)	0,0230
Odsjek (b)	0,0042
Koeficijent korelacije	0,9999

Slika 26: Rezultati mjerenja linearnosti za molibden

TOČNOST

Level	Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*c* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)	RSD (%)
Level 0	ACC-1	99,73	0	0,000	0	0	-	-
	ACC-2	100,74		0,000	0			
	ACC-3	100,55		0,000	0			
Level 1	ACC-4	99,04	150	300,661	150	151	101	1
	ACC-5	99,12		301,837	151			
	ACC-6	99,83		305,375	153			
Level 2	ACC-7	100,99	300	604,459	302	304	101	1
	ACC-8	99,41		611,039	306			
	ACC-9	101,79		609,605	305			
Level 3	ACC-10	98,99	450	897,722	449	450	100	1
	ACC-11	100,25		896,652	448			
	ACC-12	99,42		907,174	454			

Tablica 101: Rezultati mjerenja točnosti za molibden

GRANICA ODREĐIVANJA

Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*C* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)			
ACC-1	99,73	0,00	0,000	0,00	0,00	-			
ACC-2	100,74		0,000	0,00		-			
ACC-3	100,55		0,000	0,00		-			
							Prosječna vrijednost	SD	RSD (%)
QL-1	100,53	90	192,01	96	95	107	105	1,7	2
QL-2	99,93		189,705	95		105			
QL-3	98,83		192,127	96		107			
QL-4	102,70		191,300	96		106			
QL-5	99,84		186,532	93		104			
QL-6	100,27		183,880	92		102			

Tablica 102: Rezultati mjerenja granice određivanja za molibden

PRECIZNOST

Oznaka	*m* (mg)	*c* (ng/mL)	ppm	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)
PRE-1	100,38	603,220	302	303	1	0
PRE-2	100,44	608,921	304			
PRE-3	99,93	608,824	304			
PRE-4	99,54	609,607	305			
PRE-5	99,84	605,752	303			
PRE-6	100,53	605,116	303			

Tablica 103: Rezultati mjerenja preciznosti za molibden

PONOVLJIVOST

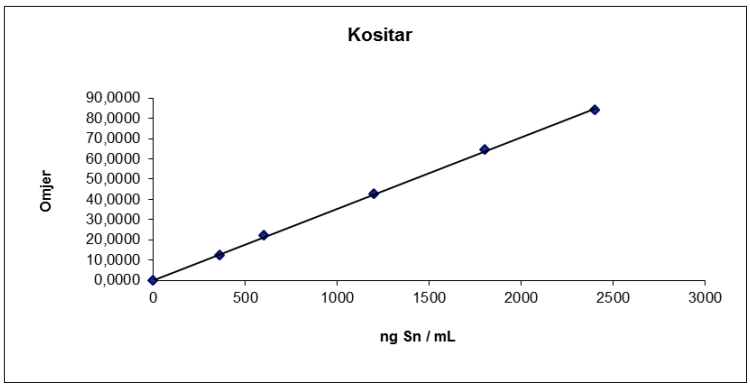
Srednja vrijednost	304
SD	1
RSD(%)	**0**

Tablica 104: Rezultati mjerenja ponovljivosti za molibden

Koeficijent korelacije za molibden iznosi 0,9999 što zadovoljava kriterij prihvatljivosti za linearnost. Analitički prinos i RSD vrijednost zadovoljavaju kriterije za granica određivanja i točnost. RSD vrijednost zadovoljava kriterij prihvatljivosti za preciznost i ponovljivost. Svi kriteriji su zadovoljeni stoga je metoda izvrsna za određivanje molibdena.

4.2.23 KOSITAR

LINEARNOST



c (ng/mL)	Omjer
0	0,0218
360	12,5279
600	21,9694
1200	42,4447
1800	64,2903
2400	83,9038

Nagib (a)	0,0353
Odsjek (b)	0,0218
Koeficijent korelacije	0,9998

Slika 27: Rezultati mjerenja linearnosti za kositar

TOČNOST

Level	Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*c* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)	RSD (%)
Level 0	ACC-1	99,73	0	0,000	0	0	-	-
	ACC-2	100,74		0,000	0			
	ACC-3	100,55		0,000	0			
Level 1	ACC-4	99,04	300	599,522	300	300	100	0
	ACC-5	99,12		597,764	299			
	ACC-6	99,83		603,288	302			
Level 2	ACC-7	100,99	600	1184,410	592	604	101	2
	ACC-8	99,41		1224,001	612			
	ACC-9	101,79		1216,385	608			
Level 3	ACC-10	98,99	900	1802,997	901	898	100	0
	ACC-11	100,25		1790,971	895			
	ACC-12	99,42		1795,506	898			

Tablica 105: Rezultati mjerenja točnosti za kositar

GRANICA ODREĐIVANJA

Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*C* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)			
ACC-1	99,73	0,00	0,000	0,00	0,00	-			
ACC-2	100,74		0,000	0,00		-			
ACC-3	100,55		0,000	0,00		-			
							Prosječna vrijednost	SD	RSD (%)
QL-1	100,53	180	382,464	191	190	106	105	3,6	2
QL-2	99,93		381,134	191		106			
QL-3	98,83		387,685	194		108			
QL-4	102,70		383,671	192		107			
QL-5	99,84		368,716	184		102			
QL-6	100,27		372,916	186		104			

Tablica 106: Rezultati mjerenja granice određivanja za kositar

PRECIZNOST

Oznaka	*m* (mg)	*c* (ng/mL)	ppm	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)
PRE-1	100,38	1211,106	606	604	4	1
PRE-2	100,44	1209,886	605			
PRE-3	99,93	1193,995	597			
PRE-4	99,54	1216,595	608			
PRE-5	99,84	1213,545	607			
PRE-6	100,53	1202,541	601			

Tablica 107: Rezultati mjerenja preciznosti za kositar

PONOVLJIVOST

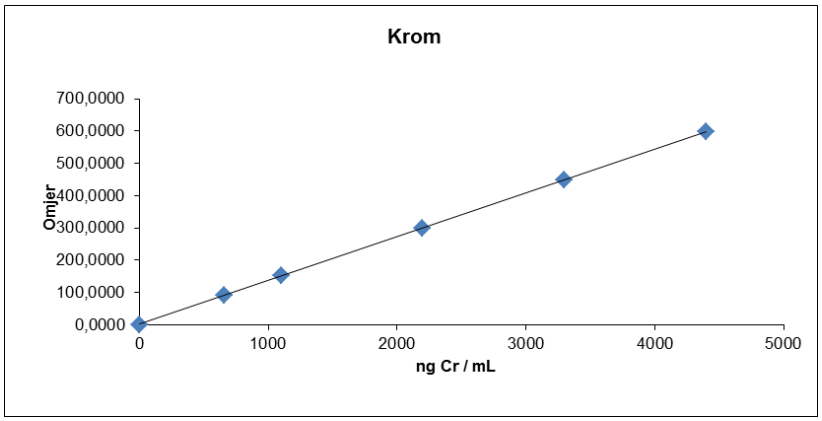
Srednja vrijednost	604
SD	6
RSD(%)	**1**

Tablica 108: Rezultati mjerenja ponovljivosti za kositar

Koeficijent korelacije za kositar iznosi 0,9998 što zadovoljava kriterij prihvatljivosti za linearnost. Analitički prinos i RSD vrijednost zadovoljavaju kriterije za granica određivanja i točnost. RSD vrijednost zadovoljava kriterij prihvatljivosti za preciznost i ponovljivost. Svi kriteriji su zadovoljeni stoga je metoda izvrsna za određivanje kositra.

4.2.24 KROM

LINEARNOST



c (ng/mL)	Omjer
0	0,0217
660	92,2529
1100	153,2511
2200	300,6059
3300	448,0696
4400	599,5209

Nagib (a)	0,1363
Odsjek (b)	0,0217
Koeficijent korelacije	1,0000

Slika 28: Rezultati mjerenja linearnosti za krom

TOČNOST

Level	Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*c* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)	RSD (%)
Level 0	ACC-1	99,73	0	0,000	0	0	-	-
	ACC-2	100,74		0,000	0			
	ACC-3	100,55		0,613	0			
Level 1	ACC-4	99,04	550	1107,330	554	549	100	1
	ACC-5	99,12		1089,088	545			
	ACC-6	99,83		1094,827	547			
Level 2	ACC-7	100,99	1100	2188,363	1094	1098	100	0
	ACC-8	99,41		2198,033	1099			
	ACC-9	101,79		2200,592	1100			
Level 3	ACC-10	98,99	1650	3239,301	1620	1631	99	1
	ACC-11	100,25		3280,364	1640			
	ACC-12	99,42		3266,867	1633			

Tablica 109: Rezultati mjerenja točnosti za krom

GRANICA ODREĐIVANJA

Oznaka	*m* (mg)	Dodani ppm	*C* (ng/mL)	Izračunati ppm	Srednji ppm	Analitički prinos (%)			
ACC-1	99,73	0,00	0,000	0,00	0,00	-			
ACC-2	100,74		0,000	0,00		-			
ACC-3	100,55		0,613	0,00		-			
							Prosječna vrijednost	SD	RSD (%)
QL-1	100,53	330	714,868	357	353	108	107	6,6	2
QL-2	99,93		725,717	363		110			
QL-3	98,83		710,087	355		108			
QL-4	102,70		699,597	350		106			
QL-5	99,84		694,438	347		105			
QL-6	100,27		691,527	346		105			

Tablica 110: Rezultati mjerenja granice određivanja za krom

PRECIZNOST

Oznaka	*m* (mg)	*c* (ng/mL)	ppm	Srednja vrijednost	SD	RSD (%)
PRE-1	100,38	2253,695	1127	1119	9	1
PRE-2	100,44	2218,255	1109			
PRE-3	99,93	2224,119	1112			
PRE-4	99,54	2259,184	1130			
PRE-5	99,84	2245,398	1123			
PRE-6	100,53	2226,511	1113			

Tablica 111: Rezultati mjerenja preciznosti za krom

PONOVLJIVOST

Srednja vrijednost	1108
SD	13
RSD(%)	**1**

Tablica 112: Rezultati mjerenja ponovljivosti za krom

Koeficijent korelacije za krom iznosi 1,0000 što zadovoljava kriterij prihvatljivosti za linearnost. Analitički prinos i RSD vrijednost zadovoljavaju kriterije za granica određivanja i točnost. RSD vrijednost zadovoljava kriterij prihvatljivosti za preciznost i ponovljivost. Svi kriteriji su zadovoljeni stoga je metoda izvrsna za određivanje kroma.

4.3 ANALIZA ELEMENTARNIH ONEČIŠĆENJA U UZORKU ERITROMICINA

1) m(uzorka)=100,16

2) m (uzorka)=99.99

Element	1) c (ng/mL)	ppm	2) c (ng/mL)	ppm	3) srednja vrijednost ppm
Li	0,000	**0,00**	0,000	**0,00**	**0,00**
V	0,009	**0,00**	0,017	**0,01**	**0,01**
Cr	0,000	**0,00**	0,000	**0,00**	**0,00**
Co	0,000	**0,00**	0,000	**0,00**	**0,00**
Ni	0,000	**0,00**	0,000	**0,00**	**0,00**
Cu	0,000	**0,00**	0,000	**0,00**	**0,00**
As	0,000	**0,00**	0,000	**0,00**	**0,00**
Se	0,000	**0,00**	0,000	**0,00**	**0,00**
Mo	0,000	**0,00**	0,000	**0,00**	**0,00**
Ru	0,000	**0,00**	0,000	**0,00**	**0,00**
Rh	0,000	**0,00**	0,000	**0,00**	**0,00**
Pd	0,002	**0,00**	0,000	**0,00**	**0,00**
Ag	0,000	**0,00**	0,000	**0,00**	**0,00**
Cd	0,000	**0,00**	0,000	**0,00**	**0,00**
Sn	0,000	**0,00**	0,000	**0,00**	**0,00**
Sb	0,000	**0,00**	0,000	**0,00**	**0,00**
Ba	0,000	**0,00**	0,000	**0,00**	**0,00**
Os	0,000	**0,00**	0,000	**0,00**	**0,00**
Ir	0,000	**0,00**	0,000	**0,00**	**0,00**
Pt	0,000	**0,00**	0,000	**0,00**	**0,00**
Au	0,000	**0,00**	0,000	**0,00**	**0,00**
Hg	0,000	**0,00**	0,000	**0,00**	**0,00**
Tl	0,000	**0,00**	0,000	**0,00**	**0,00**
Pb	0,000	**0,00**	0,000	**0,00**	**0,00**

Tablica 113: Rezultati određivanja koncentracije elementarnih onečišćenja u eritromicinu

Prema rezultatima prikazanim u tablici 113, ispitivani eritromicin ne sadrži elementarna onečišćenja osim vanadija u koncentraciji 0,01 ppm. Koncentracija vanadija je manja od specifikacije prema ICH (3 ppm) te samog limita kvantifikacije što znači da je uzorak eritromicina u skladu s zahtjevima.

5. ZAKLJUČAK

Validirana je analitička metoda za određivanje elementarnih onečišćenja u eritromicinu korištenjem ICP-MS tehnike.

Kod validacije analitičke metode ispitivani su parametri: linearnost, točnost, granica određivanja, preciznost i ponovljivosti. Rezultati provedenih validacijskih mjerenja za sve parametre nalazili su se unutar unaprijed postavljenih granica pojedinog parametra. **Time se pokazalo da je analitička metoda stabilitetno indikativna i prikladna za određivanje onečišćenja u eritromicinu u propisanim uvjetima.**

Analitički prinos zlata kod mjerenja točnosti je na granici prihvatljivosti, a mogao bi se poboljšati dodatnom stabilizacijom zlata kada bi, nakon što se uzorak otopi, dodali još klorovodične kiseline.

Koeficijent korelacije za talij iznosi 0,995 što je nešto niža vrijednost od očekivane, ali zadovoljava kriterij prihvatljivosti za linearnost. Dodatnim provjerama uočeno je da je odaziv detektora s talijem u slijepoj probi bio povišen. Nakon snimanja otopina za utvrđivanje linearnosti uređaj je očišćen. Kontaminacija talijem se spustila pa u idućim ispitivanjima nije bilo tih problema.

Metoda je pokazala da ispitivani uzorak eritromicina ne sadrži elementarna onečišćenja, osim vanadija u koncentraciji manjoj od specifikacije prema ICH te samog limita kvantifikacije, što znači da je u skladu s propisanim zahtjevima.

6. LITERATURA

1. Agilent Technologies, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: General Article
2. Agilent Technologies, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Basic components od ICP-MS
3. Bazilio A, Weinrich J. The Easy Guide to: Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry. 2012
4. Hill JS. Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Application. 2. edition, 2007
5. ICH Harmonised Guideline, Guideline for Elemental Impurities, Q3D, 2014
6. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Impurities in New Drug Products Q3B, 2006
7. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Impurities in New Drug Substances Q3A, 2006
8. Katica Lazarić, Validacija analitičkih metoda – osnovna načela
9. Katzung GB, Masters BS, Trevor JA. Basic Clinical Pharmacology. 12th edition, 2012., str. 811-814
10. Mutschler E, Derendorf H. Drug Actions. *Medpharm*, 1995., str. 539-540
11. Nigović B, Predavanja iz kolegija Analitika lijekova, 2013./2014.
12. Pilaniya K, Chandrawanshi HK, Pilaniya U, Manchandani P, Jain P, Singh N. Recent trends in the impurity profile of pharmaceuticals. J Adv Pharm Technol Res 2010;1:302-10
13. Qiu F, Norwood LD. Identification of Pharmaceutical Impurities. J Liq Chromatogr Relat Technol, 2007, 30:5-7, 877-935
14. Rama Rao N, Mani Kiran SS, Prasanthi N. L. Pharmaceutical Impurities: An Overview, Indian H. Pharm. Educ. Res., 44(3), Jul-Sep, 2010
15. Thomas R. Practical Guide to ICP-MS. 2004 (1-100. str)
16. Vogiatzis CG, Zachariadis GA. Tandem mass spectrometry in metallomics and the involving role of ICP-MS detection: A review. Anal Chim Acta, 2014;819:1-14
17. Wang T, Wu J, Hartman R, Jia X, Egan SR. A multi-element ICP-MS survey method as an alternative to the heavy metals limit test for pharmaceutical materials. J Pharm Biomed Anal, Oct. 2010
18. Waterman CK, Adami CR, Hong J. Impurities in Drug Products. U: Handbook of Isolation and Characterization of impurities in Pharmaceuticals. Satinder Ahuja, Karen Mills Alsante, Pfizer, Inc., Groton, 2003, str. 80-83

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1 SAŽETAK

Eritromicin je antibiotik u klasi makrolida, strukturno sličnih spojeva koje karakterizira makrociklični prsten. Izoliran je 1952. godine iz *Streptomyces erythreus*.

U ovom radu, razvijena je i validirana brza i učinkovita metoda s kojom se mogu odrediti, u jednom snimanju, sva elementarna onečišćenja propisana ICH Q3D smjernicom u eritromicinu koristeći masenu spektroskopiju s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS). Ispitivanje topljivosti eritromicina pokazalo je da se 100 mg eritromicina izvrsno otapa u 1 mL H_2O_2 i 1 mL HCl.

Kod validacije analitičke metode ispitivani su parametri: linearnost, točnost, granica određivanja, preciznost i ponovljivosti. Rezultati provedenih validacijskih mjerenja za sve parametre nalazili su se unutar unaprijed postavljenih granica pojedinog parametra. Time se pokazalo da je analitička metoda stabilitetno indikativna i prikladna za određivanje onečišćenja u eritromicinu u propisanim uvjetima. Metoda je pokazala da ispitivani uzorak eritromicina ne sadrži elementarna onečišćenja, osim vanadija u koncentraciji manjoj od specifikacije prema ICH te samog limita kvantifikacije, što znači da je uzorak u skladu s propisanim zahtjevima.

7.2 SUMMARY

Erythromycin is an antibiotic belonging to the macrolide class, structurally similar compounds which are characterized by a macrocyclic ring. It was isolated from *Streptomyces erythreus* in 1952.

In this paper an effective method was developed and validated with which it is possible to determine all elementary impurities proposed by ICH Q3D guideline in erythromycin using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) in a single screening. Solubility testing had shown that 100 mg of erythromycin is excellently soluble in 1 mL of H_2O_2 i 1 mL of HCL.

Following parameters were tested for method validation: linearity, accuracy, limit of quantification, precision and repeatability. Results of the conducted measuring for all parameters were found within boundaries set in advance for each parameter. That has shown that the analytical method is indicative of stability and appropriate for determining impurities in erythromycin within proposed conditions. Method has shown that the tested erythromycin

does not contain elementary impurities except for vanadium in a concentration smaller than ICH specification and the limit of quantification meaning that the sample is in accordance with regulatory requirements.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Razvoj i validacija metode za određivanje elementarnih onečišćenja u eritromicinu

Ana Brzović

SAŽETAK

Eritromicin je antibiotik u klasi makrolida, strukturno sličnih spojeva koje karakterizira makrociklični prsten. Izoliran je 1952. godine iz *Streptomyces erythreus*. U ovom radu, razvijena je i validirana brza i učinkovita metoda s kojom se mogu odrediti, u jednom snimanju, sva elementarna onečišćenja propisana ICH Q3D smjernicom u eritromicinu koristeći masenu spektroskopiju s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS). Ispitivanje topljivosti eritromicina pokazalo je da se 100 mg eritromicina izvrsno otapa u 1 mL H_2O_2 i 1 mL HCl. Kod validacije analitičke metode ispitivani su parametri: linearnost, točnost, granica određivanja, preciznost i ponovljivosti. Rezultati provedenih validacijskih mjerenja za sve parametre nalazili su se unutar unaprijed postavljenih granica pojedinog parametra. Time se pokazalo da je analitička metoda stabilitetno indikativna i prikladna za određivanje onečišćenja u eritromicinu u propisanim uvjetima. Metoda je pokazala da ispitivani uzorak eritromicina ne sadrži elementarna onečišćenja, osim vanadija u koncentraciji manjoj od specifikacije prema ICH te samog limita kvantifikacije, što znači da je uzorak u skladu s propisanim zahtjevima.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 93 stranica, 28 grafičkih prikaza, 113 tablica i 18 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Eritromicin, elementarna onečišćenja, validacija, induktivno spregnuta plazma s masenom spektrometrijom

Mentor: **Dr. sc. Biljana Nigović**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Biljana Nigović**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Ana Mornar Turk, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Ernest Meštrović, *naslovni redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Prirodoslovno matematičkog fakulteta*

Rad prihvaćen: rujan 2016.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Analysis
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Development and validation of analytical method for determination of elemental impurities in erythromicin

Ana Brzović

SUMMARY

Erythromycin is an antibiotic belonging to the macrolide class, structurally similar compounds which are characterized by a macrocyclic ring. It was isolated from *Streptomyces erythreus* in 1952.In this paper an effective method was developed and validated with which it is possible to determine all elementary impurities proposed by ICH Q3D guideline in erythromycin using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) in a single screening. Solubility testing had shown that 100 mg of erythromycin is excellently soluble in 1 mL of H_2O_2 i 1 mL of HCL.Following parameters were tested for method validation: linearity, accuracy, limit of quantification, precision and repeatability. Results of the conducted measuring for all parameters were found within boundaries set in advance for each parameter. That has shown that the analytical method is indicative of stability and appropriate for determining impurities in erythromycin within proposed conditions. Method has shown that the tested erythromycin does not contain elementary impurities except for vanadium in a concentration smaller than ICH specification and the limit of quantification meaning that the sample is in accordance with regulatory requirements.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 93 pages, 28 figures, 113 tables and 18 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Erythromycin, Elementary impurities, Validation, Inductively coupled plasma mass spectrometry

Mentor: **Biljana Nigović**, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Biljana Nigović**, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ana Mornar Turk, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ernest Meštrović, **Ph.D.** *Adjunct Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Science

The thesis was accepted: September 2016.