Primjena atomske apsorpcijske spektrometrije u analitici lijekova

Milas, Iva

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:163:584668

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Iva Milas

Primjena atomske apsorpcijske spektrometrije u analitici lijekova

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analika u razvoju farmaceutskih proizvoda Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Ane Mornar Turk i suvoditeljstvom dr.sc. Daniele Amidžić Klarić, mag. pharm., spec. kliničke farmacije.

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Mornar Turk i komentorici dr. sc. Danieli Amidžić Klarić, mag. pharm., spec. kliničke farmacije na pomoći prilikom pisanja diplomskog rada te na uloženom trudu i vremenu.

Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima na potpori i pomoći prilikom studiranja i pisanja diplomskog rada.

Sadržaj

1 UVOD……. 1

1.1 Atomska apsorpcijska spektrometrija……... 1

1.2 Osnovni princip atomske emisije i apsorpcije…….. 2

1.3 Kvantitativna analiza atomskom apsorpcijom…….. 4

1.4 Dijelovi atomskog apsorpcijskog spektrometra i način rada…… 4

1.5 Tehnike određivanja metala……. 7

1.5.1 Plamena tehnika……. 7

1.5.2 Grafitna tehnika……..... 9

1.5.3 Hidridna tehnika……... 10

1.5.4 Tehnika hladnih para……... 11

1.6 Priprema uzoraka za atomsku apsorpcijsku spektrometriju……...……... 12

2 OBRAZLOŽENJE TEME……..... 13

3 MATERIJALI I METODE……... 14

4 REZULTATI I RASPRAVA…… 15

4.1 Određivanje magnezijeva stearata u farmaceutskim proizvodima primjenom atomske apsorpcijske spektrometrije……..……..…… 15

4.2 Određivanje koncentracije olova i kadmija u učestalo primjenjivanim dječjim sirupima u Nigeriji primjenom AAS……..…….. 19

4.3 Nanočestice srebra vezane na silika gel kao novi adsorbens čvrste faze za prekoncentraciju i određivanje željeza u biološkim uzorcim……..….. 22

4.4 Metalna cijev grijana plamenom kao atomizator hidrida u atomskoj apsorpcijskoj spektrometriji: određivanje Sb u uzorcima lijekova i okoliša……... 26

5 ZAKLJUČCI……. 33

6 LITERATURA……. 34

7 SAŽETAK/SUMMARY…… 37

1 UVOD

1.1. Atomska apsorpcijska spektrometrija

Atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS) je analitička tehnika koja mjeri koncentraciju elemenata u uzorku. Koristi se u analitici lijekova, dodataka prehrani, hrane i pića. U bioanalitici koristi se za određivanje koncentracije metala u biološkim tekućinama poput krvi i urina. Nadalje je potrebno istaknuti kako ima nezamjenjivu ulogu prilikom praćenja onečišćenja okoliša, odnosno utvrđivanja prisutnosti različitih elemenata u rijekama, jezerima, potocima, morskoj vodi, pitkoj vodi kao i zraku. U industriji se uvelike upotrebljava pri provjeri prisutnosti glavnih elemenata te toksičnih onečišćenja (npr. beton, u kojem je kalcij glavni sastojak, a olovo toksično onečišćenje).

Tijekom proizvodnje lijekova koristi se značajan broj različitih metala i metaloida. Štoviše neki od njih su prisutni u lijekovima i kao aktivne supstancije (engl. *Active Pharmaceutical Ingredient*, API). U Tablici 1. prikazani su primjeri metala u farmacuetskim proizvodima.

Tablica 1. Primjeri metala u farmaceutskim proizvodima.

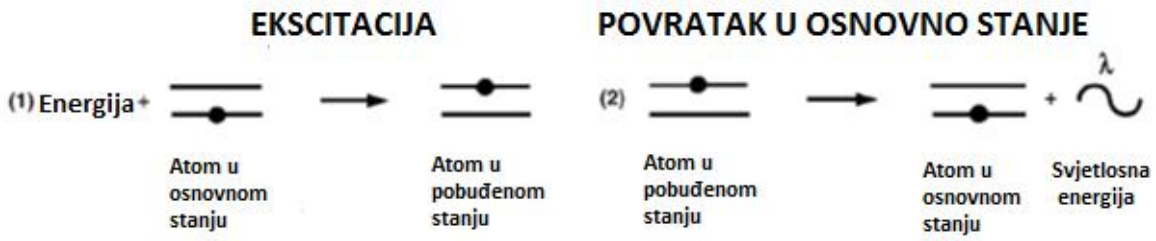
Proizvod	Terapeutska primjena	Proizvođač	Metal/metaloid
ProHance®	Kontrasno sredstvo	Bracco Diagnostics, Inc.	Gd
Multi-Hance®	Kontrasno sredstvo	Bracco Diagnostics, Inc.	Gd
Ferinject®	Kontrasno sredstvo	Syner-Med Ltd.	Fe
Venofer®	Kontrasno sredstvo	Syner-Med Ltd.	Fe
Dexferrum®		Vifor Pharma	Fe
LumenHance®	Kontrasno sredstvo	ImaRx Pharm. Corp.	Mn
Tagitol®	Kontrasno sredstvo	Bracco Diagnostics, Inc.	Ba
Lithobid®	Liječenje schizophrenije	Noven Therapeutics, LLC	Li
Gastrografin®	Kontrasno sredstvo	Bracco Diagnostics	Na
Platinol®	Kemoterapeutik	Bristol-Myers Squibb Co.	Pt
Paraplatin®	Kemoterapeutik	Bristol-Myers Squibb Co.	Pt
Silvadene®	Antimikrobno djelovanje	Monarch Pharmaceutical	Ag
Ferroquine	Antimalarijsko djelovanje		Fe

Brojni metali i metaloidi koriste se u proizvodnji ljekovitih tvari kao reagensi ili katalizatori (Pd, Pt). Pojedini od njih, poput olova, žive, arsena i kadmija, iznimno su toksični te je nužno evaluirati njihovu prisutnost u aktivnim tvarima, ali i gotovim farmaceutskim proizvodima. Atomska apsorpcijska spektroskopija vrlo često se koristi pri provjeri potencijalne kontaminacije metalima u parentalnim otopinama, identifikaciji krivotvorenih lijekova te analizi elementnog sastava ambalaže.

Konačno, potrebno je istaknuti kako je atomsku apsorpcijsku spektroskopiju moguće koristiti kao zasebnu tehniku ali i povezanu s drugim analitičkim tehnikama poput plinske kromatografije i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (Lewen, 2011; Gonzalez-Lopez JM i sur., 2012).

1.2 Osnovni princip atomske emisije i apsorpcije

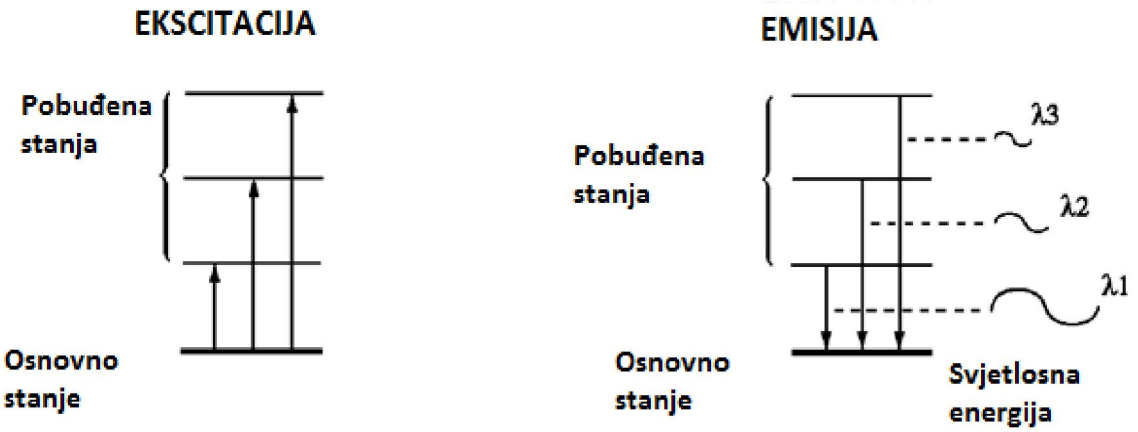
Svaki element ima specifičan broj elektrona povezanih sa svojom jezgrom. Najstabilnije elektronsko stanje, koje ima najnižu energiju, naziva se osnovno stanje. Dovođenjem potrebne količine energije, ona se apsorbira te elektron prelazi u manje stabilnu konfiguraciju poznatu kao pobuđeno stanje. Kako je to stanje nestabilno, elektron će se spontano vratiti u osnovno stanje emitirajući pritom energiju ekvivalentnu količini prethodno apsorbirane energije. Gore opisani proces prikazan je na Slici 1.



Slika 1. Proces ekscitacije elektrona i povratka elektrona u osnovno stanje.

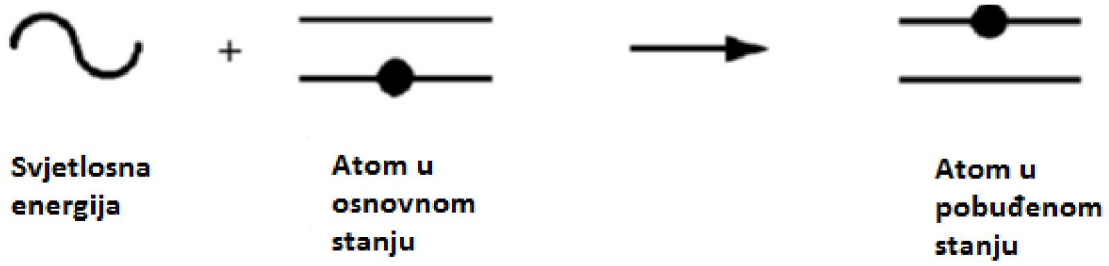
Valna duljina emitirane svjetlosne energije je direktno povezana s prijelazom elektrona. Kako svaki element ima jedinstvenu elektronsku strukturu, valna duljina emitirane svjetlosti je jedinstveno svojstvo svakog elementa. Veliki atomi mogu imati kompleksnu orbitalnu

konfiguraciju, zbog čega može doći do više elektronskih prijelaza od kojih svaki rezultira emisijom karakteristične valne duljine svjetlosti kao što je prikazano na Slici 2.



Slika 2. Prijelazi energije

Prilikom atomske apsorpcije, atom u osnovnom stanju apsorbira svjetlosnu energiju specifične valne duljine te prelazi u pobuđeno stanje (Slika 3)



Slika 3. Proces atomske apsorpcije.

tako da je količina apsorbirane svjetlosti proporcionalna broju atoma u uzorku. Mjereći količinu apsorbirane svjetlosti moguće je kvantitativno odrediti količinu analita. Korištenje specifičnih izvora svjetlosti i precizan odabir valnih duljina omogućuju specifično određivanje pojedinih elemenata u prisustvu drugih.

Postoje osnovne razlike između atomske emisije i atomske apsorpcije. Pri korištenju atomske emisije, toplinska energija ima dvostruku ulogu: prevodi uzorak u atomski oblak, a zatim ekscitira atome u pobuđeno stanje. Kad se atomi vrate u osnovno stanje, emitiraju svjetlost koju detektira instrument pri čemu intenzitet emitirane svjetlosti odgovara koncentraciji ispitivanog elementa. U atomskoj apsorpciji, dovođenjem toplinske energije,

kemijski spojevi u uzorku prevode se u slobodne atome pri čemu većina atoma ostaje u osnovnom stanju te su sposobni apsorbirati svjetlost iz izvora svjetlosti. Brzina i lakoća kojom se mogu dobiti precizna i točna mjerenja ovom tehnikom, učinila su AAS jednom od najpopularnijih metoda određivanja metala (Beaty i Kerber, 1993).

1.3. Kvantitativna analiza atomskom apsorpcijom

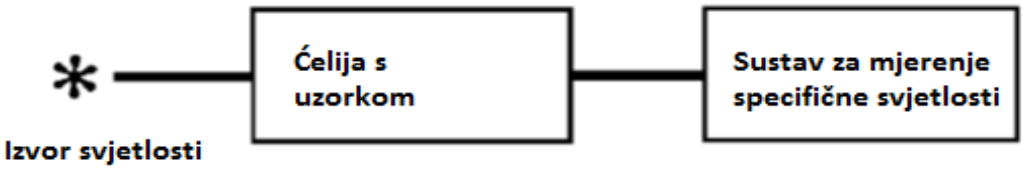
Svjetlost početnog intenziteta, I_o, usmjerena je na ćeliju koja sadrži atome u osnovnom stanju. Početni intenzitet svjetlosti smanjen je za količinu koja je određena koncentracijom atoma u ćeliji. Svjetlost je zatim usmjerena na detektor gdje se mjeri reducirani intezitet, I. Količina apsorbirane svjetlosti određena je uspoređujući I i I_o. Postoji nekoliko različitih pojmova kojima se definira količina apsorbirane svjetlosti.

Transmitancija je definirana kao omjer krajnjeg i početnog intenziteta: $T = I/I_o$.
Ona je pokazatelj dijela početne svjetlosti koji prolazi kroz ćeliju i pada na detektor. Moguće ju je izražavati i u postocima: $T = 100 \times I/I_o$.

Apsorbancija je definirana kao: $A = \log (I_o/I)$, dok postotak apsorpcije je postotak početne svjetlosti koji je apsorbiran u ćeliji: $A = 100 - T(\%)$.
U apsorpcijskoj spektrometriji, apsorbancija je najprikladnija za karakterizaciju apsorpcije svjetlosti jer je linearna s koncentracijom prema Beer Lambertov zakonu: $A = e \times l \times c$ gdje je A apsorbancija, e je apsorpcijski koeficijent koji je specifičan za analit pri specifičnoj valnoj duljini, l je duljina svjetlosnog puta kojeg presijeca analit u ćeliji (širina kivete), a c je koncentracija analita (Beaty i Kerber, 1993; Đorđević i Maćej, 1982).

1.4. Dijelovi atomskog apsorpcijskog spektrometra i način rada

Svaki apsorpcijski spektrometar sastoji se od tri osnovna dijela kao što je prikazano na Slici 4, odnosno sastoji se od izvora svjetlosti, ćelije s uzorkom i sustava za mjerenje specifične svjetlosti.

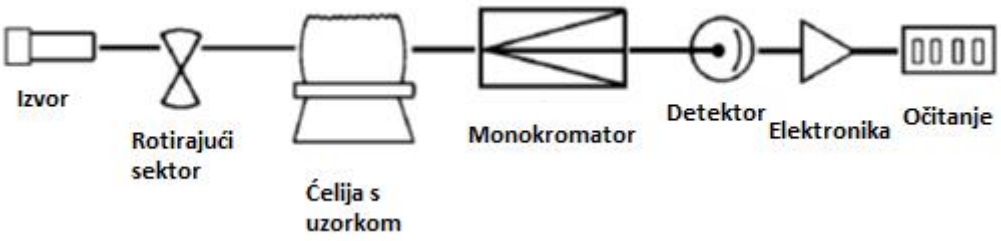


Slika 4. Osnovni dijelovi apsorpcijskog spektrometara.

Detaljnije pod dijelove atomskog apsorpcijskog spektrometra ubrajaju se:

1. Izvor svjetlosti koji emitira spektar ispitivanog elementa,
2. Ćelija u kojoj se atomizira uzorak (plamen, grafitna peć),
3. Monokromator za raspršenje svjetlosti,
4. Detektor koji mjeri intenzitet svjetlosti i pojačava signal i
5. Zaslon koji prikazuje očitanje rezultata nakon što je svjetlost obrađena elektronikom instrumenta.

Postoje dva osnovna tipa atomskog apsorpcijskog spektrometra: s jednim snopom odnosno s dva snopa svjetlosti. Na Slici 5. nalazi se shematski prikaz atomskog apsorpcijskog spektrometra s jednim snopom svjetlosti.



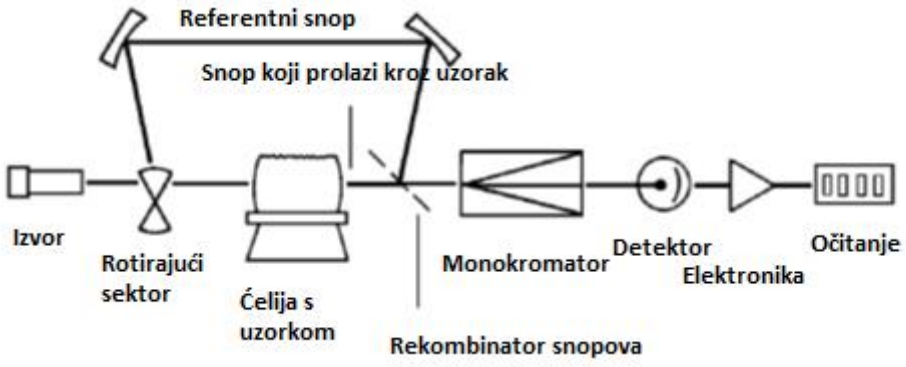
Slika 5. AAS s jednim snopom svjetlosti.

Izvor svjetlosti (šuplja katodna lampa ili lampa s električnim pražnjenjem) emitira spektar koji je specifičan za element kojeg se želi odrediti. Izvor zračenja potrebno je prilagoditi kako bi se selektivno pojačavala svjetlost koju emitira lampa, a utišala emisija iz ćelije s uzorkom. Prilagodbu izvora zračenja moguće je postići rotirajućim sektorom (tzv. *chopper*) koji je smješten između izvora i uzorka ili napajanjem lampe pulsirajućim naponom. Stavljajući uzorak u plamenik ili elektički grijanu peć nastaje atomska para kroz koju onda prolazi snop svjetlosti iz izvora. Nekoliko je dijelova potrebno za specifično mjerenje svjetlosti. Monokromator raspršuje različite valne duljine svjetlosti koje emitira izvor te izolira specifičnu

valnu duljinu koja se želi mjeriti. Izbor specifičnog izvora svjetlosti i određene valne duljine tog izvora omogućuje određivanje izabranog elementa u prisutnosti drugih. Valna duljina svjetlosti koju je izolirao monokromator, usmjerena je na detektor. Obično je to fotomultiplicirajuća cijev, koja stvara električnu struju ovisnu o intenzitetu svjetlosti. Električna struja se zatim pojačava i obrađuje instrumentnom elektronikom, koja mjeri količinu slabljenja svjetlosti u ćeliji s uzorkom i pretvara ta očitanja u koncentraciju uzorka. U sustavima s jednim snopom potreban je kratki period zagrijavanja kako bi se stabilizirao izvor svjetlosti.

Glavna prednost sustava s jednim snopom je to što ima manje optičkih dijelova te je manje složen, jednostavniji je za konstrukciju a time i jeftiniji. Zbog minimalnog broja optičkih dijelova i jednog puta svjetlosti, ima visoku propusnost svjetla. No, s druge strane nedostatak sustava s jednim snopom je to što ne pruža način kompenzacije za varijacije instrumenta tokom analize, poput promjena u intenzitetu svjetlosti iz izvora. Posljedica toga je varijabilnost signala koja može ograničiti mogućnosti izvedbe sustava s jednim snopom.

Na Slici 6. nalazi se shematski prikaz atomskog apsorpcijskog spektrometra s dva snopa svjetlosti.



Slika 6. AAS s dva snopa svjetlosti.

Kod ovog atomskog apsorpcijskog spektrometra svjetlost iz lampe je podijeljena na snop uzorka koji je usmjeren kroz ćeliju s uzorkom i na referentni snop koji zaobilazi ćeliju s uzorkom te je apsorbancija određena iz omjera. Na ovaj način fluktuacije u intenzitetu svjetlosti iz izvora ne utječe na fluktuacije u očitanju instrumenta čime se povećava stabilnost odaziva. Analize je moguće vršiti odmah, bez prethodnog zagrijavanja instrumenta.

Noviji modeli atomskog apsorpcijskog spektrometra su često automatizirani te mogu mijenjati lampe, resetirati parametre instrumenta i uvesti uzorke za visoko propusnu multielementnu analizu. (Lewinson, 2001; Beaty i Kerber, 1993)

1.5. Tehnike za određivanje metala

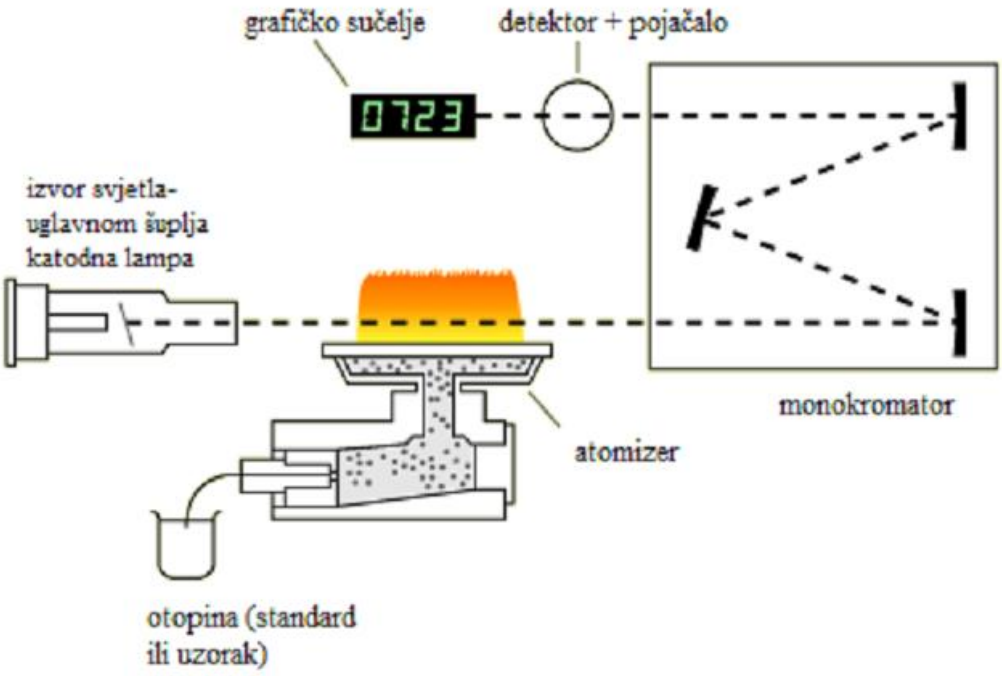
Postoji nekoliko tehnika za određivanje metala i metaloida u različitim vrstama uzoraka. To su: plamena (engl. *Flame Atomic Absorbtion Spectroscopy*, FAAS), grafitna (engl. *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy*, GFAAS) i hidridna AAS te ICP-AES (engl. *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy*) i ICP-MS (engl. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*). Plamena i grafitna tehnika koje se temelje na Beer-Lambertovom zakonu se dulje koriste za analizu metala i metaloida u lijekovima nego ICP-AES i ICP-MS (Lewen, 2011).

1.5.1. Plamena tehnika

Kako bi došlo do atomske apsorpcije, potrebno je iz tekućeg uzorka dobiti atome koji imaju sposobnost apsorbiranja svjetlosti. Spomenuti proces prikazan je na Slici 7, a na Slici 8 prikazana je plamena tehnika.

	$M^+ + A^-$	(Otopina)
1) Raspršivanje	↓	
	$M^+ + A^-$	(Aerosol)
2) Desolvacija	↓	
	MA	(Čvrsto stanje)
3) Rastapanje	↓	
	MA	(Tekućina)
4) Isparavanje	↓	
	MA	(Plin)
5) Atomizacija	↓	
	$M^\circ + A^\circ$	(Plin)
6) Ekscitacija	↓	
	M*	(Plin)
7) Ionizacija	↓	
	$M^+ + e^-$	(Plin)

Slika 7. Proces dobivanja atoma pomoću plamena.



Slika 8. Princip rada atomskog apsorpcijskog spektrometra (izvor: Amidžić Klarić, 2016).

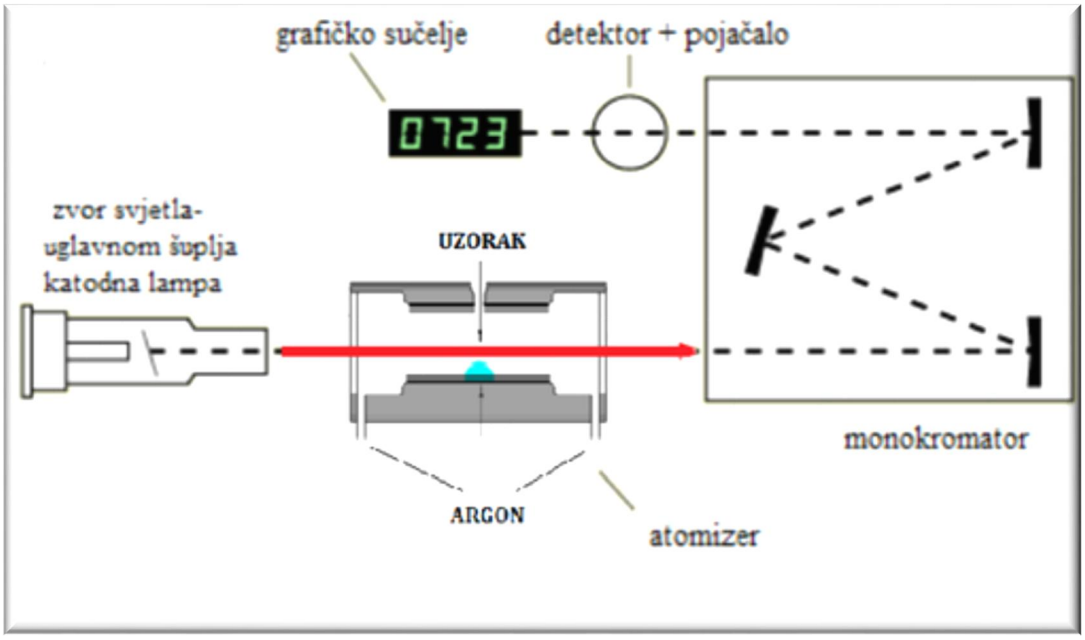
Uzorak se prvo raspršivanjem aspirira u plamenu komoru gdje se kao aerosol miješa s gorivom i oksidirajućim plinovima. Metali su u ovoj fazi još uvijek u otopini ali u obliku finih kapljica aerosola. Nakon tog slijedi proces isparavanja odnosno desolvacije kojim se uklanja otapalo. Daljnjom primjenom topline dolazi do rastapanja, a potom i do isparavanja uzorka. Daljnjim zagrijavanjem dolazi do disocijacije molekule u individualne atome koji su sposobni apsorbirati svjetlost. Dakle, temperatura plamena je važan parametar u plamenoj tehnici te su najčešće korišteni plameni u FAAS smjesa zrak/acetilen i N_2O/acetilen (Lewinson, 2001; Beaty i Kerber, 1993 Đorđević i Maćej, 1982).

Plamena tehnika je brza metoda gdje je za analizu uzorka potrebno nekoliko sekundi. To je precizna metoda analize s pragom detekcije za većinu metala u ppm. Jeftina je i jednostavna za izvođenje u odnosu na druge tehnike, no u plamenoj tehnici postoji mnogo koraka koji limitiraju osjetvljivost tehnike. Apsorbancija ovisi o broju atoma na optičkom putu spektrometra u danom trenutku. Proces raspršenja uzorka, koji uvlači uzorak u komoru s plamenom prosječnom brzinom od 3-8 mL/min ograničava brzinu uvođenja uzorka, a time i količinu uzorka koju je moguće prenijeti do plamena. Nadalje, nepoželjna karakteristika plamenika je rasipanje uzorka. Tek mali dio raspršenog uzorka dolazi do plamena, dok je ostatak usmjeren prema odvodu. Dio uzorka koji uđe u plamen kratkotrajno ostaje na putu

svjetlosti prije nego bude odnesen. Osjetljivost atomske apsorpcije moguće je povećati poboljšanjem efikasnosti uzorkovanja ili duljim zadržavanjem atoma analita na putu svjetlosti čime se postiže veća asporpcija za istu koncentraciju analita (Lewen, 2011; Beaty i Kerber, 1993).

1.5.2 Grafitna tehnika

U grafitnoj tehnici (Slika 9) mali volumen otopine uzorka kvantitativno se unosi kroz suženi otvor u zagrijanu grafitnu cijev (tzv. mini-Massmann peć). Unutar peći prilikom zagrijavanja uzorka dolazi do ekscitacije atoma. Uzorak je moguće unijeti direktno ili primjenom grafitne platforme (tzv. L'vov platforma). Postupak se sastoji od nekoliko koraka, uključujući sušenje, pougljavanje (*charring*), pepeljenje (*ashing*), atomiziranje i čišćenje (*clean-out*). Ovisno o prirodi uzorka, moguće je koristiti i druge korake zagrijavanja. Pri koraku atomizacije, peć se vrlo brzo zagrijava za visoku temperaturu (do usijavanja), obično od 2500 do 2700 °C. Atomizirani analit stvara prolazni apsorpcijski signal koji se mjeri. Kao i u plamenoj tehnici, korištenjem Beer Lamberovog zakona, iz apsorpcijskog signala se određuje koncentracija analita (Lewen, 2011).



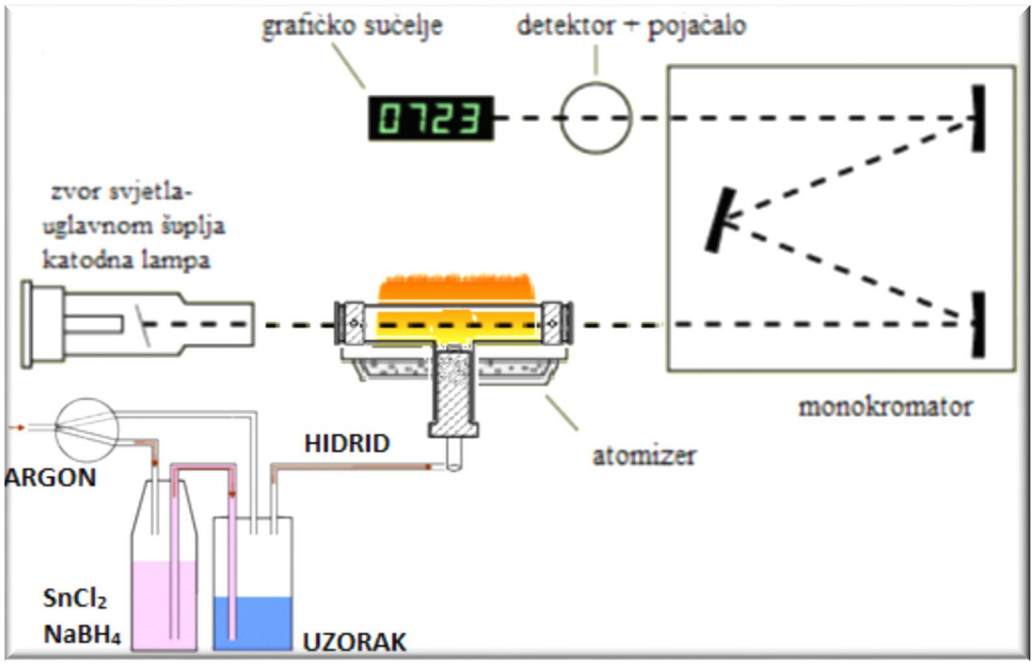
Slika 9. Grafitna tehnika (izvor: Amidžić Klarić, 2016).

Kod ove tehnike prag detekcije za većinu elemenata je u ppb. Uzorak se atomizira u veoma kratkom vremenu i nastali atomi se koncentriraju u zagrijanoj ćeliji čime dolazi do

povećanja osjetljivosti. Iako ova tehnika koristi mikrolitarske volumene uzorka, atomi dugo ostaju na svjetlosnom putu što osigurava nizak limit detekcije. Jedna od prednosti grafitne tehnike je automatizacija veća nego kod ostalih tehnika. Iako su programi zagrijavanja veoma sofisticirani, jednom kad je uzorak unesen i pokrenut program peći cijeli proces je automatiziran. Zasigurno je moguće reći kako je najveća prednost grafitne tehnike njena široka primjenjivost. Može odrediti većinu elemenata koji su mjerljivi pomoću atomske apsorpcije u širokom izboru matriksa (Beaty i Kerber, 1993). S druge strane nedostaci grafitne tehnike su to što je u odnosu na plamenu tehniku sporija, skuplja te zahtijeva iskusnog analitičara (Lewen, 2011).

1.5.3 Hidridna tehnika

Pri kvalitativnom i kvantitativnom određivanju lako hlapljivih elemenata (As, Bi, Ge, Pb, Sb, Se, Sn, Te) koji grade isparljive hidride koristi se hidridna tehnika (Slika 10). Hidridi pokazuju različit stupanj nestabilnosti i razlažu se do metala na relativno niskim temperaturama. Pri dobivanju hidrida uzorci reagiraju s reducensima, najčešće natrijevim borhidridom. Reakcija se izvodi u zatvorenoj posudi, a plinoviti produkti reakcije se pomoću struje dušika prenose u kvarcnu apsorpcijsku ćeliju. U nekim hidridnim sustavima, apsorpcijska ćelija se nalazi iznad plamenika i zagrijava se plamenom zrak-acetilen dok se u drugim sustavima ćelija zagrijava elektički. U oba slučaja hidridi se u zagrijanoj ćeliji disociraju u slobodne atome i atomska apsorpcija raste i pada kako atomi nastaju i odlaze iz apsorpcijske ćelije.



Slika 10. Hidridna tehnika (izvor: Amidžić Klarić, 2016).

Zbog visoke efikasnosti uzorkovanja, hidridna tehnika ima mogućnost detekcije koncentracija ispod µg/L. Kod složenih uzoraka osobito je važno da stvaranjem hidrida analit se odvaja od matriksa uzorka čime se jednostavno uklanjaju interferencije. Najveći nedostatak hidridne tehnike je njena ograničenost na elemente koji mogu stvarati hidride. Rezultati jako ovise o različitim parametrima, uključujući valentno stanje analita, vrijeme reakcije, tlakove plinova, koncentraciju kiselina i temperaturu apsorpcijske ćelije (Lewinson, 2001; Beaty i Kerber, 1993).

1.5.4 Tehnika hladnih para

Većina elemenata, čija se koncentracija određuje pomoću atomske apsorpcije, ne postoji u slobodnom, osnovnom stanju pri sobnoj temperaturi. Kako bi se razbile veze koje vežu atome u molekule, na uzorak se primjenjuje toplina. Izuzetak je živa čiji slobodni atomi mogu postojati na sobnoj temperaturi zbog čega ju je moguće mjeriti atomskom apsorpcijom bez zagrijavanja ćelije s uzorkom. U tehnici hladnih para živa se reakcijom s kositrovim kloridom ili natrijevim borhidratom u zatvorenom sustavu reducira u slobodne atome. Visoki napon pare metalne žive omogućuje njen prijenos pomoću struje plina u apsorpcijsku ćeliju gdje se detektira pomoću apsorpcije.

Zbog 100%-tne efikasnosti uzorkovanja, osjetljivost tehnike hladnih para je puno veća nego osjetljivost plamene tehnike. Osjetljivost je moguće dodatno poboljšati uporabom velikih volumena uzoraka. Kako se sva živa iz uzorka atomizira i transportira u ćeliju za mjerenje, povećanje volumena uzorka znači povećanje broja atoma žive koji se mjere. Limit detekcije je oko 0.02 μg/L.

Od svih tehnika, tehnika hladnog para je najosjetljivija i najpouzdanija tehnika za određivanje vrlo niskih koncentracija žive atomskom apsorpcijom. Nedostatak je njena ograničenost na živu jer se niti jedan drugi element ne može reducirati u slobodne atome pri sobnoj temperaturi (Lewinson, 2001; Beaty i Kerber, 1993).

1.6 Priprema uzoraka za atomsku apsorpcijsku spektrometriju

Kako se uzorak atomizacijom pretvara u slobodne atome neovisno o početnom stanju uzorka, priprema uzorka obično je jednostavna (Lewinson, 2001). Neke uzorke (poput bioloških tekućina) dovoljno je tek razrijediti prikladnom otopinom, zagrijati za prekoncentraciju ili izvršiti djelomično ili potpuno otapanje uzorka. No za pripremu većine uzoraka potreban je dodatak reagensa i primjena dovoljne količine energije da bi se pokidale veze i kristalna struktura čvrstih tvari. Ukoliko je potrebno, moguće je koristiti i dopunske reagense za dobivanje analita iz otopine. Dva osnovna postupka korištena za pripremu uzorka su suho i mokro otapanje *(dry and wet dissolution)*.

Tehnike suhog otapanja su fuzija (*fusion*) i suho spaljivanje *(dry ashing).* U procesu fuzije uzorak se miješa i stapa s sredstvom za taljenje *(flux)* da bi se stvorili produkti koje je moguće otopiti u vodi ili razrjeđenoj kiselini. Proces se odvija pri visokoj temperaturi (300-1000 °C) koja se postiže plamenom ili mikrovalnom peći. Suho spaljivanje koje se koristi za eliminaciju ili minimalizaciju organskih minerala prije određivanja mineralnih elemenata vrši se spaljivanjem organskih spojeva na zraku ili pari kisika.

Kod mokrog otapanja, za razgradnju organskih uzoraka prije određivanja sadržaja metala ili za ekstrakciju metala iz anorganskih matriksa što omogućuje njihovo određivanje, koriste se oksidansi. U procesu mokrog otapanja koriste se koncentrirane kiseline i zagrijavanje (različiti izvori energije: termalna, ultrazvučna i energija zračenja) (Oliviera, 2013).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Atomska apsorpcijska spektroskopija je kvantitativna metoda za određivanje koncentracija pojedinih metala u otopini. Za atomiziranje uzorka najčešće se koristi plamen, iako su u upotrebi i druge metode kao npr. grafitna peć.

Premda je udio metala u otopinama moguće odrediti i drugim analitičkim tehnikama, zbog svojih prednosti poput jednostavnosti i niske cijene analize atomska apsorpcijska spektroskopija vrlo često se koristi u analitici lijekova i njihovih onečišćenja ali i u bioanalitici.

Cilj ovog rada bio je proučiti prednosti i nedostatke atomske apsorpcijske spektroskopije te istražiti i kritički se osvrnuti na njenu ulogu u analitici farmaceutskih proizvoda.

3. MATERIJALI I METODE

Za izradu diplomskog rada koristit će se relevantna znanstvena i stručna literatura koja obrađuje problematiku atomske apsorpcijske spektrometrije. Kako bi se ispunili ciljevi istraživanja pretražit će se slijedeće baze podataka: *PubMed*, *Web of Science*, *ScienceDirect* i *Scopus*. Pretraživanje literature provest će se primjenom ključnih riječi: *Flame Atomic Absorbtion Spectroscopy*, *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy, pharmaceutical analysis*, *impurities and bioanalytical methods*. Također će se pretražiti knjige i mrežne stranice koje obrađuju navedenu problematiku.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. ODREĐIVANJE MAGNEZIJEVA STEARATA U FARMACEUTSKIM PROIZVODIMA PRIMJENOM ATOMSKE APSORPCIJSKE SPEKTROMETRIJE

Uvod

Magnezijev stearat se vrlo često primjenjuje kao ekscipijens u proizvodnji tableta i granula. Naime, djeluje kao lubrikant te omogućava učinkovitost proizvodnog procesa. Kako bi se postigla njegova učinkovitost odnosno spriječilo pucanje i lijepljenje gotovog farmaceutskog proizvoda iznimno je važna njegova pravilna raspodjela po proizvodu.

Kako bi ispitali ujednačenost raspodjele magnezijeva starata u granulama i tabletama Sugisawa i suradnici (Sugisawa i sur., 2009) primjenili su atomsku apsorpcijsku spektrometriju.

Materijali i metode

Ekstrakcija magnezijeva sterata iz proizvoda provedena je prema uputama Japanske farmakopeje. Kako bi se utvrdila raspoređenost magnezijeva stearata u granulama uzeti su uzorci s 6 do 10 lokacija unutar posude za miješanje, dok je 6 tableta grube površine odnosno 10 tableta glatke površine analizirano pojedinačno. Udio magnezijeva stearata u ovim formulacijama kretao se od niskih 0,22 do visokih 0,8% (*w*/*w*).

Uzorcima je dodana razrjeđena nitratna kiselina te su uzorci stavljeni u ultrazvučnu kupelj, te potom tresilicu tijekom 20 odnosno 15 minuta. Nakon hlađenja uzorci su centrifugirani pri 3000 rpm tijekom 10 minuta te je supernatant analiziran primjenom plamene atomske apsorpcijske spektrometrije (AA-6600 atomski apsorpcijski spektrometar, Shimadzu, Kyoto, Japan) pri valnoj duljini od 285,21 nm.

Rezultati i rasprava

Kako bi se utvdila pouzdanost ekstrakcijskog postupka te primjenjene analitičke metode provođena je validacija postupka. Ispitani su sljedeći parametri: specifičnost, linearnost, osjetljivost, točnost i preziznost metode.

Specifičnost metode ispitana je primjenom 4 različita proizvoda (Tablica 3).

Tablica 3. Specifičnost metode (interferencije s drugim materijalima).

N	koncentracija MgSt (w/w%)			
	Proizvod A (0.25 w/w%)[a]	Proizvod B (0.8 w/w%)[a]	Proizvod C (0.25 w/w%)[a]	Proizvod D (0.22 w/w%)[a]
1	0.0034	0.0728	0.0235	0.0121
2	0.0035	0.0776	0.0235	0.0117
3	0.0035	0.0440	0.0223	0.0114
Srednja vrijednost	0.0035	0.0648	0.0231	0.0117
S.D.	0.00006	0.01817	0.00012	0.00035
Interferencija s vrijednostima testa (%)[b]	2.8	8.1	9.2	5.5

a Teorijski sadržaj MgSt u svakom proizvodu.
b Izračunato naspram teorijskih sadržaja MgSt.

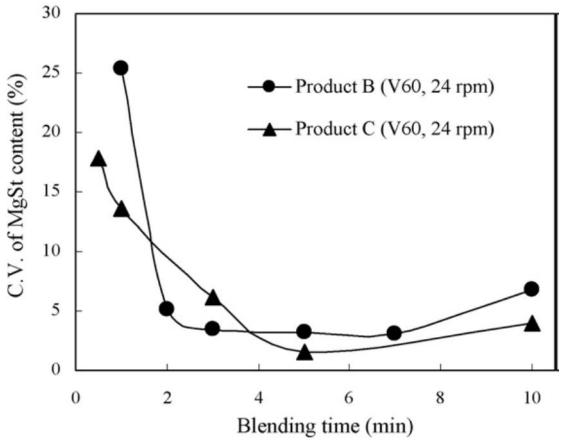
Dobiveni rezultati upućuju na neprimjenjivost metode ukoliko se kao ekscipijensi koriste i talk odnosno magnezijev silikat i kalcijev karbonat.

Izvanredna linearnost metode ($r \geq 0{,}999$) uočena je za radno područje, dok je limit određivanja (engl. *Limit of Quantitation*, LOQ) određen iz omjera signala i šuma (S/N = 10). Predloženom metodom dobivena je niska LOQ vrijednost od svega 4,5% (w/w).

Niske vrijednosti standardnih devijacija (0,1 - 0,7%) upućuju na visoku preciznost metode. Premda je nezadovoljavajuća točnost metode dobivena za iznimno niske koncentracije magnezijevog stearata (10% od vrijednosti koja se nalazi u granulama/tabletama) moguće je zaključiti kako je metoda prikladno točna. Naime, analitički prinos je bio oko 100% za koncentracije magnezijeva stearata koje su bile od 50 do 200% one u gotovim proizvodima.

Ovako validirana metoda primjenjena je za optimizaciju pojedinih koraka formulacijskog postupka. Naime ispitan je utjecaj sljedećih parametara: način dobivanja magnezijeva sterata, vrijeme njegova miješanja, veličina proizvodne šarže, vrsta mješalice te izgled vanjske površine tablete.

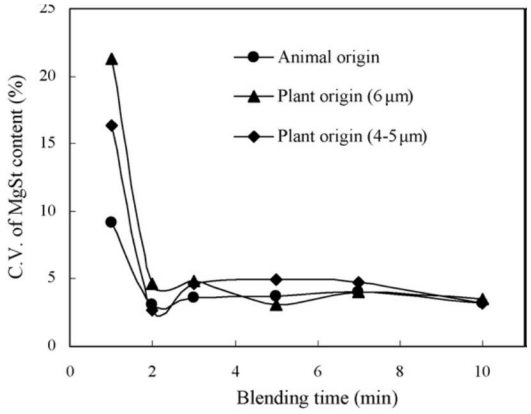
Uniformiranost raspodjele magnezijeva stearata u granulama značajno se razlikovao na samom početku postupka granulacije tijekom prve dvije minute miješanja ovisno o udijelu magnezijeva stearata u ispitanim formulacijama (od 0,22 do 0,8%, *w*/*w*). Kao što je bilo za očekivati koeficijent varijance bio je veći kod formulacije s velikim udjelom magnezijeva stearata. No, nakon početnog vremena razlika se smanjila (koeficijent varijance je bio manji od 5%) te je uniformiranost raspodijele bila jednaka bez obzira na udio magnezijeva stearata u formulaciji (Slika 11).



Slika 11. Utjecaj uniformiranosti sadržaja magnezijeva stearata na vrijeme miješanja formulacije. Na osi *y* prikazane se vrijednosti koeficijenta varijance dobivene iz 10 uzoraka.

Kako bi se ispitao utjecaj veličine šarže na ujednačenost raspodjele magnezijeva stearata ispitane su tri različite šarže: 5, 30 i 200 kg. Dobiveni rezultati upućuju kako veličina šarže nije imala značajan utjecaj kao ni vrsta korištene mješalice.

Većina proizvođača u novije vrijeme češće koristi magnezijev stearat biljnog porijekla nego animalnog zbog straha od kravlje encefalopatije. No pojedine studije su pokazale kako magnezijev stearat dobiven različitim postupcima ne pokazuje jednaku učinkovitost (Hamad i sur., 2008). Stoga je studija obuhvaćala i ispitivanje utjecaja porijekla magnezijeva stearata na ujednačenost njegove raspodjele u ispitivanim formulacijama. Ono što je moguće uočiti iz Slike 12. je da značajna razlika postoji no samo tijekom prve dvije minute miješanja.



Slika 12. Utjecaj porijekla dobivanja magnezijeva stearata na ujednačenost njegove raspodjele u granulama. Na osi *y* prikazane se vrijednosti koeficijenta varijance dobivene iz 10 uzoraka.

Prema podacima prikazanim u Tablici 4. moguće je zaključiti kako je udio magnezijeva stearata značajno niži kod tableta s hrapavom nego glatkom površinom. Daljnim istraživanjem

uočeno je kako je i ujednačenost raspodjele magnezijeva stearata u tabletama s hrapavom površinom niska (koeficijent varijance bio je visokih 41,7%). Stoga je vrijeme miješanja produženo na 3 minute čime je dobiven i bolji izgled tableta i bolja ujednačenost sadržaja magnezijeva stearata.

Tablica 4. Usporedba sadržaja magnezijeva stearata u tabletama s hrapavom i glatkom površinom

	Sadržaj MgSt (w/w%) u tabletama[a] (raspon)
Tablete s hrapavom površinom (n = 6)	0.10[b] (0.09–0.12)
Tablete s glatkom površinom (n = 10)	0.26 (0.25–0.26)

[a] Ciljni sadržaj MgSt je 0.25 w/w%.
[b] p 0.01 = 33.631 > 2.977 (Studentski T-test).

Zaključak

U radu je opisana brza metoda za utvrđivanje ujednačenosti sadržaja magnezijeva stearata u granulama i tabletama primjenom atomske apsorpcijske spektrometrije. Jedna od najvećih prednosti metode je što unutar 40 minuta 10 uzoraka može biti analizirano čime ne dolazi do značajnog zastoja u proizvodnji. Kao najznačajniji nedostatak metode ističe se neprimjenjivost za farmaceutske proizvode koji sadrže više oblika magnezijevih spojeva (Sugisawa i sur., 2009).

4.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE RAZINE OLOVA I KADMIJA U UČESTALO PRIMJENJIVANIM DJEČJIM SIRUPIMA U NIGERIJI PRIMJENOM AAS

Uvod

Nakupljanje teških metala u proizvodima poput dječjih sirupa može imati srednjoročne i dugoročne posljedice na zdravlje djece, zbog čega je nužna kontrola ovih tvari, posebice olova i kadmija (Cabrera i sur., 1995). Zbog siromaštva kao i nedostupnosti prikladne zdravstvene skrbi u Nigeriji, veliki broj djece liječi se sirupima upitne kvalitete.

Cilj ove studije je bio ispitati razinu teških metala olova i kadmija u dječjim sirupima, koji se obično izdaju u bezreceptnom režimu, korištenjem AAS tehnike te utvrditi predstavlja li ona zdravstveni rizik (Orisakwe i Nduka, 2009).

Materijali i metode

Za ispitivanje je uzeto pedeset uzorka dječjih sirupa prisutnih na Nigerijskom tržištu te su podijeljeni u dvije skupine: lokalno proizvedeni i uvezeni proizvodi. Uzorci su spaljeni i digestirani u Teflon laboratorijskom posuđu koje je očišćeno u HEPA fitriranom laboratoriju bez tragova metala kako bi se izbjegla kontaminacija. Ovaj protokol uključivao je sekvencijalno čišćenje posuđa: otopina deterdženta i ispiranje deioniziranom vodom, otopina 6M HCl i ispiranje ultra čistom vodom te otopina 7,5 M HNO_3 i ispiranje ultračistom vodom. Nakon čišćenja posuđe je sušeno u laminaru. Metoda suhog spaljivanja izvedena je dodatkom 30 ml svakog uzorka u Erlenmeyerovu tikvicu i grijanjem na ploči na 200 °C tijekom 45 min, a zatim u mufolnoj peći na 500 °C dok se volumen ne smanji do gotovo suhog uzorka. Digestija je provedena dodatkom 10 ml zlatotopke ($HCl:HNO_3$, 3:1) te zagrijavanjem do suha. Dodano je 20 ml deionizirane vode, miješano i filtrirano. Filtrat je napravljen u standardnoj volumetrijskoj tikvici, a olovo i kadmij su ispitani atomskom apsorpcijskom spektrometrijom. Limit detekcije za kadmij iznosio je 0,001, a za olovo 0,01 ppm. Kao slijepa proba korištena je deionizirana voda elektrovodljivosti manjom od 5 µS/cm. Svi uzorci su analizirani u triplikatu.

Rezultati i rasprava

Tablica 5. prikazuje razine olova i kadmija (ml/l) u dječjim sirupima proizvedenim u Nigeriji. Razine olova kretale su se od 0,01 u klorokinu do 1,08 mg/l u *Magcidu* (suspenzija magnezijeva sulfata). Najveća razina kadmija pronađena je u *Magcidu* (2,45 mg/l), a najniža u *Emzolynu* (difenhidramin) i *Colipanu* (hioscin-N-butilbromid). Oko 41,2% lokalno

proizvedenih sirupa je imalo razine olova ispod granice detekcije, dok je kadmij detektiran kod svih sirupa.

Tablica 5. Koncentracije olova i kadmija (mg/l) u sirupima proizvedenima u Nigeriji.

S/no	Farmaceutski proizvod	Serijski broj	NAFDAC broj	Datum proizvodnje	Rok trajanja	Razina metala (mg/l)		Mjesto proizvodnje
						Cd	Pb	
1	Asco-J vitamin	0020	04-7233	8/2007	8/2009	0,19	0,03	Enugu, Nigeria
2	Emvite	4110k	04-0135	8/2007	8/2010	0,33	0,41	Lagos, Nigeria
3	J— Vite	0018	04-7232	7/2007	7/2009	0,22	0,14	Enugu, Nigeria
4	Ferobin plus	LA79138	04-4838	7/2007	5/2010	0,05	0,09	Ogun, Nigeria
5	Emzolyn	3050k	04-1454	5/2007	5/2010	0,01	0,17	Lagos, Nigeria
6	Multivite	7f434012	04-0331	6/2007	11/2008	0,02	0,05	Ogun, Nigeria
7	Kingsize Vit C	HM2279C	04-0879	1/2006	12/2008	0,03	0,10	Ogidi, Nigeria
8	Asco-J Vit C	0020	04-7233	8/2007	8/2009	0,03	0,02	Enugu, Nigeria
9	Gauze Vit C	GZ00152	04-3174	2/2007	2/2009	0,02	Nd	Awka, Nigeria
10	Em-Vit C	807k	04-0262	2/2007	2/2009	0,02	Nd	Lagos, Nigeria
11	Zvobes Cough Syrup	007	04-0665	2/2006	2/2009	0,03	Nd	Lagos, Nigeria
12	Gauze multivitamine	00213	04-3234	2/2007	2/2009	0,07	Nd	Awka, Nigeria
13	Gaviron	Gvm-0049	04-5131	2/2007	2/2010	0,10	0,20	Awka, Nigeria
14	Coflin	L1907	04-0540	9/2007	8/2009	0,05	Nd	Lagos, Nigeria
15	Avipol	ASV02	04-4744	6/2007	5/2010	0,08	Nd	Ogun, Nigeria
16	Cypri Gold	260807	04-1627	8/2007	7/2009	0,02	Nd	Lagos, Nigeria
17	Heamoglobin Tonic	001HV	04-0338	7/2007	7/2010	0,05	0,12	Lagos, Nigeria
18	Emzoron Tonic	4327k	04-1450	7/2007	7/2009	0,06	0,15	Lagos, Nigeria
19	Babyrex	TBB81	04-3937	11/2007	10/2010	0,34	Nd	Ilorin, Nigeria
20	Gauze Chloroquine	TN00151	04-3166	1/2006	2/2009	0,41	0,01	Awka, Nigeria
21	Septrin Syrup	6002	04-1888	10/2006	10/2009	0,04	0,02	Ogun, Nigeria
22	Kp Multivitamine Sy,	HM2199M	NA	2/2007	1/2009	0,63	0,96	Ogidi, Nigeria
23	7 Keys Herbal Mix	179*10/08	04-1986L	10/2007	10/2010	0,64	0,12	Onitsha, Nigeria
24	Phenergan	LOTIW1200	04-0290	6/2006	8/2009	0,19	0,08	Lagos, Nigeria
25	Magcid Suspension	MD0065	04-5136	11/2007	11/2009	2,45	1,08	Awka, Nigeria
26	Jawaron Syrup	L7019	04-2037	7/2007	7/2009	0,11	Nd	Lagos, Nigeria
27	Diastop Suspension	7011	04-1393	1/2007	1/2011	0,02	0,04	Lagos, Nigeria
28	Priton Syrup	7k514008	04-0437	10/2007	9/2010	0,22	0,02	Ogun, Nigeria
29	Forte Chloroquine S	LOT1X-120	04-1718	1/2007	12/2010	0,07	Nd	Lagos, Nigeria
30	Paracetamol Syrup	L124M	04-0289	1/2008	1/2011	0,07	Nd	Lagos, Nigeria
31	Tixylix cough syrup	IW815	04-0320	9/2006	8/2009	0,14	0,09	Lagos, Nigeria
32	Broncholyte	BI 63	04-2904	12/2007	12/2010	0,02	Nd	Ogun, Nigeria
33	Colipan B	109	04-4044	8/2007	8/2010	0,01	Nd	Ogun, Nigeria
34	EM-B-Plex	3497k	04-0287	7/2007	7/2010	0,05	Nd	Lagos, Nigeria

Tablica 6. prikazuje razine olova i kadmija u uvezenim sirupima. Razine olova su bile od 0,01 mg/l u *Cadiphenu* (klorfeniramin, gvaifenezin), proizvedenom u Indiji, do 0,09 mg/l u *Maxiquinu* (kinin, rezorcinol) iz Engleske. Oko 68,8% uvezenih sirupa je imalo razine olova

ispod granice detekcije. *Chloramphenicol* i *Zentel albendazole* sirupi su imali 0,60 odnosno 0,88 mg/l kadmija. *Bellis Cough Syrup* (sirup tratinčice) je imao najnižu razinu kadmija (0,01 mg/l). Samo je suspenzija eritromicina imala razinu kadmija ispod granice detekcije.

Tablica 6. Koncentracije olova i kadmija u uvezenim dječjim sirupima.

S/no Farmaceutski proizvod Serijski broj NAFDAC broj Datum proizvodnje Rok trajanja Razina metala (mg/l) Mjesto proizvodnje							
					Cd	Pb	
1 Bellis Cough Syrup	9601	04-1814	6/2006	6/2009	0,01	Nd	Southport, Engleska
2 MIM iron syrup	003705XP	04-5942	6/2007	5/2010	0,05	Nd	Mubai, Indija
3 Pentax Paracetamol Sy	L41006	04-0073	10/2006	9/2008	0,25	Nd	Nigeria (licenc. u Eng)
4 Woodwards Gripe water	070048	04-1030	8/2007	8/2010	0,15	Nd	Nigeria (licenc. u Eng)
5 Menthodex Cough Sy	672H1	04-0971	6/2007	6/2010	0,14	Nd	UK
6 Chloramphenicol	71002	04-2745	10/2007	10/2010	0,60	Nd	Nigeria (licenc. u Jerseyu)
7 Erythromycin Suspens.	007	04-5863	11/2005	11/2008	Nd	Nd	Bulchistan, Pakistan
8 Cephalexin Syrup	061624A	04-0883	1/2006	1/2009	0,10	Nd	Cairo, A.R.E, Egipat
9 Vardorange Syrup	VO-21	04-6063	2/2006	1/2009	0,08	0,02	Mumbai, India
10 Ailon Multivit. Drop	360345	04-3204	11/2006	10/2008	0,12	0,03	London, Engleska
11 Haemoglobin Syrup	37527	04-7608	2/2006	1/2010	0,21	Nd	Tipperart, Irska
12 Halfan	6005	04-2181	3/2006	3/2009	0,48	Nd	Nanterre, Francuska
13 Zentel Albendazole	370001	04-2467	1/2007	12/2009	0,88	0,03	Bangalore, Indija
14 Maxiquine	L8107	04-5253	1/2007	12/2008	0,03	0,09	Nigeria (licenc.u Eng)
15 Piccan	S724	04-2729	7/2007	7/2010	0,09	Nd	Dublin, Irska
16 Cadiphen	E 7015	04h-1876	5/2007	4/2011	0,55	0,01	Dholka, Indija

Nd – nije detektirano

Uvezeni sirupi imali su manje koncentracije olova i kadmija nego sirupi iz Nigerije. Rezultati su pokazali prisutnost olova u 60% i kadmija u 98% ispitanih uzoraka.

Zaključak

Provedenim istraživanjem uočeno je da primjenom nekih od ispitanih sirupa moguće izložiti djecu teškim metalima. Ovaj podatak se može smatrati ozbiljnim javnozdravstvenim problemom. Svi ispitani sirupi su registrirani u Regulatornoj agenciji za hranu i lijekove čime je moguće doći do zaključka da u Nigeriji ne postoji zadovoljavajuća razina kontrole teških metala u farmaceutskim proizvodima (Orisakwe i Nduka, 2009).

4.3. NANOČESTICE SREBRA VEZANE NA SILIKA GEL KAO NOVI ADSORBENS ČVRSTE FAZE ZA PREKONCETRACIJU I ODREĐIVANJE ŽELJEZA U BIOLOŠKIM UZORCIMA

Uvod

Željezo ima više bioloških uloga u živom sustavu od bilo kojeg drugog elementa: prijenos kisika u tkiva, optimalan rad mnogih enzima uključenih u sintezu DNA, metabolizmu energije i zaštiti od slobodnih radikala i mikroorganizama (Sharma i Singh, 2003). No, u odnosu na druge prijelazne metale ovaj element je poprilično toksičan. Toksične doze mogu uzrokovati ozbiljne probleme poput depresije, brzog i plitkog disanja, kome, srčanog zastoja i konvulzije (Yacoob i sur., 2006).

Ekstrakcija čvrstom fazom (engl. *solid phase extraction*, SPE) često se koristi za prekoncentraciju i odvajanje analita iz uzoraka poput lijekova, dodataka prehrani, hrane i različitih tvari iz okoliša. Karakterizira ju jednostavnost, niska potrošnja organskog otapala i visoka ekstrakcijska učinkovitost (Elci i sur., 2008). Adsorbirajući materijal (reaktivni sorbens) ima važnu ulogu u SPE jer određuje analitičku osjetljivost, preciznost te prvenstveno selektivnost metode. U posljednje vrijeme kao sorbensi primjenjuju se nanomaterijali, među kojima i modificirani nanometarski SiO_2. Iako je silika gel zahvaljujući silanolnim grupama moguće direktno koristiti kao sorbens, zbog slabe selektivnosti rijetko se primjenjuje. Modifikacijom silika gela s organski funkcionalnim grupama i anorganskim tvarima povećava se njegova selektivnost za pojedine analite (Baysal i sur., 2008).

U ovom ispitivanju silika gel je najprije obložen nanočesticama srebra na koje se zatim vezao morin u svrhu povećanja sorpcije željeza koji reagira upravo s morinom.

Cilj studije bio je razvoj jednostavne, brze i osjetljive metode za određivanje željeza u biološkim uzorcima koristeći kao sorbens nanočestice srebra obložene silika gelom i modificirane morinom. Koncentracija željeza u biološkim uzorcima određena je FAAS-om (Khajeh i Dastafkan, 2012).

Materijali i metode

Za određivanje željeza korišten je Konik Won M300 plameni AAS opremljen šupljom katodom i plamenom acetilen-zrak. Valna duljina emisije iznosila je 248,3 nm, a širina slita 0,2 nm. pH je određen pH-metrom opremljenim staklenom kalomel elektrodom.

Standardna otopina željeza (1000 mg/l) pripremljena je otapajući $FeCl_3x6H_20$ u destiliranoj vodi, dok su radne otopine pripremljene daljnjim razrjeđivanjem dvostruko destiliranom vodom.

Da bi se pripremio sorbens, silika gel je najprije tri puta ispran s 10 ml dvostruko destilirane vode, zatim tri puta s 10 ml HCl (6 mol/l) te na kraju dvostruko destiliranom vodom sve dok pH otopine ostale nakon ispiranja nije bio jednak onom dvostruko destilirane vode. Silika gel se zatim sušio tijekom 10 h na 100 °C u sušioniku. 1 gram suhog i očišćenog silika gela se umiješao u 500 ml dvostruko destilirane vode na 45 °C, dodao se $AgNO_3$ (90 mg) i brzo uz miješanje grijao do vrenja. Brzo se dodalo 10 ml 1%-tne otopine natrijevog citrata te se smjesa uz konstantno miješanje grijala 100 min. Centrifugiranjem smjese razdvojile su se faze te se dekantacijom odvojio supernatant. Nanočestice srebra obložene silika gelom su četiri puta isprane s 20 ml dvostruko destilirane vode te se se sušile 10 h na 100 °C u sušioniku.

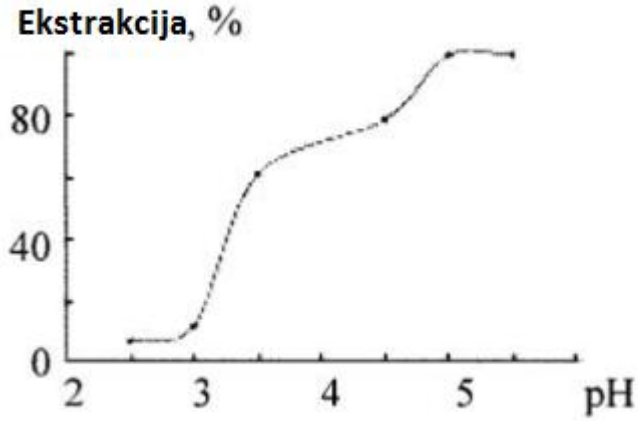
Proces ekstrakcije proveden je pomoću plastične šprice s filterima na oba kraja koja se napunila s 1 g sorbensa. SPE se tretirao s 2 ml metanola i 5 ml 0,5 mol/l HNO_3 i ispirao dvostruko destiliranom vodom do odsutnosti kiseline. Otopina 0,05 mg morina u 2 ml etanola se nanijela se na sorbens kao bi se modificirao.

1 g uzorka bubrega odnosno jetre odvagao se u Erlenmeyerovu tikvicu i grijao s dušičnom kiselinom 20 min. Nakon hlađenja, dodala se 2 ml $HClO_4$ i uzorak se grijao do dobivanja vlažnog ostatka. Uzorak se nakon toga otapio u 50 ml vode i pustio sorbens. Stvaranjem kompleksa između morina i željeza dolazi do zadržavanja željeza na sorbensu. Zadržani analit se eluirao dušičnom kiselinom i uzorci su potom analizirani FAAS-om.

Rezultati i rasprava

Ispitivan je utjecaj slijedećih faktora na uspješnost ekstrakcije željeza: pH vrijednost otopine uzorka, volumen uzorka, brzina protoka otopine uzorka i eluenta, koncentracija i volumen HNO_3 (eluent) te utjecaj interferirajućih iona na selektivnost metode.

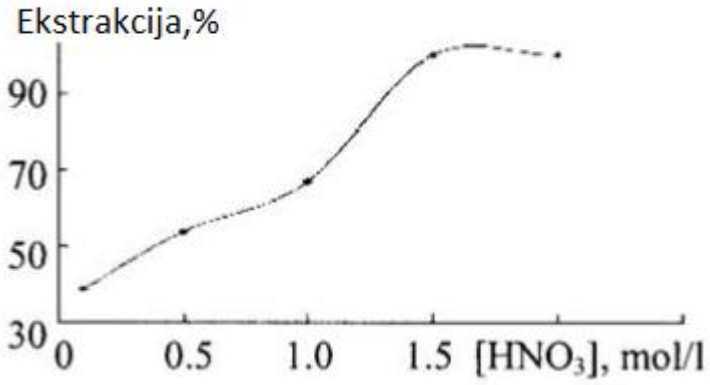
Kako proces vezanja analita za reaktivni sorbens ovisi o pH, jedan od najvažnijh faktora u SPE metodi je pH vrijednost otopine uzorka. Utjecaj pH na uspješnost ekstrakcije željeza ispitivan je pri pH od 2,5do 5,5. Kao što se vidi na Slici 13. kvantitativna ekstrakcija (> 97%) je primjećena pri pH 5 te je upravo ova pH vrijednost odabrana za daljnja istraživanja. Potrebno je istaknuti kako pri niskim pH vrijednostima može doći do raspada kompleksa Fe(III)-morin.



Slika 13. Utjecaj pH na učinkovitost ekstrakcije iona željeza.

Brzine protoka otopine uzorka i eluenta su važne za kvantitativnu ekstrakciju i eluaciju željeza u SPE. Njihov učinak ispitivan je pri brzinama 1-10 ml/min, a povećanjem brzine zamjećeno je smanjenje ekstrakcijske učinkovitosti. Kvantitativna ekstrakcija primjećena je pri brzinama protoka 1-5 ml/min, zbog čega se pri ispitivanju koristio protok od 5 ml/min.

Utjecaj koncentracije eluenta (HNO_3) na ispiranje prikazan je na Slici 14. Kvantitativna ekstrakcija postignuta je pri koncentracijama višim od 1,5 mol/l HNO_3. Utjecaj volumena eluenta ispitan je pri konc. HNO_3 1,5 mol/l te je postignuto kvantitativno iskorištenje pri volumenu od 5 ml HNO_3.



Slika 14. Utjecaj koncentracije HNO_3 na učinkovitost ekstrakcije željeza.

Utjecaj matriksa je važan faktor u određivanju koncentracije željeza u uzorcima. Kako bi se ispitala primjenjivost metode na analizu stvarnih uzoraka, tijekom razvoja metode ispitan je sadržaj željeza u binarnim smjesama željeza (0,3 mg/l) i drugih kationa. Limit tolerancije je

definiran kao koncentracija stranih iona potrebna za pogrešku od +/- 4%. Rezlultati prikazani u Tablici 7. pokazuju da ispitani ioni ne interferiraju s ekstrakcijom željeza.

Tablica 7. Ispitivanje limita tolerancije interferirajućih iona.

Strani ion	[Interferirajući ion]/[Ion željeza]
Li^+	400
Na^+	400
K^+	400
Mg^{2+}	400
Ca^{2+}	400
Ba^{2+}	400
Cu^{2+}	10
Zn^{2+}	10
Co^{2+}	10
Pb^{2+}	10
Ni^{2+}	10

Nakon razvoja metode provedena je i njena validacija. Kalibracijska krivulja bila je linearna u rasponu od 10 µg/l do 1,0 mg/l (r^2 = 0,999). Nakon ponavljanja metode 10 puta, pri određivanju 0,5 mg/l željeza dobivena je relativna standardna devijacija (RSD) od 2,5%. Limit detekcije (eng. *Limit of Detection*, LOD) je definiran kao tri standardne standardne devijacije signala slijebe probe ($C_{LOD}=3S_{d\ blank}$) i iznosi 67,0 ng/l.

Propuštanjem uzoraka (25 µg/l Fe) različitih volumena (od 25 do 500 ml) ispitan je utjecaj volumena uzorka na ekstrakcijsku učinkovitost. Analitički prinos za sve uzorke bio je veći od > 97%.

Zaključak

Predloženi postupak pokazuje prikladnost ispitanog modificiranog sorbensa za ekstrakciju tragova željeza iz bioloških uzoraka. Metoda je jednostavna, brza i ekonomična zbog mogućnosti ponovne uporabe sorbensa. Postupak je uspješno primijenjen na određivanje željeza u raznim biološkim uzorcima, a linearnost kalibracijske krivulje je unutar potrebnog raspona za kvantifikaciju željeza s limitom detekcije od 67,0 ng/l (Khajeh i Dastafkan, 2012).

4.4. METALNA CIJEV GRIJANA PLAMENOM KAO ATOMIZATOR HIDRIDA U ATOMSKOJ APSORPCIJSKOJ SPEKTROMETRIJI: ODREĐIVANJE Sb U UZORCIMA LIJEKOVA I OKOLIŠA

Uvod

Prednosti hidridne tehnike dovele su do njene primjene na praktično sve elemente koji stvaraju hlapljive isparljive hidride. Za atomizaciju hidrida trenutno se najčešće koriste uobičajni eksterno grijani atomizatori s kvarcnim cijevima (engl. *Quarz Tube Atomizers*, QTA). QTA je dizajniran u obliku T-cijevi s horizontalnim dijelom (optička cijev) koji se nalazi u ravnini s optičkim putem spektrometra. Centralni dio služi za dostavu hidrida nošenih strujom plina iz generatora. Optička cijev se grije uređajem na električni otpor ili plamenom acetilen-zrak (700-1100 °C) (Korkmaz i sur., 2005). Modifikacijom QTA bušenjem pet otvora na optičkoj cjevi (engl. *Hole Quarz Tube Atomizers*, HQTA) povećava se selektivnost i osjetljivost (Grinberg i sur.,1999). Konvencionalni QTA pokazuje visoku osjetljivost i postignuta je niža pozadinska buka što poboljšava limit detekcije no njegovi nedostaci su slaba linearnost kalibracijske krivulje i slaba otpornost na interferencije s atomizacijom zbog čega je uvedena višestruka mikroplamena QTA (engl. *Multiple Microflame QTA*, MMQTA) koja se temelji na ponavljajućoj atomizaciji analita u višestukim oblacima vodikovih radikala u optičkoj cijevi (Dedina i Matousek, 2000). Iako se time eliminira slaba linearnost kalibracijske krivulje metoda i dalje nije idealna te se razvija nova metoda (engl. *Thermospray Flame Furnance Atomic Absorption Spectrometry,* TS-FF-AAS) gdje je cijev nikla spojena na vrh plamenika FAAS-a te se kroz plamenom grijanu keramičku kapilaru u nju unosi sav uzorak. To je najveća prednost metode jer se postiže osjetljivost jednaka onoj u elektrotermičkoj AAS (ETAAS) (Gaspar i Berndt, 2000).

Zbog nedostataka kvarcnih cijevi cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost korištenja metalnih cijevi u hidridnoj tehnici. Kao primjer isparljivog spoja i određivanja antimona u sedimentima rijeka i jezera uzet je stibin (antimonijev hidrid, SbH_3), a koristio se i u uzorcima lijekova za procjenu izvedbe metalne peći (Figueiredo i sur., 2007).

Materijali i metode

Predložen sustav izgrađen je od peristaltičke pumpe, uređaja za injektiranje, vodova od polietilenskih cijevi i cijevi za kretanje plina.

Za određivanje Sb korišten je plameni apsorpcijski spektrometar (Perkin-Elmer model AAnalyst 300) opremljen deuterijskom lampom za korekciju pozadinske svjetlosti i lampom s električnim pražnjenjem kao primarnim izvorom svjetlosti.

Sve otopine pripremljene su s deioniziranom vodom i reagensima analitičkog stupnja. Stakleno posuđe je 24 h držano u 10%-tnoj HCl i zatim očišćeno ultračistom vodom. Standardna otopina antimona (100 mg/l) pripremi se otapanjem $C_4H_4KO_7Sb\ x^1/_2H_2O$ u 1 mol/l HCl dok se referentne otopine pripreme svakodnevnim razrjeđenjem standardne otopine u 1 mol/l HCl. 1%-tna otopina KBH_4 pripremljena je u 0,8% NaOH i čuvana u hladnjaku 2 tjedna nakon izrade.

Uzorci meglumin antimoniata (lijek za lišmanijazu) razrjeđeni su s 5% KI kako bi se reducirao Sb(V). Uzorci sedimenta iz rijeke (150 mg) i jezera (250 mg) mineralizirani su u mikorvalnoj pećnici. Za oba uzorka iskorišteno je 10 ml zlatotopke i 5 ml HF. Izvršen je period predigestije u trajanju od 30 minuta nakon čega slijedi zagrijavanje. Nakon mineralizacije uzorci su zagrijani gotovo do suha, a volumeni dopunjeni do 10 ml s 1 mol/l HCl. Uzorci su tretirani 5%-tnim KI kako bi se promovirala redukcija Sb.

Predloženi sustav temelji se na reakciji BH_4^- i Sb(III) u 1 mol/l HCl. Stvara se stibin i unosi u separator plina i tekućine gdje je nošen konstantnim tokom argona u gornji dio separatora, dok se ostatak uzorka aspirira kroz bočni otvor separatora i biva odbačen. Stibin zatim putem keramičke kapilare ulazi u cijev Inconel 600 smještenu iznad plamena spektrometra gdje se onda atomizira. Cijev ima šest otvora na strani okrenutoj prema plamenu što omogućuje djelomično prodiranje plamena u cijev i potiče atomizaciju antimona.

Rezultati i rasprava

Optimizacija kemijskih i fizikalnih varijabli izvedena je maksimiziranjem integrirane absorbancije standardne otopine koncentracije 40 μg/l.

Cijev od nikla, često korištena u TS-FF-AAS tehnici, prilikom korištenja kao atomizator pokazala je slabu osjetljivost i preciznost što se pripisuje nastanku $NiSb_2O_4$ i $NiSb_2O_6$ prema slijedećim jednadžbama:

$$4NiO + 2Sb \rightarrow NiSb_2O_4 + 3Ni$$

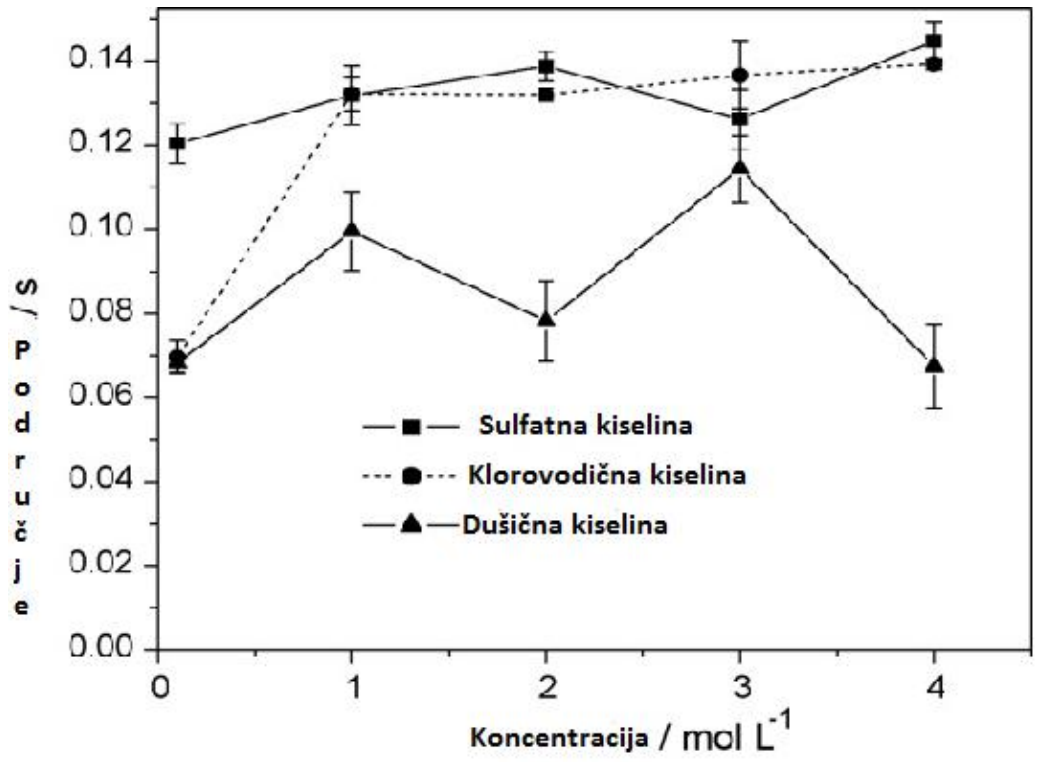
$$NiSb_2O_4 + O_2 \rightarrow NiSb_2O_6$$

Iako su ispitivanjem svojstava Inconel 600 cijevi (smjesa nikla, kroma i željeza) istih dimenzija kao cijev nikla dobiveni ohrabrujući rezultati, uočen je porast u rezultatu (kao integrirana absorbancija) nakon svake injekcije Sb standarda (40 μg/l). Bilo je potrebno barem

30 injekcija standarda da bi se postigla stabilizacija signala što upućuje na postupnu promjenu površine cijevi, a može se objasniti stvaranjem ternarnih oksida iz prethodno prikazanih jednadžbi. Stoga je proveden eksperiment kako bi se istražila modifikacija Inconel 600 cijevi i njena izdržljivost. Površina cijevi tretirana je injektiranjem standardne otopine Sb i zatim slijepe probe (4 uzastopne injekcije). Izvrsna stabilnost signala (relativna standardna devijacija, RSD, iznosila je 1,3%) postignuta je injektiranjem 200 injekcija standarda.

Skenirajućom elektronskom mikroskopijom i fluorescencijom X-zrakama karakterizirane su promjene na unutrašnoj promjeni cijevi uzrokovanje injektiranjem Sb standarda: morfološke promjene materijala i promjene u količini nikla koja pada te kroma i željeza čiji sadržaji rastu. Tijekom eksperimenta cijev je poprimila zelenkastu boju što ukazuje prisutnost Cr_2O_3 koji ima višu temperaturu taljenja (2435 °C) od Ni_2O_3 (1984 °C) i NiO (1955 °C). Novostvoreni uvijeti unutar cijevi povećava osjetljivost deset puta i ima važnu ulogu u atomizaciji antimona.

Neke mineralne kiseline poput HCl, H_2SO_4 i HNO_3 ispitane su zbog mogućnosti korištenja prilikom mineralizacije uzorka. Koncentracije su procijenjivane u rasponu od 0,1 do 4,0 mol/l u kojem su H_2SO_4 i HCl pokazale slično ponašanje (Slika 15). Zbog dobre preciznosti (RSD 2,6%) postignute korištenjem HCl za ispitivanje je izabrana 1,0 mol/l HCl. Niže vrijednosti uočene kod primjene HNO_3 odgovaraju interferencijama dušikovih oksida s hidridnom tehnikom određivanja antimona, a čiji je mehanizam još uvijek nepoznat.



Slika 15. Utjecaj karakteristika i koncentracije kiselina na analitički odgovor.

Za optimalnu koncentraciju KBH_4, ispitanu u rasponu od 0,1 do 2,0% (m/V), izabrana je koncentracija od 1% čiji je integrirani signal iznosio oko 0,30 s. Pri nižim koncentracijama zamijećen je pad analitičkog signala što odgovara nižoj efikasnosti stvaranja hidrida dok su veće koncentracije, zbog povećanog stvaranja hidrogena, narušile ponovljivost signala i dovele do njegovog blagog smanjenja.

Kako prekratak reaktor može dovesti do nepotpunog otpuštanja hidrida, a predugi povećava rizik gubitka analita, utjecaj duljine reaktora na analitički odgovor ispitan je za duljine od 10 do 90 cm, a najbolji signal postignut je pri duljini reaktora od 50 cm.

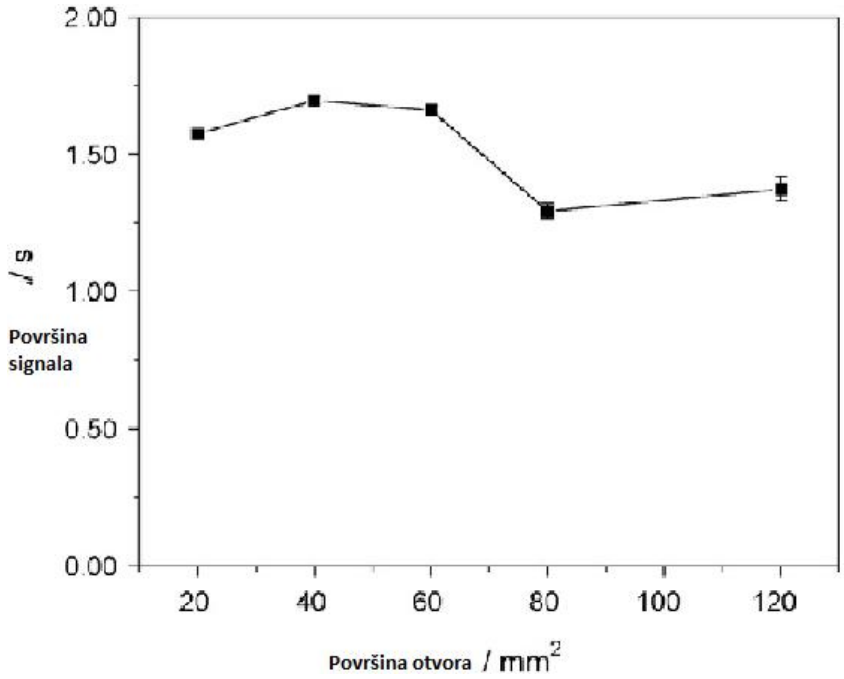
Istovremeno su ispitivani injektirani volumeni uzorka i KBH_4 (300, 600, 900, 1200, 1500 i 2000 µl). Integrirani absorbcijski signal je bio direktno proporcionalan volumenu uzorka te je za daljnje ispitivanje uzet volumen od 2000 µl.

Rezultati dobiveni ispitivanjem utjecaja brzine protoka tekućih nosača pri brzinama od 10 do 14,5 ml/min nisu pokazali razlike veće od 10% te je kao kriterij izbora uzet najbolji profil signala odnosno njegova simetričnost i analitička frekvencija zbog čega je za daljnja mjerenja izabrana brzina protoka od 13 ml/min.

Protok plina nosača (argona) ispitivan pri brzinama od 0,1 do 4,0 l/min pokazao je značajan utjecaj na analitički signal. Brzina protoka obrnuto je proporcionalna analitičkom

signalu. Naime pri većim brzinama dolazi do razrjeđenja hidrida unutar cijevi i bržeg izlaska hidrida iz cjevi no kako pri vrlo niskim brzinama dolazi do širenja pika kao optimalan protok izabran je onaj od 1 l/min.

Ispitivan je utjecaj površine otvora na cijevi na analitički odgovor zbog njegovog velikog utjecaja na atomizaciju. Korišteno je pet cijevi sa šest sličnih otvora (3,3, 6,6, 10, 13,3 i 20 mm^2) i s ukupnom probušenom površinom od 20, 40, 60, 80 i 120 mm^2 te jedna cijev bez otvora. Na Slici 16. uočljiva je razlika od 22% između cijevi s 40 i 80 mm^2 ukupno probušene površine no kada se uspoređuju cijevi s najboljim rezultatima (20, 40, 60 mm^2) vide se tek neznatne razlike od oko 1,7%. S obzirom da nije bilo statističke razlike između 40 i 60 mm^2 za daljnja ispitivanja je odabrana cijev s površinom od 60 mm^2. Rezultati testiranja cijevi bez otvora pokazali su nezadovoljavajuće rezultate RSD vrijednosti i do 30% što je moguće pripisati nedostatku plina nosača unutar cijevi.



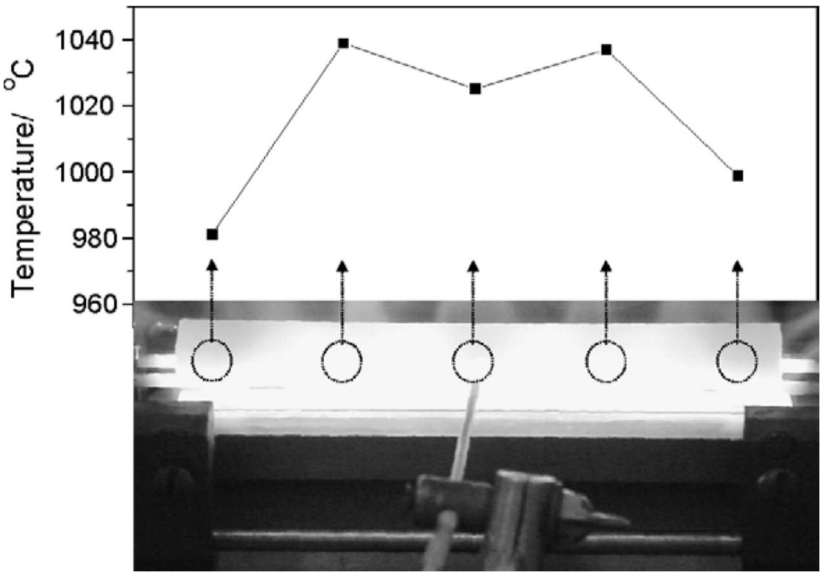
Slika 16. Utjecaj površine otvora na analitički odgovor.

Ispitivanjem dviju keramičkih kapilara različitih unutarnjih promjera (0,5 i 1,0 mm) uočene su male promjene u analitičkom signalu (RSD < 4%) te je kao kriterij izbora uzet najbolji profil signala odnosno njegova simetričnost i analitička frekvencija zbog čega je izabrana kapilara od 1 mm (140 signala u odnosu na 127 signala kapilare od 0,5 mm).

Ispitivanjem utjecaja sastava plamena na analitički odgovor kao optimalan sastav odabran je plin koji sadrži 3 l/min acetilena i 10 l/min zraka te predstavlja veoma reducirajući

plin u kojem se stvaraju vodikovi radikali koji olakšavaju atomizaciju. Promjena sastava plina prema oksidirajućim uvjetima rezultira gubitkom osjetljivosti unatoč višoj temperaturi cijevi što je posljedica manjeg stvaranja vodikovih radikala i izraženijeg reagiranja slobodnih analita s kisikom. Zaključuje se da je mehanizam atomizacije analogan onom u QTA, no atomizatori s metalnim cijevima zahtjevaju veću zalihu vodikovih radikala kako bi izvršili atomizaciju jer na metalnoj površini brže dolazi do rekombinacije H-radikala u odnosu na onu od kvarca.

Koristeći optički pirometar određena je temperatura površine cjevi u pet točaka (Slika 17). Nešto niža temperatura od oko 15 °C na sredini cijevi pripisuje se efektu hlađenja plina nosača koji ulazi u cijev na tom mjestu dok veći temperaturni pad od oko 60 °C na krajevima cijevi upućuje na manju efikasnost zagrijavanja na tim dijelovima.



Slika 17. Distribucija temperature kroz Inconel cijev

Uspoređujući signale standardne otopine antimona koncentracije 20 µg/l s istom tom koncentracijom analita, ali uz u prisutnosti interferirajućih tvaru ispitan je njihov utjecaj na signal. Nije se koristio maskirajući agens, a utjecaj interferirajućih tvari se razmatrao samo kada je oporavak bio veći od +/- 10%. Glavne interferencije, koje se mogu dogoditi u plinovitoj ili tekućoj fazi, uzrokovali su Fe, Se, Ni i Bi. Najproblematičniji je bizmut, gdje interferencija predstavlja kapacitet raspada stibina u plinovitoj fazi stvaranjem bi- i polimolekularnih vrsta s antimonom pri visokim temperaturama plamena. Kako bi se poboljšala selektivnost koristi se maskirajući agens (KI, tiourea) osobito ako interferirajuće tvari utječu na generaciju hidrida.

Linearno područje predložene metode bilo je u rasponu od 2 do 80 µg/l, a limit određivanja (engl. *Limit of Quantitation*, LOQ) iznosio je 0,75 µg/l. Konačno, metoda je zadovoljavajuće precizna budući da su RSD vrijednosti bile manje od 5%.

Zaključak

Prvotni cilj studije bio je ispitati mogućnost korištenja metalne cijevi u hidridnoj tehnici. Postignuta je dobra osjetljivost, selektivnost, analitička frekvencija, linearnosti, preciznost, i točnost metode.

Povećanje osjetljivosti tretiranjem metalne cijevi antimonom ukazuje da novostvoreni uvijeti unutar cijevi ima važnu ulogu u atomizaciji antimona. Prema tome, zaključuje se da metalne cijevi mogu predstavljati dobru alternativu u hidridnim tehnikama. Zahvaljujući fizikalnim karakteristikama, metalne cijevi otpornije su na promijene, dugoročno stabilnije te je njihov vijek ograničen jedino istrošenošću materijala što predstavlja veliku prednost, osobito u rutinskim laboratorijima. Zbog tih karakteristika metalnih cijeli i njihove niske cijene, otvara se mogućnost njihovog korištenja kao atomizatora hlapljivih isparljivih oblika prijelaznih i plemenitih metala (Figueiredo i sur., 2007).

5. ZAKLJUČCI

Premda se posljednjih godina druge tehnike za određivanje metala i metaloida sve češće koriste u farmaceutskoj industriji, atomska apsorpcijska spektrometrija i dalje ima nezamijenjivu ulogu. Glavne prednosti tehnike su jednostavnost izvođenja, niska cijena instrumenta i održavanja te prilagođenost za rutinske analize, dok se među nedostacima prvenstveno ističe vrlo često nedovoljna osjetljivost.

U ovom diplomskom radu dan je kratki pregled tehnike sa svim njenim prednostima i nedostacima te je obrađeno nekoliko radova u kojima je AAS tehnika uspiješno primjenjena za određivanje ujednačenosti sadržaja magnezijeva stearata u tabletama, koncentracije olova i kadmija u dječjim sirupima, koncentracije željeza u biološkim uzorcima nakon ekstrakcije željeza putem SPE te određivanje koncentracije antimona u uzorcima lijekova i okoliša.

6. LITERATURA

Amidžić Klarić D, Primjena atomske spektrometrije u kontroli kvalitete lijekova i dodataka prehrani, predavanje, *Farm Gla*, 2016.

Baysal A, Kahraman M, Akman S. The solid phase extraction of lead using silver nanoparticles-attached to silica gel prior to its determination by FAAS. *Curr Anal Chem*, 2009, 5, 352-357.

Beaty RD, Kerber JD. Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry. Norwalk, The Perkin - Elmer Corporation,1993. Str. 1-1 – 1-6; 2-1 – 2-9; 3-1 – 3-2; 4-1 – 4-5.

Cabrera C, Lorenzo ML, Lopez CM. Lead and cadmium contamination in dairy products and its repercussion on dietary intake. *J Agric Food Chem*, 1995, 43, 1605- 1609.

Dedina J, Matousek T. Multiple microflame - a new approach to hydride atomization for atomic absorption spectrometry. *J Anal At Spectrom*, 2000, 15, 301-304.

Đorđević J, Maćej O. Atomska apsorpciona spektrofotometrija i njena primena u određivanju mineralnog sastava mleka. *Mljekarstvo*, 1982, 32, 233- 242.

Elci L, Kartal AA, Soylak M. Solid Phase Extraction Method for the Determination of Iron, Lead and Chromium by Atomic Absorption Spectrometry Using Amberite XAD-2000 Column in Various Water Samples. *J Hazard Mater*, 2008, 153,454- 461.

Figueiredo EC, Dedina J, Zezzi Arruda MA. Metal furnace heated by flame as a hydride atomizer for atomic absorption spectometry: Sb determination in environmental and pharmaceutical samples. *Talanta*, 2007, 73, 621- 628.

Gaspar A, Berndt H. Thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry (TS-FF-AAS) — a simple method for trace element determination with microsamples in the µg/l concentration range. *Spectrochim Acta, Part B*, 2000, 55, 587- 597.

Gonzalez-Lopez JM, Gonzales-Romaris EM, Idoate-Cervantes I, Escanero JF. Atomic Absorption Spectroscopy: Fundamentals and Applications in Medicine. U: Macro to Nano Spectroscopy. Udin J, urednik, InTech, 2012, str. 1- 24.

Grinberg P, Takase I, De Campos RC. Characterization and vapour phase interference studies of a flame heated holed quartz T-tube as atomization cell for hydride generation atomic absorption spectrometry. *J Anal At Spectrom*, 1999, 14, 827-830.

Hamad ML, Gupta A, Shah RB, Lyon RC, Sayeed VA, Khan MA. Functionality of magnesium stearate derived from bovine and vegetable sources: Dry granulated tablets. *J Pharm Sci*, 2008, 97, 5328- 5340.

Khajeh M, Dastafkan K. Silver nanoparticles attached to silica gel as a new solid phase adsorbent for preconcentration and determination of iron from biological samples. *J Appl Spectrosc*, 2012, 79, 788- 792.

Korkmaz D, Demir C, Aydin F, Ataman OY. Cold vapour generation and on-line trapping of cadmium species on quartz surface prior to detection by atomic absorption spectrometry. *J Anal At Spectrom*, 2005, 20, 46-52.

Lewen N. The use of atomic spectroscopy in the pharmaceutical industry for the determination of trace elements in pharmaceuticals. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 55, 653- 661.

Lewinson R. More Modern Chemical Techniques. *Roy Soc Chem*, 2001, str. 1-25.

Oliveira E. Sample Preparation for Atomic Spectroscopy: Evolution and Future Trends. *J Braz Chem Soc*, 2003, 14, 174- 182.

Orisakwe OE, Nduka JK. Lead and cadmium levels of commonly administered pediatric syrups in Nigeria: A public health concern?. *Sci Total Environ*, 2009, 407, 5993- 5996.

Sharma AK, Singh I. Spectrophotometric Trace Determination of Iron in Food, Milk, and Tea Samples using a New Bis-azo Dye as Analytical Reagent. *Food Anal Methods*, 2009, 2, 221-225.

Sugisawa K, Kaneko T, Sago T, Sato T. Rapid quantitative analysis of magnesium stearate in pharmaceutical powders and solid dosage forms by atomic absorption: Method development and application in product manufacturing. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49, 858- 861.

Yaqoob M, Waseem A, Nabi A. Determination of total iron in fresh waters using flow injection with potassium permanganate chemiluminescence detection. *J Anal Chem*, 2006, 61, 917- 921.

6. SAŽETAK/SUMMARY

SAŽETAK

U posljednjih 20 godina potreba za analizom metala i metaloida postaje sve važnija u analitici lijekova. Ovaj rad pruža kratku raspravu o primjeni atomske apsorpcijske spektrometrije u analizi metala i metaloida u aktivnim farmaceutskih tvarima, gotovim proizvodima, dodacima prehrani i biološkim uzorcima. U radu je dan pregled tehnike i njenih modifikacija, pripreme uzoraka te razvoja metode i validacije.

SUMMARY

The need for the analysis of metals and metalloides in the pharmaceutical analysis is becoming increasingly more important in the last 20 years. This work provides a brief discussion on application of Atomic absorption spectrometry in analysis of metals and metalloides in active pharmaceutical ingredients, formulated products, dietary supplements and biological samples. In the work overview of technique and various modifications, sample preparation procedures, method development and validation is given.

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

PRIMJENA ATOMSKE APSORPCIJSKE SPEKTROMETRIJE U ANALITICI LIJEKOVA

Iva Milas

SAŽETAK

U posljednjih 20 godina potreba za analizom metala i metaloida postaje sve važnija u analitici lijekova. Ovaj rad pruža kratku raspravu o primjeni atomske apsorpcijske spektrometrije u analizi metala i metaloida u aktivnim farmaceutskih tvarima, gotovim proizvodima, dodacima prehrani i biološkim uzorcima. U radu je dan pregled tehnike i njenih modifikacija, pripreme uzoraka te razvoja metode i validacije.

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

Rad sadrži: 40 stranica, 17 grafičkih prikaza, 7 tablica i 20 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: plamena AAS, grafitna AAS, hidridna AAS, onečišćenja, teški metali

Mentor: **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*
Dr. sc. Biljana Nigović, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Daniela Amidžić Klarić, *znanstveni suradnik.*

Rad prihvaćen: srpanj 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

Application of atomic absorption spectrometry in drug analysis

Iva Milas

SUMMARY

The need for the analysis of metals and metalloides in the pharmaceutical analysis is becoming increasingly more important in the last 20 years. This work provides a brief discussion on application of Atomic absorption spectrometry in analysis of metals and metalloides in active pharmaceutical ingredients, formulated products, dietary supplements and biological samples. In the work overview of technique and various modifications, sample preparation procedures, method development and validation is given.

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

Thesis includes: 40 pages, 17 figures, 7 tables and 20 references. Original is in Croatian language.

Keywords: flame AAS, graphite furnace AAS, hydride AAS, impurities, heavy metals

Mentor: **Ana Mornar Turk**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ana Mornar Turk**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Biljana Nigović, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Daniela Amidžić Klarić, **Ph.D.** *Research Associate*

The thesis was accepted: July 2016.