

# Metalna onečišćenja u kontroli kakvoće lijekova

---

**Nigović, Biljana; Smolčić, Ivana**

*Source / Izvornik:* **Farmaceutski glasnik, 2016, 72, 215 - 227**

**Journal article, Published version**

**Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:514798>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-04-03**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



# Metalna onečišćenja u kontroli kakvoće lijekova

BILJANA NIGOVIĆ<sup>1</sup>, IVANA SMOLČIČ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet,  
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova, 10000 Zagreb, A. Kovačića 1

<sup>2</sup>Merck d.o.o. Zagreb

## UVOD

Onečišćenja u lijekovima mogu biti organskog i anorganskog podrijetla. Potječu iz različitih izvora, a potencijalno mogu ugroziti djelotvornost lijekova ili utjecati na sigurnost primjene. Važeće međunarodno harmonizirane smjernice ICH Q3A, Q3B i Q3C, koje se odnose na onečišćenja u novim lijekovima i novim djelatnim tvarima, postavljaju zahtjeve za detekciju i kvantifikaciju organskih onečišćenja i ostalih otapala (1–3). Kontrola anorganskih onečišćenja temelji se prvenstveno na farmakopejskim zahtjevima za utvrđivanje graničnih vrijednosti (engl. *Limit tests*). Opisani su brojni nedostaci dosadašnjih farmakopejskih metoda kojima se utvrđuju granične vrijednosti teških metala. Posebice je upitna mogućnost detektiranja i kvantificiranja nekih toksikološki značajnih metala. S naglaskom na sigurnost pacijenata, pokrenut je postupak međunarodne harmonizacije smjernica ICH Q3D (4), a revidiraju se i relevantna poglavlja u Europskoj farmakopeji (Ph. Eur.) i Američkoj farmakopeji (USP) vezana za kontrolu metalnih onečišćenja u lijekovima. Osim utvrđivanja vrsta metala koje treba pratiti i definiranja granica njihovog sadržaja, odabir odgovarajuće instrumentalne tehnike u rutinskoj analizi važan je korak u uspostavljanju učinkovitog sustava kontrole metalnih onečišćenja u lijekovima.

## Važnost kontrole metalnih onečišćenja u lijekovima

Toksičnost različitih elemenata odavno je dobro poznata i dokumentirana. Postoje zapisi prema kojima je kineski car Ying Zhen umro od posljedica trovanja živom, jer je koristio lijek koji je sadržavao živu. Još u drugom stoljeću prije Krista znalo se da izloženost olovu može biti štetna po zdravlje. Danas se zna da prisutnost olova i kadmija u lijekovima predstavlja ozbiljan rizik za zdravlje čak i u vrlo malim dozama. Unos 0,06 mg Pb/dan u vremenu od mjesec dana dovoljan je da izazove kronično trovanje, što dalje uzrokuje disfunkciju bubrega, osteomalaciju i opstruktivnu plućnu bolest. Kadmij je karcinogen i povezan s nizom rizika za zdravlje ljudi. Akumulira se

u tijelu i ima biološko vrijeme poluraspada od 30 godina. Arsen se zlorabio kao otrov još od rimskih vremena pa sve do sredine 19. stoljeća. Oralno unesen u većim količinama uzrokovao je ozbiljne abdominalne grčeve, dijareju, povraćanje i konačno smrt, a simptomi unesenih malih doza oponašali su simptome nekih kroničnih bolesti što je otežavalo otkrivanje uzroka smrti. Ovakva se zloupotreba arsena počela smanjivati u 18. stoljeću kada je engleski kemičar James Marsh razvio test za identifikaciju arsena u tijelu (5).

Toksikolozi neprestano istražuju utjecaj raznih elemenata na ljudsko zdravlje pa se i dozvoljene granice izloženosti temeljene na podacima istraživanja konstantno revidiraju. Neki metali potrebni su organizmu kao mikronutrijenti, ali iznad određenih granica postaju toksični. Zbog potencijalne toksičnosti metala, ali i njihove sposobnosti da kataliziraju razgradnju djelatne tvari, praćenje i kontrola sadržaja metalnih onečišćenja u lijekovima vrlo je važna aktivnost u farmaceutskoj kontroli kakvoće.

Identifikacija, kvantifikacija, kvalifikacija (biološke) sigurnosti i kontrola onečišćenja danas su ključan dio postupka razvoja lijeka. Optimizacijom postupka sinteze i odgovarajućim preformulacijskim/formulacijskim ispitivanja, moguće je smanjiti prisutnost i količine onečišćenja te u konačnici osigurati proizvodnju lijekova visoke kakvoće (6). Metalna onečišćenja mogu potjecati iz različitih izvora i faza postupka proizvodnje kao primjerice iz polaznih sirovina, ekscipijensa, reagensa, otapala, katalizatora, elektroda, reakcijskih posuda, cijevi i druge opreme korištene tijekom sinteze djelatne tvari i proizvodnje dozirnog oblika. Mogu biti posljedica izlaganja česticama dospjelim iz zraka, a izvor može biti i primarni spremnik. Zbog različitih potencijalnih putova ulaska u lijek u interesu farmaceutske industrije je praćenje metalnih onečišćenja u svim fazama. Bolje razumijevanje postupka razvoja i proizvodnje pomaže u održavanju prihvatljive razine metalnih onečišćenja da bi se postigla sukladnost specifikacijama (7, 8). Sudeći po razvoju novih smjernica jasno je da su regulatorna tijela i industrija prepoznale važnost ovog problema.

### Farmakopejske metode određivanja graničnih vrijednosti teških metala

Neprofitna organizacija U.S. Pharmacopeial Convention uvela je 1905. metodu za provjeru prisutnosti teških metala u lijekovima na američkom tržištu. Više od 100 godina kasnije još uvijek su se koristile metode temeljene na istom načelu za grupno praćenje metala u farmaceutskim tvarima (9). Dosadašnje farmakopejsko ispitivanje teških metala u Ph. Eur. (10), USP (11), Britanskoj farmakopeji (BP) (12) i Japanskoj farmakopeji (JP) (13) temelji se na reakciji metala prisutnih u uzorku i tioacetamidnog reagensa koja rezultira nastajanjem obojenih sulfida i njihovim taloženjem iz vodene otopine. Boja nastalih sulfidnih taloga vizualno se uspoređuje s bojom taloga istodobno tretirane poredbene otopine olova koja sadrži poznatu koncentraciju  $Pb^{2+}$  iona (obično 10 mg/L). Ukupni sadržaj teških metala izražava se u odnosu na poredbenu otopinu olova kao granična vrijednost, primjerice < 20 µg/g (ppm).

Dosadašnje farmakopejske metode razvijene su prije uvođenja suvremenih analitičkih uređaja i temelje se na tehnikama vlažne kemije. Ove metode, primjerice ne zahtijevaju skupe laboratorijske instrumente i visoku razinu educiranosti osoblja za izvedbu, a jednostavno se mogu prenijeti iz jednog laboratorija u drugi. No, brojni radovi navode velik broj njihovih nedostataka. Wang i suradnici (14) daju sažetu ocjenu farmakopejskih metoda navodeći da ne daju informaciju o identitetu ili koncentraciji potencijalno prisutnih metalnih iona, zatim nisu specifične, dovoljno osjetljive, jednako osjetljive za različite elemente, dugotrajne su za izvođenje, a daju slaba iskorištenja elemenata iz ispitivanih otopina uzoraka (posebno hlapljivih) te nereproducibilne i nepouzdanе rezultate jer je upitna detekcija svih elemenata od interesa. Brojni drugi autori u svojim se tumačenjima slažu s takvim zaključcima (15–18).

Postoji niz problematičnih točaka oko stvaranja sulfida potencijalno prisutnih elemenata u usporedbi s poredbenom otopinom olova poput pretpostavke da će svaki od elemenata prisutnih u uzorku (odnosno svaki od 14 elemenata koji je potrebno detektirati USP-metodom) reagirati s tioacetamidnim reagensom u jednakoj mjeri i vrlo sličnom kinetikom reakcije kao poredbena otopina olova. Zbog temeljenja na vizualnoj usporedbi boja taloga, ispitivanje je primjenjivo samo za neke elemente i nije jednako osjetljivo za sve. Budući da boje različitih metalnih sulfida variraju od bijele, žute i narančaste do smeđe i crne, ispitivanje je zapravo pogodno za metalne ione koji reakcijom daju tamno obojene sulfide kako bi usporedba s tamno smeđim talogom olovnog sulfida iz poredbene otopine bila moguća. Vizualna ocjena, odnosno usporedba obojenja, mora se napraviti u relativno kratkom vremenu od stvaranja taloga (2–5 minuta), jer mnogi metalni sulfidi mogu stvarati koloide. Ograničenje metoda predstavlja i njihova utemeljenost na subjektivnoj ocjeni i iskustvu analitičara potrebnom da bi se rezultat uvijek točno i konzistentno očitavao. Janošova i suradnici (16) navode da su farmakopejske metode pogodne za utvrđivanje graničnih vrijednosti metalnih iona koji reakcijom daju tamno smeđe ili crno obojene sulfide (Pb, Cu, Hg, Bi, Ag). Ioni kao što su Cd, Sb, As ili Zn mogu se detektirati samo u većim koncentracijama, a ispitivanje uopće nije primjenjivo za detekciju Pt, Pd, Fe ili Ni koji su uobičajeno korišteni katalizatori. Također ističu da koraci pripreme uzorka mogu uzrokovati gubitak hlapljivih elemenata poput Hg i Se. Priprema uzorka je kod mnogih analitičkih metoda najvažniji, najizazovniji i vremenski najzahtjevniji korak. Isto je i kod farmakopejskog ispitivanja teških metala. Iako Ph. Eur. i USP daju mogućnost korištenja nekoliko načina pripreme uzorka ovisno o njegovim karakteristikama (kod USP tri metode, a kod Ph. Eur. čak sedam) obilježja svih tih metoda pripreme uzorka, bez obzira na razlike, su previše radnih koraka, složenost i zahtjevnost u smislu utrošenog vremena i rada analitičara.

Relativno velika količina uzorka (oko 1 g) potrebna je za detekciju metalnih onečišćenja na ppm razini, jer se metode temelje na subjektivnom vizualnom ispitivanju i usporedbi reakcijom nastalih obojenja. Zato je primjena metode u ranim fazama

razvoja lijeka ograničena malom količinom materijala raspoloživog za istraživanja. Rezultat se izražava kao granična vrijednost u usporedbi s poredbenom otopinom samo jednog elementa i nema kvalitativnih informacija o specifičnom elementu/elementima što otežava istragu i otkrivanje potencijalnih izvora onečišćenja.

Aktivnosti vezane uz istraživanje ograničenja farmakopejskih ispitivanja metala, pokušaji njihovih izmjena i harmonizacije, kao i postavljanje novih trajnih godina. Različite organizacije, znanstvenici i stručnjaci na brojnim su skupovima i radionicama raspravljali o toj temi i iznosili zaključke istraživanja i iskustva iz prakse (19). Općenito je istaknuto da farmakopejske metode često ne mogu otkriti prisutnost nekih toksičnih metala potencijalno prisutnih u farmaceutskim tvarima i da se ozbiljno podcjenjuje njihove koncentracije te da trebaju biti zamijenjene instrumentalnim metodama veće specifičnosti i osjetljivosti za širok spektar metala od interesa. Dodatni problem dosadašnjeg pristupa ispitivanju metalnih onečišćenja u lijekovima predstavlja i različito tumačenje izraza teški metali jer nije jasno definirano koje elemente farmakopejske metode trebaju detektirati (20). U izvještaju za IUPAC Duffus navodi kako izraz teški metali nikada nije definiralo niti jedno regulatorno tijelo, a popisi elemenata na koje se odnosi ispitivanje razlikuju se u zahtjevima raznih regulatoriva (21).

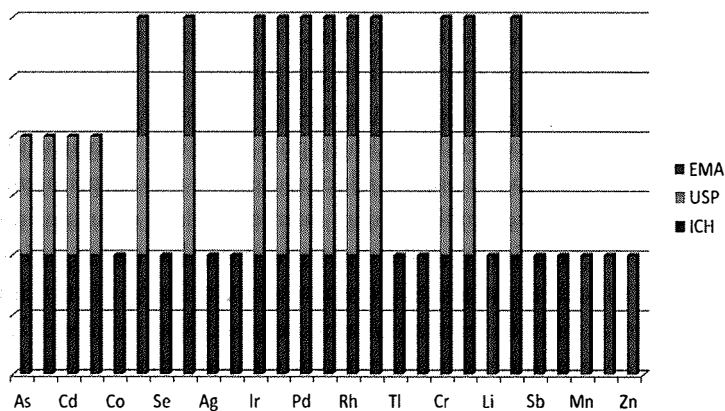
S obzirom na početnu postavku o važnosti određivanja svih potencijalno prisutnih, a posebice toksikološki značajnih metalnih onečišćenja, može se zaključiti da dosadašnje metode nisu u potpunosti udovoljavale tim zahtjevima.

### Regulatorne promjene i međunarodna harmonizacija smjernica za kontrolu metalnih onečišćenja

U proteklih desetak godina značajno je porastao interes za analizu metala u lijekovima. Objava Vodiča Europske Agencije za lijekove (EMA) za granice ostataka metalnih katalizatora ili metalnih reagensa (22), novih poglavlja u USP <232> *Elementarna onečišćenja: granice* (23) i <233> *Elementarna onečišćenja: postupci* (24), reprodukcija vodiča EMA-e u poglavlju Ph. Eur. 5.20 *Ostaci metalnih katalizatora ili metalnih reagensa* (25) i objava novog poglavlja 2.4.20 *Određivanje metalnih katalizatora ili ostataka metalnih reagensa* u Ph. Eur. 7.7 (26) primorali su industriju da počne pažljivije pratiti sadržaj metalnih ostataka različitih materijala koji se koriste u farmaceutskoj proizvodnji. U rješavanje problematike zadnja se uključila organizacija ICH koja koordinira regulatorna tijela i farmaceutsku industriju Europe, Japana, SAD-a, Kanade i Švicarske u raspravi znanstvenih i tehničkih aspekata registracije lijekova. Misija ICH-a je postići veću harmonizaciju kako bi se osiguralo da sigurni, učinkoviti i visoko kvalitetni lijekovi budu razvijeni i registrirani na najučinkovitiji način (27).

Smjernice ICH Q3D *Guideline for Elemental Impurities* prvi su put objavljene tek krajem 2011. u radnoj verziji. Period za komentare u sve tri ICH regije (SAD, EU, Japan) završen je krajem 2013. Smjernice su u prosincu 2014. dosegle četvrti

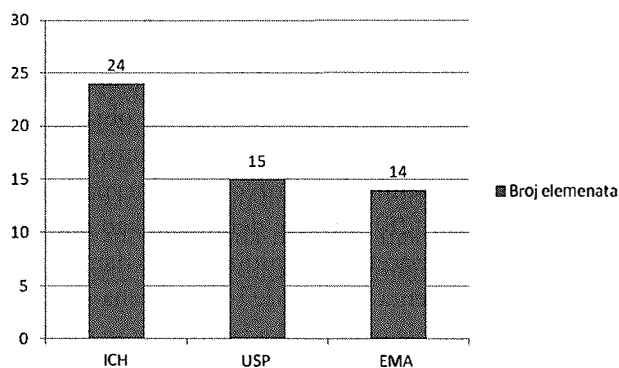
korak postupka što znači da se konačni nacrt preporučuje za usvajanje regulatornim tijelima Europske unije, Švicarske, Japana, SAD-a i Kanade. Nakon toga su utvrđeni rokovi za implementaciju smjernica unutar regija, a cijeli postupak završava kada se one implementiraju u nacionalne i regionalne postupke. Smjernice ICH Q3D primjenjivat će se na nove lijekove (koji nisu prethodno registrirani) i nove zahtjeve za odobrenja lijekova koji sadrže postojeće djelatne tvari od lipnja 2016., a za postojeće lijekove navodi se prosinac 2017. Sukladno tome u Ph. Eur. briše se iz pojedinačnih monografija poglavlje 2.4.8 *Teški metali* (osim onih koji se koriste u veterinarskim proizvodima), a poglavlje 5.20 *Ostaci metalnih katalizatora ili metalnih reagensa* zamijenit će se sa smjericama ICH Q3D. Harmonizira se u Ph. Eur. i poglavlje 2.4.20 *Određivanje metalnih katalizatora ili ostataka metalnih reagensa*. Dugotrajni postupak harmonizacije izazvao je zbunjenost u industrijskim i regulatornim krugovima zbog uočljivih razlika smjernica ICH Q3D u odnosu na ostale objavljene vodiče, od čega su najznačajnije razlike u popisu elemenata koje treba kontrolirati (slika 1.) i njihovim propisanim granicama izraženim kao dozvoljena dnevna izloženost (*Permitted Daily Exposure*; PDE) u  $\mu\text{g}/\text{dan}$  (28). PDE je definirana kao maksimalni dozvoljeni unos metalnog onečišćenja u farmaceutskom proizvodu na dan, odnosno maksimalna dozvoljena količina svakog elementa koja može biti sadržana u maksimalnom dnevnom unosu lijeka. Zbog postojanja ovih razlika jasno je da se toksikološki stručnjaci, koji rade na uspostavljanju popisa metala koje treba kontrolirati kao onečišćenja, nisu mogli potpuno složiti oko elemenata od potencijalnog interesa niti njihovih granica.



Slika 1. Metalna onečišćenja koje treba kontrolirati prema smjericama ICH Q3D, USP i vodiču EMA-e.

Uspoređujući popise elemenata i njihove propisane granice u USP i vodiču EMA-e s onima u smjericama ICH Q3D, vidljivo je da ICH Q3D svrstava elemente u skupine na temelju njihove toksičnosti, dok USP ne navodi klasifikaciju elemenata, ali izdvaja četiri glavna elementa (As, Cd, Pb i Hg) koji uvijek moraju biti uključeni u procjenu rizika. USP nije uključila neke elemente koje navodi vodič

EMA-e jer su dozvoljene dnevne izloženosti za te elemente vrlo visoke. To su Mn (prema EMA-i klasificiran kao metal malog utjecaja na sigurnost), te Fe i Zn (prema EMA-i klasificirani kao metali minimalnog utjecaja na sigurnost). Popis elemenata u smjernicama ICH Q3D sadrži najviše elemenata od interesa, čak 24, koje treba uključiti u procjenu rizika za razvoj strategije kontrole elementarnih onečišćenja u lijekovima i njihovim sirovinama (slika 2.). Najviše se podudara sa zahtjevima USP-a te uključuje Co, Se, Tl, Li, Sb i Sn koji su nekada bili dio prvih verzija poglavlja USP <232>, ali također uključuje i Ag, Au i Ba koji nikada nisu bili dio USP popisa.



**Slika 2.** Broj elemenata uključen u kontrolu metalnih onečišćenja u lijekovima prema smjernicama ICH Q3D, USP i vodiču EMA-e.

Smjernice ICH Q3D klasificiraju elementarna onečišćenja u tri grupe prema toksičnosti i vjerojatnosti pojavljivanja u lijeku (tablica 1.), u svrhu usmjeravanja procjene rizika na one elemente koji su najtoksičniji. Grupa 1 (As, Cd, Hg i Pb) obuhvaća značajno toksične metale kod bilo kojeg puta primjene. Zahtijevaju razmatranje tijekom procjene rizika za sve potencijalne izvore i sve putove primjene. Grupa 2 obuhvaća toksične metale u većem ili manjem razmjeru ovisno o putu primjene. Neki od elemenata iz ove grupe imaju malu vjerojatnost ulaska u lijek (osim ako nisu namjerno dodani) te zato ne predstavljaju značajan rizik. Da bi se utvrdilo kada trebaju biti razmotreni u procjeni rizika dodatno su podijeljeni u grupu 2A i 2B. Za grupu 2A (Co, Ni i V) zahtijeva se procjena kroz sve potencijalne izvore i sve putove primjene zbog veće vjerojatnosti pojavljivanja u lijeku. Za grupu 2B (Ag, Au, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Se, Tl) zahtijeva se procjena rizika samo ako su namjerno dodani tijekom proizvodnje djelatnih i pomoćnih tvari. Grupa 3 (Ba, Cr, Cu, Li, Mo, Sb i Sn) su elementi relativno niske toksičnosti kod oralne primjene, pa ako nisu namjerno dodani zahtijevaju razmatranje u procjeni rizika samo kod inhalacijske i parenteralne primjene. Ostalim elementima (Al, B, Fe, Zn, K, Ca, Na, Mn, Mg i W) zbog niske toksičnosti PDE nisu utvrđene u ICH Q3D nego se, u slučaju njihove prisutnosti u lijeku, primjenjuje praksa drugih smjernica i/ili regionalnih propisa.

**Tablica 1.** Klasifikacija elementarnih onečišćenja prema smjernicama ICH Q3D i preporuke za uključivanje tijekom procjene rizika

Grupa	Elementi	Uvijek	Uključiti u procjenu rizika?			
			Ako su namjerno dodani (svi putovi primjene)	Ako nisu namjerno dodani		
			Oralno	Parenteralno	Inhalacijski	
Grupa 1	As, Pb, Cd, Hg	Da				
Grupa 2A	Co, V, Ni	Da				
Grupa 2B	Ag, Au, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Se, Tl	Samo ako su namjerno dodani	Da	Ne		
Grupa 3	Ba, Cr, Cu, Li, Mo, Sb, Sn	Kod oralne primjene samo ako su namjerno dodani; Da, kod inhalacijske i parenteralne primjene	Da	Ne	Da (Cu, Li, Sb) Ne (Ba, Cr, Mo i Sn)	Da

Dozvoljena dnevna izloženost određenom metalnom onečišćenju definira se kao maksimalna dozvoljena izloženost metalu za koju je malo vjerojatno da će izazvati bilo kakav zdravstveni štetni učinak. Propisane granice različite su u smjernicama ICH Q3D u odnosu na one u USP i vodiču EMA-e, ali su u svim dokumentima utvrđene za oralnu, parenteralnu i inhalacijsku primjenu. PDE se temelji na tjelesnoj masi odrasle osobe bilo kojeg spola od 50 kg. Ova niža tjelesna masa predstavlja dodatni faktor sigurnosti u odnosu na uobičajeno korištene mase od 60 kg ili 70 kg. Samo USP koristi posebne granice za parenteralne pripravke velikog volumena i posebne dvije opcije izračuna sukladnosti s propisanim granicama za parenteralno primijenjene lijekove u ovisnosti o volumenu dnevne doze. Utvrđene PDE vrijednosti smatraju se zaštitom za zdravlje svih populacija pacijenata. Niže granice elementarnih onečišćenja mogu biti potrebne u slučajevima kada razine ispod granica toksičnosti imaju utjecaj na druga svojstva lijeka (primjerice element katalizira razgradnju djelatne tvari). Čimbenici koji su razmatrani u procjeni sigurnosti za utvrđivanje PDE bili su toksičnost, oksidacijsko stanje elementa u kojem će se vjerojatno nalaziti u lijeku, ljudska izloženost, najrelevantnija studija na životinjama, kancerogenost, reproduktivna toksičnost, toksičnost za ciljani organ i put primjene. Slično kao vodič EMA-e i ICH Q3D navodi da razine metalnih onečišćenja više od utvrđenih PDE mogu biti prihvatljive u nekim slučajevima, primjerice kod isprekidanog doziranja, kratkoročnog doziranja (tj. 30 dana ili kraće) i specifičnih indikacija (npr. ugrožen život, posebne medicinske potrebe, rijetke bolesti). Opravdanje povećanih razina u ovakvim situacijama treba napraviti za svaki pojedinačni slučaj koristeći pristup temeljen na riziku, a ICH Q3D navodi primjere izračuna. Kada je poznata toksičnost



različitih oksidacijskih stanja istog elementa PDE su utvrđene na temelju informacija o toksičnosti onog koji se očekuje u lijeku. Od proizvođača se ne zahtijeva specijacija (rasprostranjenost elemenata među kemijskim vrstama uključujući izotopni sastav, elektronsko ili oksidacijsko stanje i/ili kompleksnu ili molekularnu strukturu), ali se informacije mogu koristiti za opravdanje viših razina onečišćenja u pojedinim slučajevima.

ICH Q3D po uzoru na USP popisuje sve potencijalne izvore metalnih onečišćenja (namjerno dodani u sintezi ili proizvodnji, prirodno se pojavljuju, nenamjerna zagađenja nastala interakcijama s proizvodnom opremom ili spremnicima). Za razliku od ICH Q3D, dozvoljene dnevne izloženosti u USP načelno se ne odnose na pomoćne i djelatne tvari osim tamo gdje je specificirano u poglavlju <232> ili individualnim monografijama, iako stupanj tih onečišćenja mora biti poznat, dokumentiran i biti dostupan na zahtjev. Vodič EMA-e ograničava ostatke metalnih katalizatora ili metalnih reagensa dodanih tijekom sinteze u djelatnim i pomoćnim tvarima te navodi da ne trebaju ograničenja i za farmaceutski oblik.

Dok EMA-in vodič i ICH Q3D ne specificiraju analitičke tehnike koje bi trebalo koristiti za određivanje metalnih onečišćenja, USP u poglavlju <233> opisuje dva analitička postupka uz korištenje tehnika atomske emisijske spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (ICP-AES) i masene spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) kao i kriterije za prihvatljive alternativne postupke (24). Poglavlje 2.4.20 u Ph. Eur. opisuje određivanje metalnih katalizatora i ostataka metalnih reagensa u farmaceutskim tvarima i također upućuje na korištenje visokosofisticirane ICP-MS tehnike (26).

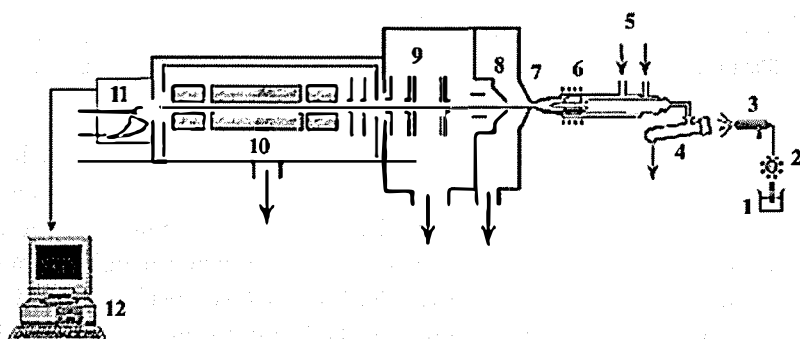
### ICP-MS u ispitivanju metalnih onečišćenja u lijekovima

Iz ranije navedenih razloga, poput utjecaja metalnih onečišćenja na sigurnost primjene lijekova (neželjeni farmakološko-toksikološki efekti) ili na njihovu stabilnost i učinkovitost (uzroci inkompatibilnosti i razgradnje) te s obzirom na rastuću količinu toksikoloških podataka o raznim elementima i najavljene promjene u regulatornim zahtjevima, zadnjih desetak godina intenzivirala se potreba za razvojem visoko osjetljivih i selektivnih metoda za određivanje metalnih onečišćenja u lijekovima i farmaceutskim sirovinama (15). Krajnji cilj nije samo usklađivanje sa strožim specifikacijama, nego i osiguranje sigurne i učinkovite primjene lijekova. Prikładne metode, koje industrija nastoji razviti, trebale bi određivati metale u vrlo niskim koncentracijama, imati mogućnost detekcije i određivanja samo jednog metalnog iona, ali i smjese metalnih iona, biti brze i specifične (8). Također je poželjno da korištena tehnika bude jednostavna za rutinski rad prosječno educiranog analitičara, a razmatra se uvijek i financijski aspekt nabave i održavanja uređaja.

ICP-MS je od svoje komercijalizacije 1983. najbrže razvijajuća tehnika za analizu elemenata u tragovima. Mogućnost određivanja vrlo niskih koncentracija, brza simultana analiza velikog broja elemenata, kao i sposobnost mjerenja izotopa, čine

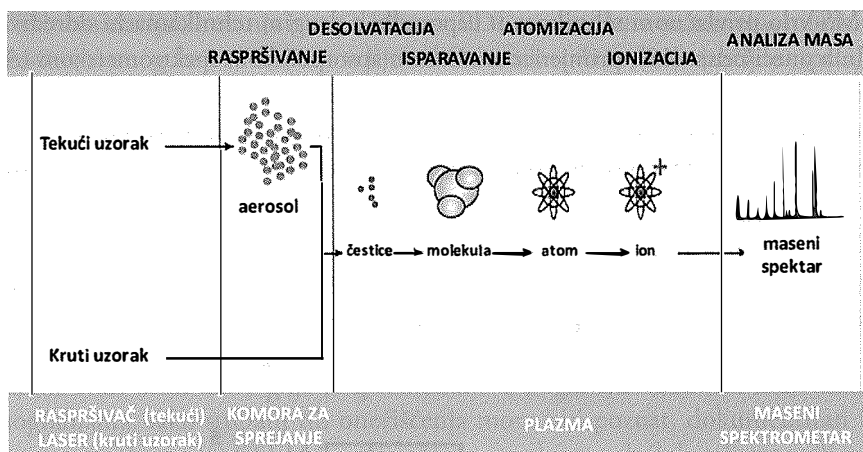
ICP-MS vrlo privlačnom tehnikom u usporedbi s drugim tehnikama za određivanje metalnih onečišćenja (18), primjerice atomskom apsorpcijskom spektrometrijom (AAS) i ICP-AES (također poznata kao ICP-OES). No, zbog još uvijek manje komercijaliziranosti u odnosu na druge tehnike (što je djelomično posljedica više cijene), postoji percepcija ICP-MS tehnike kao komplicirane i namijenjene istraživačkim, a ne rutinskim analizama.

Iako su danas dostupni ICP-MS uređaji različitog dizajna, rad se u osnovi temelji na nekoliko koraka (29): uvođenje uzorka, stvaranje iona u induktivno spregnutoj plazmi (ICP), plazma/vakuum sučelje, usmjeravanje iona te razdvajanje iona u masenom analizatoru i mjerenje (slika 3.).



**Slika 3.** Shematski dijagram 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 (engl. *sampler cone*), 8) drugi konus (engl. *skimmer cone*), 9) ionske leće, 10) kvadrupolni maseni analizator, 11) detektor multiplikator elektrona, 12) obrada podataka.

ICP-MS je tehnika u kojoj se ICP koristi kao ionizacijski izvor, a detekcija nastalih iona provodi se masenom spektrometrijom (MS). Za plazmu se uglavnom koristi plin argon uz temperaturu plazme od 6 000 do 10 000 K što je pogodno za simultano pobuđivanje (ekscitaciju) i ionizaciju većine elemenata periodnog sustava, što omogućuje multielementarna analiza (19). Najjednostavniji postupak pripreme uzorka za ICP-MS analizu je izravno otapanje. Važno je paziti na kvalitetu otapala da se preko njega ne bi uvela potencijalna onečišćenja. Uzorak se uvodi pomoću peristaltičke pumpe u raspršivač gdje se formira aerosol uzorka koji prolazi kroz komoru za sprejanje u plazmu. Plazma se stvara u struji argona u kvarcnoj cijevi ili baklji. Pod visokom temperaturom plazme uzorak prolazi faze desolvacije, isparavanja, atomizacije i ionizacije (slika 4.). Nastali ioni se ekstrahiraju iz plazme u regiju masenog spektrometra kroz par konusnih ploča s malim središnjim otvorima. Nakon toga se ioni fokusiraju pomoću niza ionskih leća u maseni analizator koji razdvaja pozitivno nabijene ione na temelju njihovih omjera masa i naboja ( $m/z$ ). Ioni se mjere upotrebom multiplikatora elektrona i sabiru pomoću brojača za svaki maseni broj (30).



Slika 4. Shematski prikaz procesa u ICP-MS tehnici od uvođenja uzorka do analize masa

Mogućnost brze i učinkovite multielementarne analize čini ICP-MS tehniku uz ICP-AES znatno naprednijim izborom za analizu metalnih onečišćenja u odnosu na korištene metode temeljene na taloženju. Iako obje tehnike nude odlične performanse, jednostavnu pripremu uzoraka i značajno kraće vrijeme analize u usporedbi s drugim instrumentalnim metodama (31), ICP-MS nadilazi performanse ICP-AES tehnike u smislu osjetljivosti jer su granice detekcije u ppt razinama (ng/kg odnosno ng/L) dok su za ICP-AES razine ppb do ppm (g/L do mg/L). Relativna jednostavnost masenih spektara u usporedbi s optičkim emisijskim spektrima ICP-AES tehnike olakšava interpretaciju rezultata i smanjuje rizik međuelementarnih interferencija. Maseni spektri cijelog periodnog sustava elemenata sadrže samo oko 220 masa od interesa u usporedbi s desecima tisuća emisijskih linija optičkih emisijskih spektara. Svaki element u masenom spektru predstavlja jedan ili više izotopa. Specifični maseni spektri dostupni za svaki pojedini element omogućavaju tvrtkama razvijanje računalnih programa za procjenu elemenata koje sadrže nepoznati uzorci, čak i bez dostupnih poredbenih elemenata (32). U velikom broju suvremenih studija navode se prednosti metoda razvijenih upotrebom ICP-MS u usporedbi s AAS tehnikom. U prednosti se ubrajaju pokrivanje širokog raspona elemenata, visoka osjetljivost, široko analitičko radno područje, minimalna količina uzorka, brzina analize, minimalne interferencije, informacije o izotopima te mogućnost specijacijske analize (8). Sve te mogućnosti tehnike potvrđuju status ICP-MS kao primarne tehnike za određivanje tragova metalnih onečišćenja u lijekovima. Zahtjevi za sve osjetljivijim mjerenjima uz veću produktivnost neprestano rastu pa ICP-MS ima prostora za razvoj i preuzimanje udjela u industriji na račun drugih tehnika. Gledajući izvrsne karakteristike i prednosti koje nudi ICP-MS, može se zaključiti da su najveća ograničenja tehnike veća financijska investicija, troškovi analiza i održavanja, nedostupnost certificiranih standarda kao i zahtjev većeg stupnja vještina analitičara (15).

Jedno od najbrže rastućih područja ICP-MS je kombinacija separacijskih tehnika (npr. tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti; HPLC, kapilarne elektroforeze; CE i ionske kromatografije; IC) s ICP-MS kao detektorom da bi se odredio kemijski oblik elemenata u uzorku. Budući da na unos, akumulaciju, transport i interakcije različitih elemenata značajno utječe specifični elementarni oblik, potpuna karakterizacija elemenata je nužna prilikom procjene rizika za zdravlje ljudi. Primjerice, poznato je da As, Hg, Cd i Se imaju različita toksikološka svojstva ovisno o tome nalaze li se u organskom ili anorganskom obliku ili pak ovisno o oksidacijskom stanju anorganskih oblika. Stoga su specijacijske analize ovih elemenata predmet različitih studija koje koriste ICP-MS detekciju u kombinaciji s nekom separacijskom tehnikom, često HPLC tehnikom. Interes za određivanje oksidacijskog stanja i kompleksnih oblika različitih elemenata u stalnom je porastu, a ICP-MS je postala jedna od najpopularnijih tehnika za specijacijske analize (18).

## ZAKLJUČAK

Zbog utjecaja na sigurnost i učinkovitost terapije lijekovima ispitivanje i kontrola metalnih onečišćenja važna su pitanja u farmaceutskoj kontroli kakvoće. ICH Q3D navodi da se pristup temeljen na procjeni rizika treba koristiti u svim fazama životnog ciklusa lijeka. Znanja stečena tijekom razvoja lijeka, u kombinaciji s iskustvima i podacima iz komercijalne proizvodnje, trebaju se koristiti za bolja razumijevanja postupaka što će u konačnici poboljšati kontrolu elementarnih onečišćenja. To ujedno znači i nužnost uključivanja i povezivanja različitih službi/sektora unutar farmaceutske industrije kao što su stručnjaci iz razvoja analitike i razvoja tehnologije, nabave, registracije, ispitivanja stabilnosti, proizvodnje, laboratorijske kontrole kvalitete, osiguranja kvalitete i naravno uprave. U nastojanju održanja na kompetitivnom farmaceutskom tržištu upotreba ICP-MS tehnike omogućit će proizvođačima lijekova da sa sigurnošću utvrde kakvoću svojih proizvoda po pitanju metalnih onečišćenja.

## Metal impurities in quality control of pharmaceuticals

B. Nigović, I. Smolčić

### Abstract

Metal impurities in pharmaceuticals originate from different sources, i.e. through raw materials, catalyst, reagents, solvents, various equipments used in the synthesis, etc. They have the potential to affect safety and efficacy of medicines. Current control of inorganic impurities has been primarily based on pharmacopoeial requirements for heavy metals with questionable capabilities of pharmacopoeial methods for detecting and quantification of some toxicologically significant metals. In the past few years, the

subject of metals analyses in pharmaceuticals has gained considerable interest. With a focus on patient safety, the process of international harmonization of guidelines (ICH Q3D) has been initiated as well as the revision of relevant chapters in the United States Pharmacopoeia (USP) and European Pharmacopoeia (Ph. Eur.). Apart from defining the metals to be monitored and stringent limits, the use of instrumental techniques in routine analysis is being proposed. This work gives a detailed overview of the proposed changes and shortcomings of traditional approaches in pharmacopoeial limit test for metals, the literature survey of the risk-based approach in establishing an effective control system for metal impurities in pharmaceuticals and the benefits of the use of ICP-MS technique in complying with the more stringent requirements.

## Literatura – References

1. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Impurities in New Drug Substances Q3A (R2), 2006.
2. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Impurities in New Drug Products Q3B (R2), 2006.
3. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C (R5), 2011.
4. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Harmonised Tripartite Guideline: Guideline for Elemental Impurities Q3D, 2014.
5. Toxipedia: Arsenic poisoning. <http://www.toxipedia.org/display/toxipedia/Arsenic+Poisoning/>, datum pristupa: 15.10.2015.
6. Diwakar Sherikar O, Jignesh Mehta P, Mohanlal Khatri D. Various approaches for impurity profiling of pharmaceuticals – An overview. *J. Pharm. Res.* 2011; 4:1937–1942.
7. Kashyap Wadekar R, Mitali Bhalme, Srinivasa Rao S, Vigneshwar Reddy K, Sampath Kumar L, Balasubrahmanyam E. Evaluating impurities in drugs (Part I of III). *Pharm. Tech.* 2012; 36:46–51.
8. Krishna Murty A.S.R., Kulshresta U.C., Nageswara Rao T., Kumar Talluri M.V.N. Determination of heavy metals in selected drug substances by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Ind. J. Chem. Technol.* 2005; 12:229–231.
9. Thayer M.A. Trace Metals Debate. *Chemical & Engineering News* 2013; 91:10–13.
10. The United States Pharmacopoeia. 38th ed. General Tests and Assays <231>Heavy Metals Rockville, MD: United States Pharmacopoeial Convention, 2015.
11. European Pharmacopoeia. 8th ed. 2.4 Limit tests, 2.4.8 Heavy metals. Strasbourg: Council of Europe; 2013.
12. The British Pharmacopoeia. London: The British Pharmacopoeia Commission Secretariat of the Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency, 2015.
13. The Japanese Pharmacopoeia, 16th ed. 1.07 Heavy Metals Limit Test. Tokyo: Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, 2013.
14. Wang T, Wu J, Hartman R, Jia X, S. Egan R. A multi-element ICP-MS survey method as an alternative to the heavy metals limit test for pharmaceutical materials. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000; 23:867–890.
15. Nageswara Rao R, Kumar Talluri M.V.N. An overview of recent applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in determination of inorganic impurities in drugs and pharmaceuticals. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007; 43:1–13.

16. Janošova V, Sykorova M, Štroffekova O, Havranek E. Determination of selected elements by X-ray fluorescence spectrometry in liquid drug samples after the preconcentration with thioacetamide. *J. Anal. Chem.* 2010; 65:56–63.
17. Lewen N, Mathew S, Schenkenberger M, Raglione T. A rapid ICP-MS screen for heavy metals in pharmaceutical compounds. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004; 35:739–752.
18. Huang J, Hu X, Zhang J, Li K, Yan Y, Xu X. The application of inductively coupled plasma mass spectrometry in pharmaceutical and biomedical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006; 40:227–234.
19. USP Heavy Metals Testing Methodologies Workshop, Summary. held August 26–27, 2008.
20. 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.
21. Duffus J.H. »Heavy metals« – a meaningless term?. *The International Union of Pure and Applied Chemistry* 2002; 74:793–807.
22. Guideline on the Specification Limits for Residues of Metal Catalysts or Metal Reagents. Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/4446/2000. London: European Medicines Agency, 2008.
23. United States Pharmacopeia, General Chapter <232> Elemental Impurities—Limits. 2013.
24. United States Pharmacopeia, General Chapter <233> Elemental Impurities – Procedures. 2013.
25. European Pharmacopoeia, 7.7 ed. General Chapter 5.20 Metal catalyst or metal reagent residues. 2012.
26. European Pharmacopoeia, 7.7 ed. Methods of analysis 2.4.20 Određivanje metalnih katalizatora ili ostataka metalnih reagensa. 2012.
27. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. <http://www.ich.org/about/vision.html>, datum pristupa: 28.01.2016.
28. Lewen N. What's New in testing pharmaceuticals for metals: Metals and limits in limbo. *Spectroscopy* 2014; 29:42–50.
29. ICP-MS Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: A Primer. Santa Clara, CA: Agilent Technologies Inc. 2005, 2–40.
30. Thomas R. Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners, 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2013, 1–13.
31. Cassap M. Using ICP-MS and ICP-OES to measure trace elemental impurities in pharmaceuticals in compliance with proposed pharmacopeia chapters. *Spectroscopy* 2011; 26:26–29.
32. SPECTRO: Simultaneous ICP-MS in the pharmaceutical industry, a powerful new tool for elemental analysis. <http://live.spectro.com/category/products/icp-ms-spectrometers/>, datum pristupa: 28.11.2015.

*Primljeno 23. prosinca 2016.*