Promjene u ispitivanju metalnih onečišćenja u kontroli kakvoće lijekova

Smolčić, Ivana

Professional thesis / Završni specijalistički

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:163:099383

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ivana Smolčić

PROMJENE U ISPITIVANJU METALNIH ONEČIŠĆENJA U KONTROLI KAKVOĆE LIJEKOVA

Specijalistički rad

Zagreb, 2015

Mentor rada: Prof. dr. sc. Biljana Nigović

Specijalistički rad obranjen je dana 25.3.2015. na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu pred povjerenstvom u sastavu:

1. **Izv. prof. dr. sc. Ana Mornar Turk**

   Sveučilište u Zagrebu

   Farmaceutsko-biokemijski fakultet

2. **Prof. dr. sc. Biljana Nigović**

   Sveučilište u Zagrebu

   Farmaceutsko-biokemijski fakultet

3. **Dr. sc. Biserka Cetina Čižmek, znanstvena savjetnica**

   PLIVA Hrvatska d.o.o. Zagreb

Rad ima 88 listova.

PREDGOVOR

Ovaj specijalistički rad izrađen je u sklopu poslijediplomskog specijalističkog studija Razvoj lijekova na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu.

Stručno znanje i skustvo stečeni dosadašnjim radom u farmaceutskoj industriji u području proizvodnje i osiguranja kakvoće lijekova utjecali su na odabir teme ovog završnog rada, kojim sam željela pokazati kako je povezanost akademske zajednice, regulatornih tijela i stručnjaka različitih područja unutar farmaceutske industrije nužna da bi se nove spoznaje o lijekovima uspješno implementirale u praksi i tako postigao konačni cilj svih sudionika u tom kompleksnom procesu - dobrobit pacijenata.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Biljani Nigović na pozitivnom stavu, iskazanom zanimanju za temu ovog završnog rada i svim stručnim savjetima.

Zahvaljujem se suprugu i obitelji na podršci i velikom strpljenju.

SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA

Objasnit će se etički, ekonomski i regulatorni razlozi važnosti kontrole metalnih onečišćenja u osiguranju sigurnosti i učinkovitosti lijekova. Prikazat će se postojeće stanje regulative (Ph. Eur., USP, ICH) i najavljene promjene u zahtjevima za kontrolu metalnih onečišćenja u lijekovima te objasniti sličnosti i razlike zahtjeva/smjernica na tom području. Provest će se studija literature o primjeni ICP-MS metoda u analizi metalnih onečišćenja u lijekovima i obraditi opće karakteristike tehnike te napraviti usporedba s metodama temeljenim na taloženju metala u obliku sulfida koje se trenutno primjenjuju. Napravit će se prosudba značaja usklađivanja s ovim regulatornih promjenama za farmaceutsku industriju.

MATERIJAL I METODE

Za izradu ovog rada obrađeni su i uspoređeni regulatorni zahtjevi koji se odnose na promjene u ispitivanju metalnih onečišćenja u lijekovima: poglavlja europske (Ph.Eur) i američke farmakopeje (USP) i njihove izmjene, vodič Europske agencije za lijekove (EMA), te dokumenti vezani uz međunarodnu harmonizaciju smjernica za elementarna onečišćenja (ICH Q3D). Korišteni su podaci dostupni na mrežnim stranicama EMA-e, ICH, USP, Međunarodnog vijeća za farmaceutske pomoćne tvari (IPEC) i drugi. Znanstveni i stručni radovi u kojima je obrađeno ispitivanje metalnih onečišćenja u lijekovima primjenom ICP-MS tehnike pronađeni su pretraživanjem dostupnih baza podataka i elektroničkih izvora kao što su MEDLINE/PubMed, ScienceDirect, Elsevier i drugi.

REZULTATI

Onečišćenja u lijekovima mogu biti organskog ili anorganskog porijekla i potjecati od različitih izvora. Potencijalno mogu ugroziti djelotvornost lijekova ili utjecati na sigurnost primjene. Važeće

međunarodno harmonizirane smjernice (ICH) koje se tiču onečišćenja u lijekovima i aktivnim farmaceutskim supstancama (Q3A, Q3B i Q3C) obrađuju zahtjeve za organska onečišćenja i ostatna otapala. Trenutna kontrola anorganskih onečišćenja temelji se primarno na farmakopejskim zahtjevima ispitivanjem graničnih vrijednosti za teške metale s upitnom mogućnosti detektiranja nekih toksikološki značajnih metala. S naglaskom na sigurnost pacijenata, pokrenut je proces međunarodne harmonizacije smjernica (ICH Q3D), a revidiraju se i relevantna poglavlja u USP i Ph. Eur. Osim definiranja metala koje treba pratiti i strožih granica prihvatljivosti, predlaže se upotreba instrumentalnih tehnika u rutinskoj analizi. U radu je dan detaljan pregled predloženih promjena i nedostataka tradicionalnog pristupa, prednosti primjene ICP-MS tehnike u usklađivanju sa strožim zahtjevima, kao i prosudba pristupa temeljenog na riziku u uspostavljanju učinkovitog sustava kontrole metalnih onečišćenja u lijekovima.

ZAKLJUČAK

Dokazani su brojni nedostaci trenutno važećih farmakopejskih metoda kojima se ispituju granične vrijednosti teških metala, a najviše zabrinjava upitna mogućnosti detektiranja nekih toksikološki značajnih metala. Razvoj modernih analitičkih tehnika omogućio je dobivanje kvantitativnih i specifičnih informacija o sadržaju metala u lijekovima i sirovinama, a pokretanjem međunarodne harmonizacije smjernica (ICH Q3D) i revidiranjem relevantnih poglavlja u USP i Ph. Eur. najavilo se razdoblje upotrebe instrumentalnih tehnika, posebno ICP-MS u rutinskoj analizi. Jasno je da tradicionalni limit test nije više adekvatan da zadovolji potrebe niti industrije niti pacijenata, a osim utvrđivanja metala koje treba pratiti i definiranja granica prihvatljivosti, odabir odgovarajuće analitičke metode biti će važan korak u uspostavljanju učinkovitog sustava kontrole metalnih onečišćenja u lijekovima.

SUMMARY

OBJECTIVES

Ethical, economic and regulatory reasons of the importance of controlling metal impurities in ensuring the safety and efficacy of drugs will be explained. The research will present the current state of legislation (Ph.Eur., USP, ICH) and the announced changes in the requirements for the control of metal impurities in pharmaceuticals and explain the similarities and differences in the requirements/guidelines in this area. A literature study on the application of ICP-MS methods in the analysis of metal impurities in pharmaceuticals will be carried out, general characteristics of the technique will be discussed and a comparison with currently used methods based on a sulfide precipitation of the metals will be made. Critical assessment of the importance of compliance with these regulatory changes for the pharmaceutical industry will be made.

MATERIAL AND METHODS

For the purpose of this research the regulatory requirements related to changes in metal impurities analysis in pharmaceuticals were analyzed and compared: chapters of the European Pharmacopoeia (EP) and the US Pharmacopoeia (USP) and amendments, European Medicines Agency Guideline (EMA) and documents related to the international harmonization of guidelines for elemental impurities (ICH Q3D). Data available on the websites of EMA, ICH, USP, International Pharmaceutical Excipient Council (IPEC) and other were used. Scientific and technical papers which deal with testing of metal impurities in pharmaceuticals using the ICP-MS technique were found by searching available databases and electronic sources such as MEDLINE/PubMed, ScienceDirect, Elsevier and other.

RESULTS

Impurities in drugs may be organic or inorganic and originate from different sources. They have the potential to affect safety and efficacy of drugs. The existing internationally harmonized guidelines (ICH) concerning impurities in drugs and active pharmaceutical substances (Q3A, Q3B and Q3C) address the requirements for organic impurities and residual solvents. Current control of inorganic impurities is primarily based on pharmacopoeial requirements for heavy metals with questionable capabilities of detecting some toxicologically significant metals. With a focus on patient safety, the process of international harmonization of guidelines (ICH Q3D) has been initiated and the revision of relevant chapters in the USP and EP. Besides 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, the benefits of the use of ICP-MS in complying with the more stringent requirements and the critical assessment of the risk-based approach in establishing an effective control system for metal impurities in pharmaceuticals.

CONCLUSION

Many shortages of currently valid pharmacopoeial methods for detection of limit concentrations of heavy metals have been proven and the most worrying is questionable capability of detecting some toxicologically significant metals. Development of modern analytical techniques made it possible to obtain quantitative and specific information regarding the content of metals in drugs and raw materials, while initiation of international harmonization of guidelines (ICH) and review of the relevant chapters in the USP and Ph.Eur. announced the period of use of instrumental techniques, particularly ICP-MS, for routine analysis. It is clear that the traditional limit test is no longer adequate to meet the needs of either the industry or patients. In addition to determining the metals to be monitored and defining the acceptable limits, selection of appropriate analytical method will be an important step in establishing an effective control system for metal impurities in pharmaceuticals.

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA ... 1

2. CILJ ISTRAŽIVANJA ... 3

3. MATERIJAL I METODE ... 4

4. RASPRAVA ... 5

4.1. Vrste i izvori onečišćenja u lijekovima i farmaceutskim sirovinama ... 5

4.2. Važnost kontrole metalnih onečišćenja u lijekovima ... 7

4.3. Regulatorni zahtjevi za ispitivanje onečišćenja u lijekovima ... 9

4.3.1. Farmakopejske metode određivanja graničnih vrijednosti teških metala ... 11

4.3.1.1. Metode ispitivanja i priprema uzorka prema USP ... 12

4.3.1.2. Metode ispitivanja i priprema uzorka prema Ph. Eur. ... 15

4.3.1.3. Prednosti i nedostaci važećih farmakopejskih metoda za ispitivanje teških metala 18

4.4. Regulatorne promjene i međunarodna harmonizacija smjernica za ispitivanje metalnih onečišćenja u lijekovima ... 24

4.4.1. Sličnosti i razlike zahtjeva EMA-e, Ph. Eur., USP i ICH Q3D smjernica ... 26

4.4.1.1. Zahtjevi EMA vodiča ... 31

4.4.1.2. Zahtjevi USP poglavlja <232> i <233> ... 33

4.4.1.3. Zahtjevi ICH Q3D ... 36

4.4.1.4. Postavljanje koncentracijskih granica za metalna onečišćenja ... 44

4.4.1.4.1. Pretvorba između PDE i koncentracijskih granica prema ICH Q3D ... 44

4.4.1.4.2. Pretvorba između PDE i koncentracijskih granica prema EMA vodiču ... 51

4.4.1.4.3. Pretvorba između PDE i koncentracijskih granica prema USP ... 53

4.4.1.5. Sažeti pregled razlika između smjernica ICH Q3D, USP i EMA ... 54

4.5. ICP-MS u ispitivanju metalnih onečišćenja u lijekovima ... 60

4.5.1. Načela rada ICP-MS ... 60

4.5.2. Priprema uzorka za ICP-MS analizu ... 66

4.5.3. Prednosti i nedostaci ICP-MS tehnike ... 70

4.6. Utjecaj najavljenih promjena na farmaceutsku industriju ... 76

5. ZAKLJUČAK ... 81

6. LITERATURA ... 82

7. KRATICE ... 87

8. ŽIVOTOPIS ... 88

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Najvažniji čimbenici u terapiji lijekovima svakako su učinkovitost i sigurnost za pacijenta. Praćenje i kontrola onečišćenja općenito osiguravaju kvalitetu i sigurnost lijeka, pa su i vezane analitičke aktivnosti među najvažnijim pitanjima u modernoj farmaceutskoj kontroli kakvoće. [(1)] Velik je broj potencijalnih izvora i vrsta onečišćenja u lijekovima i sirovinama, ali posebnu pažnju treba posvetiti onim koja imaju utjecaj na stabilnost ili učinak lijeka ili pokazuju toksikološke efekte. [(2,3)]

Važeće međunarodno harmonizirane smjernice (ICH) koje se tiču onečišćenja u lijekovima i aktivnim farmaceutskim supstancama (Q3A, Q3B i Q3C) obrađuju zahtjeve za organska onečišćenja i ostatna otapala. Trenutna kontrola anorganskih onečišćenja temelji se još od početka 20. stoljeća na farmakopejskim zahtjevima, primarno na ispitivanju graničnih vrijednosti za teške metale koji se koriste bez odgovarajućeg pristupa temeljenog na riziku, a upitna je mogućnost detektiranja nekih toksikološki najznačajnijih metala. [(4)] Brojni su radovi koji govore o nedostacima tog tradicionalnog pristupa, a ne postoji ni međunarodni dogovor oko definicije tj. popisa za teške metale. S naglaskom na sigurnost pacijenata, predloženo je stvaranje nove ICH Q3D smjernice koja bi razjasnila zahtjeve i osigurala harmonizirani pristup za kontrolu metala koji su klasificirani kao anorganska onečišćenja.

Razvoj modernih analitičkih tehnika omogućio je dobivanje kvantitativnih i specifičnih informacija o sadržaju metala u lijekovima i sirovinama [(5)], a revidiranjem relevantnih poglavlja u USP i Ph. Eur. najavilo se razdoblje upotrebe instrumentalnih tehnika, posebno ICP-MS u rutinskoj analizi. Jasno je da tradicionalni limit test nije više adekvatan da zadovolji potrebe niti industrije niti pacijenata, a osim utvrđivanja metala koje treba pratiti i definiranja granica prihvatljivosti, odabir odgovarajuće analitičke metode biti će važan korak u uspostavljanju učinkovitog sustava kontrole metalnih onečišćenja u lijekovima.

Istraživanje u okviru ovog rada uključuje detaljan pregled dostupne literature iz područja ispitivanja metalnih onečišćenja u lijekovima, s naglaskom na objašnjenje porijekla metalnih onečišćenja u lijekovima i farmaceutskim sirovinama, važnost praćenja njihove prisutnosti i kvantifikacije, regulatorne zahtjeve i prednosti analize tih onečišćenja instrumentalnim tehnikama,

posebno ICP-MS, u usporedbi s metodama temeljenim na taloženju metala u obliku sulfida i utvrđivanjem graničnih vrijednosti. Napravit će se sažetak informacija o:

- izvorima metalnih onečišćenja u lijekovima i farmaceutskim sirovinama i njihovom utjecaju na kakvoću i sigurnost lijekova,
- karakteristikama analize metalnih onečišćenja u farmaceutskoj industriji od početaka primjene metode limit testa za teške metale do današnjih instrumentalnih analiza s naglaskom na ICP-MS tehniku,
- trenutno važećoj regulativi i najavljenim promjenama na tom području,
- mogućim načinima implementacije novih zahtjeva u standardne procese kontrole kakvoće u farmaceutskoj industriji što će služiti kao pojašnjenje značaja izmjene regulatornih zahtjeva u kontroli kakvoće lijekova i prikaz složenosti primjene tih izmjena u praksi.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Objasnit će se etički, ekonomski i regulatorni razlozi važnosti kontrole metalnih onečišćenja u osiguranju sigurnosti i učinkovitosti lijekova. Prikazat će se postojeće stanje regulative (Ph. Eur., USP, ICH) i najavljene promjene u zahtjevima za kontrolu metalnih onečišćenja u lijekovima, te objasniti sličnosti i razlike zahtjeva/smjernica na tom području. Provest će se studija literature o primjeni ICP-MS metoda u analizi metalnih onečišćenja u lijekovima i obraditi opće karakteristike tehnike te napraviti usporedba s metodama temeljenim na taloženju koje se trenutno primjenjuju. Napravit će se prosudba značaja usklađivanja s ovim regulatornih promjenama za farmaceutsku industriju.

3. MATERIJAL I METODE

Za potrebe rada korišteni su znanstveni radovi u kojima su obrađene karakteristike analize metalnih onečišćenja u farmaceutskoj industriji primjenom metode limit testa za teške metale te primjenom instrumentalne tehnike ICP-MS. Pregledom dostupnih stručnih članaka prikupljani su podaci o utjecaju navedenih promjena na farmaceutsku industriju. U pretraživanju su korištene dostupne baze podataka i elektronički izvori kao što su MEDLINE/PubMed, ScienceDirect, Elsevier i drugi uz primjenu ključnih riječi poput: *metal impurities, heavy metals, pharmaceuticals, ICP-MS, metal analysis, atomic spectroscopy, limit test* i slično. Napravljen je pregled postojećeg stanja regulatornih normi, usporedba različitih zahtjeva/smjernica i pregled najavljenih promjena u ispitivanju metalnih onečišćenja u lijekovima. To obuhvaća pregled važećih poglavlja u Europskoj farmakopeji (Ph.Eur) i Američkoj farmakopeji (USP) koja se odnose na ispitivanje elementarnih onečišćenja utvrđivanjem graničnih vrijednosti na teške metale (limit test), kao i objavljenih novih poglavlja USP 232 "Elementarna onečišćenja – granice" i 233 "Elementarna onečišćenja – postupci", pregled Vodiča Europske agencije za lijekove (EMA) za određivanje granica ostataka metalnih katalizatora, te dokumenata vezanih uz međunarodnu harmonizaciju smjernica za elementarna onečišćenja (ICH Q3D) u aktualnim fazama. Korišteni su i podaci dostupni na mrežnim stranicama Europske agencije za lijekove, tijela za međunarodnu harmonizaciju smjernica (ICH), IPEC federacije (globalna organizacija koja promiče kvalitetu farmaceutskih pomoćnih tvari), Američke farmakopeje (USP) i drugi.

4. RASPRAVA

4.1. Vrste i izvori onečišćenja u lijekovima i farmaceutskim sirovinama

Riječ onečišćenje označava nešto što je nečisto ili čini drugu tvar nečistom. Jedna od mogućih definicija onečišćenja u farmaceutskoj industriji bila bi da je to bilo koji materijal koji utječe na čistoću materijala od interesa (aktivne farmaceutske tvari (API) ili lijeka). [2] Prema smjernici ICH Q3A[6] *Onečišćenja u novim ljekovitim supstancijama* onečišćenje se definira kao bilo koji sastojak nove ljekovite supstancije koji nije kemijski subjekt definiran kao nova ljekovita supstancija. Prema smjernici ICH Q3B [7] *Onečišćenja u novim gotovim lijekovima* onečišćenje se definira kao bilo koji sastojak novog gotovog lijeka koji nije ljekovita supstancija ili ekscipijens u gotovom lijeku.

Onečišćenja u lijekovima su pitanje kakvoće jer potencijalno mogu ugroziti djelotvornost lijeka ili utjecati na sigurnost primjene. [8] Mogu biti uzrok inkompatibilnosti, razgrađivati djelatnu tvar i time uzrokovati nestabilnost lijeka i smanjiti njegov učinak. Često imaju neželjene farmakološko-toksikološke učinke koji mogu prevagnuti u odnosu na korist od primljene terapije, a mogu se i nakupljati u organizmu. Zbog svega navedenog, njihova je prisutnost u lijekovima nepoželjna. [1, 9]

S kemijskog aspekta, farmaceutska onečišćenja su neizbježna jer niti jedna kemijska reakcija nije 100% selektivna, kao što niti jedan kemijski spoj nije potpuno tj. u svim uvjetima stabilan. [8] U praksi je gotovo nemoguće proizvesti lijek bez onečišćenja, a kada bi i bilo moguće postupak bi bio vrlo skup. Zato se prisutnost onečišćenja u koncentracijama unutar određenih granica smatra prihvatljivom.[9]

S obzirom na njihov velik potencijalni utjecaj, sve nečistoće prisutne u lijeku trebalo bi u potpunosti razumjeti (kvalitativno odnosno kemijski i kvantitativno), te ako je potrebno kvalificirati kroz toksikološku procjenu. [8] Sva potencijalna onečišćenja trebala bi biti identificirana kako bi se saznalo njihovo porijeklo odnosno izvor, a onda i mogući način minimizacije tih onečišćenja u lijekovima. [2] Primjerice, identifikacija onečišćenja koja potječu iz procesa (sinteze ili formulacije) i razgradnih produkata može omogućiti razumijevanje nastanka tih onečišćenja i definirati mehanizme razgradnje. [3] Identifikacija, kvantifikacija, kvalifikacija i kontrola onečišćenja danas su ključan dio

procesa razvoja lijeka jer je na taj način od samog početka, kroz optimizaciju procesa sinteze i odgovarajuća preformulacijska/formulacijska ispitivanja, moguće reducirati njihovu prisutnost/količine u gotovom lijeku i u konačnici osigurati proizvodnju lijekova visoke kakvoće. [2,3,8]

Da bi se osigurala kakvoća API-a i gotovih lijekova odnosno postigla sukladnost specifikacijama, onečišćenja se moraju pažljivo pratiti i tijekom optimizacije i promjena procesa što za proizvođače može predstavljati dodatni utrošak vremena i novca. Stoga je stroži pristup u razvojnom stadiju kao i što potpunije razumijevanje procesa važno u održavanju prihvatljive razine onečišćenja i odgovarajuće kakvoće lijekova. [10]

Već iz usporedbe samih izraza o*nečišćenje* i *aktivna farmaceutska tvar* može se zaključiti da je općeniti stav kako su onečišćenja inferiorna API-u u smislu razine famakološke aktivnosti, što ne mora uvijek biti točno. [3] Prisutnost nekih onečišćenja ne mora nužno štetno utjecati na kvalitetu lijeka ako ona imaju terapijski učinak koji je sličan ili veći od same aktivne tvari. Međutim, smatra se da je tim superiornim svojstvima onečišćenja (farmakološkim ili toksikološkim) narušena čistoća aktivne tvari/lijeka sa stajališta njegove uporabe. To znači da se bilo koji strani materijal koji ne pripada formulaciji, a prisutan je u aktivnoj tvari ili gotovom lijeku treba razmatrati kao onečišćenje, bez obzira da li je potpuno inertan ili farmakološki superioran, i potrebno je napraviti odgovarajuću procjenu njegovog sadržaja u lijeku. [2, 3]

Za opisivanje onečišćenja u literaturi se koriste različiti izrazi [3], primjerice:

- nusprodukti
- razgradni produkti
- interakcijski produkti
- intermedijeri
- srodni spojevi
- transformacijski produkti

Neki od tih izraza nagovještaju potencijalne izvore onečišćenja, npr. razgradni produkti ili intermedijeri, dok neki naizgled umanjuju njihov negativan utjecaj, npr. srodni spojevi.

Onečišćenja dakle mogu potjecati iz različitih izvora. Tijekom procesa sinteze API-a različiti intermedijeri ili nusprodukti reakcija mogu dospjeti u API kao onečišćenja ili iz njih mogu nastati druga onečišćenja, a potencijalni izvor su i svi polazni materijali, reagensi, ligandi, katalizatori i otapala korišteni tijekom sinteze API-a. Mogu nastati tijekom različitih koraka proizvodnje lijeka i biti prisutna u gotovom lijeku. To mogu biti onečišćenja vezana uz API ili ekscipijense korištene za proizvodnju gotovog lijeka i ona nastala kao razgradni produkti lijeka zbog nestabilnosti API-a ili inkopatibilnosti sa ekscipijensima. Onečišćenja mogu nastati i nakon završetka proizvodnje, kao razgradni produkti tijekom procesa starenja lijeka u uvjetima čuvanja ili stresnim uvjetima, a postoji i utjecaj proizvodnog procesa lijeka (npr korištene opreme) ili kontakta sa primarnim pakiranjem. [2,3] Od svih tih potencijalnih onečišćenja posebnu pozornost treba posvetiti onim koja imaju utjecaj na stabilnost ili učinak lijeka pa bismo ih mogli nazvati *štetnima*. Zbog mobilnosti molekula, osobito u čvrstim ljekovitim oblicima, općenito se štetnijim smatraju male molekule kao što su voda (može hidrolizirati neke lijekove ili utjecati na učinak), mali elektrofili (primjerice aldehidi i derivati karboksilnih kiselina), peroksidi (mogućnost oksidacije nekih lijekova) i metali (mogu katalizirati oksidaciju i druge razgradne puteve lijeka). *Štetnim onečišćenjima* od velike važnosti smatraju se naravno i ona sa toksikološkim učincima. [3]

Općenito se može reći da postoje dva osnovna tipa onečišćenja koja nalazimo u lijekovima:

1. Onečišćenja povezana sa API-em
2. Onečišćenja koja nastaju tijekom formulacije i/ili starenjem, odnosno ona povezana sa gotovim oblicima. [2]

4.2. Važnost kontrole metalnih onečišćenja u lijekovima

Toksičnost različitih elemenata odavno je dobro poznata i dokumentirana. Postoje izvješća da je kineski car Ying Zhen umro od posljedica trovanja živom jer je koristio lijek koji je sadržavao živu, a trebao ga je učiniti besmrtnim. Još u drugom stoljeću prije Krista znalo se da izloženost olovu može biti štetna. [5] Prisutnost olova i kadmija u lijekovima predstavlja ozbiljan rizik za zdravlje čak i u vrlo

malim dozama. Unos 0.06 mg Pb/dan kroz period od mjesec dana dovoljan je za kronično trovanje, a kronična toksičnost uzrokuje disfunkciju bubrega, osteomalaciju i opstruktivnu plućnu bolest. Kadmij je karcinogen i povezan sa nizom rizika za zdravlje ljudi. Akumulira se u tijelu i ima biološko vrijeme poluraspada 30 godina. [1] Arsen je najpoznatiji po svojoj upotrebi kao otrov još od rimskih vremena pa do sredine 19. stoljeća. Zbog nedostatka boje, mirisa i okusa bio je vrlo pogodan za korištenje u svrhu namjernog trovanja. Oralno unesen u većim količinama uzrokovao je ozbiljne abdominalne grčeve, dijareju, povraćanje i konačno smrt, a simptomi oralno unešenih malih doza oponašali su simptome nekih kroničnih bolesti što je otežavalo otkrivanje uzroka smrti kod počinjenih ubojstava. Ovakva zloupotreba arsena počela je polako opadati u 18. stoljeću kada je engleski kemičar James Marsh razvio kemijski test za identifikaciju arsena u tijelu. [12]

Toksikolozi neprestano istražuju utjecaj raznih elemenata na ljudsko zdravlje, pa se i dozvoljene granice izloženosti temeljene na podacima istraživanja konstantno revidiraju. Time se povećava potreba ispitivanja lijekova na njihovu prisutnost. [5] Neki metali potrebni su organizmu kao mikronutrijenti, ali iznad određenih granica postaju toksični. Iako je toksičnost različitih elemenata, posebno spomenutih Hg, As i Pb dobro poznata, granice njihove dozvoljene prisutnosti u lijekovima nisu jasno definirane u nacionalnim farmakopejama. Zato je potrebno tražiti prikladne metode za kontrolu takvih metala u vrlo niskim koncentracijama (ppm ili ppb) bilo za pojedini metalni ion ili za smjesu metalnih iona. [13]

Anorganska onečišćenja tj. metalna onečišćenja mogu potjecati iz različitih izvora i faza kao npr. iz sirovina (djelatne tvari ili ekscipijensi), reagensa, otapala, elektroda, katalizatora, reakcijskih posuda, cijevi i druge opreme korištene tijekom sinteze API-a i proizvodnje lijeka (Tablica 1). Mogu biti posljedica izlaganja česticama dospjelim iz zraka, izvor može biti primarni spremnik, itd. Zbog poznate sposobnosti metala da kataliziraju razgradnju, ali i zbog njihove potencijalne toksičnosti praćenje i kontrola sadržaja metalnih onečišćenja u intermedijerima, sirovinama i gotovim lijekovima vrlo je važna aktivnost u farmaceutskoj kontroli kakvoće. Zbog različitih potencijalnih putova ulaska u lijek u interesu farmaceutske industrije je praćenje tih onečišćenja u svim fazama razvoja procesa. Sudeći po razvoju novih smjernica jasno je da su regulatorna tijela i industrija prepoznale važnost ovog problema. [1, 5, 13, 14]

Tablica 1. Klasifikacija potencijalnih izvora onečišćenja prema ICH smjernicama Q3A, Q3B i Q3C [8]

Organska onečišćenja	Polazni materijali
	Intermedijeri
	Nusprodukti
	Razgradni produkti
	Reagensi, ligandi i katalizatori
Anorganska onečišćenja	Reagensi, ligandi i katalizatori
	Teški metali i drugi ostatni metali
	Anorganske soli
	Drugi materijali npr. filteri, drveni ugljen
Ostatna otapala	Anorganske i organske tekućine

4.3. Regulatorni zahtjevi za ispitivanje onečišćenja u lijekovima

Ispitivanje onečišćenja u farmaceutskim proizvodima jedno je od važnijih područja interesa te postoje strogi propisi kojima se utvrđuje prihvatljivost prisutnosti različitih onečišćenja i koncentracijske granice prihvatljivosti. [5] Metode za određivanje prisutnosti/sadržaja različitih onečišćenja u svrhu kontrole kakvoće lijekova opisane su u nacionalnim farmakopejama. [9]

Važeće međunarodno harmonizirane smjernice (ICH) koje se tiču onečišćenja u lijekovima i aktivnim ljekovitim supstancama (Q3A, Q3B i Q3C) klasificiraju ih u tri skupine: organska, anorganska i ostatna otapala (Tablica 1). Q3A [6] i Q3B [7] jasno obrađuju zahtjeve za organska onečišćenja, a dodatno razvijena smjernica Q3C [11] bavi se zahtjevima za ostatna otapala.

ICH Q3A[6] se bavi kemijskim i sigurnosnim aspektima onečišćenja u novim aktivnim supstancijama tj. djelatnim tvarima (API) i definira granice za izvještavanje, identifikaciju i kvalifikaciju. Klasificira onečišćenja kao organska, anorganska i ostatna otapala. Kontrola organskih onečišćenja u API-ima prema ICH Q3A temelji se na maksimalnoj dnevnoj dozi djelatne tvari (≤ 2g/dan ili > 2 g/dan) i ukupnom dnevnom unosu onečišćenja (TDI). Niže granice od propisanih mogu biti prikladne ako je onečišćenje neuobičajeno toksično.

ICH Q3B[7] nadopunjuje ICH Q3A i daje smjernice u vezi s onečišćenjima u gotovim lijekovima koji sadrže nove, kemijski sintetizirane djelatne tvari. Bavi se onim onečišćenjima klasificiranim kao razgradni produkti djelatne tvari ili produkti interakcija djelatne tvari sa ekscipijensima i/ili primarnim spremnikom, te ih zajednički naziva razgradni produkti. Granične vrijednosti za izvještavanje i kontrolu onečišćenja se predlažu na temelju maksimalne dnevne doze djelatne tvari primjenjene u gotovom lijeku i na ukupnom dnevnom unosu onečišćenja. Na temelju maksimalne dnevne doze granice izvještavanja podjeljene su u dvije grupe (≤ 1g i > 1 g). Identifikacijske granice su podjeljene u četiri grupe (< 1 mg, 1 mg do 10 mg, > 10 mg do 2 g i > 2 g) i uključuju niskodozirne lijekove. Npr. za lijekove kod kojih je maksimalna dnevna doza 10 mg do 2 g onečišćenja u razini 0.2% ili više moraju biti identificirana. Granice za razgradne produkte izražavaju se ili kao postotak djelatne tvari ili kao TDI razgradnog produkta. Niže granice mogu biti prikladne ako je razgradni produkt neuobičajeno toksičan. Više granice trebaju biti znanstveno opravdane.

ICH Q3C[11] propisuje zahtjeve za ostatna otapala u lijekovima. Preporučuje korištenje manje toksičnih otapala u proizvodnji djelatnih tvari i gotovih dozirnih oblika lijekova i postavlja granice (količine koje se smatraju toksikološki prihvatljivima) za ostatna otapala u gotovim lijekovima radi sigurnosti pacijenata. Ostatna otapala definirana su kao organski hlapljivi spojevi koji su korišteni ili proizvedeni u proizvodnji djelatne tvari ili ekscipijensa ili samog gotovog lijeka.

Trenutno ne postoje međunarodno harmonizirane smjernice koje bi osigurale adekvatnu kontrolu metalnih onečišćenja, koja su klasificirana kao anorganska, u gotovim lijekovima i sirovinama. Zato je predloženo stvaranje nove smjernice ICH Q3D koja bi na sličan način kao smjernice Q3A, Q3B i Q3C razjasnila zahtjeve za metalna onečišćenja. [4] S naglaskom na sigurnost pacijenata, nova ICH smjernica, koja bi uključivala listu metala s odgovarajućim dozvoljenim granicama postavljenim na temelju toksikoloških podataka i faktora rizika pojavljivanja, osigurala bi harmonizirani i prikladan pristup kontroli metalnih onečišćenja u gotovim lijekovima i sirovinama između ICH regija i izbjegla dupliciranje analiza u industriji uslijed različitih zahtjeva u regijama. Trenutna kontrola anorganskih onečišćenja temelji se još od početka 20. stoljeća na farmakopejskim zahtjevima, primarno na ispitivanju graničnih vrijednosti za teške metale koji se koristi bez adekvatnog pristupa temeljenog na riziku kako bi se kontrolirali metali za koje postoji vjerojatnost prisutnosti. Ta metodologija bila je u

početku namijenjena uglavnom kontroli metala koji stvaraju taloge sulfida, kao što su olovo, bakar i drugi metali koji su bili potencijalna onečišćenja od cijevi za vodu, proizvodne opreme, procesa ili drugih izvora. Iako su se faktori rizika za onečišćenje metalima dramatično promijenili tijekom razvoja industrijske farmaceutske proizvodnje, standardi za njihovu kontrolu nisu slijedili taj razvoj i vrlo su se malo mijenjali, a granične vrijednosti nemaju uporište u aktualnim toksikološkim podacima. Broj metala koje zaista možemo detektirati farmakopejskim testom na teške metale je ograničen, a upitna je mogućnost detekcije nekih toksikološki najznačajnijih metala.

Zato se u završnom konceptu ICH Q3D naglašava upravo pristup temeljen na procjeni rizika. Kako bi se osigurala korist za javno zdravstvo predviđeno je da se za kontrolu metalnih onečišćenje utvrdi sigurnosno temeljen pristup. Osobito je važno uspostaviti odgovarajuće kontrole onih metala s jasno utvrđenim toksikološkim rizikom.

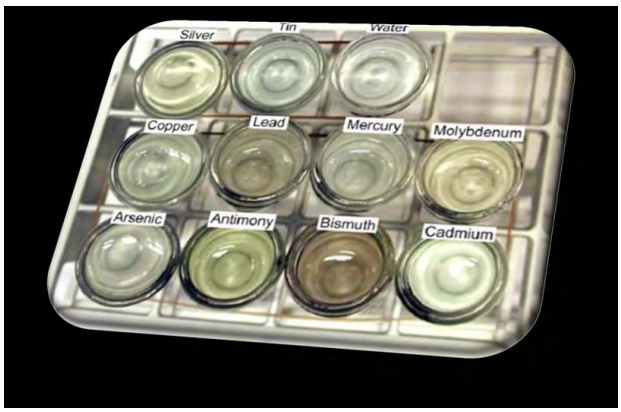
4.3.1. Farmakopejske metode određivanja graničnih vrijednosti teških metala

1905. godine U.S. Pharmacopeial Convention, neprofitna organizacija koja postavlja standarde poznata kao USP, uvela je metodu za provjeru prisutnosti teških metala u lijekovima na američkom tržištu. Više od 100 godina kasnije farmaceutska industrija još uvijek koristi metode temeljene na istom načelu. [15]

Američka farmakopeja (USP), britanska farmakopeja (BP), europska farmakopeja (Ph. Eur.) i japanska farmakopeja (JP) već više od 100 godina koriste ispitivanje za grupno praćenje ukupnog sadržaja metala u farmaceutskim materijalima. Načelo limit testa na teške metale je reakcija između metala prisutnih u uzorku i tioacetamidnog reagensa koja rezultira nastajanjem obojenih sulfida (taloženje metalnih sulfida iz vodene otopine) nakon čega se boja nastalih sulfidnih taloga vizualno uspoređuje sa bojom taloga simultano i slično tretirane standardne otopine olova koja sadrži poznatu koncentraciju Pb (obično 10mg/L). Ukupni sadržaj teških metala izražava se u odnosu na standard olova kao limit test, odnosno granična vrijednost, npr. <20 μg/g. [1, 14, 16] Zbog sličnosti metoda u navedenim farmakopejama u radu će se pod farmakopejskom metodom za teške metale razmatrati

metoda USP opisana u poglavlju <231> *Heavy Metals* [17] uz neke usporedbe s metodom Ph. Eur. 2.4.8. [18].

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 (Slika 1), test je zapravo pogodan za metalne ione koji reakcijom daju tamno obojene sulfide kako bi usporedba sa tamno smeđim talogom olovnog sulfida bila moguća. USP test na teške metale trebao bi moći detektirati Pb, Hg, Bi, As, Sb, Sn, Cd, Ag, Cu, i Mo. [14, 17]



Slika 1. Boje nastalih taloga elemenata u USP testu na teške metale [19]

Priprema uzorka je kod mnogih analitičkih metoda najvažniji, najizazovniji i vremenski najzahtjevniji korak. Isto je i kod farmakopejskog limit testa na teške metale. I USP i Ph. Eur daju mogućnost korištenja nekoliko metoda pripreme uzorka ovisno o karakteristikama uzorka. Kod USP[17] su to tri metode (I, II i III), a kod Ph. Eur.[18] čak sedam (A, B, C, D, E, F i G). Obilježja svih tih metoda pripreme uzorka, bez obzira na razlike, su previše radnih koraka, kompliciranost i zahtjevnost u smislu utrošenog vremena i rada analitičara. Dobiveni rezultat, neovisno o korištenoj metodi, nije dovoljno osjetljiv i specifičan, a iskorištenja elemenata su nepouzdana. [14]

4.3.1.1. Metode ispitivanja i priprema uzorka prema USP

Metoda I se koristi za tvari koje u uvjetima testa daju bistre, bezbojne otopine. Osim podešavanja pH između 3.0 i 4.0, priprema uzorka svodi se na prilično izravno otapanje.

Ispitivana otopina je propisana otopina ispitivane tvari prema individualnoj monografiji ili je pripremljena otapanjem u kiselini i razrjeđivanjem s vodom količine ispitivane tvari u g izračunato prema formuli 2.0/(1000L), gdje je L granica teških metala kao postotak. Nakon toga se pH podešava između 3.0 i 4.0.

Poredbena otopina (standard) priprema se razrjeđivanjem standardne otopine olova (1 ml sadrži 10 µg Pb) s vodom i podešavanjem pH između 3.0 i 4.0. Kontrolna otopina priprema se iz ispitivane otopine dodatkom standardne otopine olova i podešavanjem pH između 3.0 i 4.0. Pripremljena je na bazi 100 µl (0,1 ml) standardne otopine olova po gramu ispitivane tvari, pa sadrži 1 µg olova po g ispitivane tvari odnosno 1 ppm Pb = 1 dio olova u milijun dijelova ispitivane tvari.

Postupak: U svaku od 3 otopine (ispitivana otopina, poredbena otopina i kontrolna otopina) dodaje se acetatni pufer pH 3.5 i onda 1,2 mL tioacetamid-glicerinske baze (TS), razrijedi s vodom, promiješa i ostavi stajati 2 minute nakon čega se boja promatra iznad bijele podloge. Boja otopine nastala od ispitivanog uzorka nije tamnija od boje poredbene otopine (stadard), a boja kontrolne otopine je jednaka ili tamnija od boje poredbene otopine. Ako je boja kontrolne otopine svjetlija od poredbene otopine treba koristiti metodu pripreme uzorka II umjesto metode I.

Metoda II se koristi za supstancije koje ne daju bistre, bezbojne otopine pod uvjetima testa specificiranim za metodu I ili za supstancije koje zbog svoje kompleksne prirode interferiraju s taloženjem metala pomoću sulfidnog iona ili za nehlapljiva i hlapljiva ulja. USP posebno napominje da se ovom metodom pripreme uzorka ne može utvrditi prisutnost žive.

Kod ove metode uzorci se moraju žariti, ugljenizirati, razgraditi (digestirati) i ponovno žariti prije nego se mogu prevesti u tekući oblik. Razlika u odnosu na metodu I je što nema kontrolne otopine, a za pripremu ispitivane otopine koristi se puno više radnih koraka i tretiranja uzorka kiselinama i visokom temperaturom.

Ispitivana tvar (uzorak) u količini u g izračunatoj prema formuli iz metode I se zagrijava na niskoj temperaturi sa sulfatnom kiselinom dok ne pougljeni. Karboniziranoj masi se dodaju nitratna i sulfatna kiselina i pažljivo zagrijava do prestanka razvijanja bijelih para. Nakon toga se žari u žarnoj peći na 500 do 600°C do potpunog gubitka ugljika. Kada se ohladi, dodaje se klorovodična kiselina, digestira

na parnoj kupelji i onda uparava na parnoj kupelji do suha. Ostatak nakon uparavanja se navlaži s kloridnom kiselinom, doda voda i ponovno digestira. Dodaje se amonijev hidroksid da bi se otopina alkalizirala i razrijedi s vodom nakon čega se sa octenom kiselinom podešava pH između 3.0 i 4.0 i po potrebi filtrira. Postupak dodavanja acetatnog pufera i tioacetamidnog reagensa te vizualne usporedbe obojenja jednak je kao u metodi I. Boja ispitivane otopine nije tamnija od boje poredbene otopine.

Metoda III, metoda mokre razgradnje (digestije) koristi se samo u slučajevima kada se ne mogu koristiti metode I i II. Uključuje ispitivanu otopinu, poredbenu otopinu i kontrolnu otopinu koje se pripremaju prema sličnom principu.

Priprema poredbene otopine uključuje niz koraka kao što su zagrijavanje smjese sulfatne i nitratne kiseline do pojave bijelih para, hlađenje, dodavanje vode i vodikovog peroksida (ukoliko se njime tretira i uzorak), te ponavljano zagrijavanje, hlađenje i razrjeđivanje s vodom prije dodavanja 2 ml standardne otopine olova (20 μg Pb).

Priprema ispitivane otopine također je zahtjevna, a predložena je i različita priprema ovisno o tome da li je uzorak u čvrstom ili tekućem agregatnom stanju. Količina ispitivane tvari u g izračunava se prema formuli iz metode I. Ispitivani uzorak se zagrijava u tikvici za sagorjevanje uz dodavanje smjese sulfatne i nitratne kiseline i vrenje do pojave tamnog obojenja. Zatim se opetovano dodaje nitratna kiselina i grije dok se ne prestane pojavljivati tamno obojenje otopine. Nakon toga se jače zagrijava do razvitka gustih bijelih para, hladi i dodaje voda te ponovno zagrijava do smanjenja volumena otopine. Ako je otopina žuta mora se obezbojiti dodavanjem otopine jakog vodikovog peroksida.

Kontrolna otopina priprema se istim postupkom kao ispitivana otopina uz dodatak 2 ml standardne otopine olova na kraju pripreme. pH svih otopina se nakon prenošenja u podešava između 3.0 do 4.0. Ispitivanje i usporedba obojenja se provodi na jednak način kao u metodi I.

4.3.1.2. Metode ispitivanja i priprema uzorka prema Ph. Eur.

Metoda A je slična USP metodi I s manjim razlikama u pripremi otopina. Dok se prema USP uzorak (ispitivana tvar) uspoređuje sa „čistim" standardom olova, metoda A u Ph. Eur. uspoređuje uzorak sa standardom olova pomješanim s otopinom ispitivane tvari.

Ispitivana otopina (vodena otopina ispitivane tvari), poredbena otopina (smjesa standardne otopine olova koja sadrži 1 ppm ili 2 ppm olova i vodene otopine ispitivane tvari) i slijepa proba (smjesa vode i vodene otopine ispitivane tvari) se nakon podešavanja pH na 3.5 i dodatka 1,2 mL tioacetamidnog reagensa, te 2 minute stajanja ispituju uspoređivanjem nastalih obojenja. Poredbena otopina mora pokazivati blago smeđe obojenje u usporedbi sa slijepom probom, a ispitivana tvar udovoljava ispitivanju ako smeđe obojenje nije intenzivnije od poredbene otopine.

Ako je teško procjeniti rezultate, otopine se filtriraju kroz membranski filtar veličine pora 3 μm bez predfiltra, nakon čega se uspoređuju mrlje na filtarpapiru (vrijedi za metode A, B, C, D, F).

Metoda B je potpuno drugačija od USP metode II. Jednaka je metodi A osim što se za pripremu svih otopina umjesto vode upotrebljava organsko otapalo koje sadrži minimalan postotak vode (npr. dioksan ili aceton koji sadrže 15% vode).

Ispitivana otopina dobiva se otapanjem ispitivane tvari u organskom otapalu koje sadrži minimalan postotak vode. Poredbena otopina (smjesa standardne otopine olova koja sadrži 1 ppm ili 2 ppm olova i otopine ispitivane tvari u organskom otapalu). Slijepa proba (smjesa otapala upotrebljenog za ispitivanu tvar i otopine ispitivane tvari u organskom otapalu)

Metode C i D djelomično su slične USP metodi II. Obje uključuju karboniziranje i žarenje prije nego se uzorak otopi.

Metoda C

Za dobivanje ispitivane otopine nema jednostavnog otapanja ispitivane tvari nego je potrebno ispitivanu tvar u krutom obliku podvrgnuti raznim koracima pripreme koji uključuju: zagrijavanje (ili uparavanje do suha na vodenoj kupelji), žarenje do sivkastog ili skoro bijelog ostatka pri temperaturi

do najviše 800°C, hlađenje i vlaženje ostatka s razrjeđenom sulfatnom kiselinom, te ponovno uparavanje, žarenje i hlađenje. Nakon toga još slijede dodavanje razrijeđene kloridne kiseline, fenolftaleina i koncentriranog amonijaka do pojave ružičastog obojenja, hlađenje, dodavanje ledene acetatne kiseline do obezbojenja, filtriranje po potrebi i razrjeđivanje s vodom.

Osim poredbene otopine (pripremljene tretiranjem standardne otopine olova (10 ppm Pb) prema postupku za ispitivanu otopinu i miješanjem s ispitivanom otopinom) i slijepe probe (voda i ispitivana otopina) za metodu C priprema se još i kontrolna otopina. Kontrolna otopina se priprema postupkom za ispitivanu otopinu tako da se ispitivanoj tvari doda standardna otopina olova (10 ppm Pb) i na kraju se dobivenoj otopini doda ispitivana otopina.

Postupak podešavanja pH, dodatka tioacetamidnog reagensa i usporedbe obojenja je jednak kao u metodama A i B. Dodatan je zahtjev da se kontrolna otopina mora moći usporediti s poredbenom otopinom.

Metoda D vrlo je slična metodi C uz neke manje razlike. Također sadrži niz koraka kao što su žarenje na 800°C, hlađenje, dodavanje kiseline, fenolftaleina i koncentriranog amonijaka, pojavu ružičastog obojenja, dodavanje kiseline do obezbojenja, filtriranje po potrebi i razrjeđivanje s vodom. Pripreme svih otopina, podešavanje pH i dodavanje reagensa, kao i vizualna usporedba obojenja slijede isti princip kao u metodi C.

Metoda E zahtjeva upotrebu aparature za filtraciju koja se pripremi postavljanjem cilindra štrcaljke bez klipa na nosač na ploči s membranskim filtrom veličine pora 3 μm i predfiltrom iznad njega. U metodi se koriste samo ispitivana otopina (otopina ispitivane tvari u vodi) i poredbena otopina (standardna otopina olova (1 ppm Pb) razrjeđena do istog volumena kao ispitivana otopina). Obje otopine tretiraju se na isti način tj nakon prvog filtriranja u predfiltrat se dodaje pufer pH 3.5 i tioacetamidni reagens, a nakon 10 minuta stajanja ponovno se filtrira uz promjenjeni redosljed filtara (prvo membranski, a zatim predfiltar). Boja mrlje dobivene ispitivanom otopinom nije intenzivnija od boje mrlje poredbene otopine.

Metoda F gotovo je jednaka USP metodi III i sadrži puno koraka za pripremu ispitivane otopine iz ispitivane tvari u čvrstom ili tekućem stanju.

Prema postupku za pripremu ispitivane otopine pripremaju se i poredbena otopina (umjesto ispitivane tvari uptrebljava se standardna otopina olova (10 ppm Pb)), kontrolna otopina (nakon dodatka standardne otopine olova (10 ppm Pb) ispitivanoj tvari) i slijepa proba (bez ispitivane tvari). Otopine se promatraju okomito prema bijeloj podlozi nakon 2 minute stajanja uz jednake zahtjeve za nastala obojenja kao i kod metoda A, B, C i D.

Metoda G koristi proces razgradnje (digestije) koji treba biti prikazan ovisno o vrsti uporabljene mikrovalne peći (npr. mikrovalne pećnice s kontrolom energije, one s kontrolom temperature ili mikrovalne pećnice pod visokim tlakom).

Ispitivana otopina priprema se sukcesivnim dodavanjem sulfatne kiseline, nitratne kiseline i otopine jakog vodikovog peroksida u čašu s ispitivanom tvari uz mješanje, nakon čega se dobivena smjesa prenese u posudu za razgradnju. Kao i u metodi F, ostale otopine pripremaju se jednakim postupkom osim što poredbena otopina umjesto ispitivane tvari sadrži standardnu otopinu olova (10 ppm Pb), kod kontrolne otopine ispitivanoj tvari se dodaje standardna otopina olova (10 ppm Pb), a slijepa proba priprema se bez ispitivane tvari.

Razgradnja otopina vrši se uporabom dva zasebna prikladna programa, a nakon prve razgradnje dodaje otopina jakog vodikovog peroksida. Nakon hlađenja i prenošenja u tikvicu podešava se pH vrijednost i dodaje reagens kao u metodi F, nakon čega se vrši filtriranje kroz membranski filtar veličine pora 3 µm bez predfiltra i uspoređuju se mrlje na filtarpapiru dobivene različitim otopinama.

4.3.1.3. Prednosti i nedostaci važećih farmakopejskih metoda za ispitivanje teških metala

Razvoj analitičke metode je u središtu ispitivanja onečišćenja, budući da se za njihovu detekciju i kvantifikaciju mora koristiti odgovarajuća metoda. Osnovno pitanje koje se postavlja tijekom ispitivanja onečišćenja, a koje se aktualiziralo zadnjih 10-ak godina u analitičkim, toksikološkim i industrijskim krugovima je koja razina ispitivanja je dovoljna da bi se postigla sigurnost da su sva onečišćenja od značaja detektirana. Pokušaj odgovora na to pitanje pokrenuo je promjene u ispitivanju metalnih onečišćenja u lijekovima, a u budućnosti će odrediti i izbor analitičkih uvjeta i tehnika, kao i općeniti pristup tom problemu u farmaceutskoj kontroli kakvoće.

Trenutno važeće farmakopejske metode razvijene su prije uvođenja modernih analitičkih uređaja i temelje se na tehnikama vlažne kemije. Kao što je ranije objašnjeno, nakon pripreme uzorka slijedi reakcija kojom se formiraju sulfidi od elemenata prisutnih u uzorku. Ukupan sadržaj teških metala se nakon vizualne usporedbe rezultirajućih otopina izražava u odnosu na odgovor standarda olova kao granična vrijednost (limit) npr. <20 g g^{-1}.

Možda upravo zbog zastarjelosti, ove farmakopejske metode imaju određene prednosti, npr.:

- ne zahtijevaju skupe laboratorijske instrumente,
- ne zahtijevaju visoku razinu educiranosti osoblja za izvedbu,
- jednostavno se mogu prenijeti iz jednog laboratorija u drugi. [16]

Međutim, brojni su radovi koji navode poteškoće u postizanju pouzdanih i reproducibilnih rezultata farmakopejskim limit testovima na teške metale. Tijekom životnog vijeka ovih metoda bilo je pokušaja modifikacija kako bi se umanjila neka ograničenja i nedostaci, ali nisu postignuta značajna poboljšanja.

Wang i suradnici [14] daju opću i sažetu ocjenu farmakopejskih metoda navodeći da su nespecifične, neosjetljive, vremenski dugotrajne i radno zahtjevne, a rezultiraju slabim ili nikakvim iskorištenjima elemenata. Ne daju informaciju o identitetu ili koncentraciji metalnih iona koji su uzrok rezultata. I brojni drugi autori u svojim se tumačenjima slažu s takvim nedostacima. [1, 9, 13, 20]

Iste nedostatke sistematično navode i N. Lewen i suradnici [16] uz tumačenje niza pretpostavki na kojima se temelje farmakopejski limit testovi za teške metale:

- Relativno velika količina uzorka (oko 1 g) je potrebna za razinu detekcije u ppm ($\mu g\ g^{-1}$) budući da 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. [16, 20]
- Priprema uzorka može biti komplicirana i dugotrajna. S obzirom da neke metode pripreme uključuju korake žarenja i ugljeniziranja, to može dovesti do gubitka hlapljivih elemenata.[16, 14]
- Budući da se rezultat izražava kao limit test u usporedbi sa standardom samo jednog elementa nema kvalitativnih informacija ili informacija o specifičnom elementu/elementima koji su uzrok mogućeg višeg rezultata od očekivanog. To otežava istragu i otkrivanje potencijalnih izvora onečišćenja. [16,14]
- Postoji niz problematičnih točaka oko stvaranja sulfida potencijalno prisutnih elemenata u usporedbi sa standardom olova:
    - Metoda se temelji na pretpostavci će svaki od elemenata prisutnih u uzorku (odnosno svaki od 14 elemenata koje USP metoda može detektirati) reagirati s tioacetamidnim reagensom 100% ili u jednakoj mjeri kao standard olova kako bi se formirali sulfidni spojevi.
    - Slijedeća je pretpostavka da će bilo koji sulfid nastao u uzorku stvoriti talog koji se može usporediti s talogom koji stvara standard olova.
    - Metoda također pretpostavlja da su kinetike reakcija za stvaranje potencijalnih sulfida vrlo slične kinetici reakcije za stvaranje olovnog sulfida u otopini standarda i da na kinetiku reakcija ne utječe značajno matriks uzorka.
    - Vizualna ocjena tj. usporedba obojenja mora se napraviti u relativno kratkom vremenu od stvaranja taloga (2-5 min.) budući da mnogi metalni sulfidi mogu formirati koloide, pa se tako nastoje minimizirati potencijalni efekti Ostwaldovog mehanizma rasta. Ostwaldov mehanizam rasta tj. Ostwaldov mehanizam zrenja (eng. Ostwald ripening) označava otapanje malih kristala ili čestica sola i ponovno taloženje otopljenih tvari na površinama većih kristala ili čestica sola. Do zrenja dolazi jer manje čestice imaju veću površinsku energiju i stoga veću ukupnu Gibbsovu energiju nego veće čestice, što vodi do prividno veće topljivosti manjih čestica. [21]

- Budući da se metoda temelji na vizualnoj usporedbi, ona pretpostavlja da su vizualne karakteristike potencijalno nastalih sulfida dovoljno slične olovnom sulfidu i da na njih nije utjecao matriks uzorka kako bi se mogle smatrati suštinski jednakim.

- Ograničenje metoda predstavlja i njihova utemeljenost na subjektivnoj ocjeni i iskustvu analitičara (tzv. ljudski faktor) potrebnom da bi se rezultat uvijek točno i konzistentno očitavao. Samo fine razlike u načinu rada mogu uzrokovati različitu interpretaciju rezultata jer je potrebno razumijevanje faktora utjecaja kao što su:
  - utjecaj vremena stajanja uzoraka prije očitanja rezultata,
  - minimalne vizualne razlike između različitih standarda olova,
  - mjera u kojoj je uzorak prošao formiranje koloida,
  - utjecaj osvjetljenja u laboratoriju.
- Upitna je detekcija svih elemenata od interesa. Zbog temeljenja na subjektivnoj vizualnoj usporedbi obojenja nastalih reakcijom i različitih boja metalnih sulfida, farmakopejske metode pogodne su za određivanje samo nekih elemenata, uz izraženu nejednaku osjetljivosti na različite elemente. Janošova i suradnici [9] navode da su farmakopejski testovi na teške metale pogodni za metalne ione koji reakcijom daju tamno smeđe ili crno obojene sulfide (Pb, Cu, Hg, Bi, Ag) kako bi usporedba s tamno smeđim obojenjem olovnog sulfida bila moguća. Ioni kao što su Cd, Sb, As ili Zn mogu se detektirati samo u većim koncentracijama, a test uopće nije primjenjiv za detekciju Pt, Pd, Fe ili Ni koji su uobičajeno korišteni katalizatori.

Janošova i suradnici [9] dokazuju utjecaj volumena tioacetamidnog reagensa i pH propisanih u Ph. Eur. na učinkovitost taloženja pojedinih sulfida i utvrđuju optimalne uvjete. Kako bi postigli bolje rezultate, kombinirali su prekoncentracijsku metodu iz farmakopeje tj. taloženje s tioacetamidom (Ph. Eur. metoda A) sa kasnijom filtracijom i određivanjem teških metala instrumentalnom metodom. Budući da sve metode testa na teške metale u Ph. Eur. i USP propisuju podešavanje pH otopina na 3.5 (između 3.0 i 4.0) i volumen tioacetamidnog reagensa 1,2 mL ovo ispitivanje općenito je primjenjivo. Utvrđeni su optimalni uvjeti reakcije taloženja:

- pH 8.5 za Fe, Zn, Hg i Cd

Fe stvara FeS u neutralnom do blago alkalnom mediju. Ph. Eur. koristi poseban test za određivanje Fe. Bijeli talog **ZnS** formira se pri pH 8.5 i nije ga moguće opaziti tijekom izvođenja testa na teške metale jer nije obojen. **Hg** stvara talog pri pH 3.5, ali potpuno taloženje događa se kod pH 8.5. **Cd** stvara žuti talog CdS pri pH 8.5-11.5. Limit test na teške metale nije primjenjiv za određivanje Cd budući da je žuta boja njegovog taloga teško uočljiva u prisutnosti tamno obojanih sulfida ostalih elemenata.

- pH 11.5 za Mn, Co, Cu i Pb;

  Određivanje **Cu** moguće je pri pH 9.5–11.5. Optimalan pH za taloženje **Pb** je 6.5 – 11.5. Pb i Cu djelomično se talože pri pH 3.5 i u alkalnijem mediju. Ioni **Mn, Co, Cu i Pb** formiraju tamno smeđe sulfide koji su pogodni za vizualnu usporedbu pri limit testu za teške metale. Međutim taloženje tih elemenata nije potpuno pri pH 3.5–8.5 izuzev Pb koje se može odrediti pri pH 3.5.

- 1,2 mL dodanog tioacetamida.

  Ispitani su volumeni od 0,6 do 2,4 mL u usporedbi sa 1,2 mL proprisanih u Ph. Eur. Kod malog volumena dodanog tioacetamida (0,6 mL) nisu se istaložili svi metalni ioni, a kod većeg volumena (2,4 mL) višak bi mogao dovesti do otapanja formiranih sulfida.

Ispitivanjem je potvrđeno da se unatoč propisanom pH 3.5 veća točnost, odnosno niži limit detekcije, postiže taloženjem u alkalnom mediju. Modifikacijom pH u testu za teške metale moglo bi se postići taloženje elemenata u skupinama i ubrzati analiza (npr Fe, Zn, Hg i Cd pri pH 8.5, a Mn, Co, Cu i Pb pri pH 11.5). Optimizacijom pH i instrumentalnim određivanjem sadržaja postigla se mogućnost kvantifikacije Zn i Cd za koje farmakopejski test nije primjenjiv jer stvaraju sulfide bijele odnosno žute boje. Određivanje sadržaja elemenata u lijekovima zahtjeva optimalnije uvjete pH za taloženje dok je farmakopejski propisan volumen tioacetamida od 1,2 mL optimalan za reakciju taloženja.

Važna pretpostavka limit testa na teške metale da koraci pripreme uzorka ne uzrokuju gubitak bilo kojeg elementa od interesa i da ne sprečavaju formiranje taloga ili koloida za usporedbu nije

znanstveno utemeljena za hlapljive elemente kao što su primjerice Hg ili Se. S obzirom na njihove poznate toksikološke učinke upravo se tu ističe potreba za razvojem pouzdanije i točnije metode. [16]

USP komisija za harmonizaciju USP, Ph. Eur. i JP metoda za ispitivanje teških metala kroz svoja je istraživanja iznijela zaključke o raznim nedostacima farmakopejskih metoda. Blake [22] donosi zaključke studije predstavljene na farmakopejskom forumu 1995:

Studija predstavljena u ovoj publikaciji provedena je u svrhu usklađivanja ispitivanja teških metala za HPMC između tri navedene farmakopeje. Rezultati su pokazali da oko 50 % metala može biti izgubljeno tijekom procesa žarenja. Gubitak metala vjerojatno je ovisan o matriksu, a budući da su postupci vrlo radno zahtjevni iskorištenja mogu značajno varirati među analitičarima. U izvješću se navodi da živa, koja je jedan od toksičnih teških metala, nije dala odgovor u reakciji u niti jednom setu uzoraka. Zbog gubitka metala tijekom žarenja upitna je valjanost rezultata dobivenih trenutnim USP, JP i Ph. Eur. općim postupcima testa.

Aktivnosti vezane uz istraživanje ograničenja farmakopejskih testova na teške metale, pokušaje njihovih izmjena i harmonizacije i postavljanje novih standarda traju godinama. Različite organizacije, znanstvenici i stručnjaci na brojnim su stručnim skupovima i radionicama raspravljali o toj temi i iznosili zaključke istraživanja i iskustva iz prakse. Samo jedan od brojnih primjera je radionica održana 2008. godine u organizaciji Medicinskog instituta Nacionalne akademije znanosti sjedinjenih američkih država [23] (eng. Institute of Medicine of the National Academy of Sciences of the United States), podržana od strane USP na kojoj su iznijeti sljedeći zaključci o nedostacima USP testa za metalna onečišćenja opisanog u poglavlju <231>: To je subjektivni vizualni test koji se temelji na taloženju metalnih sulfida. Brojne procjene tijekom posljednjih 13 godina pokazale su da ova metoda često ne može otkriti prisutnost metala od velikog interesa, kao što je živa, i ozbiljno podcjenjuje koncentracije drugih metala. Za velik broj tih metala se zna da su toksični (olovo, arsen, kadmij, živa), a potencijalno su prisutni u farmaceutskim sastojcima. Opći konsenzus govornika i stručnjaka odbora za planiranje na radionici je da je sadašnja metodologija za ispitivanje metala nedovoljna i treba biti zamijenjena instrumentalnim metodama veće specifičnosti i osjetljivosti za širok spektar metala od interesa. U isto vrijeme, potrvđeno je da se trenutnim state-of-the-art metodama metali mogu detektirati u razinama znatno ispod one kliničke i toksikološke važnosti. Izazov je dakle spajanje

mogućnosti metoda, procjene rizika i vjerojatnosti prisutnosti metala od interesa na način koji najbolje štiti zdravlje ljudi.

Dodatni problem trenutnog pristupa ispitivanju metalnih onečišćenja u lijekovima predstavlja i različita upotreba i razumjevanje izraza teški metali. Iako USP i Ph. Eur. navode test na teške metale, nije jasno definirano koje elemente metoda treba detektirati. Nema međunarodno dogovorene definicije teških metala što dodatno otežava upotrebu ovih metoda i postavljanje popisa elemenata za rutinsku analizu. [5]

U tehničkom izvještaju za IUPAC Duffus [24] navodi kako izraz teški metali nikada nije definiran od strane niti jednog regulatornog tijela, popisi elemenata na koje se odnosi razlikuju se ili uopće nisu navedeni u zahtjevima raznih regulativa. Osim toga, izraz teški metali često se koristi kao zajedničko ime za metale i polumetale (npr. arsen) koje se povezuje sa zagađivanjem i potencijalnom toksičnosti za ljude ili okoliš. Postoji tendencija pretpostavljanja kako svi takozvani teški metali imaju toksična svojstva, iako to nije utemeljeno kemijskim i toksikološkim podacima. Čak i izraz metal se često nepravilno koristi u toksikološkoj literaturi i legislativi i označava čisti metal i sve kemijske vrste u kojima može postojati čime se netočno može zaključiti kako čisti metal i sve njegove vrste imaju ista fizikalno-kemijska, biološka i toksikološka svojstva. Klasifikacija temeljene na kemijskim svojstvima, odnosno na periodnom sustavu elemenata, omogućila bi da se razumijevanje kemijskih temelja toksičnosti upotrijebi za određivanje najtoksičnijih metalnih ionskih vrsta.

S obzirom na početnu postavku o važnosti određivanja svih potencijalno prisutnih, a posebno toksikološki značajnih metalnih onečišćenja može se zaključiti da trenutno korištene metode ne udovoljavaju tim zahtjevima. Prema tome, postoji velika potreba za razvojem osjetljivih i selektivnih metoda za određivanje metalnih onečišćenja u lijekovima i farmaceutskim sastojcima, ne samo kako bi se udovoljilo strožim specifikacijama u budućnosti, nego i u svrhu osiguranja učinkovitosti i sigurnosti primjene lijekova. [1]

4.4. Regulatorne promjene i međunarodna harmonizacija smjernica za ispitivanje metalnih onečišćenja u lijekovima

U proteklih desetak godina značajno je porastao interes za temu analize metala u lijekovima. Objava Vodiča Europske Agencije za lijekove (EMA) za granice ostataka metalnih katalizatora ili metalnih reagensa [25], novih poglavlja USP <232> *Elementarna onečišćenja: granice* i <233> *Elementarna onečišćenja: postupci* [26, 27] i reprodukcija EMA vodiča u poglavlju Ph. Eur. 5.20 *Ostaci metalnih katalizatora ili metalnih reagensa* [28] primorali su industriju da počne pažljivije pratiti sadržaj metalnih ostataka različitih materijala koji se koriste u farmaceutskoj proizvodnji. U rješavanje problematike zadnje se uključilo tijelo ICH. ICH spaja regulatorna tijela i farmaceutsku industriju Europe, Japana i SAD-a da rasprave znastvene i tehničke apsekte registracije lijekova. Misija ICH je postići veću harmonizaciju kako bi se osiguralo da sigurni, učinkoviti i visoko kvalitetni lijekovi budu razvijeni i registrirani na najučinkovitiji način. [29]

Na zahtjev proizvođača koji traže međunarodnu harmonizaciju, ICH je pristao formirati Stručnu radnu skupinu (EWG) koja će razmotriti elemente i granice elementarnih onečišćenja. EWG je formirana u listopadu 2009. USP promatra dogovore EWG. Kako su dogovori napredovali, USP je napravila manje prilagodbe svih granica opisanih u poglavlju <232> osim za živu. [22]

Prema radnom planu EWG od 14. srpnja 2014. [30] dokument ICH Q3D *Guideline for Elemental Impurities* (hrv. Vodič za elementarna onečišćenja) prvi puta je objavljen u draftu tek krajem 2011. Korak 2 završen je u lipnju 2013., a verzija 2b [31] objavljena je 26. srpnja 2013. Period za komentare u sve tri ICH regije (SAD, EU, Japan) završen je 31.12.2013. EWG je pregledala i složila sve javne komentare, a reviziju tehničkog dijela Q3D je završila u lipnju 2014. tijekom sastanka u Minneapolisu. Potpisivanje faze 4 dokumenta bilo je planirano do kraja rujna 2014. Ovaj rok nije ostvaren, ali njegova kratkoća pokazuje nastojanje za što bržim završetkom harmonizacije. Korak 4 verzija ICH Q3D dokumenta objavljena je 16.12.2014. [32] Dokument je dosegao korak 4 procesa što znači da se konačni nacrt preporučuje za usvajanje regulatornim tijelima Europske unije, Švicarske, Japana, SAD-a i Kanade. Nakon toga slijedi utvrđivanje rokova za implementaciju i smjernica unutar regija, a cijeli proces završava kada smjernice budu implementirane u nacionalne i regionalne postupke.

U listopadu 2014. je odobrena Radna skupina za implementaciju (IWG). Tijekom razvoja Q3D smjernice, iz primjedbi primljenih tijekom perioda javne rasprave, jasno se pokazalo da postoji nedostatak jedinstvenog tumačenja smjernica. Zato je odlučeno da IWG pod pokroviteljstvom ICH treba razviti program obuke i prateću dokumentaciju kako bi se osiguralo ispravno i usklađeno tumačenje novih Q3D smjernica od strane industrije i regulatornih tijela i ujednačena implementacija u ICH i ne - ICH regijama. Završetak materijala za obuku planiran je do kraja ožujka 2015. [33]

Dugotrajni proces harmonizacije i neslužbeni status smjernice ICH Q3D doveo je do odgoda najavljenih datuma implementacije ranije objavljenih dokumenata - EMA vodiča i novih poglavlja u USP i Ph. Eur. Razdoblje nejasnih rokova završetka ICH Q3D izazvalo je zbunjenost u industrijskim i regulatornim krugovima zbog uočljivih razlika draft ICH Q3D dokumenta u odnosu na ostale objavljene dokumenate, od čega su najznačajnije razlike u popisu elemenata i propisanim granicama tj. dozvoljenoj dnevnoj izloženosti (PDE) za elemente. Sa stajališta proizvođača lijekova, nesigurnost i predstojeće promjene uzrokuju određene poteškoće i potrebne su različite usklađene aktivnosti kako bi se postigla racionalizacija troškova i vremena [34].

U srpnju 2013. CHMP je odlučila odgoditi primjenu EMA vodiča na postojeće proizvode na tržištu do završetka ICH Q3D vodiča, indicirajući da će se harmonizirati sa njim kada bude završen. EMA vodič trenutno je važeći za nove proizvode od 1. rujna 2008., a trebao je postati važeći i za proizvode na tržištu od 1. rujna 2013. EMA je u vrijeme objavljivanja ovog vodiča dala odgodu za implementaciju od 5 godina za prilagodbu za proizvode na tržištu, ali se zbog kasnog uključivanja ICH u problematiku odlučila za novu odgodu tog datuma. I komisija Europske farmakopeje je revidirala svoju strategiju u vezi implementacije poglavlja 5.20 koje nije postalo zakonski obvezujuće od 1. travnja 2014. što je bio prvotno određen rok. U travnju 2012. Komisija je odlučila da će reproducirati EMA vodič u poglavlju 5.20 i u kasnijem stupnju uvesti referencu na to poglavlje u općoj monografiji 2034. Međutim, zbog odluke CHMP o odgodi datuma primjene EMA vodiča za proizvode na tržištu i kako bi se osigurala usklađenost pristupa Ph. Eur. s regulatornim tijelima, Komisija je u kolovozu 2013. odlučila odgoditi publikaciju revidirane opće monografije 2034 u *Dodatku 8.1.* čime je zapravo do završetka ICH Q3D odgođena zakonski obvezujuća primjena

poglavlja 5.20. [35] Prema tome, smatra se da su i EMA i Ph. Eur. indirektno najavile da će se harmonizirati sa ICH Q3D smjernicama po njihovom završetku.

U stručnom osvrtu na trenutno stanje zahtjeva za metalna onečišćenja u lijekovima Lewen [34] daje kratak pregled ovih izmjena. Navodi kako je status USP poglavlja <232> i <233> bio upitan i prije objave draft dokumenta ICH Q3D 2b. Najprije su trebala postati službena 01.12.2012., ali je to odgođeno u studenom 2012. Službena su postala u veljači 2013. ali je planirani datum njihove implementacije 01.05.2014. konstantno bio upitan iako je već predstavljao odgodu. Konačno je u svibnju 2013. odlučeno da će se datum implementacije poglavlja <232> i <233> ponovno odgoditi, ali isto tako i uklanjanje poglavlja <231> *Heavy Metals* iz općeg dijela. USP je dodatno odlučila napraviti neke promjene u poglavljima <232> i <233> [36, 37] koje bi trebale biti službene u kolovozu 2015., s datumom implementacije u prosincu 2015. Budući da su ova poglavlja već službena industrija ih može koristiti, međutim regulatorno nije nužno dokazati slaganje s propisanim zahtjevima. Do službene implementacije moguće je koristiti poglavlje <231>.

Zbog odgađanja implementacije USP poglavlja <232> i <233> do završetka ICH Q3D smjernice i nastojanja što većeg usklađivanja, ali ipak i određenih samostalnih stavova USP, postoji mogućnost potencijalnih promjena i u budućnosti. Izmjene i odluke vezane uz ovu tematiku USP ažurno objavljuje na službenim stranicama. [38]

4.4.1. Sličnosti i razlike zahtjeva EMA-e, Ph. Eur., USP i ICH Q3D smjernica

Između objavljenih dokumenata: EMA vodiča [25], poglavlja u Ph. Eur. [28], USP [26, 27, 36, 37] i završnog ICH-Q3D [32] najznačajnije su razlike u popisu elemenata (Slika 2) i propisanim granicama za svaki element (Tablica 2). Budući da je Ph. Eur. reproducirala EMA vodič u poglavlju 5.20 u daljnjem tekstu će se obraditi zahtjevi objavljeni u EMA vodiču [25], koji se ujedno odnose i na Ph. Eur.

Promatrajući popise elemenata i njihove granice u USP i EMA/Ph.Eur koji su nastali prije draft dokumenta ICH Q3D, korak 2b, vidljivo je da je USP napravila odmak uvrstivši četiri glavna (As, Cd,

Pb i Hg) potencijalna nenamjerna onečišćenja. USP nije uključila neke elemente koje navodi EMA jer su granice za te elemente vrlo visoke i nesukladnost s istima najprije bi značila GxP nesukladnost (odstupanje). To su Mn (prema EMA klasificiran kao metal malog utjecaja na sigurnost), te Fe i Zn (prema EMA klasificirani kao metali minimalnog utjecaja na sigurnost).

ICH Q3D popis elemenata 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 3.). Najviše se podudara sa USP i uključuje Co, Se, Tl, Li, Sb i Sn koji su nekada bili dio draft dokumenta USP 232, ali također uključuje i Ag, Au i Ba koji nikada nisu bili dio USP popisa.

EMA/Ph.Eur. i ICH Q3D uključuju kategorije elemenata na temelju njihove toksičnosti dok ih trenutna verzija USP ne navodi.

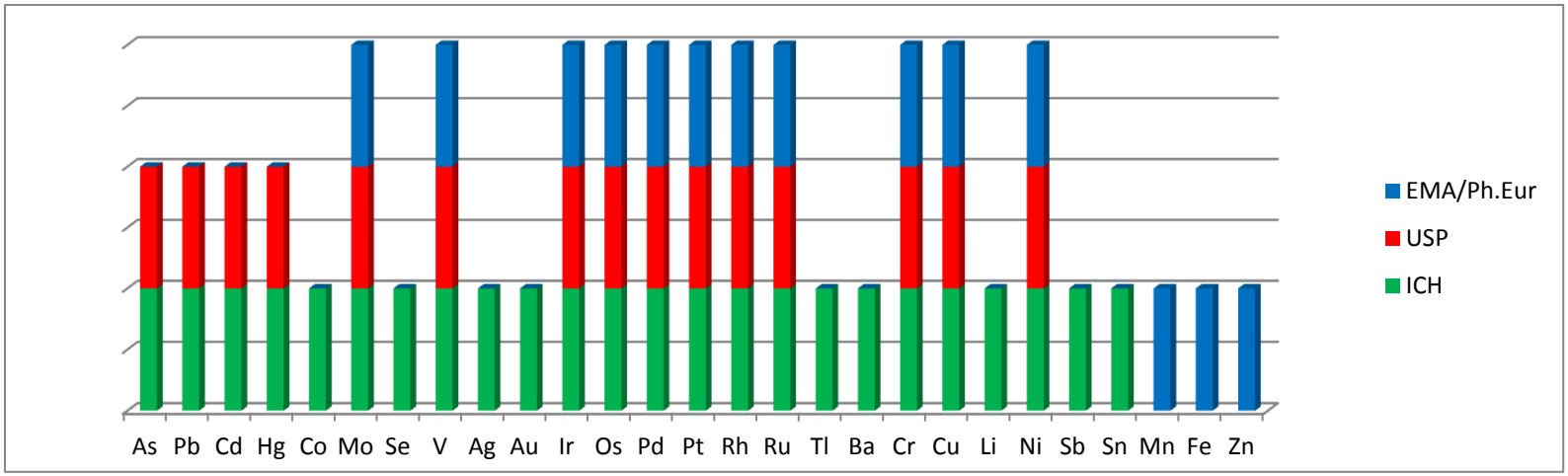
Trenutni popisi elemenata:

EMA: Pd, Pt, Ir, Rh, Ru, Os, Mo, Ni, Cr, V, Cu, Mn, Fe, Zn;

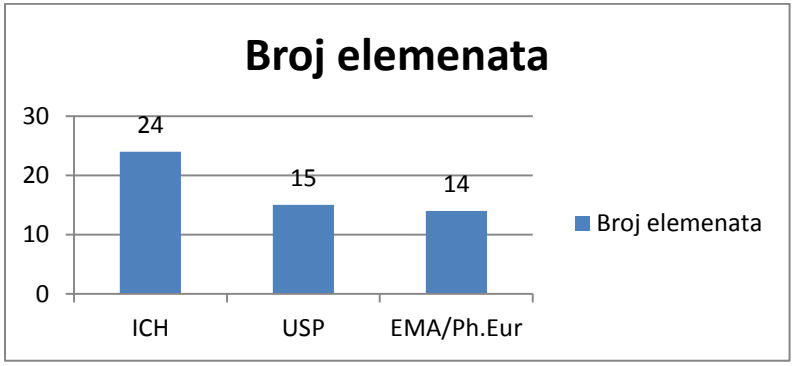
USP: Cd, Pb, As, Hg, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Cr, Mo, Ni, V, Cu;

ICH Q3D: Cd, Pb, As, Hg, Co, Ni, V, Ag, Au, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Se, Tl, Ba, Cr, Cu, Li, Mo, Sb, Sn

Upravo zbog postojanja ovih razlika je jasno da se toksikološki stručnjaci koji rade na uspostavljanju propisa ne mogu potpuno složiti oko elemenata od potencijalnog interesa niti njihovih granica.



Slika 2: Elementi koje treba kontrolirati prema ICH Q3D, USP i EMA/Ph.Eur.



Slika 3: Broj elemenata koje treba kontrolirati prema ICH Q3D, USP i EMA/Ph.Eur.

Tablica 2. Popis relevantnih elemenata i postavljenih granica prema ICH Q3D [31, 32] u usporedbi sa USP [26, 36] i EMA/Ph.Eur. [25]

Element	Oralna primjena (PDE u µg/dan)			Parenteralna primjena (PDE u µg/dan)			Inhalacijska primjena (PDE)			LVP (µg/g)
	ICH	USP	EMA/ Ph.Eur.	ICH	USP	EMA/ Ph.Eur.	ICH (µg/dan)	USP (µg/dan)	EMA/Ph.Eur. (ng/dan)	samo USP
ICH klasa 1 (*4 glavna elementa*)										
As	15	~~1.5~~ (15) [a]	NP	15	~~1.5~~ (15) [a]	NP	~~1.9~~ (2)	~~1.5~~ (1.9) [a]	NP	~~0.15~~ (1.5)
Pb	~~5.0~~ (5)	~~5~~ (5.0)	NP	~~5.0~~ (5)	~~5~~ (5.0)	NP	~~5.0~~ (5)	~~5~~ (5.0)	NP	0.5
Cd	~~5.0~~ (5)	~~25~~ (5.0)	NP	~~6.0~~ (2)	2.5	NP	~~3.4~~ (2)	~~1.5~~ (3.4)	NP	0.25
Hg	~~40~~ (30)	15 [a]	NP	~~4.0~~ (3)	1.5 [a]	NP	~~1.2~~ (1)	~~1.5~~ (1.2) [a]	NP	0.15
ICH klasa 2A										
Co	50	NP	NP	~~5.0~~ (5)	NP	NP	~~2.9~~ (3)	NP	NP	NP
Ni	~~600~~ (200)	~~500~~ (600)	250	~~60~~ (20)	~~50~~ (60)	25	~~6.0~~ (5)	~~1.5~~ (6.0)	100	~~5.0~~ (6.0)
V	~~120~~ (100)	~~100~~ (120)	250	~~12~~ (10)	~~10~~ (12)	25	~~1.2~~ (1)	~~30~~ (1.2)	NP	~~1.0~~ (1.2)
ICH klasa 2B										
Ag	~~170~~ (150)	NP	NP	~~35~~ (10)	NP	NP	~~6.9~~ (7)	NP	NP	NP
Au	~~130~~ (100)	NP	NP	~~130~~ (100)	NP	NP	~~1.3~~ (1)	NP	NP	NP
Ir	~~1000~~(100)*	100	100 **	10 *	10	10 **	~~1.4~~ (1) *	1.5	NP	1.0
Os	~~1000~~(100)*	100	100 **	10 *	10	10 **	~~1.4~~ (1) *	1.5	NP	1.0
Pd	100	100	100	10	10	10	~~1.0~~ (1)	~~1.5~~ (1.0)	NP	1.0
Pt	~~1000~~ (100)	100	100	10	10	10	~~1.4~~ (1)	1.5	70 ***	1.0
Rh	~~1000~~(100)*	100	100 **	10 *	10	10 **	~~1.4~~ (1) *	1.5	NP	1.0
Ru	~~1000~~(100)*	100	100 **	10 *	10	10 **	~~1.4~~ (1) *	1.5	NP	1.0
Tl	~~8.0~~ (8)	NP	NP	~~8.0~~ (8)	NP	NP	~~69~~ (8)	NP	NP	NP
Se	~~170~~ (150)	NP	NP	~~85~~ (80)	NP	NP	~~140~~ (130)	NP	NP	NP
ICH klasa 3										
Ba	~~13000~~(1400)	NP	NP	~~1300~~ (700)	NP	NP	~~340~~ (300)	NP	NP	NP
Cr	11 000	NP [b]	250	1100	NP [b]	25	~~2.9~~ (3)	~~25~~ (2.9)	10 za Cr (VI)	NP [b]
Cu	~~1300~~ (3000)	~~1000~~ (1300)	2 500	~~130~~ (300)	~~100~~ (130)	250	~~13~~ (30)	~~100~~ (13)	NP	~~10~~ (13)
Li	~~780~~ (550)	NP	NP	~~390~~ (250)	NP	NP	25	NP	NP	NP
Mo	~~180~~ (3000)	~~100~~ (180)	250	~~180~~ (1500)	~~10~~ (90)	25	~~7.6~~ (10)	~~10~~ (7.6)	NP	~~1.0~~ (9.0)
Sb	1200	NP	NP	~~600~~ (90)	NP	NP	~~22~~ (20)	NP	NP	22
Sn	~~6400~~ (6000)	NP	NP	~~640~~ (600)	NP	NP	~~64~~ (60)	NP	NP	64

Tablica 2 prikazuje popis 24 elementa koje ICH Q3D navodi kao relevantne i usporedbi sa USP i EMA/Ph.Eur popisom elemenata, te navodi postavljene granice izražene kao PDE u µg/dan (ng/dan za inhalacijsku primjenu kod EMA/Ph.Eur). Vrijednosti u zagradama pokazuju promjene tj. usklađivanja. Kratica LVP kod USP označava parenteralne pripravke velikog volumena tj. kada je dnevna doza lijeka primjenjenog parenteralno veća od 100 ml.

Napomena: PDE se baziraju na tjelesnoj masi odrasle osobe bilo kojeg spola od 50 kg. NP oznaka znači nije primjenjivo. Vrijednosti u zagradama kod USP predstavljaju nove predložene vrijednosti za USP poglavlje 232 [(36)] s predviđenim datumom implementacije 01.12.2015., dok su precrtane vrijednosti ispred zagrade stare vrijednosti uključene u USP poglavlje 232 od 01.02.2013. [(26)] Vrijednosti u zagradama kod ICH predstavljaju nove vrijednosti prema zadnje objavljenom dokumentu korak 4 [(32)], a precrtane vrijednosti ispred zagrade su stare vrijednosti iz draft dokumenta korak 2b [(31)].

* (ICH Q3D): Nema dovoljno podataka da bi se postavile PDE za Ir, Os, Rh i Ru za bilo koji put primjene tako da se PDE za ove elemente postavljene na temelju njihove sličnosti sa Pt.

** (EMA): Granica podgrupe. Ukupna količina metala podgrupe 1B (Ir, Os, Rh, Ru) ne smije prijeći navedenu granicu. Jedino EMA kategorizira Ir, Os, Rh i Ru u podgrupu i ne navodi pojedinačne granice za ova 4 elementa. Ovaj konzervativni pristup je prihvaćen zbog nedovoljnih toksikoloških podataka.

*** (EMA): Pt kao heksakloroplatinska kiselina

a (USP): Granice za As su utemeljene na najtoksičnijem anorganskom obliku, a granice za Hg su utemeljene na anorganskom (2+) oksidacijskom stanju. Budući da je najtoksičniji oblik metil-živa rijetko prisutan u lijekovima, granica je postavljena za najčešći anorganski oblik. USP ove elemente procjenjuje kao najkritičnije u vezi različite toksičnosti njihovih anorganskih i kompleksnih organskih oblika.

b (USP): PDE granice za Cr nisu postavljene za oralnu, parenteranu primjenu i za LVP zbog toga što se ne smatraju važnima za sigurnost pacijenata. USP postavlja samo PDE za inhalacijsku primjenu Cr.

4.4.1.1. Zahtjevi EMA vodiča

Cilj EMA vodiča [25] je preporučiti maksimalno prihvatljive granice koncentracije za **ostatke metalnih katalizatora ili metalnih reagensa** koji mogu biti prisutni u:

- farmaceutskim supstancama (definirane kao API ili ekscipijensi) ili
- u gotovim lijekovima.

Metali na koje se vodič odnosi se normalno koriste kao katalizatori procesa ili reagensi tijekom sinteze farmaceutskih supstanci (u sintezi API-a, sintezi bilo kojeg farm. ekscipijensa ili sintezi bilo kojeg farm. ekscipijensa koji se koristi tijekom proizvodnje lijeka ali nije prisutan u gotovom lijeku).

Metalni ostaci u farmaceutskim supstancijama i lijekovima mogu potjecati iz nekoliko izvora kao što su: metalni katalizatori i metalni reagensi korišteni tijekom sinteze API-a ili ekscipijensa, proizvodna oprema i cijevi, bulk pakiranje, okoliš, otapala za čišćenje itd.

Budući da je upotreba metala kao katalizatora i reagensa ograničena na definirane kemijske reakcije, ograničenje njihovih ostataka u samim farmaceutskim supstancijama je dovoljno i ne trebaju ograničenja u gotovim lijekovima. Kako je porijeklo ostatka nevažno s obzirom na njegove potencijalne toksične efekte, koncentracijske granice načelno su primjenjive i na ostatke metala iz drugih izvora. Međutim, prihvaćanje koncentracijskih granica i validirana metoda u specifikaciji za druge izvore su potrebni samo u vrlo iznimnim slučajevima kada se zna da su nedovoljno ograničeni GMP-om, GDP-om ili drugim relevantnim propisom. Farmaceutske tvrtke se mogu osloniti na informacije od pouzdanih dobavljača.

Vodič se ne odnosi na:

- potencijalne nove ljekovite supstance ili ekscipijense korištene u kliničkim ispitivanjima
- metale koji su namjerne komponente farmaceutskih supstanci (kao što su anioni soli) ili
- metale koji se koriste kao farmaceutski ekscipijensi u lijeku (npr. željezov oksid kao pigment).
- vanjska metalna onečišćenja kojima se više bave GMP, GDP ili drugi relevantni propis.

Vodič primjenjuje različite granice za oralne i parenteralne putove primjene, a specifične granice su također postavljene za inhalacijsku izloženost nekim metalima. Kada je izloženost kratka, PDE se

može prilagoditi. Izraz PDE definira se kao farmaceutski maksimalna dozvoljena izloženost metalu na kroničnoj bazi za koju je malo vjerojatno da će izazvati bilo kakav zdravstveni štetni učinak.

Metalni ostaci klasificirani su u tri kategorije na temelju razine njihovog utjecaja na sigurnost, a koncentracijske granice postavljene na temelju maksimalne dnevne doze, duljine trajanja liječenja i puta primjene lijeka kao i na temelju PDE metalnog ostatka (Tablica 3).

Tablica 3. Klasifikacija s obzirom na potencijalni rizik za ljudsko zdravlje

Metali značajnog utjecaja na sigurnost	Klasa 1A	Pt, Pd
	Klasa 1B	Ir, Rh, Ru, Os
	Klasa 1C	Mo, Ni, Cr, V
Metali niskog utjecaja na sigurnost	Klasa 2	Cu, Mn
Metali minimalnog utjecaja na sigurnost	Klasa 3	Fe, Zn

Klasa 1: metali značajne toksičnosti. To su metali za koje se zna ili se sumnja da su humani karcinogeni ili mogući uzročni agensi drugih značajnih toksičnosti.

Klasa 2: metali nižeg toksičnog potencijala za ljude. Obično se dobro podnose u razinama izloženosti koje se tipično nalaze tijekom primjene ljekovitih proizvoda. Mogu biti metali u tragovima potrebni za nutritivne svrhe ili su često prisutni u hranjivim tvarima ili gotovim dodacima prehrani.

Klasa 3: metali bez značajne toksičnosti. Njihov sigurnosti profil je utvrđen. Općenito se dobro podnose u dozama koje su znatno veće od doza tipičnih kod primjene ljekovitih proizvoda. Prisutni su u okolišu ili u biljnom i životinjskom svijetu.

Kod utvrđivanja koncentracijskih granica kao relevantna vrijednost uzeta je tjelesna masa odrasle osobe od 50 kg. Ova relativno mala tjelesna masa služi kao dodatni sigurnosni faktor u odnosu na često korištene mase od 60 kg ili 70 kg za odrasle osobe. Pretpostavljen je udisajni volumen odrasle osobe: 20 m^3 dnevno (24 h) i radna inhalacijska izloženost: 8 h dnevno (u 24 h).

Specijacija

Specijacijska analiza se ne zahjeva, ali navodi da treba paziti na činjenicu da metalni ostaci mogu biti prisutni u drugačijem obliku nego što je oblik elementa u originalnom katalizatoru ili reagnesu. Ukoliko nema posebnog opravdanja test treba biti specifičan za svaki element.

Analitički postupci

Za određivanje svakog metalnog ostatka treba se koristiti prikladna i validirana analitička metoda. Ukoliko nije drugačije opravdano test treba biti specifičan za svaki element. Ukoliko postoji opravdanje, može se koristiti općenitija analitička metoda koja uključuje jedan ili više metalnih ostataka sa općenitim koncentracijskim limitom ako se može dokazati da neće biti prijeđena granica izloženosti za niti jedan specificirani metal. Treba se koristiti bilo koji harmonizirani postupak opisan u farmakopejama, ako je to moguće. U protivnom, proizvođači mogu izabrati najprikladniji validirani analitički postupak za određenu primjenu. Ako su prisutni samo elementi skupine 2 ili 3 može se koristiti nespecifična metoda. Korištenje polukvantitativnih limit testova na metale opisanih u farmakopejama može biti prikladno, ali samo ako su prilagođeni i odgovarajuće validirani.

4.4.1.2. Zahtjevi USP poglavlja <232> i <233>

USP ne navodi klasičnu klasifikaciju elemenata u kategorije s obzirom na njihovu toksičnost (odnosno utjecaj na sigurnost pacijenata) i vjerojatnost pojavljivanja u lijekovima i sastojcima lijeka ovisno o putu primjene, nego objavljuje jedinstveni popis u kojem ipak izdvaja „4 glavna“ elementa (As, Cd, Pb i Hg) zbog toksičnosti i prirodne zastupljenosti [36,37]. Zbog sveprisutnosti ovi elementi (minimalno) moraju biti razmotreni u kontrolnoj strategiji temeljenoj na procjeni rizika.

Poglavlje USP <232> [36] specificira **granice za elementarna onečišćenja u lijekovima**. Elementarna onečišćenja **uključuju katalizatore i onečišćenja iz okoline** koja mogu biti prisutna u aktivnim ljekovitim supstancama, ekscipijensima i gotovim lijekovima. Ova onečišćenja mogu se pojavljivati prirodno, biti namjerno dodana ili biti nenamjerno uvedena (npr interakcijama sa

procesnom opremom ili sa primarnim pakiranjem). Kada se zna da su elementarna onečišćenja prisutna, da su bila dodana ili potencijalno mogu biti uvedena u lijek, osiguravanje sukladnosti sa propisanim granicama je obavezno. Kontrolna strategija temeljena na procjeni rizika može biti prikladna kada analitičari odrede kako osigurati sukladnost sa ovim standardima.

Propisane granice nisu primjenjive za proizvode namijenjene isključivo za veterinarsku upotrebu i konvencionalna cjepiva, za totalnu parenteralnu prehranu i dijalizate.

Propisane granice ne odnose se na eksipijense i aktivne supstance, osim tamo gdje je specificirano u ovom poglavlju ili individualnim monografijama. Međutim, stupanj elementarnih onečišćenja prisutan u API-ima i ekscipijensima mora biti poznat, dokumentiran i biti dostupan na zahtjev. Proizvođači moraju odrediti prihvatljive granice elementrarnih onečišćenja u materijalima korištenim u proizvodnji njihovih proizvoda, ovisno o konačnoj namjeni materijala.

Poglavlje navodi granice onečišćenja (μg/g) za API-e i ekscipijense lijekova koji se doziraju u maksimalnoj dnevnoj dozi ≤10 g/dan, odgovaraju PDE (μg/dan) propisanim za gotovi lijek podjeljenim sa 10 (jednako opciji 1 u ICH Q3D). Neki sastojci će morati imati drugačije granice ovisno o individualnoj monografiji.

Toksičnost elementarnog onečišćenja povezana je sa njegovom bioraspoloživosti koja je određena za tri puta primjene: oralni, parenteralni i inhalacijski. Granice se baziraju na kroničnoj izloženosti i odnose se na elementarna onečišćenja u gotovom lijeku. PDE za proizvode koji se primjenjuju topikalno na ozljeđenu ili oštećenu kožu, te za proizvode koji se primjenjuju mukozalno iste su kao i PDE za oralnu primjenu, osim ako je drugačije navedeno u individualnim monografijama.

Kao i u EMA vodiču, PDE se temelje na tjelesnoj masi odrasle osobe bilo kojeg spola od 50 kg. Ukoliko je metalno onečišćenje prisutno u formulaciji namjenjenoj pedijatrijskoj upotrebi prikladno bi bilo koristiti prilagodbu za manju tjelesnu masu.

Specijacija

Iako svaki element može biti prisutan u različitim oksidacijskim ili kompleksacijskim stanjima USP kao posebno kritične izdvaja **As i Hg** zbog različite toksičnosti njihovih anorganskih i kompleksnih organskih oblika. Granice za As su utemeljene na najtoksičnijem anorganskom obliku.

As se može mjeriti i kao ukupni arsen pod pretpostavkom da je sav As u uzorku u anorganskom obliku. Ako se u tom slučaju prijeđu postavljene granice moguće je postupkom specijacije tj kvantificiranjem anorganskog oblika utvrditi da li je taj anorganski oblik unutar propisanih granica. Granice za Hg su utemeljene na anorganskom (2^+) oksidacijskom stanju. Budući da je najtoksičniji oblik metil-živa rijetko prisutan u lijekovima, granica je postavljena za najačešći anorganski oblik. Za one proizvode kod kojih se potencijano može pojaviti metil-živa (npr. materijali ribljeg porijekla) granice se trebaju propisati u individualnim monografijama.

Analitičko ispitivanje – poglavlje <233> [37]

Ako praćenjem procesa i kontrolom lanca nabave proizvođači mogu pokazati odsutnost elementarnih nečistoća, tada daljnje ispitivanje ne mora biti nužno potrebno. Kada se ispitivanje provodi da bi se dokazala sukladnost, analitički postupci za određivanje razina onečišćenja opisani su u poglavlju <233> *Elementarna onečišćenja – postupci*. [37] Poglavlje opisuje dva analitička postupka (Postupak 1 i 2), a također i kriterije za prihvatljive alternativne postupke. Validacijskim ispitivanjem analitičari trebaju potvrditi da je opisani analitički postupak pogodan za ispitivanje određenog materijala. Postupak 1 može se koristiti za elementarna onečišćenja koja su općenito pogodna za detekciju pomoću tehnike ICP-AES (ICP-OES), a Postupak 2 za ona pogodna za detekciju pomoću ICP-MS.

Prije upotrebe bi analitičari trebali potvrditi da je postupak prikladan za korišteni instrument i uzorak na način da zadovoljava opisane zahtjeve za validaciju alternativnih postupaka. U protivnom se mogu koristiti alternativni postupci (u skladu sa *General Notices and Requirements 6.30, Alternative and Harmonized Methods and Procedures*) koji moraju zadovoljavati opisane validacijske kriterije. Bilo koji alternativni postupak koji je validiran i zadovoljava kriterije prihvatljivosti smatra se prikladnim za upotrebu. Poglavlje je također svojevrstan vodič za različite mogućnosti pripreme uzorka (izravno mjerenje tekućih uzoraka ili kod alternativnim postupaka koji dozvoljavaju ispitivanje neotopljenih uzoraka, izravno otapanje u vodenim otopinama ili u organskim otapalima, digestija). Izbor je ostavljen analitičarima koji razvijaju metodu, a ovisi o materijalu.

4.4.1.3. Zahtjevi ICH Q3D

Tri su glavna dijela ICH Q3D dokumenta[32]:

- procjena toksikoloških podataka za potencijalna elementarna onečišćenja,
- utvrđivanje PDE za svaki element od toksikološkog značaja i
- primjena pristupa temeljenog na procjeni rizika za kontrolu elementarnih onečišćenja u lijekovima.

ICH Q3D odnosi se na nove gotove lijekove (koji nisu prethodno registrirani) i nove lijekove koji sadrže postojeće djelatne tvari. Ne odnosi se na lijekove korištene tijekom faza kliničkih ispitivanja. Primjena na postojeće lijekove ne očekuje se prije isteka 36 mjeseci od objave ICH vodiča.

Utvrđene PDE smatraju se zaštitom za zdravlje svih populacija pacijenata. Appendix 1 objašnjava metodu za utvrđivanje PDE za svako elementarno onečišćenje, a sažetak sigurnosne procjene za svaki pojedini element je u Appendixu 3. Niže granice elementarnih onečišćenja mogu biti potrebne u slučajevima kada razine ispod granica toksičnosti imaju utjecaj na druga svojstva kakvoće lijeka (npr. element katalizira razgradnju aktivne supstance).

PDE su utvrđene samo za oralnu, parenteralnu i inhalacijsku primjenu. Faktori koji su razmatrani u procjeni sigurnosti za utvrđivanje PDE su bili:

- Oksidacijsko stanje elementa u kojem će se vjerojatno nalaziti u lijeku;
- Ljudska izloženost i sigurnosni podaci kada su davali prikladne informacije;
- Najrelevantnija studija na životinjama;
- Put primjene;
- Relevantne završne točke.

Kada je bilo prikladno, postojeći standardi za dnevni unos nekih elementarnih onečišćenja za hranu, vodu, zrak ili izloženost na radu su korišteni za utvrđivanje PDE za lijekove. Najdulja studija na životinjama je obično smatrana kao relevantna, ali u nekim slučajevima i kraća studija što je objašnjeno u individualnim PDE procjenama. Kod lijekova za inhalaciju studije s topljivim solima su

relevantnije od onih sa česticama. Ovisno o dostupnim podacima, inhalacijske PDE bazirane su ili na lokalnoj toksičnosti (respiratorni sustav) ili na sistemskoj toksičnosti.

Za PDE utvrđene za inhalaciju (oralni ili parenteralni put kada je primjenjivo) doze su normalizirane na 24h/7 dana izloženosti. U nedostatku podataka i/ili gdje su dostupni podaci smatrani nedovoljnima za sigurnosnu procjenu kod parenteralne ili inhalacijske primjene faktori preračuna su korišteni kako bi se dobile PDE iz PDE za oralnu primjenu. Za druge putove primjene opisan je koncept izvođenja PDE, ukoliko je to potrebno.

Za parenteralne lijekove s maksimalnim dnevnim volumenom do 2 litre, maksimalni dnevni unos se može koristiti za izračun dozvoljenih koncentracija iz PDE, a za one čiji dnevni volumen prelazi 2 litre za izračun se može koristiti volumen od 2 litre.

Slično kao EMA vodič i ICH Q3D navodi da razine elementarnih onečišćenja više od utvrđenih PDE mogu biti prihvatljive u nekim slučajevima kao npr:

- isprekidano doziranje,
- kratkoročno doziranje (tj. 30 dana ili kraće),
- specifične indikacije (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.

Specijacija

Specijacija je definirana kao rasprostranjenost elemenata među kemijskim vrstama uključujući izotopski sastav, elektronsko ili oksidacijsko stanje i/ili kompleksnu ili molekularnu strukturu. Kada je poznata toksičnost različitih vrsta istog elementa PDE su utvrđene na temelju informacija o toksičnosti vrste koja se očekuje u lijeku. Od proizvođača se ne zahtjeva specijacija, ali se informacije mogu koristiti za opravdanje nižih ili viših razina onečišćenja u pojedinim slučajevima.

Klasifikacija elemenata

Vodič klasificira elementarna onečišćenja u tri grupe na temelju njihove toksičnosti (PDE) i vjerojatnosti pojavljivanja u lijeku, a u svrhu usmjeravanja procjene rizika na one elemente koji su najtoksičniji, ali ujedno imaju i osnovanu vjerojatnost uključenosti u lijek (Tablica 4).

Grupa 1 (As, Cd, Hg i Pb) – značajno su toksični kod bilo kojeg puta primjene. Obično imaju ograničenu primjenu ili se uopće ne primjenjuju u farmaceutskoj proizvodnji, ali mogu biti prisutni u uobičajeno korištenim materijalima (npr. sirovine prirodne rude). Zahtijevaju razmatranje tijekom procjene rizika za sve potencijalne izvore i sve putove primjene. Rezultat procjene rizika će odrediti sastojke za koje mogu biti potrebne dodatne kontrole, u nekim slučajevima testiranje na elemente skupine 1 kako bi se osigurala sukladnost sa propisanim PDE.

Grupa 2 – toksični 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 podjeljeni.

- Grupa 2A (Co, Ni i V) - zahtijevaju procjenu kroz sve potencijalne izvore i sve putove primjene zbog veće vjerojatnosti pojavljivanja u lijeku.
- Grupa 2 B (Ag, Au, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Se, Tl) – zbog smanjene vjerojatnosti pojavljivanja u lijeku zahtijevaju biti uključeni u procjenu rizika samo ako su namjerno dodani tijekom proizvodnje aktivnih supstanci, ekscipijensa ili drugih sastojaka lijeka.

Grupa 3 (Ba, Cr, Cu, Li, Mo, Sb i Sn) – elementi relativno niske toksičnosti kod oralne primjene (imaju visoke PDE, obično >500 μg/dan), pa ako nisu namjerno dodani ne zahtijevaju razmatranje u procjeni rizika. Zahtijevaju razmatranje u procjeni rizika kod inhalacijske i parenteralne primjene, osim ako je PDE za taj put primjene iznad 500 μg/dan.

Ostali elementi (Al, B, Fe, Zn, K, Ca, Na, Mn, Mg i W) – zbog niske toksičnosti i /ili različitih regionalnih propisa PDE nisu utvrđene u ICH Q3D nego se, u slučaju njihove prisutnosti ili uključenosti u lijek, primjenjuje praksa drugih smjernica i/ili regionalnih propisa.

Tablica 4. Klasifikacija elementarnih onečišćenja prema ICH Q3D i preporuke za uključivanje tijekom procjene rizika

		Uključiti u procjenu rizika?				
		Uvijek	Ako su namjerno dodani (svi putovi primjene)	Ako nisu namjerno dodani		
Grupa	Elementi			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

Procjena rizika i kontrola elementarnih onečišćenja

U razvoju kontrolne strategije za elementarna onečišćenja u lijekovima trebaju se slijediti načela upravljanja rizicima opisana u ICH Q9. Procjena rizika (fokusirana na procjenu razine elementarnih onečišćenja u proizvodu u povezanosti s PDE) treba biti temeljena na znanstvenim znanjima i načelima i treba povezati razmatranja o sigurnosti za pacijenta i razumijevanje proizvoda i proizvodnih procesa. Proces procjene rizika služi proizvođačima da se fokusiraju na one elemente koji zahtjevaju dodatnu kontrolu. Procjena rizika i kontrolni pristup trebaju biti dokumentirani na odgovarajući način, a stupanj uloženog truda i stupanj formalnosti zapisa treba biti proporcionalan stupnju rizika.

Proces procjene rizika se opisuje u tri koraka koji se često provode simultano:

1. **Identifikacija** poznatih i potencijalnih izvora elementarnih onečišćenja koji mogu naći put do gotovog lijeka;
2. **Vrednovanje** prisutnosti pojedinog elementarnog onečišćenja u lijeku određivanjem opaženih ili predviđenih razina elementarnog onečišćenja i usporedbom s utvrđenim PDE;

3. **Sažetak i dokumentiranje procjene rizika** – identificirati da li su kontrole ugrađene u proces dovoljne ili identificirati dodatne kontrole za ograničavanje elementarnih onečišćenja u lijeku.

1. Potencijalni izvori (identifikacija potencijalnih elementarnih onečišćenja i uključivanje u procjenu rizika)

ICH Q3D popisuje sve potencijalne izvore elementarnih onečišćenja, od kojih svaki može doprinijeti elementarnim onečišćenjima u lijeku zasebno ili u kombinaciji s drugim potencijalnim izvorima. Preporučuje se upotreba metode procjene rizika za utvrđivanje utjecaja svakog od njih na određeni lijek kako bi se u konačnici utvrdio ukupni utjecaj tj. rizik elementarnih onečišćenja u lijeku i identificirala onečišćenja koja treba dokazati, mjeriti i kontrolirati u svrhu postizanja kvalitetnog i stabilnog lijeka, sigurnog za pacijenta. Potencijalni izvori su:

- Ostatna elementarna onečišćenja od elemenata **namjerno dodanih u reakcijama ili procesima** koji su korišteni u proizvodnji aktivnih supstancija, ekscipijensa ili drugih sastojaka lijeka (npr. metalni katalizatori).
- Elementarna onečišćenja koja nisu namjerno dodana, a **potencijalno su prisutna u aktivnim supstancijama, vodi ili ekscipijensima** korištenima u proizvodnji lijeka.
- Elementarna onečišćenja koja su potencijalno uvedena u aktivnu supstanciju i/ili lijek preko **proizvodne opreme.**
- Elementarna onečišćenja koja se potencijalno mogu otpustili u aktivnu supstanciju ili lijek iz njegovog **spremnika**.

Rizik onečišćenja od proizvodne opreme može biti reduciran kroz poznavanje procesa, odabir i kvalifikaciju opreme, GMP procese. Općenito se smatra da je utjecaj proizvodne opreme i sustava zanemariv i pod kontrolom odgovarajućih GMP propisa i kontrola. Specifična elementarna onečišćenja trebaju se procijeniti na temelju poznavanja sastava dijelova proizvodne opreme koji dolaze u doticaj sa sastojcima lijeka. Općenito su procesi proizvodnje API-a agresivniji od procesa

proizvodnje gotovog lijeka u smislu potencijala pojavnosti i uklanjanja elementarnih onečišćenja iz opreme.

Rizik onečišćenja od vode može biti reduciran kroz sukladnost sa farmakopejskim zahtjevima za kakvoću vode, ako se u procesima koristi pročišćena voda ili voda za injekcije.

Identificiranje potencijalnih elementarnih onečišćenja koja potječu iz primarnog pakiranja treba se temeljiti na znanstvenom razumijevanju mogućih interakcija između određenog tipa lijeka i njegovog spremnika. Kada se pregledom sastojaka pokaže da spremnik ne sadrži elementarna onečišćenja, daljnja procjena rizika nije potrebna. Procjena utjecaja ovog izvora onečišćenja nije potrebna kod tvrdih dozirnih oblika zbog male vjerojatnosti izlučivanja iz spremnika u tvrde oblike. Vjerojatnost postoji kod tekućih i polutvrdih dozirnih oblika tijekom perioda roka valjanosti, pa se trebaju provesti studije procjene. ICH navodi neke faktore koje treba uključiti u studiju: hidrofilnost/hidrofobnost, ionski sadržaj, pH, temperaturni uvjeti, kontaktna površina, sastav spremnika/sastojaka, završna sterilizacija, proces pakiranja, sterilizacija sastojaka, trajanje čuvanja.

2. Vrednovanje

Kada je završen proces identifikacije moguća su dva ishoda:

- procjena rizika ne identificira potencijalna onečišćenja ili
- identificira jedan ili više potencijalnih elemenata.

U slučaju prisutnosti, svako elementarno onečišćenje može imati jedan ili više izvora. Mnoga će biti isključena iz razmatranja na temelju procjene vjerojatnosti njihovog pojavljivanja i potencijala da prijeđu PDE granice. Podaci za ovu procjenu mogu doći iz različitih izvora kao npr: prethodna znanja, objavljena literatura, podaci prikupljeni iz sličnih procesa, informacije ili podaci dobiveni od dobavljača, analiza sastojaka lijeka ili analiza gotovog lijeka. Tijekom procjene rizika treba uključiti i dodatne faktore koji mogu utjecati na stupanj elementarnih onečišćenja u lijekovima kao npr:

- Učinkovitost njihovog uklanjanja tijekom daljnjeg procesa
- Prirodna zastupljenost elemenata (važno za elemente koji nisu namjerno dodani)
- Prethodno znanje o koncentracijama elementarnih onečišćenja iz specifičnih izvora.

Za proizvođače lijekova je važno da ICH Q3D navodi kako se procjena rizika može olakšati informacijama o potencijalnim elementarnim onečišćenjima dobivenim od dobavljača aktivnih supstancija, ekscipijensa, spremnika ili proizvodne opreme.

3. Sažetak procesa procjene

Sažetak procjene rizika nastaje pregledom relevantnih podataka za proizvod ili sastojak i kombiniranjem sa informacijama i znanjem stečenim kroz rad s različitim proizvodima i procesima kako bi se identificirala značajna elementarna onečišćenja koja su predmet interesa u određenom proizvodu.

Treba razmotriti značaj opaženih ili predviđenih razina elementarnih onečišćenja u odnosu na PDE za pojedini element. Kao mjera značaja opažene razine onečišćenja definirana je kontrolna granica (prag) = razina koja je 30% od utvrđene PDE u gotovom lijeku. Ova kontrolna granica se može koristiti da bi se odredilo da li su potrebne dodatne kontrole. Da bi se primjenila kontrolna granica potrebno je razumjeti izvore varijabilnosti razine elementarnih onečišćenja koji mogu uključivati:

- Varijabilnost analitičke metode
- Varijabilnost razine elementarnog onečišćenja u specifičnim izvorima
- Varijabilnost razine elementarnog onečišćenja u gotovom lijeku.

Postoji mnogo prihvatljivih pristupa za sažetak i dokumentiranje procjene rizika kao npr. tablice ili pisani sažeci razmatranja i zaključaka. Sažetak bi trebao identificirati elementarna onečišćenja, njihove izvore i kontrole te kriterije prihvatljivosti po potrebi.

Kontrola

Kontrola elementarnih onečišćenja je dio ukupne kontrolne strategije za lijek koja osigurava da elementarna onečišćenja ne prijeđu PDE.

Ako je procjenom utvrđeno da se očekuje da će razina ukupnih elementarnih onečišćenja (iz svih izvora u lijeku) stalno biti ispod kontrolne granice (30% PDE) nisu potrebne dodatne kontrole ako je proizvođač prikladno procjenio podatke i dokazao adekvatne kontrole elementarnih onečišćenja. To je način potvrde da su očekivane razine konzistentne i predvidive tj. način osiguranja da su pretpostavke

procjene rizika valjanje. Kada procjena rizika pokaže da razina elementarnih onečišćenja može prijeći kontrolnu granicu moraju se uspostaviti kontrole koje će osigurati da razina ne prijeđe PDE u lijeku. Neki od pristupa koje proizvođač može koristiti su:

- modifikacija koraka u proizvodnom procesu koji rezultiraju smanjenjem elementarnih onečišćenja kroz specifične ili nespecifične korake pročišćavanja,
- implementacija posebno dizajniranih procesnih ili ulaznih kontrola,
- utvrđivanje specifikacijskih granica za ekscipijense ili materijale (npr. intermedijeri sinteze) kako bi se ograničila razina utjecaja iz tih izvora,
- utvrđivanje specifikacijskih granica za aktivnu supstanciju i za lijek,
- odabir odgovarajućeg pakiranja.

Za kontrolu elementarnih onečišćenja može se primijeniti **periodično testiranje** u skladu sa principima ICH Q6A. [39] To je zapravo testiranje proizvoda po reduciranom programu –za puštanje serije lijeka nije potrebno da se test provodi rutinski na svakoj seriji, nego se testira na unaprijed odabranim serijama i/ili u određenim vremenskim razmacima. Takvo testiranje mora biti opravdano i odobreno od regulatornih tijela prije implementacije, a sva odstupanja koja se jave prilikom periodičnog testiranja treba prijaviti nadležnim regulatornim tijelima.

Analitički postupci

Za određivanje elementarnih onečišćenja treba koristiti odgovarajuće prikladne postupke. Ukoliko nije drugačije opravdano, test treba biti specifičan za svako elementarno onečišćenje identificirano za kontrolu tijekom procjene rizika. Trebaju se koristiti farmakopejski postupci ili odgovarajući validirani postupci.

4.4.1.4. Postavljanje koncentracijskih granica za metalna onečišćenja

Pri razvoju metode potrebno je odrediti da li je maksimalna dnevna doza različita od 10g/dan i ako je, kakav to ima utjecaj na granice svakog pojedinog analita od interesa. Maksimalna dnevna doza može imati značajan utjecaj na završno postavljene granice sukladnosti. [34]

4.4.1.4.1. Pretvorba između PDE i koncentracijskih granica prema ICH Q3D

PDE izraženo u μg/dan definirana je kao maksimalni dozvoljeni unos elementarnog onečišćenja u farmaceutskom proizvodu na dan tj. maksimalna dozvoljena količina svakog elementa koja može biti sadržana u maksimalnom dnevnom unosu lijeka [32].

Budući da PDE odražava samo ukupnu izloženost putem lijeka, pretvorba PDE u koncentracije je koristan alat u procjeni elementarnih onečišćenja u lijekovima i njihovim sastojcima. Za pretvorbu postoji nekoliko opcija koje omogućuju da koncentracijske granice elementarnih onečišćenja u lijeku ili njegovim sastojcima u konačnici osiguraju da gotovi lijek bude u skladu sa postavljenim PDE. Za izbor opcije važno je znati ili pretpostaviti koliki je dnevni unos lijeka.

Pri izboru bilo koje opcije mora se uzeti u obzir moguća prisutnost elementarnih onečišćenja iz spremnika i proizvodne opreme. Ako se na temelju procjene rizika utvrdi postojanje utjecaja iz ovih izvora on se mora uvrstiti u konačnu procjenu. Procijenjeni dnevni unos iz ovih izvora treba se oduzeti od PDE prije izračuna maksimalnih dozvoljenih koncentracija u ekscipijensima i API-u.

Opcija 1: Uobičajene dozvoljene koncentracijske granice elemenata u sastojcima lijeka za gotove lijekove s dnevnim unosom od najviše 10 g (10 g ili manje)

Ova opcija pojednostavljenog izračuna, osim dnevnog unosa lijeka ≤10 g, pretpostavlja i da su **elementarna onečišćenja identificirana tijekom procjene rizika (ciljni elementi) prisutna u svim sastojcima lijeka**. Upotrebom jednadžbe 1 i dnevnog unosa od 10 g izračunava se dozvoljena koncentracija svakog ciljnog elementa za svaki sastojak lijeka:

koncentracija (μg/g)= PDE (μg/dan) / maksimalna dnevna doza lijeka (g/dan) (1)

Ako svi sastojci u lijeku zadovoljavaju koncentracijsku granicu iz opcije 1 za sve potencijalno prisutne elemente, onda svi sastojci mogu biti korišteni u bilo kojem udjelu u lijeku.

Primjer 1:

Lijek A (čvrsti oralni oblik) sadrži 9 sastojaka (1 API i 8 ekscipijensa), a maksimalni dnevni unos iznosi 2.5 g (Tablica 5). Opcija 1 dozvoljava da svaki sastojak može biti prisutan u bilo kojem udjelu.

Tablica 5. Maksimalni dnevni unos sastojaka lijeka A

Sastojak	Dnevni unos u g
1	0.200
2	1.100
3	0.450
4	0.350
5	0.265
6	0.035
7	0.060
8	0.025
9	0.015
Gotovi lijek	2.500

Procjenom rizika utvrđena su elementarna onečišćenja od interesa. **Opcija 1 navodi da koncentracija svakog elementarnog onečišćenja u svakom sastojku lijeka može maksimalno biti PDE za element (µg/dan) /10 (g/dan)**. Na temelju poznatih PDE (Tablica 2) dobivamo maksimalno dozvoljene koncentracije (Tablica 6). **Maksimalni dnevni unos** bilo kojeg promatranog elementarnog onečišćenja nije zbroj maksimalno dozvoljenih koncentracija tog onečišćenja u svim sastojcima lijeka (zbroj vrijednosti u koloni), nego **umnožak maksimalno dozvoljene koncentracije elementarnog onečišćenja sa stvarnom maksimalnom dnevnom dozom lijeka.**

Iako je npr. dozvoljena koncentracija Pb za svaki sastojak lijeka 0.5 µg/g, ukoliko znamo da je maksimalni dnevni unos gotovog lijeka 2.5 g onda unos bilo kojeg sastojka ne može biti veći od 2.5 g. Iz toga proizlazi da je maksimalni dnevni unos Pb 0.5 µg/g x 2.5 g = 1.25 µg. Vidimo da maksimalni dnevni unos ne prelazi propisanu granicu PDE za Pb (Tablica 6).

Tablica 6. Dozvoljene koncentracije elementarnih onečišćenja za sastojke lijeka A (dnevni unos 10 g)

Sastojak	Maksimalna dozvoljena koncentracija (μg/g)					
	Pb	As	Cd	Hg	Pd	Ni
1	0.5	1.5	0.5	3	10	20
2	0.5	1.5	0.5	3	10	20
3	0.5	1.5	0.5	3	10	20
4	0.5	1.5	0.5	3	10	20
5	0.5	1.5	0.5	3	10	20
6	0.5	1.5	0.5	3	10	20
7	0.5	1.5	0.5	3	10	20
8	0.5	1.5	0.5	3	10	20
9	0.5	1.5	0.5	3	10	20
Maksimalni dnevni unos onečišćenja (μg)	1.25	3.75	1.25	7.5	25	50
PDE (μg/dan) iz tablice 2	5	15	5	30	100	200

Opcija 2a: Dozvoljene koncentracijske granice elemenata u sastojcima lijeka za gotove lijekove s točno određenim dnevnim unosom

Ova opcija je slična opciji 1 osim što nema pretpostavke da je dnevni unos lijeka 10 g. Koristi se jednadžba iz opcije 1 ali se u nazivnik uvrštava stvarni maksimalni dnevni unos.

Ako svi sastojci u lijeku zadovoljavaju koncentracijsku granicu iz opcije 2a za sve potencijalno prisutne elemente (ciljne elemente), onda svi sastojci mogu biti korišteni u bilo kojem udjelu u lijeku.

Primjer 2a:

Razmatramo dva lijeka (čvrsti oralni oblici). Maksimalni dnevni unos za lijek A iznosi 2.5 g, a za lijek B 12 g (Tablica 7). Oba gotova lijeka sadrže 9 sastojaka (1 aktivna supstanca i 8 ekscipijensa).

Tablica 7. Maksimalni dnevni unos sastojaka za lijekove A i B

Sastojak	Dnevni unos u g (za lijek A)	Dnevni unos u g (za lijek B)
1	0.200	0.960
2	1.100	5.280
3	0.450	2.160
4	0.350	1.680
5	0.265	1.272
6	0.035	0.168
7	0.060	0.288
8	0.025	0.120
9	0.015	0.072
Gotovi lijek	2.500	12.000

Kao i u primjeru 1 utvrđena su elementarna onečišćenja od interesa. **Opcija 2a navodi da je maksimalna koncentracija svakog elementarnog onečišćenja u svakom sastojku lijeka PDE za element (µg/dan) /maksimalna dnevna doza lijeka (g/dan)**. Na temelju poznatih PDE (Tablica 2) dobivamo maksimalno dozvoljene koncentracije (Tablica 8). Kao i kod opcije 1, m**aksimalni dnevni unos onečišćenja** je **umnožak maksimalno dozvoljene koncentracije elementarnog onečišćenja sa stvarnom maksimalnom dnevnom dozom lijeka**.

Iz toga proizlazi da je maksimalni dnevni unos As za lijek A 6 µg/g x 2.5 g = 15 µg, a za lijek B 1.25 µg/g x 12 g = 15 µg. Vidimo da maksimalni dnevni unos As ne prelazi propisanu granicu PDE As (Tablica 8). Što je maksimalna dnevna doza lijeka veća koncentracija elementarnog onečišćenja u sastojku lijeka smije biti manja jer pacijent uzme veću količinu sastojka u kojem se nalazi onečišćenje.

Tablica 8. Dozvoljene koncentracije za sastojke lijeka A i B (točno određen dnevni unos)

Sastojak	Maksimalna dozvoljena koncentracija (µg/g) Lijek A						Maksimalna dozvoljena koncentracija (µg/g) Lijek B					
	Pb	As	Cd	Hg	Pd	Ni	Pb	As	Cd	Hg	Pd	Ni
1	2	6	2	12	40	80	0.42	1.25	0.42	2.5	8.33	16.67
2	2	6	2	12	40	80	0.42	1.25	0.42	2.5	8.33	16.67
3	2	6	2	12	40	80	0.42	1.25	0.42	2.5	8.33	16.67
4	2	6	2	12	40	80	0.42	1.25	0.42	2.5	8.33	16.67
5	2	6	2	12	40	80	0.42	1.25	0.42	2.5	8.33	16.67
6	2	6	2	12	40	80	0.42	1.25	0.42	2.5	8.33	16.67
7	2	6	2	12	40	80	0.42	1.25	0.42	2.5	8.33	16.67
8	2	6	2	12	40	80	0.42	1.25	0.42	2.5	8.33	16.67
9	2	6	2	12	40	80	0.42	1.25	0.42	2.5	8.33	16.67
Maksimalni dnevni unos onečišćenja (µg)	5	15	5	30	100	200	5	15	5	30	100	200
PDE (µg/dan) iz tablice 2	5	15	5	30	100	200	5	15	5	30	100	200

Opcija 2b: Dozvoljene koncentracijske granice elemenata u pojedinim sastojcima lijeka za gotove lijekove s točno određenim dnevnim unosom

Ova opcija zahtjeva dodatne informacije u vezi potencijala određenih elementarnih onečišćenja da budu prisutna u određenim sastojcima lijeka. Dozvoljene koncentracije mogu se postaviti na temelju distribucije elemenata u sastojcima (npr. veće koncentracije u sastojcima u kojima su ciljni elementi

prisutni). Ako je procjenom rizika utvrđeno da određeni element nije potencijalno onečišćenje nekog sastojka lijeka onda ne treba određivati kvantitativni rezultat za taj element u tom sastojku.

Pristup dozvoljava da maksimalna dozvoljena koncentracija nekog elementa u određenom sastojku može biti veća nego u Opciji 1 ili Opciji 2a, ali to mora biti kompenzirano nižom dozvoljenom koncentracijom u drugim sastojcima lijeka. Za svaki element identificiran kao potencijalno prisutan u nekom sastojku lijeka maksimalna očekivana masa elementarnog onečišćenja u gotovom lijeku ne smije prijeći utvrđene PDE, a može se izračunati množenjem mase svakog sastojka u maksimalnom dnevnom unosu sa dozvoljenom koncentracijom utvrđenom (procjenjenom) od strane proizvođača u svakom materijalu, te zbrajanjem umnožaka za sve sastojke lijeka. Da bi se odredile specifične granice onečišćenja za svaki element u svakom sastojku lijeka može se koristiti jednadžba 2:

$$\mathrm{PDE}(\mu g/\mathrm{day}) \geq \sum_{k=1}^{N} C_k \cdot M_k \qquad (2)$$

k= indeks za svaki od N sastojaka u lijeku

C_k= dozvoljena koncentracija elementarnog onečišćenja u sastojku k (µg/g)

M_k= masa sastojka k u maksimalnom dnevnom unosu lijeka (g)

Primjer 2b:

Razmatramo lijek A iz primjera 1 - čvrsti oralni oblik s maksimalnim dnevnim unosom od 2.5 g. Procjenom rizika utvrđena su elementarna onečišćenja od interesa.

Da bi se mogla koristiti opcija 2b mora se koristiti sastav gotovog lijeka i imati dodatno znanje o sadržaju svakog elementarnog onečišćenja u sastojcima promatranog lijeka. Količine sastojaka u maksimalnoj dnevnoj dozi nalaze se u tablici 5. Podaci za procjenu mogu se dobiti iz različitih izvora kao npr: prethodna znanja, objavljena literatura, podaci prikupljeni iz sličnih procesa, informacije ili podaci dobiveni od dobavljača, analiza sastojaka lijeka ili analiza gotovog lijeka. Podaci u Tablici 9 preuzeti su iz ICH Q3D primjera [32]

Tablica 9. Primjer mogućih koncentracija elementarnih onečišćenja (μg/g) u sastojcima lijeka A

Sastojak	Koncentracija (μg/g)					
	Pb	As	Cd	Hg	Pd	Ni
1	< LOQ	0.5	< LOQ	< LOQ	20	50
2	0.1	0.1	0.1	0.1	*	< LOQ
3	0.1	0.1	0.1	0.1	*	< LOQ
4	1	1	1	1	*	5
5	0.1	0.1	0.1	0.1	*	< LOQ
6	0.5	0.5	0.5	0.5	*	0.5
7	0.1	0.1	0.1	0.1	*	< LOQ
8	20	1	1	1	*	< LOQ
9	10	10	10	10	*	50

<LOQ = ispod granice kvantifikacije; *Procjenom rizika identificirano je da Pd ne predstavlja potencijalno elementarno onečišćenje - nije dobiven kvantitativan rezultat.

Na temelju tih vrijednosti (izmjerenih koncentracija tj dobivenih podataka o sadržaju elemenata u pojedinim sastojcima) postavljaju se potencijalne koncentracije svakog elementarnog onečišćenja za svaki sastojak. Primjer tako postavljenog seta koncentracija preuzet iz ICH Q3D je u Tablici 10.

Tablica 10. Primjer potencijalnih koncentracija elementarnih onečišćenja u sastojcima lijeka A

Sastojak	Potencijalna koncentracija (μg/g)					
	Pb	As	Cd	Hg	Pd	Ni
1	< LOQ	5	< LOQ	< LOQ	500	750
2	0.5	5	1	5	*	< LOQ
3	0.5	5	1	5	*	< LOQ
4	5	5	5	35	*	80
5	0.5	5	1	5	*	< LOQ
6	5	10	5	125	*	100
7	2.5	5	1	5	*	< LOQ
8	50	40	10	35	*	< LOQ
9	50	100	50	200	*	1200

<LOQ = ispod granice kvantifikacije; *Procjenom rizika identificirano je da Pd ne predstavlja potencijalno elementarno onečišćenje - nije dobiven kvantitativan rezultat.

Maksimalni dnevni unos elementarnog onečišćenja za lijek dobiva se korištenjem jednadžbe 2 tj. zbrajanjem umnožaka tako postavljenih koncentracija elementarnog onečišćenja (μg/g) i stvarne mase sastojka u maksimalnoj dnevnoj dozi lijeka (g). To znači da se dozvoljene koncentracije elementarnog onečišćenja u sastojcima lijeka moraju postaviti tako da maksimalni dnevni unos tog onečišćenja ne prelazi PDE (Tablica 11).

Tablica 11. Primjer izračuna maksimalnog dnevnog unosa Pb za lijek A korištenjem jednadžbe 2

Sastojak	Pb		
	A Potencijalna konc. (µg/g) (tablica 10)	B Masa sastojka u max. dnevnoj dozi lijeka (g) (tablica 5)	Očekivani dnevni unos elementarnog onečišćenja za sastojak (µg) = A x B
1	*	0.200	*
2	0.5	1.100	0.55
3	0.5	0.450	0.225
4	5	0.350	1.75
5	0.5	0.265	0.133
6	5	0.035	0.175
7	2.5	0.060	0.15
8	50	0.025	1.25
9	50	0.015	0.75
Maksimalni očekivani dnevni unos elementarnog onečišćenja za lijek (µg) = zbroj (A x B) za svaki sastojak	4.98		
PDE (µg/dan) iz tablice 2	5		

Opcija 3: Analiza gotovog lijeka

Koncentracija svakog elementa može biti mjerena u gotovom lijeku. Jednadžba 1 se koristi s maksimalnom dnevnom dozom lijeka da bi se izračunala maksimalno dozvoljena koncentracija elementarnog onečišćenja.

Primjer 3:

Razmatramo lijek A iz primjera 1 (Tablica 5). Maksimalni dnevni unos onečišćenja u ovoj opciji dobiva se umnoškom maksimalno dozvoljene koncentracije i maksimalnog dnevnog unosa lijeka što u konačnici odgovara propisanoj granici PDE (Tablica 12).

Tablica 12. Izračun dozvoljenih koncentracija onečišćenja za gotovi lijek A (dnevna doza 2.5 g)

	Maksimalna dozvoljena koncentracija onečišćenja (µg/g) = PDE (µg/dan) / maksimalni dnevni unos lijeka (g/dan)					
	Pb	As	Cd	Hg	Pd	Ni
Gotovi lijek A	2	6	2	16	40	240
Maksimalni dnevni unos onečišćenja (µg)	5.0	15	5.0	40	100	600
PDE (µg/dan) iz tablice 2	5.0	15	5.0	40	100	600

4.4.1.4.2. Pretvorba između PDE i koncentracijskih granica prema EMA vodiču

Ako je poznato ili se sumnja da proces sinteze farmaceutskih supstancija (API, ekcipijensi) dovodi do prisutnosti metalnih ostataka zbog upotrebe specifičnih metalnih katalizatora ili metalnih reagensa, treba postaviti koncentracijske granice i validirani test za ostatke svakog specifičnog metala. **Dovoljne su granice za metalne ostatke u farmaceutskim supstancijama, ali se ta granica u nekim slučajevima može zamijeniti granicom za metalni ostatak u gotovom proizvodu (Opcija 2b).** EMA vodič razvrstava lijekove u tri skupine [25].

1. Lijekovi primijenjeni oralno, parenteralno ili inhalacijski – dvije opcije postavljanja koncentracijskih granica metalnih ostataka

Opcija 1 (jednaka je opciji 1 u ICH Q3D): Za svaki metal može se koristiti koncentracijska granica u ppm (EMA vodič navodi i granice u ppm), a izračunata je iz propisanih PDE (Tablica 2) uz pretpostavku dnevne doze gotovog lijeka od 10 g na temelju jednadžbe:
koncentracija (ppm)= PDE (μg/dan) / maksimalna dnevna doza lijeka (g/dan)

Ako sve farmaceutske supstancije u lijeku zadovoljavaju koncentracijsku granicu iz opcije 1 za sve potencijalno prisutne metale, onda mogu biti korištene u bilo kojem udjelu u lijeku.

Opcija 2: Koristi se kada dnevna doza lijeka prelazi 10 g na dan

Opcija 2a (jednaka opciji 2a u ICH Q3D)

Da bi se izračunala koncentracija metalnog ostatka dozvoljena u farmaceutskoj supstanciji koristi se propisani PDE (μg/dan) (Tablica 2) zajedno sa stvarnom dnevnom dozom farmaceutske supstancije (sastojka) u lijeku. U jednadžbu iz opcije 1 u nazivnik se uvrsti maksimalna dnevna doza gotovog lijeka jer je to i teoretski maksimum dnevne doze farmaceutske supstancije.

Primjer: Propisani PDE za Cu prema EMA vodiču iznosi 2500 μg/dan. Ako je dnevna doza lijeka 15 g dozvoljena koncentracija Cu je 167 ppm (2500/15), a ako je dnevna doza lijeka 5g onda je dozvoljena koncentracija Cu 500 ppm (2500/5).

Opcija 2b: Alternativno, nije potrebno da svaka farmaceutska supstancija zadovoljava granice iz opcije 1 ili izračunate granice iz opcije 2a.

Može se koristiti propisani PDE (μg/dan) (Tablica 2) sa poznatom maksimalnom dnevnom dozom gotovog lijeka da bi se odredila koncentracija metalnog ostatka koji može potjecati od bilo koje farmaceutske supstance u lijeku. Pristup je prihvatljiv ako se dokaže da su metalni ostaci u svim supstancijama reducirani na minimum i implicira da maksimalna granica metala u određenoj supstanciji može biti veća nego u opciji 1 ili opciji 2a, ali to mora biti kompenzirano nižom maksimalnom granicom u drugim supstancijama.

2. Lijekovi primijenjeni drugim putovima primjene

Ukoliko nema drugog posebnog razloga i opravdanja, granice za parenteralnu primjenu trebaju se primjenjivati za farmaceutske supstancije primjenjene drugim putovima, uključujući inhalacijski. PDE za oralnu primjenu mogu se primijeniti ako apsorpcija nije veća od oralne apsorpcije, npr. kod kutane primjene lijekova. Posebne granice postavljene su za inhalacijsku primjenu za neke elemente (Pt, Cr(VI) i Ni) zbog specifične toksičnosti za ovaj put primjene (Tablica 2).

3. Lijekovi koji se koriste kratkotrajno i kod po život opasnih indikacija

Budući da se PDE i koncentracijske granice u EMA vodiču temelje na kroničnoj upotrebi, veće granice mogu biti prihvatljive u slučajevima kratkotrajne primjene (30 dana ili manje), ali samo ako prve dvije opcije nisu moguće. Prihvatljivost većih granica moguća je i u specifičnim situacijama promatranjem omjera rizika i koristi npr. za spašavanje života. Opravdanja moraju biti bazirana na svakom pojedinom slučaju.

4.4.1.4.3. Pretvorba između PDE i koncentracijskih granica prema USP

USP koristi tri opcije za određivanje sukladnosti sa specificiranim granicama [36].

Opcija 1: Upotrebljava se jednadžba koja je zapravo jednaka jednadžbi 1 u ICH Q3D:

PDE (μg/dan) ≥ izmjerena koncentracija elementa (μg/g) x maksimalna dnevna doza lijeka (g/dan)

Granice propisane u USP poglavlju <232> su dozvoljene dnevne doze, PDE (μg/dan) elementarnih onečišćenja za gotovi lijek koji pacijent uzima na jedan od tri načina primjene. **Rezultati dobiveni analizom tipične dozne jedinice se pomnože sa maksimalnom dnevnom dozom i onda se usporede sa propisanim PDE** (Tablica 2).

Opcija 2: Sumacijska opcija

Koristi se za parenteralne pripravke s maksimalnom namjenjenom dozom većom od 10 mL, ali ne većom od 100 mL. Zbroj količina za svako onečišćenje (μg/g) prisutno u svim sastojcima lijeka ne smije biti veći od propisane PDE za to onečišćenje.

$$PDE \geq [\sum^{M1} (C_M \times W_M)] \times D_D$$

M = svaki sastojak koji se koristio u proizvodnji dozne jedinice

C_M = koncentracija elementa u sastojku (API ili ekscipijens) (μg/g)

W_M = masa sastojka u doznoj jedinici (g/ doznoj jedinici)

D_D = broj jedinica u maksimalnoj dnevnoj dozi (jedinica/dan)

Prije korištenja ove opcije proizvođač mora osigurati da dodatna elementarna onečišćenja ne mogu biti nehotice dodana tijekom proizvodnog procesa ili putem pakirnog materijala tijekom roka valjanosti.

Opcija 3: Opcija pojedinačnih sastojaka

Koristi se samo za LVP kod kojih je dnevna doza lijeka primjenjenog parenteralno veća od 100 mL.

To znači da količine elementarnih onečišćenja prisutnih u svakom sastojku lijeka (LVP) moraju biti manje od propisanih granica PDE za ta elementarna onečišćenja (μg/g). Ako svaki sastojak (API i ekscipijensi) LVP zadovoljava propisane granice PDE, tada se u formulaciji može koristiti u bilo

kojem udjelu. Očekuje se da će proizvođači osigurati da proizvodni proces i spremnici kao mogući izvori ne doprinose značajno ukupnoj količini elementarnih onečišćenja.

4.4.1.5. Sažeti pregled razlika između smjernica ICH Q3D, USP i EMA

USP popis uključuje 15 elemenata od interesa, EMA vodič 14, a ICH Q3D čak 24. EMA/Ph.Eur. i ICH Q3D stavljaju elemente u skupine na temelju njihove toksičnosti, dok USP ne navodi klasifikaciju elemenata ali izdvaja *4 glavna* elementa: As, Cd, Pb i Hg koji uvijek moraju biti uključeni u procjenu rizika. Pregled najvažnijih razlika je u Tablici 13.

PDE su u svim dokumentima utvrđene za tri puta primjene: oralno, parenteralno i inhalacijski. PDE se temelje na tjelesnoj masi odrasle osobe bilo kojeg spola od 50 kg. Ova niža tjelesna masa predstavlja dodatan faktor sigurnosti u odnosu na uobičajeno korištene mase od 60 kg ili 70 kg. Samo USP koristi posebne granice za LVP i posebne dvije opcije izračuna sukladnosti s propisanim granicama za parenteralno primjenjene lijekove u ovisnosti o volumenu dnevne doze.

EMA vodič odnosi se na ostatke metalnih katalizatora ili metalnih reagensa dodanih tijekom sinteze, a ograničenje njihovih ostataka u API-ima i ekscipijensima je dovoljno i ne trebaju ograničenja za te ostatke u gotovim lijekovima. ICH Q3D po uzoru na USP popisuje sve potencijalne izvore elementarnih onečišćenja (namjerno dodana u sintezi ili proizvodnji, prirodno se pojavljuju, nenamjerna zagađenja nastala interakcijama s proizvodnom opremom ili spremnicima). Za razliku od ICH Q3D, PDE u USP načelno se ne odnose na ekscipijense i aktivne supstancije osim tamo gdje je specificirano u poglavlju <232> ili individualnim monografijama, iako stupanj tih onečišćenja mora biti poznat, dokumentiran i biti dostupan na zahtjev.

Dok EMA i ICH Q3D ne specificiraju tehnike/analitičke postupke koje bi trebalo koristiti, USP u poglavlju <233> opisuje dva analitička postupka uz korištenje tehnika ICP-AES i ICP-MS kao i kriterije za prihvatljive alternativne postupke. Uvrštavanje konkretnih tehnika u poglavlje <233> USP je napravila najveći odmak od ostalih smjernica. Može se pretpostaviti da će zato USP poglavlje <233> biti prikladno za korištenje i prilikom usklađivanja sa drugim zahtjevima.

Tablica 13. Sažeti pregled razlika između smjernica ICH Q3D, USP i EMA

Zahtjev	ICH Q3D	USP	EMA
Na koje elementarne nečistoće se odnosi (izvori)	Elementarna onečišćenja koja su namjerno dodana u sintezi: • ostatna elementarna onečišćenja od elemenata namjerno dodanih u reakcijama ili procesima korištenim u pripremi aktivnih supstancija, ekscipijensa (npr. metalni katalizatori) ili kao zagađenja: • potencijalno prisutna u API-ima, vodi ili ekscipijensima korištenima u proizvodnji lijeka • potencijalno uvedeni u API ili lijek interakcijama s proizvodnom opremom • potencijalno mogu biti otpušteni u API ili lijek iz spremnika.	Elementarna onečišćenja uključuju katalizatore i onečišćenja iz okoline koja mogu biti prisutna u aktivnim ljekovitim supstancijama, ekscipijensima i gotovim lijekovima. Ova onečišćenja mogu: • se pojavljivati prirodno, • biti namjerno dodana ili • biti nenamjerno uvedena (npr. interakcijama s procesnom opremom ili sa spremnicima	Ostaci metalnih katalizatora ili metalnih reagensa. Metali na koje se vodič odnosi: • normalno se koriste kao katalizatori procesa ili • reagensi tijekom sinteze farmaceutskih supstancija (metali korišteni u sintezi API-a, sintezi bilo kojeg farmaceutskog ekscipijensa ili sintezi bilo kojeg farmac. ekscipijensa koji se koristi tijekom proizvodnje lijeka ali nije prisutan u gotovom lijeku). Koncentracijske granice također primjenjive na ostatke metala iz drugih izvora, međutim samo u vrlo iznimnim slučajevima (nedovoljno ograničeni pomoću GMP-a, GDP-a ili drugim relevantnim propisom).
Da li se elementarna onečišćenja prate analizom gotovog lijeka ili analizom sastojaka	Prihvatljiva oba načina. PDE u µg/dan u ICH Q3D definirano je kao maksimalna dozvoljena količina elementarnog onečišćenja koja može biti sadržana u maksimalnom dnevnom unosu gotovog lijeka. Pretvorba PDE u koncentracije služi kao alat u procjeni elementarnih onečišćenja u lijekovima i njihovim sastojcima. Koncentracijske granice u opciji izračuna 1, 2a i 2b su postavljene za sastojke lijeka, a opcija 3 služi za	Primarno u gotovim lijekovima, ali su prihvatljiva oba načina. Poglavlje USP 232 specificira granice (PDE) za elementarna onečišćenja u gotovim lijekovima. Granice u ovom poglavlju se ne odnose na eksipijense i aktivne supstancije, osim tamo gdje je specificirano u ovom poglavlju ili individualnim monografijama. Stupanj elementarnih onečišćenja prisutan u aktivnim supstancijama i ekscipijensima mora biti	Primarno u sastojcima lijekova, ali su prihvatljiva oba načina. Termin PDE u vodiču koristi se kao i u ICH Q3C smjernici i definira se kao farmaceutski maksimalna dozvoljena izloženost metalu na kroničnoj bazi za koju je malo vjerojatno da će izazvati bilo kakav zdravstveni štetni učinak. Ograničenje metalnih ostataka (koncentracijska granica) u sastojcima lijekova je dovoljno i ne trebaju ograničenja u gotovim lijekovima, ali se

Zahtjev	ICH Q3D	USP	EMA
	mjerenje koncentracija elemenata u gotovom lijeku.	poznat, dokumentiran i biti dostupan na zahtjev.	koncentracijska granica u nekim slučajevima može zamijeniti granicom za metalni ostatak u gotovom proizvodu (Opcija 2b).
Klasifikacija elemenata prema toksičnosti tj stupnju rizika za pacijente	Tri grupe: 1, 2A, 2B, 3	Nema klasične klasifikacije. Izdvojena 4 glavna elementa: Pb, Hg, As i Cd.	Tri grupe: 1A, 1B, 1C, 2 i 3. Jedino EMA kategorizira Ir, Os, Rh i Ru u podgrupu 1B i ne navodi pojedinačne granice.
Broj relevantnih elemenata	24	15	14
Putovi primjene za koje su postavljene granice za nečistoće	PDE su utvrđene za tri puta primjene: • oralno, • parenteralno (neovisno o volumenu doze) • inhalacijski. ICHQ3D navodi da se opisani koncept može upotrijebiti za određivanje odgovarajućih PDE za druge putove primjene.	PDE za tri puta primjene: • oralno, • parenteralno (ovisno o volumenu doze tj posebne granice za LVP) • inhalacijski. Granice se baziraju na kroničnoj izloženosti. PDE za proizvode koji se primjenjuju topikalno, te za proizvode koji se primjenjuju mukozalno iste su kao i PDE za oralnu primjenu osim ako je drugačije navedeno u individualnim monografijama. PDE granice za Cr su postavljene samo za inhalacijsku primjenu (oralna, parenterana primjena i LVP se ne smatraju važnima iz stajališta sigurnosti za pacijenta).	EMA primjenjuje različite granice za 3 puta primjene: • oralno • parenteralno (neovisno o volumenu doze) • za inhalacijsku izloženost nekim metalima (Pt, Ni i Cr(VI)). Ukoliko nema posebnog razloga i opravdanja granice za parenteralnu primjenu trebaju se primjenjivati za farmaceutske supstancije primijenjene drugim putovima, uključujući inhalacijski. PDE za oralnu primjenu mogu se primijeniti ako apsorpcija drugim putovima primjene vjerojatno neće biti veća od oralne apsorpcije npr. kod kutane primjene lijekova.

Zahtjev	ICH Q3D	USP	EMA
Da li se predlaže upotreba procjene rizika	DA Postoje preporuke za uključivanje elemenata u procjenu rizika ovisno o grupi, da li su namjerno dodani ili ne i ovisno o putu primjene (tablica 4). U razvoju kontrolne strategije za elementarna onečišćenja u lijekovima trebaju se slijediti načela upravljanja rizicima. Procjena rizika proizvoda bi trebala biti fokusirana na procjenu razine elementarnih onečišćenja u proizvodu u povezanosti sa PDE.	DA Ako praćenjem procesa i kontrolom lanca nabave proizvođači mogu pokazati odsutnost elementarnih nečistoća, tada daljnje ispitivanje ne mora biti nužno potrebno. Zbog sveprisutnosti As, Cd, Pb i Hg ovi elementi (minimalno) moraju biti razmotreni u kontrolnoj strategiji temeljenoj na procjeni rizika.	DA
Da li se predlaže upotreba informacija dobivenih od dobavljača ili drugih izvora	DA Informacije za procjenu rizika između ostalih uključuju: podatke prikupljene od samog proizvođača lijeka, informacije od proizvođača djelatne tvari, ekscipijensa ili podatke dostupne u objavljenoj literaturi.	DA Ako praćenjem procesa i kontrolom lanca nabave proizvođači mogu pokazati odsutnost elementarnih nečistoća, tada daljnje ispitivanje ne mora biti nužno potrebno.	DA Farmaceutske kompanije ne trebaju raditi opsežne testove za pronalaženje metalnih ostataka iz nepoznatih izvora kako bi bile u skladu sa ovim vodičem. Mogu se osloniti na opće informacije od pouzdanih dobavljača.
Opcije izračuna koncentracijskih granica za elemente tj ispitivanje sukladnosti sa propisima	**Opcija 1**: Za gotove lijekove s dnevnim unosom najviše 10 g. Upotrebom jednadžbe (konc. elementa= PDE / 10) izračunava se dozvoljena koncentracija svakog ciljanog elementa za svaki sastojak lijeka. **Opcija 2a**: Za gotove lijekove s točno određenim dnevnim unosom. Koristi se jednadžba iz opcije 1 ali se u nazivnik uvrštava stvarni maksimalni dnevni unos. **Opcija 2b**: Za gotove lijekove s točno	**Opcija 1**: Uglavnom se koristi, a formula je jednaka formuli u opciji 2a ICH Q3D. PDE (µg/dan) ≥ izmjerena vrijednost elementa (µg/g) x maksimalna dnevna doza lijeka (g/dan) Rezultati dobiveni analizom tipične dozne jedinice se pomnože sa maksimalnom dnevnom dozom i usporede sa PDE. **2. Sumacijska opcija** - Za parenteralne pripravke sa maksimalnom namijenjenom dozom većom od 10 ml	**Opcija 1**: Za svaki metal može se koristiti koncentracijska granica u ppm (propisana u tablici koju EMA navodi) a izračunate su uz pretpostavku dnevne doze gotovog lijeka od 10 g. Ova opcija jednaka je opciji 1 u ICH Q3D. **Opcija 2a**: Da bi se izračunala koncentracija metalnog ostatka dozvoljena u farmaceutskoj supstanci koristi se PDE (µg/dan) zajedno sa stvarnom dnevnom dozom sastojka u lijeku. Predloženi izračun jednak izračunu u opciji

Zahtjev	ICH Q3D	USP	EMA
	određenim dnevnim unosom Dozvoljava da maksimalna dozvoljena koncentracija nekog elementa u određenom sastojku može biti veća nego u Opciji 1 ili Opciji 2a, ali to mora biti kompenzirano nižom dozvoljenom koncentracijom u drugim sastojcima lijeka. Zbroj umnožaka stvarnih količina sastojaka u maksimalnoj dnevnoj dozi lijeka i maksimalno dozvoljenih koncentracija elementarnog onečišćenja za sastojak koje se postavljaju procjenom ne smije u gotovom lijeku biti veći od PDE postavljenih u ICH. **Opcija 3**: Mjerenje koncentracije elementa u gotovom proizvodu (lijeku).	ali ne većom od 100 ml. Zbroj količina za svako onečišćenje (µg/g) prisutno u svim sastojcima lijeka ne smije biti veći od propisane PDE. **3. Opcija pojedinačnih sastojaka** Koristi se samo za LVP kod kojih je dnevna doza lijeka primijenjenog parenteralno veća od 100 mL. Količine elementarnih onečišćenja prisutnih u svakom sastojku lijeka LVP moraju biti manje od propisanih granice za ta elementarna onečišćenja iskazanih u tablici (µg/g).	2a ICH Q3D. **Opcija 2b**: Alternativno, nije potrebno da svaka farmaceutska supstancija zadovoljava granice iz Opcije 1 ili izračunate granice iz Opcije 2a Može se koristiti PDE (µg/dan) iz tablice sa poznatom maksimalnom dnevnom dozom gotovog lijeka da bi se odredila koncentracija metalnog ostatka koji može potjecati od bilo koje farmaceutske supstancije u lijeku.
Specijacija elemenata	PDE u ICH Q3D utvrđene su korištenjem toksikoloških podataka o oblicima tj. stanjima koji se očekuju u lijekovima. Od proizvođača se ne zahtjeva specijacija, ali takve informacije mogu koristiti npr. za opravdanje nižih ili viših razina onečišćenja u pojedinim slučajevima.	Specijacija može biti potrebna ako se prijeđu postavljene granice za As i Hg. USP procjenjuje **As i Hg** kao najkritičnije u vezi različite toksičnosti njihovih anorganskih i kompleksnih organskih oblika. PDE granice za As su utemeljene na najtoksičnijem anorganskom obliku. Može se koristiti i metoda za ukupni As, a ako se prijeđe granica radi se specijacija (kvantifikacija različitih oblika). Granice za Hg su utemeljene na anorganskom (2+) oksidacijskom stanju – najčešći anorganski oblik. Za proizvode kod kojih se potencijalno može pojaviti najtoksičniji oblik metil-	Ne zahtijeva se nužno od proizvođača. EMA navodi da treba paziti na činjenicu da metalni ostaci mogu biti prisutni u drugačijem obliku nego što je oblik elementa u originalnom katalizatoru ili reagensu. Ukoliko nema posebnog opravdanja test treba biti specifičan za svaki element. Također se navodi da postoje brojni problematični aspekti kod davanja preporuka za granice sigurnosti za metalne ostatke u lijekovima a kao jedna od poteškoća navodi se specijacija i oblik.

Zahtjev	ICH Q3D	USP	EMA
		živa (npr. materijali ribljeg porijekla) granice se trebaju propisati u individualnim monografijama.	
Predloženi analitički postupci za kontrolu	Ne specificiraju se tehnike/analitički postupci koje bi trebalo koristiti.	Analitički postupci za određivanje razina onečišćenja opisani su u poglavlju <233> *Elementarna onečišćenja – postupci*. Poglavlje 233 opisuje 2 analitička postupka: 1. postupak za elemente pogodne za detekciju pomoću ICP-AES ili ICP-OES 2. postupak za elemente pogodne za detekciju pomoću ICP-MS. Analitičari trebaju verificirati da je postupak prikladan za korišteni instrument i uzorak. Poglavlje također opisuje i kriterije za prihvatljive alternativne postupke (zahtjevi za validaciju alternativnih postupaka).	Ne specificiraju se tehnike/analitički postupci koje bi trebalo koristiti.

4.5. ICP-MS u ispitivanju metalnih onečišćenja u lijekovima

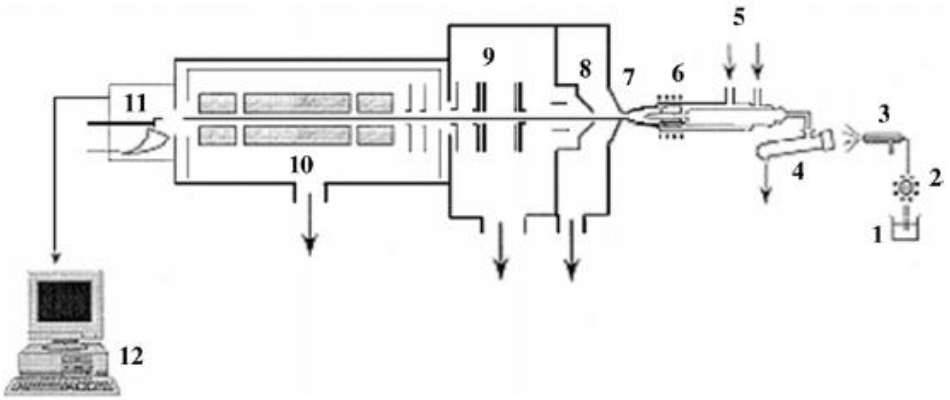
Iz ranije navedenih razloga, kao što su utjecaj metalnih onečišćenja na sigurnost primjene lijekova (neželjeni farmakološko-toksikološki efekti) ili na njihovu stabilnost i učinkovitost (uzroci inkopatibilnosti i razgradnje), te s obzirom na rastuću količinu toksikoloških podataka o raznim elementima i najavljene promjene u regulatornim zahtjevima, zadnjih desetak godina intenzivirala se potreba za razvojem visoko-osjetljivih i selektivnih tehnika i analitičkih metoda za određivanje metalnih onečišćenja u lijekovima i farmaceutskim sirovinama. Krajnji cilj nije samo usklađivanje sa strožim specifikacijama nego i osiguranje sigurne i učinkovite primjene lijekova. [1]

Prikladne 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. Poželjno je da korištena tehnika bude jednostavna za rutinski rad prosječno educiranog analitičara, a razmatra se uvijek i financijski aspekt nabave i održavanja uređaja. [5, 13] Sudeći po uključivanju ICP-AES i ICP-MS u USP poglavlje <233>, a unatoč tome što ICH Q3D ne specificira tehnike koje treba koristiti, čini se da će u bliskoj budućnosti upravo ove tehnike zamijeniti metode temeljene na taloženju u rutinskoj analizi metalnih onečišćenja u farmaceutskim sirovinama i gotovim lijekovima.

4.5.1. Načela rada ICP-MS

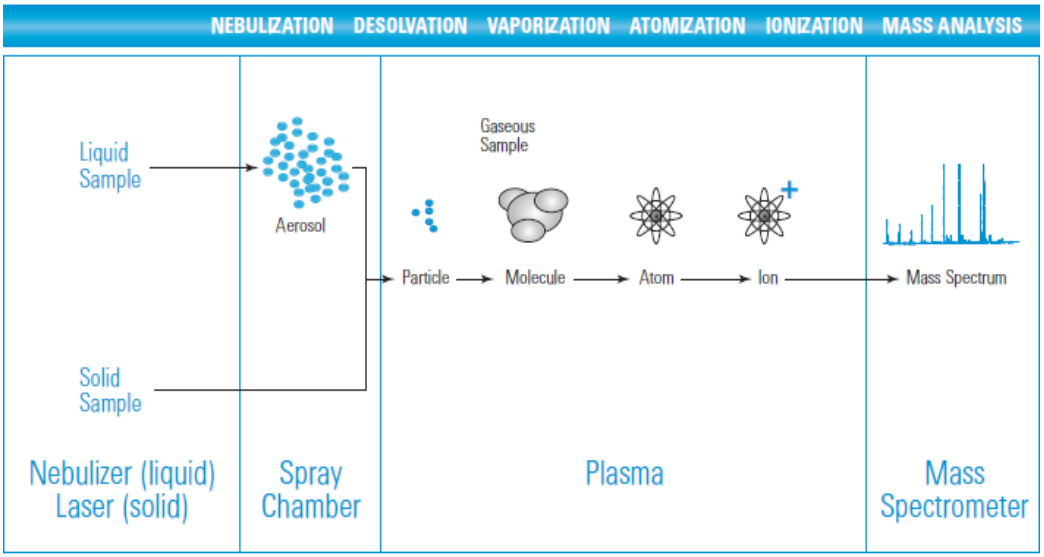
Masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) je od svoje komercijalizacije 1983. godine najbrže razvijajuća tehnika za elemente u tragovima. Mogućnost vrlo niskih granica detekcije, brze multielementarne analize i sposobnost mjerenja izotopa čine ICP-MS vrlo atraktivnom tehnikom u usporedbi s drugim tehnikama za određivanje metalnih onečišćenja kao što su primjerice FAA i ICP-OES koje se tradicionalno koriste za detekciju u većim koncentracijama. S druge strane, zbog još uvijek manje komercijaliziranosti u odnosu na druge tehnike (što je djelomično posljedica više cijene), postoji percepcija ICP-MS kao komplicirane tehnike namijenjene istraživačkim, a ne rutinskim analizama. Iako su danas dostupni ICP-MS uređaji različitog dizajna osnovni dijelovi

uređaja općenito su raspršivač, komora za sprejanje, plazma baklja, „konusi“ sučelja (međusklopa), vakuum komora, ionske leće, maseni analizator i detektor (Slika 4). [40]



Slika 4. Shematski dijagram ICP-MS instrumenta [1]. 1) tekući uzorak, 2) pumpa, 3) raspršivač, 4) komora za sprejanje, 5) ulazi za plin argon u baklju, 6) baklja, 7) prvi konus (eng. sampler cone), 8) drugi konus (eng. skimmer cone), 9) ionske leće, 10) kvadrupolni maseni analizator, 11) detektor multiplikator elektrona, 12) obrada podataka. Ovisno o modelu mogu postojati manje razlike u dijelovima uređaja.

ICP-MS je tehnika u kojoj se induktivno spregnuta plazma (ICP) koristi kao ionizacijski izvor, a detekcija nastalih iona se vrši masenom spektrometrijom (MS). Uglavnom korišteni plin za plazmu je argon uz temperaturu plazme od 6000 do 10 000 K što je pogodno za simultano pobuđivanje (ekscitaciju) i ionizaciju većine elemenata periodnog sustava, zbog čega je moguća multielementarna analiza. [20] Kvarcna baklja sastoji se od tri koncentrične cijevi u koje se uvode različiti protoci argona. Uzorak koji je obično u tekućem obliku uvodi se najčešće pomoću peristaltičke pumpe u raspršivač gdje se formira aerosol uzorka koji prolazi kroz komoru za sprejanje i onda kroz centralnu cijev baklje. Pod visokom temperaturom plazme uzorak prolazi faze desolvacije, isparavanja, atomizacije i ionizacije (Slika 5). 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/naboj (*m/z*). Ioni se mjere upotrebom multiplikatora elektrona i sabiru pomoću brojača za svaki maseni broj. (1, 5, 20, 40)



Slika 5. Shematski prikaz procesa u ICP-MS od uvođenja uzorka do analize masa [41]

Rad ICP-MS instrumenta u osnovi se temelji na nekoliko dijelova [41]:

• uvođenje uzorka

• stvaranje iona u ICP

• plazma/vakuum sučelje (međusklop)

• usmjeravanje iona

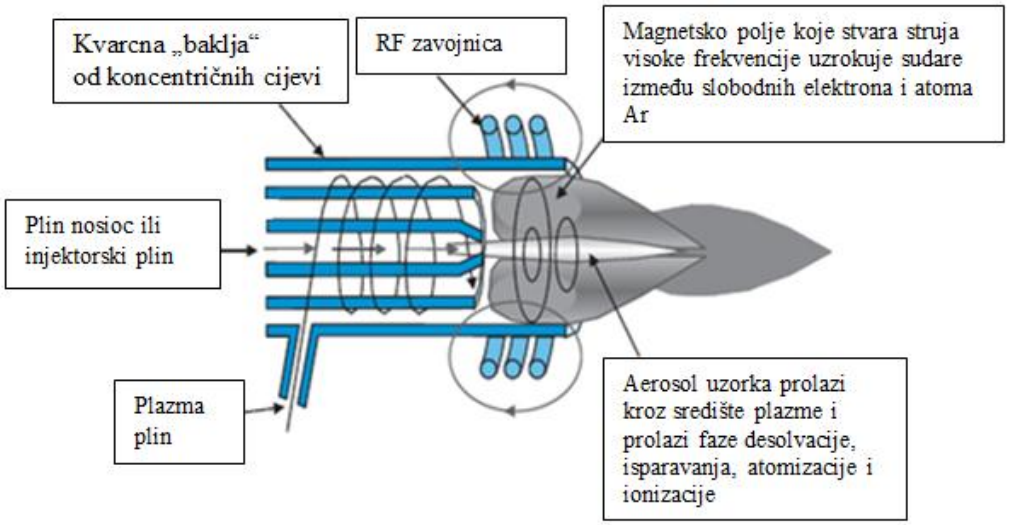
• razdvajanje iona i mjerenje (maseni analizator, detektor)

Uvođenje uzorka

Uzorak se obično uvodi u induktivno spregnutu plazmu (ICP) u obliku aerosola koji nastaje propuštanjem uzorka kroz jednostavni pneumatski raspršivač. Veće kapljice aerosola se uklanjaju iz struje plina pomoću komore za sprejanje, a preostale manje kapljice (predstavljaju 1-2 % uzorka) se uvlače u središnji kanal argon plazme. Glavna svrha je pretvaranje tekućeg uzorka u aerosol i učinkoviti prijenos manjih kapljica u središte plazme, a odbacivanje većih kapljica koje se ne bi u potpunosti razgradile u plazmi.

Stvaranje iona u ICP

Uzorak aerosola prolazi u plazmu koja se stvara u struji argona (Ar) u kvarcnoj cijevi ili baklji. Plin argon se uvodi kroz niz koncentričnih kvarcnih cijevi koje formiraju ICP. Baklja je smještena u središtu ohlađene bakrene zavojnice, kroz koju prolazi električna struja velike snage, visoke frekvencije. Intenzivno magnetsko polje koje stvara struja uzrokuje sudare između slobodnih elektrona i atoma Ar, stvarajući ione i još elektrona sve dok se ne formira stabilna plazma visoke temperature. Struju visoke frekvencije proizvodi RF generator snage do 1600 W. Pod visokom temperaturom plazme uzorak prolazi faze desolvacije, isparavanja, atomizacije i ionizacije (aerosol uzorka se trenutačno razgrađuje u plazmi i nastaju atomi analita koji se simultano ioniziraju uklanjanjem jednog elektrona iz svakog atoma). Plazma baklje u ICP-MS instrumentima najčešće se temelje na Fassel dizajnu (Slika 6) , a razlikuju se u unutarnjem promjeru središnje (injektorske) plinske cijevi.



Slika 6. ICP-MS baklja prema Fassel dizajnu

Svrha plazme je da formira pozitivno nabijene ione iz uzorka aerosola, a osnovni koraci su:

- Kapljice uzorka ulaze u plazmu i suše se.
- Plazma razgrađuje osušene čestice uzorka kako bi se stvorili atomi (atomizacija).
- Formiranje iona iz atoma uzorka postiže se uklanjanjem jednog elektrona. Kod različitih elemenata različita je jednostavnost i učinkovitost ovog koraka što se najčešće navodi kao ionizacijska učinkovitosti za svaki element.

U fazi atomizacije proces je optimiziran i za ICP-OES. Kod tehnike ICP-OES emitirana svjetlost se mjeri od pobuđenih atoma koji emitiraju različite frekvencije svjetlosti karakteristične za energetski prijelaz određenog analita. Na visokim temperaturama svi elementi će emitirati zračenje jer su ekscitirani i onda vraćeni u početno stanje. Intenzitet svjetlosti proporcionalan je koncentraciji analita. ICP-MS mjerenje zahtijeva dodatni korak. Atomi moraju biti ionizirani budući da maseni analizator može razdvajati samo ione tako da je ICP ionski izvor što zahtijeva više energije. Upravo stvaranje i detekcija velikih količina iona daje ICP-MS karakteristiku niskih granica detekcije.

Sučelje (međusklop)

Pozitivno nabijeni ioni koji su proizvedeni u plazmi se izdvajaju u vakuum sustav preko para takozvanih konusa koji su u osnovi metalne ploče sa središnjim otvorima kroz koje ioni prolaze. Koriste se mali otvori, obično promjera 1 mm ili manje, kako bi se u području masenog spektrometra (MS) održavao visoki vakuum. **Uloga ICP-MS sučelja (konusi i prostor između njih) je izdvojiti reprezentativni uzorak iona plazme i učinkovito ih prenijeti u više vakuum regije** u kojima se nalaze sustavi usmjeravanja iona, MS i detektor. Od atmosferskog tlaka do visokog vakuuma potrebno je više vakuum komora (obično tri) na progresivno nižim tlakovima.

Usmjeravanje iona

U završnoj fazi (faza analizatora) niski tlak omogućuje učinkoviti prijenos iona kroz maseni analizator u detektor. **Kako bi se spriječio gubitak iona iz snopa, elektrostatske ploče poznate kao ionske leće se koriste da učinkovito usmjere i prenesu nabijene vrste u maseni spektrometar**. One zadržavaju ione usmjerene u kompaktnoj ionskoj zraci dok prolaze kroz vakuum sustav u završnu komoru, gdje su smješteni maseni spektrometar (MS) i detektor. Obično se koriste jedna ili više cilindričnih leća na koje se može primijeniti napon. Kada pozitivni ioni koje generira plazma prolaze kroz elektrostatsko polje u sustavu leća, oni su privučeni negativnim, a odbijaju ih pozitivna polja tako da mogu biti usmjereni u traženoj putanji. Ionske leće obavljaju i drugu važnu funkciju, odvajanje iona analita od fotona i preostalog neutralnog materijala koji ne smije doći do detektora. Elektrostatsko polje u lećama skreće ione dok na čestice koje su bez naboja polje ne utječe. U slučaju sustava

temeljenog na sudar/reakcija ćelijama (CRC) koje služe za uklanjanje spektralnih interferencija, CRC ćelija se također nalazi u srednjem dijelu.

Maseni spektrometar

Ioni prolaze iz sustava ionskih leća (sa ili bez CRC) u završnu fazu tj. vakuum fazu analizatora, gdje se **razdvajaju na temelju svojih omjera mase i naboja (*m/z*)**. U ICP-MS instrumentima koriste se tri različite vrste masenih analizatora: kvadrupolni, magnetski sektor i „time-of- flight" skraćeno TOF (hrv. vrijeme leta). Zbog jednostavnosti korištenja, raspona masa, brzine skeniranja i relativno niske cijene najčešće se koristi kvadrupolni maseni analizator koji za razdvajanje iona koristi kombinaciju električnih polja istosmjerne i izmjenične struje iona. Budući da plazma gotovo isključivo proizvodi jednostruko nabijene ione, omjer *m/z* je jednak masi iona što čini maseni spektar vrlo jednostavnim za tumačenje. Omjer električnih polja istosmjerne i izmjenične struje je fiksan, ali naponi se mogu mijenjati. Za određeni postavljeni napon samo jedan omjer *m/z* je stabilan i kvadrupolni analizator brzo skenira u rasponu masa (2-260 amu).

Detekcija iona

Detektor koji se koristi u gotovo svim modernim ICP-MS instrumentima je takozvani multiplikator elektrona, što znači da može generirati mjerljiv signalni puls od utjecaja jednog iona (svaki elektron koji udara svaku slijedeću dinodu pod visokim negativnim nabojem oslobađa nekoliko elektrona iz te površine i tako dalje kroz mnoge faze detektora). On je u velikoj mjeri odgovoran za karakteristiku vrlo visoke osjetljivosti po kojima je tehnika dobro poznata. **Multiplikator elektrona detektira svaki ion koji izlazi iz analizatora. Detektor računa i pohranjuje ukupni signal za svaku masu (*m/z*) stvarajući maseni spektar** koji omogućuje jednostavan i precizan kvalitativni prikaz uzorka. Veličina svakog pika je izravno proporcionalna koncentraciji elementa u uzorku. Kvantitativni rezultati se dobivaju usporedbom intenziteta signala s onima koje daju kalibracijski standardi.

4.5.2. Priprema uzorka za ICP-MS analizu

Lijekovi i njihovi sastojci mogu biti u različitim oblicima: vodene ili organske otopine, suspenzije, tablete, gelovi, puderi i slično. Zbog velikog broja potencijalnih analita i velike raznolikosti vrsta uzoraka nije realno predložiti općeniti način pripreme uzorka primjenjiv na sve. Puno je važnije pronaći tehniku pripreme koja će funkcionirati za određeni uzorak i analit od interesa u potrebnim razinama. Priprema uzorka za pojedine materijale može biti pokrivena posebnim monografijama. Načini pripreme uzorka uključuju:

- izravnu analizu (bez pripreme krutih uzoraka),
- izravno otapanje (vodene otopine, organske otopine),
- postupke digestije koji se koriste kada uzorak nije izravno topljiv u vodenim ili organskim otapalima.

Općenito se može reći da, osim ako analitička metoda uključuje izravnu analizu krutih uzoraka, farmaceutski uzorci moraju biti u otopini kako bi se analizirali. Uzorci i slijepe probe mogu biti dopunjeni s ciljnim elementima, odnosno elementima koji na temelju provedene procjene rizika imaju potencijal da se nalaze u uzorku. [5,42]

Najjednostavniji postupak pripreme uzorka je izravno otapanje. Važno je paziti na kvalitetu otapala kako se preko njega ne bi uvela potencijalna onečišćenja. Zato se preporuča mjerenje električne vodljivosti korištene deionizirane vode, a pazi se i kod izbora organskih otapala iako općenito nisu dostupna sa certificiranim niskim koncentracijama metala i polumeatala. Kod postupka pripreme uzorka digestijom, gdje se obično koriste kiseline, važno je da korištena kiselina ne kontaminira uzorak metalima/polumetalima. Na tržištu su dostupne kiseline ultravisoke kvalitete koje sadrže ppt i sub-ppt koncentracije različitih elemenata. Često se koriste nitratna kiselina (HNO_3), kloridna kiselina (HCl), sulfatna kiselina (H_2SO_4) i fluoridna kiselina (HF). Izbor digestijske metode i kiseline ovisi o prirodi matriksa uzorka i o ispitivanim analitima. Za hlapljive elemente nije pogodna metoda otvorene digestije, dok je kod nekih za potpunu digestiju nužna povišena temperatura i tlak. [5]

Zahtjevi za pripremu uzorka za analizu pomoću ICP-MS su općenito jednostavniji nego za analizu drugim tehnikama za analizu elemenata u tragovima (Tablica 14). U većini slučajeva nije potrebno blisko podudaranje matriksa kalibracijskih standrada i uzorka, a široki linearni dinamički raspon ICP-MS znači da je potrebno manje kalibracijskih točaka i da nisu potrebna višestruka razrjeđenja jednog uzorka. Najvažnije je osigurati da TDS razina (razina ukupno otopljenih tvari) bude prikladna za ICP-MS. Općenito prihvaćena gornja granica iznosi 2000 ppm TDS, iako to može varirati ovisno o vrsti matriksa. Pojavom ICP-MS sa sudar/reakcijskim ćelijama i učinkovitim uklanjanjem poliatomskih interferencija analitičari su dobili više slobode u izboru otapala i kiseline za digestiju.

Prilikom pripreme uzorka kod analize ICP-MS tehnikom treba općenito razmotriti slijedeće:

- ICP-MS mjerenje je onoliko dobro kolika je kvaliteta korištenih reagensa. Dodatna osjetljivost u odnosu na druge tehnike za analizu metala znači da reagensi koji se koriste za npr. za ICP-OES analize ne moraju biti prihvatljivi za ICP-MS, ovisno o potrebnim granicama izvještavanja.
- Filtriranje ili centrifugiranje se mogu koristiti za uzorke koji sadrže čestice koje mogu začepiti cijev za uvođenje uzorka i raspršivač. Međutim, budući da analiti mogu biti sadržani ili adsorbirani na frakciju čestica treba znati da filtrirani ili centrifugirani uzorci neće sadržavati rezultate za ukupne metale nego samo za topljive. Prilikom filtracije može doći do gubitka analita adsorpcijom na filter ili može doći do onečišćenja.
- Mokra kemijska razgradnja (digestija):

  Digestija u otvorenim posudama zahtjeva djelovanje kiseline ili smjese kiselina na uzorak u zagrijanom otvorenom spremniku. To je najčešće korištena metoda digestije. Treba paziti da se izbjegne kontaminacija iz čestica u zraku i unakrsne kontaminacije uzoraka prskanjem. Postoji potencijal za gubitak hlapljivih analita, osobito ako je dopušteno da se uzorak osuši.

  Digestija u zatvorenim posudama ima prednosti u odnosu na otvorenu jer se povećava tlak i temperatura u otopini za digestiju i time povećava učinkovitost digestije, a osigurava se i da se hlapljivi elementi ne izgube u atmosferu. Često se koristi digestija u mikrovalnim pećnicama - bolja iskorištenja hlapljivih elemenata, manje mogućnosti kontaminacije uzroka, minimalni volumeni reagensa, lakše ponovljivi postupci i bolji radni uvjeti. [41]

Tablica 14: Primjeri postupaka pripreme uzoraka za analizu metalnih onečišćenja u lijekovima/djelatnim tvarima korištenjem ICP-MS tehnike

Primjena	Analiti	Način pripreme uzorka	Referenca
ICP-MS probir na teške metale u lijekovima (API i intermedijeri u fazi razvoja)	14 elemenata: As, Sb, Sn, Cd, Pt, Pd, Pb, Hg, Ru, Mo, Se,Bi, In, Ag	Izravno otapanje u 25% otopini 2-butoksietanol/voda (25/75 v/v)	16
Multielementarna ICP-MS metoda za teške metale u farmaceutskim djelatnim tvarima i intermedijerima	69 elemenata: B, Na, Mg, Al, Si, P, K, Ca, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Rb, Sr, Y, Zn, Nb, Mo, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, In, Sn, Sb, Te, Cs, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi, Th, U	Izravno otapanje u otopini 1% ili 80% nitratna kiselina/voda	14
Određivanje koncentracija metalnih katalizatora u tri lijeka: enalapril maleat (Pd), kalcijev folinat (Pt), levodopa (Rh), i ispitivanje koncentracija drugih metalnih onečišćenja kako bi se odredile potencijalne interferencije.	Pd, Pt, Rh (dodatno: Be, V, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Cd, Sn, Tl, Pb)	Otapanje u razrjeđenoj otopini kiseline: kalcijev folinat i levodopa - otapanje u 0.2M HNO_3; enalapril maleat - otapanje u 1:1 HNO_3 i razrjeđivanje do 0.3 M. Postignuta je dobra osjetljivost uz niske razine detekcije ng/g kod niske koncentracije uzorka (0.1%).	39
Određivanje teških metala u četiri različita lijeka: diciklomin HCl, etambutol, pirazinamid, furazolidon	Ti, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Hg, Pb	Otapanje i digestija: Uzorci otopljeni u koncentriranoj HNO_3, otopina stajala preko noći i onda grijana na 60-80°C uz dodavanje H_2O_2 do uništenja organske tvari, ohlađena na sobnu temperaturu i razrjeđena sa destiliranom vodom.	13
Određivanje Pd u fosinopril natriju	Pd	Izravno otapanje u 25% (v/v) otopini 2-butoksietanol/voda	43
Određivanje W u dva API-a i dva intermedijera	W	Izravno otapanje u 80% nitratnoj kiselini – smjesa koncentrirane HNO_3 i deionizirane vode 80:20 (v/v)	44

Primjena	Analiti	Način pripreme uzorka	Referenca
Ispitivanje različitih uzoraka heroina na 73 elementa	73 elementa: Li, Be, B, Na, Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Br, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, In, Sn, Sb, Te, I, Cs, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Hf, Ta, W, Fe, Os, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi, Th, U	Izravno otapanje u 3% nitratnoj kiselini	45
Određivanje Al u LVP koji se koriste za potpunu parenteralnu prehranu i u injekcijskim vrećicama	Al	Metoda dodatka standarda u 1% HNO_3 za LVP; mikrovalna digestija sa HNO_3 za injekcijske vrećice	46
Analiza onečišćenja u metamfetaminu	Na, Pd, Ba, I, Br, Mg, Al, Si, Cl, Ca, Sc, Ti, V, Cr, Zn, Sr, Pb, Cu, Ag, Sn	Izravno otapanje u vodi (0.1% otopina)	47
Određivanje elemenata u tragovima u metamfetamin HCl	Na, Br, Pd, Ba, I	Izravno otapanje u vodi (0.1% - 1% otopina)	48
Određivanje sub-ppm koncentracija Fe i Pd u djelatnoj tvari metotreksat	Fe	Mikrovalna digestija, H_2SO_4 + HNO_3	49

4.5.3. Prednosti i nedostaci ICP-MS tehnike

Mogućnost brze i učinkovite multielementarne analize čini ICP-MS i ICP-OES tehnike znatno naprednijim analitičkim izborom za analizu metalnih onečišćenja u odnosu na trenutno korištene metode temeljene na taloženju. Obje tehnike nude odlične performanse, jednostavnu pripremu uzoraka i značajno kraće vrijeme analize čak i u usporedbi sa drugim instrumentalnim metodama. [50]

U rasponu instrumentalnih tehnika, posebno atomske spektrometrije, koje se koriste u analitičkim laboratorijima ICP-MS ima jedinstvenu poziciju zbog svoje brzine, osjetljivosti, dinamičkog raspona i elementarne pokrivenosti. [41] ICP-MS ima slične karakteristike, ali nadilazi performanse ICP-OES (također poznata kao ICP-AES) u smislu osjetjivosti jer su granice detekcije u ppt razinama (ng/kg) dok su za ICP-OES razine ppb do ppm (g/L do mg/L).

Relativna jednostavnost masenih spektara u usporedbi s optičkim emisijskim spektrima olakšava interpretaciju rezultata i smanjuje rizik međuelementarnih interferencija. Cijeli maseni spektar periodnog sustava elemenata sadrži samo oko 220 masa od interesa u usporedbi s desecima tisuća emisijskih linija optičkog emisijskog spektra. Svaki element u masenom spektru predstavlja jedan ili više izotopa. Spektrane interferencije se ipak mogu pojaviti, a uobičajene su:

- Izobarične interferencije – pojavljuju se kada izotopi različitih elemenata imaju iste omjere masa/naboj (*m/z*).
- Interferencije dvostrukih naboja – mogu se pojaviti kod dvovalentnih iona, a obično se pojavljuju kod elemenata niskog ionizacijskog potencijala kao što su alkalijski metali i elementi rjetkih zemalja. Primjerice $^{138}Ba^{++}$ ima masu 138, ali budući da je dvostruko nabijen omjer *m/z* iznosi 69. Može interferirati sa $^{69}Ga^{+}$ jednakog omjera *m/z*.
- Spektralne interferencije koje nastaju kada se u plazmi formiraju poliatomske nabijene čestice kao npr BaO^{+}.

Mnoge interferencije su dobro poznate i dokumentirane kako bi se mogle napraviti potrebne korekcije. Zbog poznatih masenih spektara pojedine tvrtke razvijaju računalne programe s tablicama za procjenu koje elemente sadrže nepoznati uzorci čak i bez dostupnih standarda ili ako instrument nikada nije bio kalibriran za neke elemente. [42]

Sve te mogućnosti tehnike pomažu pojasniti raširenu prihvaćenost ICP-MS u svim vrstama industrije i potvrđuju status ICP-MS kao primarne tehnike za mjerenje tragova metala. Budući da zahtjevi za sve osjetljivijim mjerenjima uz veću produktivnost neprestano rastu, ICP-MS ima prostora za razvoj i preuzimanje udjela u industriji na račun drugih tehnika. [41]

Tvrtke koje rade na razvoju i komercijalizaciji ICP-MS tehnike naglašavaju njezine prednosti kao npr: selektivnost, visoka osjetljivost, niske granice detekcije, brzina analize, mogućnost specijacijske analize. [41] U velikom broju suvremenih studija spominju se prednosti metoda razvijenih upotrebom ICP-MS u usporedbi s limit testom za teške metale, ali i s tehnikom atomske spektrometrije.

U poželjne karakteristike ICP-MS, odnosno prednosti tehnike ubrajaju se:

- Pokrivanje širokog raspona elemenata (selektivnost)

  Gotovo svi elementi se mogu mjeriti ICP-MS-om: alkalijski i zemnoalkalijski metali, prijelazni metali i metali, polumetali, elementi rjetkih zemalja (skandij, itrij i lantanoidi), većina halogena i neki od nemetala. [41] Budući da ICP-MS pruža analitičaru široki raspon selektivnosti elemenata, pri razvoju određene metode moguće je uključiti što više moguće elemenata. [14]

- Vrlo niske granice detekcije

  Kombinacija visoke osjetljivost i niskih pozadinskih signala omogućuje vrlo niske granice detekcije (DL) koje se kreću od **ppb i sub-ppb do sub-ppt** razina, u većini slučajeva ppt (ng/kg odnosno ng/l), a također omogućuje kvantifikaciju u ppm razinama. [16, 40, 41] U većini slučajeva te su granice 100 do 1000 puta niže od onih koje se rutinski postižu upotrebom ICP-AES, a moguće ih je postići za gotovo sve elemente periodnog sustava elemenata. [1, 14, 16] Granice detekcije općenito ovise o analiziranom elementu, matriksu uzorka, pripremi i instumentalnim uvjetima korištenim u analizi. [1]

- Široko analitičko radno područje

- Minimalna količina uzorka

  Velika osjetljivost omogućuje korištenje manje koncentriranih otopina uzoraka čime se eliminira potreba za velikom količinom uzorka i minimiziraju potencijalni učinci matriksa uzorka na rezultat. Prilikom razvoja metoda koje su namjenjene za upotrebu na uzorcima koji

sadrže različite organske molekule uključujući soli, slobodne kiseline i baze, vrlo je poželjno što je moguće više minimizirati utjecaj matriksa razrjeđivanjem uzorka. [16]

- Brzina analize - s velikom brzinom skeniranja analizatorom, mjerenje cijelog skupa elemenata traje samo oko 4 minute po uzorku. ICP-MS služi za izvođenje brze i automatizirane multielementarne analize. [16, 20, 41]
- Izvrstan kromatografski detektor
- Jednostavnost masenih spektara elemenata

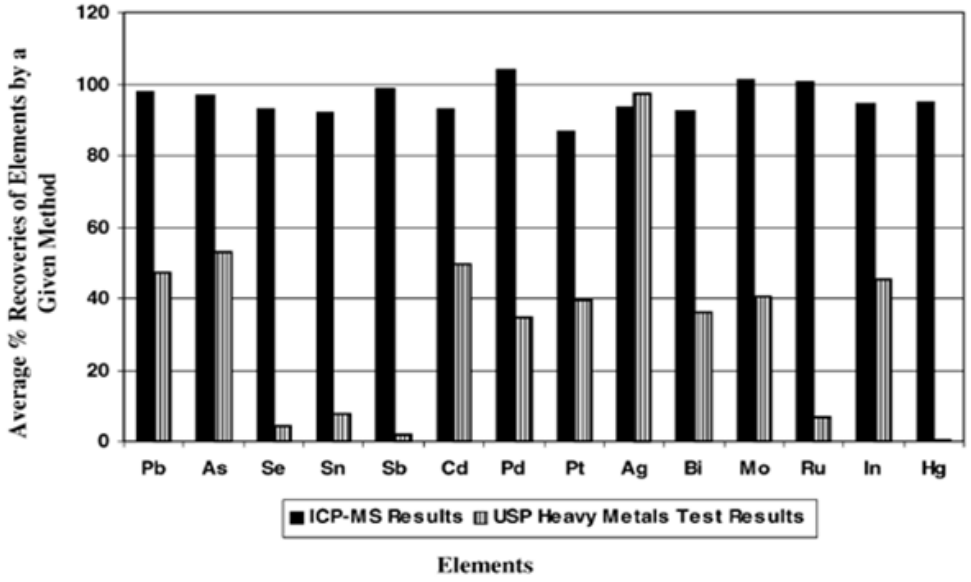
  Dok ICP-AES ima nedostatak kompleksnih spektralnih inetrferencija i točnosti kod koncentracija u ultratragovima, ICP-MS je zbog jednostavnosti masenih spektara brzi alat za automatsku kvalitativnu, polukvantitativnu ili kvantitativnu elementarnu analizu u različitim uzorcima. [1, 14, 51] Spektrogrami su jednostavni jer pikovi nastaju od jednostruko nabijenih iona bez obzira koliko složen bio matriks. U ICP-MS spojevi se atomiziraju i ioniziraju bez obzira na kemijsku strukturu u kojoj je inkorporiran element od interesa. [20]
- Minimalne interferencije,

  Interferencije obično nastaju zbog formiranja višestruko nabijenih iona, oksida ili poliatomskih izobaričnih interferencija formiranih u plazmi. [5] Kod ICP-MS dobro su poznate mogućnosti za kontrolu i smanjenje njihovog utjecaja. [16, 20]
- Informacije o izotopima

  Jedno od najbrže rastućih područja ICP-MS je kombinacija separacijskih tehnika (npr. HPLC, CE, IC) s ICP-MS kao detektorom da bi se odredio kemijski oblik elemenata u uzorku. [41, 42] Budući da na unos, akumulaciju, transport i interakcije različitih elemenata značajno utječe specifični elementarni oblik, potpuna karakterizacija elemenata je nužna prilikom procjene njihove koristi ili rizika za zdravlje ljudi. Primjerice, poznato je kako As, Hg, Cd i Se imaju različita toksikološka svojstva ovisno da li se nalaze u organskom ili anorganskom obliku ili pak ovisno o oksidacijskom stanju anorganskih oblika, pa su specijacijske analize ovih elemenata predmet različitih studija koje koriste ICP-MS detekciju u kombinaciji sa nekom separacijskom tehnikom, često HPLC. 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. [20]

Kako bi dokazali prednosti metode razvijene upotrebom ICP-MS i neučinkovitost farmakopejske metode N.Lewen i suradnici [16] napravili su direktnu usporedbu uključivši u analizu 14 elemenata koji se inače ispituju farmakopejskom metodom (As, Se, Cd, In, Sn, Sb, Pb, Bi, Ag, Pd, Pt, Hg, Mo, Ru). Metoda koristi oko 40 puta manju količinu uzorka (0,025 g) u usporedbi s farmakopejskim limit testom za teške metale. Devet različitih lijekova (različiti matriksi uzoraka) je analizirano USP testom na teške metale, metodom II. Unatoč tome što je svaka ispitivana otopina sadržavala ukupno 140 μg/g ispitivanih elemenata (dodana je količina ekvivalentna 10 μg/g svakog od ukupno 14 elemenata), niti jedna nije dala rezultat za ukupni sadržaj teških metala više od 80 μg/g. Usporedno su svi uzorci analizirani ICP-MS metodom (Slika 7).



Slika 7. Grafička usporedba prosječnih iskorištenja elemenata iz ispitivanih otopina sa poznatom dodanom količinom elemenata dobivenih korištenjem USP testa na teške metale, metode II i onih dobivenih korištenjem ICP-MS metode.

Kod uzoraka pripremljenih USP metodom:

- Prosječna iskorištenja za nekoliko elemenata uključujući Se, Ru, Sn, Sb and Hg bila su < 10%.

- Prosječna iskorištenja za elemente Pb, As, Cd, Mo, Pd, Pt i In bila su između 30 i 50%.
- Ag je jedini element čije je iskorištenje iz svih cjepljenih otopina uzoraka bilo zadovoljavajuće – prosječno 97%.

ICP-MS metodom postignuta su znatno veća iskorištenja svih elemenata od interesa, posebno hlapljivih. Autori napominju da je u svim ispitivanim otopinama s dodanom poznatom količinom elemenata, prosječno iskorištenje Pb bilo oko 50% što navodi na zaključak da usporedba sa standardom olova koja se zahtjeva prema USP metodi ne daje optimalne rezultate. Zbog ekstremnih uvjeta kojima je uzorak izložen tijekom USP testa (temperatua oko 500 – 600 °C) autori smatraju dobivena slaba iskorištenja očekivanima.

Metoda koju su razvili kao alternativni ICP-MS test na teške metale, osim već spomenutih prednosti, kao što su manja količina uzorka, informacije o pojedinim elementima, brzina analize i kvantifikacija, pokazala je dodatne prednosti. Provedena je QSAR analiza podataka (kvantitativni odnos strukture i aktivnosti) kako bi se pokušalo razumjeti da li priroda API-a (nekoliko strukturnih aspekata) ima utjecaj na iskorištenja elemenata. Za procjenu potencijalnog utjecaja pojedinih funkcionalnih skupina, prosječno iskorištenje za svaki element u matriksu koji je sadržavao određenu funkcionalnu skupinu uspoređeno je s prosječnim iskorištenjem svakog elementa u svim ispitivanim matriksima. Nije opažena korelacija između strukturnih karakteristika ispitivanih uzoraka i iskorištenja elemenata čime je dokazana primjenjivost metode za različite uzorke, a uspješno je primjenjena na instrumentima dvaju različitih proizvođača.

Jedan od nedostataka farmakopejske metode temeljene na taloženju elemenata je rezultat dobiven kao limit test koji analitičaru ne daje informacije o elementu koji je uzrokovao povišeni rezultat. Upravo intrumentalno određivanje metalnih onečišćenja u farmaceutskim sastojcima i gotovim lijekovima ICP-MS tehnikom može biti korisno u pronalaženju korjena proizvodnog procesa lijekova u kojima se odrede ioni teških metala u tragovima. Takav zaključak, pored dokazane brzine i učinkovitosti metode za multielementarnu analizu i određivanje sadržaja metalnih iona u vrlo malim koncentracijama, donose Murty i suradnici razvojem metode za određivanje sadržaja teških metala u četiri lijeka pomoću ICP-MS. [13]

Wang i suradnici [14] razvili su multielementarnu ICP-MS metodu kao polukvantitativnu ili kvantitativnu alternativu limit testu za teške metale koja koristi jednostavnu pripremu uzorka - direktno otapanje uzoraka u 1 ili 80% otopini nitratne kiseline. Za razliku od polukvantitativnih metoda, koje nude neki dobavljači instrumenata, koje koriste tablice za usporedbu dobivene kalibracijom elementa sa samo nekoliko elemenata, ova metoda koristi kalibraciju instrumenta sa 69-elementarnim radnim standardom i može služiti za ispitivanje metala od farmaceutskog interesa i gotovo svih elemenata u periodnom sustavu elemenata. Uz postupke predložene u ovom radu, svaki uzorak može se pripremiti i analizirati u manje od 15 minuta nakon pokretanja instrumenta što je znatno brže u odnosu na USP ili Ph. Eur test na teške metale gdje za jedan uzorak može biti potrebno jedan sat ili dulje, osobito kada se koriste metode koje uključuju žarenje. Postignuta su odlična iskorištenja za sve uzorke korištene u studiji. Metoda je opisana kao iznimno brza, osjetljiva, precizna, jednostavna i specifična.

Gledajući izvrsne karakteristike i prednosti koje nudi ICP-MS, visoka cijena sigurno je jedan od glavnih razloga zašto ova tehnika nije doživjela veću popularnost. [40] ICP-OES i ICP-MS zahtijevaju veći stupanj vještina analitičara u odnosu na tehnike atomske apsorpcijske spektrometrije, a ICP-MS se smatra najzahtjevnijom. [5] Može se zaključiti da su najveća ograničenja tehnike velika financijska investicija i troškovi analiza i održavanja te nedostupnost certificiranih standarda. [1,20]

4.6. Utjecaj najavljenih promjena na farmaceutsku industriju

Dugotrajni proces harmonizacije izazvao je među pripadnicima različitih farmaceutskih tvrtki određenu zabrinutost i zbunjenost u vezi priprema za usklađivanje sa značajnim promjenama koje će nastupiti u načinu analize metalnih onečišćenja u farmaceutskoj industriji. Ovakva situacija nastala je najviše zbog uočljivih razlika među objavljenim dokumentima tj zahtjevima EMA-e/Ph.Eur, USP i nacrta ICH Q3D. Analitičari i drugi stručnjaci kao predstavnici farmaceutske industrije smatraju da je priprema za ove promjene vrlo težak zadatak, te su se zadnjih nekoliko godina vodile brojne rasprave o mogućim načinima implementacije novih zahtjeva u standardne procese kontrole kakvoće.

U stručnom osvrtu na stanje zahtjeva za metalna onečišćenja u lijekovima Lewen [34] navodi dva moguća pristupa pripremi: pasivni i proaktivni pristup.

Pasivni pristup označava čekanje do potpunog završetka ICH Q3D smjernica i točno utvrđenih datuma do kada će se farmaceutska industrija morati uskladiti s promjenama. Brojne izmjene koje su se događale zadnjih godina i odgađanja primjene istih, pogađale su financijski i glede utrošenog vremena i angažmana one koji su nastojali razviti prikladne analitičke metode ili prilagoditi svoje proizvodne procese. Zato pasivni pristup može biti prihvatljiv za neke tvrtke jer je njegova prednost u sigurnosti krajnjeg cilja i mogućnosti usmjerenih akcija nakon što zahtjevi i rokovi budu točno utvrđeni. Nedostatak može biti kratak rok za postizanje sukladnosti.

Proaktivni pristup, koji se često smatra poželjnim u vrlo kompetitivnom okruženju farmaceutske industrije, u ovom se slučaju za mnoge pokazao iscrpljujućim i upitne isplativosti. Koristi bi na kraju ipak mogle imati tvrtke s velikim brojem proizvoda i materijala koje treba procijeniti. U ovom slučaju moglo se na temelju objavljenih dokumenata pretpostaviti popis elemenata i propisane granice, a posebno od kolovoza 2013. godine, nakon najave EMA-e i Ph. Eur. da će se harmonizirati sa završnim ICH Q3D zahtjevima. U periodu nedovršenog ICH dokumenta zbog mogućnosti promjena, ali i vjerojatnosti da USP neće u potpunosti prihvatiti konačne zahtjeve ICH Q3D, mogao se primijeniti konzervativni pristup - prihvatiti popis svih elemenata koji se predlažu, te se uskladiti s nižim granicama za elemente kod kojih postoje razlike u granicama.

Primjer proaktivnog pristupa pripreme za nove ICH Q3D smjernice je objava standardiziranog pisma i obrasca od strane IPEC Amerika koje farmaceutske tvrtke mogu koristiti za prikupljanje informacija od svojih dobavljača u vezi elementarnih onečišćenja u farmaceutskim pomoćnim tvarima (ekscipijensima). [52] IPEC Federacija je globalna organizacija koja promiče kvalitetu farmaceutskih pomoćnih tvari, a predstavlja četiri postojeća regionalna Međunarodna vijeća za farmaceutske pomoćne tvari (IPEC Amerika, IPEC Europa, IPEC Japan i IPEC Kina) [53] Pismo se može prilagoditi i uključiti imena proizvoda, kontakt informacije i slično. Obrazac predstavlja standardizirani format za prikupljanje informacija o elementima klase 1, 2a, 2b i 3 predložene u dokumentu ICH Q3D korak 2b (Slika 8). Zamišljeno je da prikupljanjem odgovora i boljim poznavanjem kakvoće farmaceutskih sirovina, kao dijelom analize rizika, tvrtke planiraju implementaciju konačnih dozvoljenih granica elemenata u gotovim proizvodima i definiraju planove testiranja. Međutim, ne zna se mnogo o metalnim onečišćenjima u pomoćnim tvarima, a pomoćne tvari dobivene iz biljnih izvora ili prirodne rude predstavljat će najveći izazov jer se mogu razlikovati od serije do serije ili od godine do godine. Suradnja s dobavljačima za proizvođače će u budućnosti sigurno biti sve važnija.[52]

Supplier Name:	**Supplier Phone Number:**
Supplier Address:	**Supplier Email Address:**
Manufacturer (if different than Supplier):	**Date Form Filled Out:**

Directions:
Identify elemental impurities in (Material Name) that are likely to be present. If likely to be present, identify expected concentration (or range), analytical method used and limit of detection, if known. Please note if any metals are intentionally used in the manufacturing process in the Comments column.

Please complete a separate form for each material

Material Name_____

Source/Type of Excipient: ____Mineral ___Mineral derived ____Plant ___Plant derived ___Synthetic ___Fermentation derived

Other (explain):_____

Elemental Impurity		Class	Likely to be Present			If Known, Please Identify the Expected Concentration /Units (or Range)	Analytical Method Used (and Limit of Detection if Available)	Comments regarding source of information (i.e.; frequency of testing, process understanding, etc.)
Arsenic (inorganic)	As	1	Yes ☐	No ☐	Unknown ☐			
Cadmium	Cd	1	Yes ☐	No ☐	Unknown ☐			
Mercury (inorganic)	Hg	1	Yes ☐	No ☐	Unknown ☐			
Lead	Pb	1	Yes ☐	No ☐	Unknown ☐			
Cobalt	Co	2A	Yes ☐	No ☐	Unknown ☐			
Molybdenum	Mo	2A	Yes ☐	No ☐	Unknown ☐			
Selenium	Se	2A	Yes ☐	No ☐	Unknown ☐			

Slika 8. Izgled prve stranice obrasca IPEC Amerika za prikupljanje informacija o elementarnim onečišćenjima u farmaceutskim sirovinama od dobavljača [52]

Novi zahtjevi za ispitivanje elementarnih onečišćenja značajno će utjecati na proizvođače i na njihove dobavljače budući da farmakopejski testovi ispitivanja graničnih vrijednosti teških metala više neće biti prihvatljivi. Unatoč dokazanim nedostacima metoda temeljenih na taloženju nema razloga misliti da farmaceutska industrija ima problem elementarnih onečišćenja. Ipak, proizvođači lijekova će morati analitički dokazati da su njihovi proizvodi u skladu s novim postavljenim sigurnosnim granicama. Dok će upotreba instrumentalnih tehnika omogućiti tvrtkama da analiziraju više uzoraka u kraćem vremenu i sa sigurnošću utvrde kakvoću svojih proizvoda po pitanju elementarnih onečišćenja, predstavnici industrije naglašavaju i potencijalne poteškoće. Tvrtke će možda morati kupiti analitički instrument ili pronaći ugovorni laboratorij koji ima instrumente potrebne za obavljanje analize. Neke farmaceutske tvrtke nisu ranije imale potrebu koristiti ICP-MS ili ICP-OES u kontroli kakvoće, a morat će se i prilagoditi korištenju preporučenih priprema uzoraka za različite dozirne oblike i matrikse i uložiti u obuku tehničkog osoblja. Cijeli proces od narudžbe instrumenta, isporuke, instalacije do razvoja metoda i validacije može trajati mjesecima. Iako su danas dostupni instrumenti koji mogu zadovoljiti sve analitičke potrebe u skladu s novim zahtjevima, dobavljači instrumenata moraju biti pripremljeni glede potrebnih operativnih postupaka, standarda, potrošnog materijala, informatičkih sustava, validacije i servisnih usluga. Alternativa implementaciji novih skupih instrumenata i analitičkih metoda u redovne postupke kontrole kakvoće za proizvođače je korištenje ugovornih laboratorija čime se uklanja teret obuke osoblja, kvalifikacije instrumenta i održavanja, a prednost je i bolje razumijevanje problema oko pripreme različitih uzoraka i rješavanje svih poteškoća analize od strane laboratorija koji rutinski obavlja posao. [15]

Danas su na tržištu dostupni brojni visokokvalitetni ICP-MS instrumenti koji imaju slične specifikacije. Odluka o izboru instrumenta koji će nabolje odgovarati potrebama tvrtke treba se temeljiti na procesu procjene tijekom kojeg treba razmotriti neke važne faktore [54] kao što su:

- performanse instrumenta (radna svojstva),
- uporabljivost
- pouzdanost.

Ovisno o primjeni instrumenta **performanse** se mogu razmatrati kroz razne kriterije: sposobnost detekcije, osjetljivost, točnost i preciznost, kratkotrajna i dugotrajna stabilnost signala, reduciranje

interferencija, izvedba prilikom korištenja alternativnih uređaja za uzorkovanje i drugi. Ipak, za konačnu odluku treba razmotriti i manje vidljive faktore kao što su jednostavnost upotrebe, pouzdanost i tehnička podrška dobavljača.

Prilikom razmatranja **uporabljivosti** važno je nekoliko kriterija:

- jednostavnost upravljanja kod rutinske upotrebe i kod razvoja metode,
- učestalost rutinskog održavanja,
- kompatibilnost sa dodatnom opremom za uzorkovanje i učestalost njenog rutinskog održavanja,
- zahtjevi za instalaciju (veličina prostora i način postavljanja instrumenta, kontrola temperature i slično),
- tehnička podrška i
- edukacija.

U analitičkom laboratoriju farmaceutske tvrtke s velikom količinom dnevno obavljenih analiza vrlo je vjerojatno da će instrumentom upravljati tehničko osoblje, pa će jednostavnost software-a i sličnost s ranije korištenim software-ima na drugim instrumentima svakako utjecati na vrijeme potrebno za provođenje potpune edukacije. Važno je i da software bude sukladan sa zahtjevima FDA 21 CFR Part 11, odnosno da omogućuje službenu upotrebu elektronskih zapisa i elektronskih potpisa umjesto ručnih/papirnih, uz potrebne sigurnosne mjere i *audit trail*. Budući da je tijekom analize uzorak u kontaktu s brojnim dijelovima u unutrašnjosti instrumenta jako je važno znati koji dijelovi trebaju biti zamijenjeni ili pregledani i koliko često tj. koju vrstu redovnog održavanja treba provoditi dnevno, tjedno, mjesečno ili godišnje kako bi se instrument održao u dobrom radnom stanju. Tehnička podrška jako je važna, osobito ako laboratorij nema prethodnog iskustva sa ICP-MS. Trebalo bi razmotriti ne samo stručne kvalifikacije specijalista dobavljača instrumenta, nego i mogućnost da u svakom trenutku pruže tehničku podršku, a prednost je i dostupnost literature/pisanih materijala za primjenu instrumenta. Svakako treba ispitati i kakav oblik edukacije dobavljač nudi u smislu trajanja, broja osoba i kvalitete.

Pouzdanost instrumenta djelomično je pod utjecajem rutinskog održavanja i vrste analiziranih uzoraka, ali se smatra da je više odraz dizajna samog instrumenta. Ovaj je faktor teško ranije

procijeniti, pa bi prije kupnje bilo dobro razmotriti vrstu servisne podrške koju dobavljač može ponuditi: u kojem vremenu serviser može doći u laboratorij ili barem telefonski raspraviti o problemu, da li postoji mogućnost daljinske dijagnostike (pristup preko Interneta), koliki su troškovi posjeta servisera i kako se obračunavaju, mogućnost i troškovi godišnjeg preventivnog održavanja. [54]

Možda najvažnije od svega je korištenje pristupa temeljenog na procjeni rizika koji se potiče u svim navedenim dokumentima. Iako obavezno testiranje svih elemenata u svakom materijalu na svakoj seriji može biti jedan od načina dokazivanja sukladnosti, važno je shvatiti da se korištenjem procjene rizika potencijalno može eliminirati testiranje nekih ili svih elemenata u bilo kojem proizvodu ili sirovini i u konačnici postići racionalizacija troškova i vremena. Ovakav pristup uvijek mora biti znanstveno i stručno utemeljen, odnosno tvrtka mora imati široko znanje o:

- proizvodnim procesima svojih proizvoda i korištenoj opremi,
- procesima svojih dobavljača, odnosno o kvalifikacijama dobavljača,
- načinima proizvodnje i porijeklu svih polaznih materijala i intermedijera uključujući spremnike.

ICH Q3D [32] 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 unaprjeđenje razumijevanja i provođenja procesa što će u konačnici poboljšati kontrolu elementarnih onečišćenja. To ujedno znači i nužnost uključenosti i povezanosti 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. Onim tvrtkama kojima nedostaju navedena znanja testiranje je svakako najsigurniji put u osiguranju sukladnosti sa zahtjevima.

5. ZAKLJUČAK

Zbog utjecaja na sigurnost i učinkovitost terapije lijekovima ispitivanje i kontrola onečišćenja važna su pitanja u farmaceutskoj kontroli kakvoće. Trenutna kontrola anorganskih onečišćenja temelji se primarno na farmakopejskim zahtjevima ispitivanjem graničnih vrijednosti za teške metale. Metode su razvijene prije uvođenja modernih analitičkih uređaja i temelje se na tehnikama vlažne kemije s upitnom mogućnosti detektiranja nekih toksikološki značajnih metala. Prema tome, postoji velika potreba za razvojem osjetljivih i selektivnih metoda za određivanje metalnih onečišćenja u lijekovima i farmaceutskim sastojcima, ne samo kako bi se udovoljilo strožim specifikacijama u budućnosti, nego i u svrhu osiguranja učinkovitosti i sigurnosti primjene lijekova.

Razvoj modernih analitičkih tehnika omogućio je dobivanje kvantitativnih i specifičnih informacija o sadržaju metala u lijekovima i sirovinama, a revidiranjem relevantnih poglavlja u USP i Ph. Eur. najavilo se razdoblje upotrebe instrumentalnih tehnika, posebno ICP-MS u rutinskoj analizi. S naglaskom na sigurnost pacijenata, pokrenut je i proces međunarodne harmonizacije smjernica tj. stvaranje nove ICH Q3D smjernice koja bi razjasnila zahtjeve i osigurala harmonizirani pristup za kontrolu metalnih onečišćenja. Jasno je da tradicionalni limit test nije više adekvatan da zadovolji potrebe niti industrije niti pacijenata, a osim utvrđivanja metala koje treba pratiti i definiranja granica prihvatljivosti, odabir odgovarajuće analitičke metode biti će važan korak u uspostavljanju učinkovitog sustava kontrole metalnih onečišćenja u lijekovima.

Uzimajući u obzir kontinuirani razvoj regulatornih zahtjeva koji ide uz bok prikupljanju toksikoloških podataka o raznim elementima i unaprjeđenju analitičkih tehnika, puno je vjerojatnije da će se granice prihvatljivosti za elementarna onečišćenja u lijekovima u budućnosti smanjivati, a ne povećavati. To dovodi do zaključka da će osjetljivije tehnike poput ICP-MS imati sve veću ulogu u analizi elemenata u lijekovima neovisno o tome da li će to biti regulatorno zahtijevano ili će biti prirodan odabir proizvođača u nastojanju održanja na kompetitivnom farmaceutskom tržištu.

6. LITERATURA

1. 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. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2007;43:1-13.
2. Diwakar Sherikar O, Jignesh Mehta P, Mohanlal Khatri D. Various approaches for impurity profiling of pharmaceuticals -An overview. Journal of Pharmacy Research 2011;4(6):1937-1942.
3. Ahuja S, Alsante K. Handbook of isolation and characterization of impurities in pharmaceuticals. Amsterdam: Academic Press; 2003, str. 1-9
4. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Final Concept Paper, Q3D: Impurities: Guideline for Elemental Impurities, Dated 17 July 2009.
5. Lewen N. The use of atomic spectroscopy in the pharmaceutical industry for the determination of trace elements in pharmaceuticals. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2011;55:653-661.
6. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Impurities in New Drug Substances Q3A (R2); 2006
7. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Impurities in New Drug Products Q3B (R2); 2006
8. Qiu F, Norwood D. Identification of pharmaceutical impurities. Journal of liquid chromatography \& related technologies. 2007;30(5-7):877-935.
9. 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. Journal of Analytical Chemistry 2010;65:56-63.
10. Kashyap Wadekar R, Mitali Bhalme, Srinivasa Rao S, Vigneshwar Reddy K, Sampath Kumar L, Balasubrahmanyam E. Evaluating Impurities in Drugs (Part I of III). Pharmaceutical Technology 2012; 36 (2):46-51
11. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C (R5); 2011

12. Toxipedia: Arsenic poisoning. Updated by Steven Gilbert (May 30, 2014) Available at: http://www.toxipedia.org/display/toxipedia/Arsenic+Poisoning. Accessed October 15, 2014
13. 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. Indian Juornal of Chemical Technology 2005; 12: 229-231
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. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2000; 23: 867-890.
15. Thayer M. A. Trace Metals Debate. Chemical & Engineering News 2013; 91 (33): 10-13
16. Lewen N, Mathew S, Schenkenberger M, Raglione T. A rapid ICP-MS screen for heavy metals in pharmaceutical compounds. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2004;35:739-752.
17. The United States Pharmacopeia/The National Formulary, USP32/NF27, General Chapter <231> Heavy Metals, stranica 134-136
18. European Pharmacopoeia, Method 2.4.8 „Heavy Metals“
19. Agilent Technologies. New USP <232/233> Elemental Impurity (Metals) Tests. USP Webinar, December 08, 2010
Available at:http://www.chem.agilent.com/Library/eseminars/Public/Atomic_Portfolio_USP-232-233-Pharma_Webinar.pdf. Accessed September 23, 2014
20. 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. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2006;40:227-234.
21. Macan J. Definicije pojmova vezanih uz strukturu i pripravu solova. Kemija u industriji 2011; 60 (3): 135–153
22. USP Elemental Impurities: Standards-Setting Record, December 20, 2012
23. USP Heavy Metals Testing Methodologies Workshop, held August 26-27, 2008, Summary
24. Duffus J. H. „Heavy metals“ – a meaningless term?. The International Union of Pure and Applied Chemistry 2002; 74 (5): 793-807

25. European Medicines Agency (EMA), Guideline on the Specification Limits for Residues of Metal Catalysts or Metal Reagents, London, 21 February 2008 (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/4446/2000)
26. General Chapter <232> „Elemental Impurities – Limits“ ,Unitet States Pharmacopeia 37, Official February 1, 2013
27. General Chapter <233> „Elemental Impurities – Procedures“ ,Unitet States Pharmacopeia 37, Official February 1, 2013
28. European Pharmacopoeia General Chapter 5.20 „Metal catalyst or metal reagent residues“, 2012
29. ICH official website
Avaliable at: http://www.ich.org/. Accessed September 29, 2014
30. ICH Q3D EWG Work Plan, 14 July 2014
31. ICH Draft Consensus Guideline, Guideline for Elemental Impurities Q3D, step 2b version; 26 July 2013
32. ICH Harmonised Guideline, Guideline for Elemental Impurities Q3D, step 4 version; 16 December 2014
33. ICH Final Concept Paper, Q3D: Elemental Impurities IWG, 1 October 2014
34. Lewen N. What's New in Testing Pharmaceuticals for Metals: Metals and Limits in Limbo. Spectroscopy 2014; 29 (5): 42-50
35. European Pharmacopoeia News, Press release on the implementation of Chapter 5.20, 29 August 2013, Strasbourg, France
Available at: https://www.edqm.eu/en/The-European-Pharmacopoeia-revises-its-strategy-regarding-implementation-of-chapter-520-Metal-catalysts-or-Metal-reagent-residues-1583.html?mbID=128. Accessed September 29, 2014
36. The proposed revisions to General Chapter <232> „Elemental Impurities – Limits“ ,Unitet States Pharmacopeia 37 proposed in Pharmacopeial Forum 40(2).
37. The proposed revisions to General Chapter <233> „Elemental Impurities – Procedures“ ,Unitet States Pharmacopeia 37 proposed in Pharmacopeial Forum 40(2).

38. Key Issue: Elemental Impurities

Available at: http://www.usp.org/usp-nf/key-issues/elemental-impurities. Accessed December 1, 2014

39. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Prug products: Chemical Substances Q6A; 1999

40. Thomas R. Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners, Third Edition. CRC Press; 2013, str. 1-13

41. Agilent Technologies. ICP-MS Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: A Primer. Agilent Technologies, Inc.; 2005, str. 2-40.

42. SPECTRO: Simultaneous ICP-MS in the Pharmaceutical Industry; A Powerful New Tool for Elemental Analysis

Available at: http://live.spectro.com/category/products/icp-ms-spectrometers/. Accessed September 23, 2014

43. Lewen N., Schenkenberger M., Larkin T., Conder S., Brittain H. The determination of palladium in fosinopril sodium (monopril) by ICP-MS. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 1995; 13 (7): 879–883.

44. Wang T., Ge Z., Wu J., Li B., Liang A. Determination of tungsten in bulk drug substance and intermediates by ICP-AES and ICP-MS. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 1999; 19 (6):937–943.

45. Myors R., Wells R.J., Skopec S.V. i sur. Preliminary investigation of heroin fingerprinting using trace elemental concentrations. Anal. Commun. 1998; 35:403–410.

46. Harigaya K., Kuwahara Y., Nishi H. Determination of aluminum in large volume parenteral drug products used in total parenteral nutrition therapy by ICP-MS with a dynamic reaction cell. Chem. Pharm. Bull. 2008; 56 (4):475–479.

47. Suzuki S., Tsuchihashi H., Nakajima K., Matshushita A., Nagao T. Analysis of impurities in methamphetamine by inductively coupled plasma mass spectrometry and ion chromatography. J. Chromatogr. Sci. 1988; 437 (1):322–327.

48. Kishi T. Analysis of trace elements in methylamphetamine hydrochloride by inductively coupled plasma-mass spectrometry. Journal of Research of the National Bureau of Standards (U.S.A.) 1988; 93:469–471.
49. Niemela M., Kola H., Eilola K., Peramaki P. Development of analytical methods for the determination of sub-ppm concentrations of palladium and iron in methotrexate. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2004; 35 (3):433–439
50. Cassap M. Using ICP-MS and ICP-OES to Measure Trace Elemental Impurities in Pharmaceuticals in Compliance with Proposed Pharmacopeia Chapters. Spectroscopy 2011; 26 (3): 26-29.
51. Lásztity A., Kelkó-Lévai Á., Varga I., Zih- Perényi K., Bertalan É. Development of atomic spectrometric methods for trace metal analysis of pharmaceuticals. Microchemical Journal 2002;73:59-63
52. IPEC Americas: IPEC-Americas Elemental Impurities Template
Available at: http://ipecamericas.org/content/ipec-americas-elemental-impurities-template. Accessed September 19, 2014
53. IPEC Federation: Cover page. Available at: http://www.ipec.org/. Accessed September 19, 2014
54. Thomas R. How to Select an ICP-MS System: Some Important Considerations. Spectroscopy 2013; 28 (11): 28-24.