Verifikacija farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja u lijekovima

Završki, Mario

Professional thesis / Završni specijalistički

2018

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:163:149133

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Mario Završki

VERIFIKACIJA FARMAKOPEJSKIH METODA ZA ODREĐIVANJE ONEČIŠĆENJA U LIJEKOVIMA

Specijalistički rad

Zagreb, 2018.

PSS studij: Razvoj lijekova

Mentor rada: prof. dr. sc. Biljana Nigović

Specijalistički rad obranjen je dana 09.11.2018. na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. izv.prof.dr.sc. Ana Mornar Turk

2 .prof.dr.sc. Biljana Nigović

3. dr.sc. Biserka Cetina Čižmek, znanstvena savjetnica

Rad ima 74 listova.

PREDGOVOR

Ovo istraživanje provedeno je u sklopu Poslijediplomskog specijalističkog studija Razvoj lijekova na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Na odabir teme završnog specijalističkog rada utjecao je moj interes za analitiku lijekova te rad u farmaceutskoj industriji.

Kroz ovaj rad želio bih prikazati postupak provođenja verifikacije i validacije analitičkih metoda u GMP okruženju. Također mi je cilj ukazati na važnost validacija analitičkih metoda u farmaceutskoj industriji te dati pregled trenutno važećih smjernica i regulatornih zahtjeva u određivanju onečišćenja lijekova, s naglaskom na HPLC metode.

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Biljani Nigović na podršci, pristupačnosti i svim stručnim savjetima tijekom izrade ovog rada. Veliko hvala Vedranu Krištaforu (Pliva, Kontrola kvalitete), koji mi je omogućio izradu ovog specijalističkog rada.

SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je verificirati, odnosno djelomično validirati farmakopejske HPLC metode za određivanje onečišćenja u lijekovima. Cilj je također ispitati čistoću tvari i farmaceutskog proizvoda kroz provođenje postupka validacije te dati pregled trenutno važećih smjernica i regulatornih zahtjeva u određivanju onečišćenja u lijekovima, s naglaskom na HPLC metode.

MATERIJAL/METODE

Istraživanje uključuje pregled dostupne znanstvene literature iz područja analitike i kontrole kvalitete lijekova. Pregled uključuje: znanstvene radove, Američku (USP) i Europsku farmakopeju (Ph. Eur.), najnovija izdanja stručnih knjiga, elektroničke izvore te važeće smjernice regulatornih tijela. Pregled regulatornih smjernica posebno je bio usmjeren na internacionalno harmonizirane smjernice (ICH): Q2 "Validacija analitičkih postupaka: Tekst i metodologija", Q3A "Onečišćenja u novim ljekovitim tvarima", Q3B "Onečišćenja u novim ljekovitim proizvodima", Q6A "Specifikacije: Postupci ispitivanja i kriteriji prihvatljivosti za nove ljekovite tvari i nove ljekovite produkte: kemijske tvari".

U postupcima verifikacija/validacija analitičkih metoda, analitičkim protokolima su propisani validacijski parametri koji će se ispitati, kao i kriteriji prihvatljivosti koji moraju biti zadovoljeni kako bi postupak verifikacije/validacije bio uspješno proveden.

Sva ispitivanja su provedena prema važećim regulatornim smjernicama, uključujući ICH smjernice, farmakopeje (Ph. Eur. i USP), pod GMP uvjetima. Ispitivanja su provedena na prikladnim HPLC instrumentima te su korištene referentne tvari, kao i reagensi prikladne čistoće, u skladu s farmakopejskim propisima.

REZULTATI

U eksperimentalnom dijelu rada, u verifikaciji Ph. Eur. metode za određivanje srodnih spojeva u nikotinamidu ispitani su validacijski parametri: selektivnost, preciznost, limit kvantifikacije, te stabilnost otopina. Prilikom verifikacije USP metode za određivanja graničnih vrijednosti formaldehida i acetaldehida u polietilen glikolu 3350 ispitani su parametri: selektivnost, preciznost, limit kvantifikacije te stabilnost otopina. Tijekom verifikacije Ph. Eur. metoda za određivanje monomera etil akrilata i metakrilne kiseline u kopolimeru metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1) i 30%-tnoj disperziji kopolimera metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1) ispitani su validacijski parametri: selektivnost, limit kvantifikacije, preciznost te stabilnost otopina. Djelomična validacija analitičke metode za određivanje srodnih spojeva u farmaceutskom proizvodu koji sadrži djelatnu tvar atenolol uključuje provjeru parametara: selektivnost, linearnost, limit kvantifikacije, preciznost i točnost. Rezultati svih provedenih ispitivanja su unutar kriterija prihvatljivosti za navedene validacijske parametre.

ZAKLJUČAK

Uspješno su provedene verifikacije farmakopejskih HPLC metoda za određivanje onečišćenjima u farmaceutskim tvarima, kao i djelomična validacija HPLC metode za određivanje srodnih spojeva u farmaceutskom proizvodu. Rezultati provedenih ispitivanja bit će korišteni u farmaceutskoj industriji, a verificirane/validirane analitičke metode će biti rutinski primjenjivane u analitici ovih proizvoda u laboratorijima kontrole kvalitete.

SUMMARY

OBJECTIVES

The purpose of this study is to verify/partially validate pharmacopoeial HPLC methods for determination of impurities in drugs. The objective is to investigate the purity of tested substances and pharmaceutical product during the validation process and to provide an overview of the current guidelines and regulatory requirements for determination of impurities in drugs, with emphasis on HPLC methods.

MATHERIAL/METHODS

Research includes a review of available scientific literature in the field of analytics and quality control of medicines. The review includes scientific papers, the United States Pharmacopoeia (USP) and European Pharmacopoeia (Ph. Eur.), the latest editions of professional books, electronic sources and valid guidelines of regulatory bodies. The review of the regulatory guidelines was specifically directed towards ICH Harmonised Guidelines: (ICH): Q2 "Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology", Q3A "Impurities in New Drug Substances", Q3B "Impurities in New Drug Products", Q6A "Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances".

Validation parameters which will be examined, as well as acceptance criteria which have to be met in order to successfully validate methods, are prescribed in method validation/verification protocols.

All tests were conducted according to valid regulatory guidelines, including ICH Guidelines, Pharmacopoeias (Ph. Eur. and USP), in GMP environment. Tests were performed using appropriate HPLC instruments. Reference standards, as well as reagents of appropriate purity were used, in accordance with pharmacopoeias.

RESULTS

In the experimental part, the following validation parameters were tested during the verification of Ph. Eur. method for determination of related substances in nicotinamide: selectivity, precision, limit of quantification and stability of solutions. During the verification of USP method for limits of formaldehyde and acetaldehyde in polyethylene glycol 3350, the following parameters were tested: selectivity, precision, limit of quantification and stability of solutions. In the verification of Ph. Eur. method for determination of monomers: ethyl acrylate and methacrylic acid in the methacrylic acid – ethyl acrylate copolymer (1:1) and methacrylic acid - ethyl acrylate copolymer (1:1) dispersion 30 per cent, the following validation parameters were examined: selectivity, limit of quantification, precision and stability of solutions. During the partial validation of the analytical method for determination of related substances in the pharmaceutical product which contains active substance atenolol, the following parameters were checked: selectivity, linearity, limit of quantification, precision and accuracy. The results of all performed tests are within the acceptance criteria which were set for the validation parameters being examined.

CONCLUSION

Verification studies of pharmacopoeial methods for determination of impurities in pharmaceuticals, as well as a partial validation of HPLC method for determination of impurities in a pharmaceutical product have been successfully performed. The results of tests carried out will be used in the pharmaceutical industry and verified/validated analytical methods will be routinely applied in quality control of these products in quality control laboratories.

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA 1

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 3

3. MATERIJAL I METODE 4

3.1. Zahtjev kvalitete lijeka 4

3.2. Onečišćenja 7

3.3. HPLC 10

3.4. Validacija analitičkih metoda 14

3.5. Verifikacija analitičkih metoda 23

3.6. Eksperimentalni podaci 25

3.6.1. Farmakopejska metoda za određivanje srodnih spojeva u nikotinamidu 25

3.6.2. Farmakopejska metoda za određivanje graničnih vrijednosti formaldehida i acetaldehida u polietilen glikolu 3350 30

3.6.3. Farmakopejske metode za određivanje etil akrilata i metakrilne kiseline u kopolimeru metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1) te u 30%-tnoj disperziji kopolimera metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1) 34

3.6.4. Metoda za određivanje onečišćenja A i onečišćenja J (Ph. Eur.) u farmaceutskom proizvodu koji sadrži djelatnu tvar atenolol 37

4. REZULTATI 40

4.1. Verifikacija farmakopejske metode za određivanje srodnih spojeva u nikotinamidu 40

4.2. Verifikacija farmakopejske metode za određivanje graničnih vrijednosti formaldehida i acetaldehida u polietilen glikolu 3350 45

4.3. Verifikacija farmakopejske metode za određivanje etil akrilata i metakrilne kiseline u kopolimeru metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1) te u 30%-tnoj disperziji kopolimera metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1) 50

4.4. Djelomična validacija metode za određivanje onečišćenja A i onečišćenja J (Ph. Eur.) u farmaceutskom proizvodu koji sadrži djelatnu tvar atenolol 56

5. RASPRAVA 64

5.1. Nikotinamid 64

5.2. Polietilen glikol 3350 64

5.3. Kopolimer metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1) i 30%-tna disperzija kopolimera metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1) 65

5.4. Farmaceutski proizvod koji sadrži djelatnu tvar atenolol 67

6. ZAKLJUČAK....68
7. LITERATURA....70
8. POPIS KRATICA....72
9. ŽIVOTOPIS....74

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Vrlo je važno osigurati da razvijeni lijek odgovara zahtjevima kvalitete te da je njegova kvaliteta održavana sve dok na posljetku ne bude primijenjen. Kao rezultat toga, mora se razviti serija ispitivanja, prikladnih za određenu supstanciju koja se analizira, ovisno o njezinoj prirodi, stadiju razvoja i/ili proizvodnje. Sve faze istraživanja i razvoja u farmaceutskoj industriji odvijaju se uz potporu analitike, stoga je razvoj i validacija analitičkih metoda od temeljne važnosti u farmaceutskoj industriji. Validacije analitičkih metoda daju informacije koje su nužne za prijavu novog lijeka regulatornim tijelima. [1, 2] Onečišćenja u aktivnim farmaceutskim tvarima mogu se klasificirati kao: organska onečišćenja, anorganska onečišćenja i ostatna otapala. Organska onečišćenja mogu nastati tijekom procesa proizvodnje i/ili skladištenja aktivnih farmaceutskih tvari. [3] Onečišćenja u farmaceutskih proizvodima mogu se klasificirati kao razgradni produkti farmaceutske tvari ili kao reakcijski produkti farmaceutske tvari i pomoćne tvari i/ili kontaktnog pakirnog materijala, odnosno primarnog spremnika. [4] Validacija analitičkih metoda je važan dio analitičke kemije za potvrdu da je upotrijebljena analitička metoda za određeno ispitivanje prikladna za namijenjenu uporabu. [2] Farmakopejske metode koje su navedene u službenim monografijama validirane su od strane službenih laboratorija. Za farmakopejske metode je važno da svaki pojedini laboratorij provede verifikaciju metode koju namjerava koristiti u svom laboratoriju. [1] Verifikacija farmakopejskih metoda mora sadržavati dokaz da se metoda prikladno koristi u prihvatnom laboratoriju, pod stvarnim uvjetima korištenja. [5] Farmakopejski tekstovi, uključujući i monografije se redovito ažuriraju uzimajući u obzir promjene u tržišnim proizvodima kao i znanstveni napredak. Monografije i opća poglavlja mogu se revidirati, npr. kako bi se zadovoljili zahtjevi zaprimljeni od regulatornih tijela ili industrije. Revizija je moguća i ako je potrebno uskladiti monografije sličnih tvari, ako farmakopeja implementira nove propise ili smjernice (npr. ICH Q3D smjernice) ili ako je potrebno ažurirati zastarjele tekstove. [6] Prijedlozi novih tekstova (monografija) dostupni za komentiranje objavljuju se na internetskim stranicama:

farmakopejskom forumu (za tekstove iz Američke farmakopeje; USP), odnosno Pharmaeuropa (za tekstove iz europske farmakopeje; Ph.Eur.). Metode tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) se vrlo često koriste u analitici lijekova zbog svoje specifičnosti (sve komponente uzorka se razdvajaju međusobno na koloni tako da dobiveni rezultati sa sigurnošću potječu od analita). [2] Jedan od glavnih razvojnih trendova u analitici je određivanje analita u sve nižim koncentracijama u uzorcima, koji se nalaze u sve složenijim matricama. [7] Tijekom razvoja farmaceutskog proizvoda, analitičke metode se često modificiraju, u skladu s promjenama u sintetskom putu aktivne farmaceutske supstancije (eng. active pharamceutical substance; API), formulacije proizvoda, kao i zbog unaprjeđenja znanja o onečišćenjima i razgradnim produktima. Značajnost navedenih izmjena se mora evaluirati da bi se utvrdilo da li i u kojoj mjeri je nužna revalidacija metode. [8]

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj rada je verificirati, odnosno djelomično validirati farmakopejske HPLC metode za određivanje onečišćenja. Verifikacija će se provesti za USP metodu iz monografije pomoćne tvari polietilen glikola 3350 za određivanja graničnih vrijednosti formaldehida i acetaldehida. Verificirat će se Ph. Eur. metoda iz monografije aktivne tvari nikotinamida za određivanje srodnih spojeva te Ph. Eur. metode iz monografija pomoćnih tvari kopolimera metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1) i njegove 30% disperzije za određivanje limita monomera etil akrilata i metakrilne kiseline. Provest će se djelomična validacija metode za određivanje srodnih spojeva u farmaceutskom proizvodu koji sadrži atenolol kao djelatnu tvar.

Nakon provedenih postupaka verifikacije/validacije analitičkih metoda, dobit će se uvid u čistoću ispitivanih tvari, odnosno farmaceutskog proizvoda.

Također je cilj rada dati pregled trenutno važećih smjernica i regulatornih zahtjeva u određivanju onečišćenja u lijekovima, s naglaskom na HPLC metode.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Zahtjev kvalitete lijeka

Prema ICH Q6A smjernicama, zahtjev kvalitete lijeka (specifikacija lijeka) definirana je kao lista ispitivanja, referenci na analitičke postupke te kriterija prihvatljivosti koji uključuju brojčane granice, područja ili ostale kriterije za opisana ispitivanja, kojima farmaceutska tvar ili farmaceutski proizvod moraju udovoljavati kako bi se smatrali prihvatljivima za namijenjenu upotrebu. [9]

Specifikacija predstavlja kritični standard kvalitete, predložena je od strane proizvođača, a odobrena od strane regulatornih tijela. Specifikacija je dio cjelokupne strategije kontrole ljekovitih tvari i farmaceutskih proizvoda, dizajnirana kako bi se osigurale kvaliteta i dosljednost proizvoda. Specifikacija se koristi kako bi se potvrdila kvaliteta ljekovite tvari ili proizvoda, umjesto da se provodi potpuna karakterizacija, a treba biti usmjerena na značajke koje su važne u osiguranju sigurnosti i djelotvornosti ljekovite tvari i farmaceutskog proizvoda. [9]

Farmakopejska diskusijska grupa (PDG) Europske farmakopeje, Japanske farmakopeje i Američke farmakopeje izrazila je predanost pravovremenom usklađivanju (harmonizaciji) svojih postupaka. [9] ICH Q4B Stručna radna skupina (EWG) evaluira i predlaže farmakopejske tekstove na korištenje u sve tri ICH regije, kako bi se olakšalo njihovo priznavanje od strane regulatornih tijela kao međusobno zamjenjivima. Tako se namjerava izbjeći prekomjerna ispitivanja od strane farmaceutske industrije. [10]

Kada je postignuta usklađenost, referenca na usklađeni postupak i kriterij prihvatljivosti se smatra prihvatljivim za specifikacije u sve tri regije. Farmakopeje su pristale uključiti u svoje tekstove izjave koje ukazuju da su postupci i kriteriji prihvatljivosti iz sve tri farmakopeje istovjetni i stoga međusobno zamjenjivi. [9]

Postavljanje specifikacija važan je koncept s ciljem osiguranja dostupnosti sigurnih i efikasnih farmaceutskih proizvoda pacijentima. [1] Kada se specifikacija prvi puta predlaže, potrebno je prikazati opravdanost za svaki postupak i kriterij prihvatljivosti uključen u specifikaciju. Opravdanost bi se trebala temeljiti na relevantnim podacima o razvoju, farmakopejskim standardima, podacima ispitivanja ljekovite tvari i farmaceutskog proizvoda iz toksikoloških i kliničkih ispitivanja, rezultatima ispitivanja stabilnosti. Osim toga, treba razmotriti razumni raspon očekivane analitičke i proizvodne varijabilnosti. [9]

Analitičke metode su podložne određenim stupnjevima varijabilnosti pa su tako neke analitičke metode točnije od drugih. Npr. titrimetrija obično pokazuje koeficijente varijacije koji su niži nego kromatografske metode. Navedeno treba uzeti u obzir kod postavljanja kriterija prihvatljivosti za određivanje sadržaja u specifikaciji, pri čemu je moguće postaviti vrijednost za titrimetrijsko određivanje sadržaja aktivne farmaceutske tvari na ±0,5%, dok HPLC metode tipično pokazuju koeficijent varijacije od ±1%. [1]

Periodično ispitivanje lijeka ili ispitivanje koje je moguće preskočiti predstavlja ispitivanje lijeka određenim testovima u svrhu puštanja lijeka u promet, na unaprijed odabranim serijama i/ili u unaprijed određenim intervalima, pri čemu se ne ispituje svaka serija lijeka. Serije koje nisu ispitane također moraju odgovarati prihvaćenim kriterijima za taj lijek. Ovakva vrsta ispitivanja mora biti opravdana te odobrena od strane regulatornih tijela prije implementacije. Ovaj koncept može se primijeniti npr. na ostatna otapala i mikrobiološko ispitivanje krutih oralnih ljekovitih oblika. [9]

Specifikacija za puštanje lijeka u promet skup je kemijskih, bioloških i mikrobioloških ispitivanja, kao i kriterija prihvatljivosti koji određuju prikladnost serije lijeka u vrijeme puštanja u promet. Specifikacija roka valjanosti (eng. shelf life) pak određuje prikladnost farmaceutske tvari u vremenu ponovnog testiranja, ili kako bi lijek bio zadovoljavajuće kvalitete tijekom roka uporabe. [11]

Koncept različitih kriterija prihvatljivosti specifikacija za puštanje serije lijeka u promet u odnosu na rok valjanosti odnosi se isključivo na farmaceutske proizvode. U tom slučaju uspostavljaju se stroži kriteriji prihvatljivosti za puštanje serije lijeka u odnosu na rok valjanosti. Primjeri gdje se navedeno može primijeniti su parametri: sadržaj i onečišćenja (razgradni produkti). Ovaj koncept nije svugdje primjenjiv; primjerice u Japanu i SAD-u su regulatorni kriteriji prihvatljivosti jednaki za puštanje serije lijeka kao i za rok valjanosti. [9]

Ispitivanja tijekom procesa mogu se provesti tijekom proizvodnje ljekovite tvari ili farmaceutskog proizvoda, umjesto ispitivanja koja se provode prije puštanja serije lijeka. Određena ispitivanja koja se provode tijekom procesa proizvodnje, gdje je kriterij prihvatljivosti identičan ili stroži od kriterija postavljenog za puštanje lijeka (npr. pH otopine), mogu biti dovoljna da se zadovolji zahtjev specifikacije kada je ispitivanje uvršteno u specifikaciju. Ovaj pristup bi trebao biti validiran kako bi se pokazalo da se rezultati ispitivanja ili karakteristike proizvoda ne mijenjaju tijekom procesne faze sve do gotovog proizvoda. [9]

Poznato je da je u trenutku podnošenja prijave dostupna samo ograničena količina podataka, što može utjecati na postavljanje kriterija prihvatljivosti. Kao rezultat toga, može biti potrebno priložiti revidirane kriterije prihvatljivosti na temelju iskustva s proizvodnjom ljekovite tvari ili farmaceutskog proizvoda. Kriteriji prihvatljivosti trebaju se nužno usredotočiti na sigurnost i djelotvornost. Primjer je postavljanje kriterija prihvatljivosti za specificirano onečišćenje. [9]

3.2. Onečišćenja

Ispitivanje onečišćenja je univerzalni test koji je općenito primjenjiv na sve ljekovite tvari i farmaceutske proizvode te je sastavni dio njihovih specifikacija.[9]

ICH Q3A smjernice klasificiraju onečišćenja kao: organska, anorganska i ostatna otapala. Organska onečišćenja mogu nastati tijekom procesa proizvodnje i/ili skladištenja aktivnih farmaceutskih tvari. Mogu biti identificirana ili neidentificirana, hlapljiva ili nehlapljiva, a uključuju: polazne materijale, međuprodukte, razgradne produkte, reagense, ligande, katalizatore. Anorganska onečišćenja mogu nastati tijekom procesa proizvodnje. Uglavnom su poznata i identificirana te uključuju: reagense, teške metale, anorganske soli, druge tvari. Otapala su anorganske ili organske tekućine koje se koriste kao vehikuli za pripremu otopina ili suspenzija u sintezi aktivnih farmaceutskih tvari. [3]

Specifikacija aktivne farmaceutske tvari treba sadržavati popis onečišćenja. Individualna onečišćenja sa specifičnim kriterijima prihvatljivosti u specifikaciji se iskazuju kao specificirana onečišćenja. Specificirana onečišćenja mogu biti identificirana i neidentificirana. Nespecificirana onečišćenja ograničena su općim kriterijima prihvatljivosti te nisu pojedinačno navedena u specifikaciji.[3]

Onečišćenja u farmaceutskim proizvodima mogu se klasificirati kao razgradni produkti farmaceutske tvari ili kao reakcijski produkti farmaceutske tvari i pomoćne tvari i/ili kontaktnog pakirnog materijala. Općenito se onečišćenja u aktivnoj farmaceutskoj tvari ne moraju pratiti ili specificirati u farmaceutskom proizvodu osim ako nisu razgradni produkti. Onečišćenja u farmaceutskim proizvodima mogu nastati tijekom proizvodnje i/ili čuvanja lijeka.[4]

Podnositelj regulatorne prijave za novu aktivnu farmaceutsku tvar treba prikazati stvarno prisutna, kao i potencijalna onečišćenja koja nastaju tijekom sinteze, pročišćivanja i skladištenja tvari. Taj se prikaz treba temeljiti na znanstvenoj procjeni kemijskih reakcija uključenih u sintezu, onečišćenjima povezanim sa sirovinama koja bi mogla doprinijeti profilu onečišćenja nove ljekovite tvari te mogućim produktima

razgradnje. Podnositelj prijave također treba prikazati laboratorijska ispitivanja provedena u svrhu detekcije onečišćenja u novoj ljekovitoj tvari. To uključuje rezultate ispitivanja serija proizvedenih tijekom razvojnog procesa, kao i serija proizvedenih komercijalnim procesom te rezultate stres studija (eng. stress testing) koje se koriste kako bi se identificirala potencijalna onečišćenja koja nastaju tijekom procesa skladištenja. Profil onečišćenja na komercijalnim serijama ljekovite tvari treba se usporediti s onima koje se koriste u razvoju te bi se svaka razlika trebala razmotriti.[3]

Stres studija ljekovite tvari može dati uvid u moguće produkte razgradnje, što pak može pomoći utvrditi putove razgradnje i intrinzičnu stabilnost molekule te potvrditi stabilitetno-indikativnu moć korištenih analitičkih postupaka. [11]

Svako prisutno onečišćenje koje prelazi granicu prijavljivanja (eng. reporting threshold) i ukupna onečišćenja uočena u serijama ljekovitih tvari namijenjenih za klinička, sigurnosna i stabilitetna ispitivanja, kao i u komercijalnim serijama, trebaju biti prijavljena skupa s naznačenom analitičkom metodom. Rezultati ispod 1,0% prikazuju se na dva decimalna mjesta, a rezultati iznad 1,0% se prikazuju na jedno decimalno mjesto. Preporučen je tablični prikaz rezultata onečišćenja. Sva onečišćenja koja prelaze granicu prijavljivanja trebaju biti zbrojena i prikazana kao ukupna onečišćenja. [3]

Specifikacija farmaceutskog proizvoda treba sadržavati popis razgradnih produkata koji se očekuju tijekom proizvodnje komercijalnog proizvoda, kao i tijekom preporučenih uvjeta skladištenja. [12] U predviđanju profila razgradnje komercijalnog proizvoda mogu biti korištene stabilitetne studije, kemijsko-razvojne studije te rezultati analiziranih serija. [13]

Preporuka je uključiti sljedeće vrste razgradnih produkata u specifikaciju farmaceutskog proizvoda, tamo gdje je primjenjivo: [13]

- svaki specificirani identificirani razgradni produkt
- svaki specificirani neidentificirani razgradni produkt

- svaki nespecificirani razgradni produkt s odgovarajućim kriterijem prihvatljivosti
- ukupni razgradni produkti

Kriterij prihvatljivosti za razgradne produkte ne bi trebao biti postavljen više od kvalifikacijskog nivoa. Ako postoji USP monografija koja uključuje limit za specificirane identificirane razgradne produkte, preporuka je da se kriteriji prihvatljivosti ne postavljaju iznad limita koje propisuje monografija. Ako je nivo razgradnih produkta iznad nivoa specificiranog u USP monografiji, pristupa se kvalifikaciji onečišćenja. [13] Kvalifikacija onečišćenja podrazumijeva dobivanje i evaluiranje podataka koji utvrđuju biološku sigurnost pojedinog onečišćenja ili određenog profila onečišćenja na specificiranim razinama. [3]

Organska onečišćenja se najčešće određuju kromatografskim postupcima, koji daju najtočnije rezultate. Kromatografske metode uključuju separaciju kojom se dobiva razlučivanje onečišćenja u odnosu na ljekovitu tvar koja se ispituje i detekciju koja omogućuje točno mjerenje onečišćenja. Kako je većina ljekovitih tvari polarna i nehlapljiva, HPLC je najčešća tehnika izbora za praćenje aktivnih tvari i njihovih onečišćenja. Pri tome se uglavnom koristi UV detektor.[14] Zadovoljavajuće odvajanje onečišćenja i/ili razgradnih produkata od glavne aktivne komponente lijeka zahtjeva optimizaciju brojnih kromatografskih parametara, uključujući: punilo kolone (vrstu stacionarne faze, veličinu čestica), sastav mobilne faze, način eluiranja i ostale parametre. HPLC metode za određivanje onečišćenja moraju biti usklađene s regulatornim zahtjevima, biti prenosive u laboratorije širom svijeta, ne bi smjele biti previše složene niti zahtijevati puno vremena za izvođenje te bi trebale biti relativno jeftine. [15]

3.3. HPLC

U tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti (HPLC) tekući uzorak ili kruti uzorak otopljen u prikladnom otapalu prolaze kroz kromatografsku kolonu nošeni tekućom mobilnom fazom. Razdvajanje sastavnica na kromatografskoj koloni određeno je interakcijama stacionarne faze i analita, što uključuje: adsorpciju, razdiobu, ionsku izmjenu, razdvajanje na temelju veličine čestica (eng. size exclusion), kao i interakcijama mobilne faze i analita. [16]

Kromatografske kolone su uglavnom izrađene od nehrđajućeg čelika, s unutarnjim promjerom od 2,1 mm do 4,6 mm te duljinom od oko 30 mm do 300 mm. Kolone su punjene česticama poroznog silikagela veličine 3-10 µm, koje mogu imati nepravilan ili sferični oblik. [16] Silika gel je najčešće punilo u kolonama korištenim u kromatografiji normalnih faza, pri čemu se mehanizam zadržavanja temelji na adsorpciji polarnih grupa molekula na polarne grupe stacionarne faze. Kolone s oktadecilsilil silikagelom najčešće se koriste u kromatografiji obrnutih faza, gdje se mehanizam zadržavanja temelji na razdjeljenju lipofilnog djela molekula na stacionarnoj fazi. Većina molekula lijekova sadrži i lipofilne i polarne grupe. Mobilna faza također uz stacionarnu fazu utječe na zadržavanje molekula. Polarnija mobilna faza će brže eluirati spoj s kolone koja sadrži silika gel kao stacionarnu fazu, dok će lipofilnija mobilna faza brže eluirati spoj s obrnuto-fazne kolone. [17] Oko 75% HPLC analitičkih metoda bazira se na obrnuto-faznoj kromatografiji, kako zbog sigurnosnih razloga korištenjem nepolarnih otapala, tako i zbog razlike u pripremi uzorka u odnosu na kromatografiju normalnih faza. [1]

Instrumenti se općenito sastoje od spremnika s mobilnom fazom, pumpe koja tjera mobilnu fazu kroz sustav pod visokim tlakom, injektora koji služi uvođenju uzorka u mobilnu fazu, kromatografske kolone, detektora te uređaja za prikupljanje podataka.[18]

Kada se tijekom analize koristi jedna mobilna faza fiksnog sastava, to se naziva izokratno eluiranje. U tekućinskoj kromatografiji je često teško pronaći jednu mobilnu fazu koja je prikladna za razdvajanje svih

spojeva. [16] Postupak kontinuiranog mijenjanja sastava otapala tijekom analize naziva se gradijentno eluiranje. [18] Pri tome je moguće riješiti problem velike razlike u vremenima zadržavanja različitih spojeva smjese.[16]

Postupak analize se općenito sastoji od:

1. uravnoteženja kolone i detektora mobilnom fazom određene brzine protoka, sve dok se ne dobije konstantan signal.

2. Injektiranja uzorka

3. Pokretanja gradijentnog programa

4. Snimanja kromatograma

5. Analiziranja propisanog farmakopejskom monografijom.[18]

Najpopularniji HPLC detektori se baziraju na spektroskopskom mjerenju, uključujući UV/Vis apsorpciju i fluorescenciju. Korištenjem UV/Vis detektora dobiva se kromatogram s prikazom ovisnosti apsorbancije o vremenu eluiranja. Protočna ćelija ima volumen 1-10 µL i duljinu optičkog puta od 0,2-1 cm. Jedna od ograničenja je ta da mobilna faza ne smije jako apsorbirati na valnoj duljini mjerenja. [16] UV/Vis detektori mogu biti fiksne valne duljine, varijabilnih valnih duljina ili detektori s diodnim nizom (eng. diode array detector; DAD). Ovi detektori su osjetljivi, imaju široko linearno područje i relativno su otporni prema temperaturnim promjenama i sastavu mobilne faze. Prikladni su za analite koji sadrže kromofore poput dvostruke veze i spojeve s nesparenim elektronima, kao npr. brom, jod i sumpor. [19]

Detektor varijabilnih valnih duljina koristi deuterijsku ili ksenonsku lampu kao izvor svjetlosti, a željena valna duljina se izolira pomoću monokromatora. DAD provodi istodobno mjerenje apsorbancije kao funkcije vremena eluiranja i određenog raspona valnih duljina. Tako se dobiva UV spektar za svaki eluirani kromatografski pik. [19]

Fluorescencija nastaje kada spoj apsorbira elektromagnetsko zračenje te zatim emitira zračenje veće valne duljine. Fluorescencija je svojstvo malog broja molekula lijekova pri čemu su fluorescencijski detektori bolja opcija od UV/Vis detektora zbog veće selektivnosti i osjetljivosti. Mora se voditi računa o izboru pH vrijednosti mobilne faze, kako fluorescencija ne bi bila umanjena ili prekinuta. [19]

Drugi često korišteni HPLC detektori su oni bazirani na elektrokemijskom mjerenju kao npr. amperometrija, voltametrija, kulometrija i konduktometrija. [16] Elektrokemijska detekcija može se koristiti za ionske spojeve ili spojeve koji se lako oksidiraju ili reduciraju. Ovaj se oblik detekcije može koristiti u analizi anorganskih iona, protolitičkih organskih spojeva kao što su amini i karboksilne kiseline te spojeva poput fenola, tiola i alkohola. [19]

Kod analita koji nemaju značajan kromofor, moraju se koristiti druge vrste detektora kao što su: detektori indeksa refrakcije, detektori raspršenja svjetlosti (eng. evaporating light-scattering detector; ELSD), detektori specifični za elemente, elektrokemijski i maseni detektori. [19]

Detektori indeksa refrakcije prate promjene u indeksu refrakcije mobilne faze koji se događa zbog prisutnosti otopljenih molekula analita. [19] Detektori indeksa refrakcije su gotovo univerzalni te se mogu primijeniti za gotovo sve komponente, no imaju slabiji limit detekcije: od 100 ng -1 µg injektiranog analita. Također, ova vrsta detektora nije primjenjiva kod gradijentnog eluiranja, osim ako komponente mobilne faze nemaju identičan indeks refrakcije. [16]

Detektor raspršenja svjetla u uparenom uzorku (ELSD) zahtjeva raspršenje eluensa, nakon čega se aerosol prevodi kroz zagrijanu cijev koja omogućuje isparivanje mobilne faze. Preostale čestice prolaze kroz snop svjetlosti, a raspršena svjetlost se zatim detektira pod fiksnim kutom. Mobilna faza mora biti hlapljiva, a analiti nižeg vrelišta od mobilne faze. [19]

Kemiluminiscencijski detektor (CLND) je vrlo selektivan i osjetljiv. Ako analit sadrži barem jedan atom dušika, može biti detektiran. [19]

Masena spektrometrija temelji se na principu stvaranja nabijenih molekula ili molekularnih fragmenata ili u visokom vakuumu ili neposredno prije nego uzorak uđe do područja visokog vakuuma. Ionizirane molekule nastaju u plinskoj fazi. Nabijene molekule u plinskoj fazi mogu se kretati pod utjecajem ili električnog ili magnetskog polja kako bi se odredila njihova molekulska masa i molekulska masa fragmenata koji nastaju raščlanjivanjem molekule. [17] Spektrometri masa spregnuti s HPLC instrumentima imaju dobru detekcijsku granicu, tipično od 100 pg – 1 ng injektiranog analita. Nadalje, spektrometri masa daju kvalitativne, strukturne informacije, pomoću čega se analit može identificirati i strukturno karakterizirati. Mnoge mobilne faze su inkompatibilne s masenim detektorima. [16]

3.4. Validacija analitičkih metoda

Validacija analitičkih metoda daje potvrdu da je metoda prikladna za namijenjenu svrhu.[20] Validacija metoda predstavlja zahtjev dobre proizvođačke prakse [9] te daje informacije koje su nužne za prijavu novog lijeka regulatornim tijelima. [2]

Veliki problem s kojim se suočavaju farmaceutske industrije u svijetu predstavljaju drugačiji validacijski zahtjevi za regulatorne prijave podnesene za odobravanje proizvoda ovisno o mjestu gdje se nalazi regulatorno tijelo. Npr. prijava bilo kojeg farmaceutskog proizvoda regulatornim tijelima u Europi, Japanu i SAD-u zahtjeva korištenje ICH kriterija validacije metoda. Međutim, prijava tog istog proizvoda od strane te iste industrije u nekom drugom dijelu svijeta zahtjeva korištenje njihovih lokalnih smjernica. Postupak prijave lijeka time postaje skuplji zbog izdavanja dokumentacije, osposobljavanja radnog osoblja, itd. Zbog svega navedenog postoji potreba i u tijeku je usklađivanje (harmonizacija) različitih validacijskih smjernica prema ICH smjernicama. [2]

Tipični validacijski parametri koji bi se trebali evaluirati, prema ICH Q2 smjernicama [20] jesu:

- Točnost
- Preciznost (ponovljivost, srednja preciznost i reproducibilnost)
- Specifičnost/selektivnost
- Limit detekcije (LOD)
- Limit kvantifikacije (LOQ)
- Linearnost
- Područje primjene

Specifičnost/selektivnost

Specifičnost/selektivnost je sposobnost nedvosmislenog potvrđivanja analita u prisutnosti ostalih komponenti, najčešće onečišćenja, razgradnih produkata, placeba. Ispitivanje specifičnosti potrebno je provesti tijekom validacije testova identifikacije, određivanja onečišćenja i sadržaja.

Identifikacijski testovi trebali bi moći razlikovati spojeve sličnih struktura za koje postoji vjerojatnost da su prisutne u uzorku. Moguće je potvrditi identitet usporedbom analiziranog uzorka koji sadrži analit s referentnom tvari. Uzorak koji ne sadrži analit mora dati negativan rezultat.

U kromatografskom ispitivanju sadržaja i onečišćenja, potrebno je prikazati reprezentativne kromatograme kako bi se potvrdila selektivnost metode. Pojedinačne komponente pri tome moraju biti označene. Za kritičnu separaciju komponenti, selektivnost se može prikazati razlučivanjem između dviju komponenti koje eluiraju međusobno blizu.

Ako su dostupna onečišćenja, potvrda selektivnosti za određivanje onečišćenja se može provesti cijepljenjem ispitivane aktivne farmaceutske tvari ili ljekovitog produkta s onečišćenjima na određenoj razini te dokazivanjem međusobne odvojenosti tih onečišćenja i/ili od ostalih komponenti u uzorku.

Ako onečišćenja nisu dostupna, selektivnost se može potvrditi usporedbom rezultata uzoraka koji sadrže onečišćenja s drugom validiranom metodom (npr. farmakopejskom). To uključuje uzorke koji su podvrgnuti stres ispitivanjima, odnosno utjecaju svjetla, topline, vlage, kiselinsko/bazne hidrolize te oksidacije.

Ispitivanje čistoće kromatografskog pika može potvrditi da kromatografski pik analita ne potječe od više od jedne tvari. (npr. DAD, masena spektrometrija).

Točnost

Točnost testa određivanja onečišćenja se ispituje cijepljenjem uzoraka (aktivne tvari ili ljekovitog oblika) s poznatom količinom onečišćenja. U slučaju kada onečišćenja nisu dostupna, prihvatljivo je usporediti rezultate drugim neovisnim postupkom. Potrebno je napraviti ispitivanje točnosti na minimalno tri koncentracijska nivoa i pripremiti najmanje tri uzorka po nivou.

Točnost se prikazuje kao postotak dobivenog sadržaja u odnosu na poznatu količinu analita/onečišćenja dodanog u uzorak ili kao razlika između rezultata mjerenja i prave/prihvaćene vrijednosti.

Preciznost

Preciznost analitičkog postupka pokazuje ponovljivost rezultata kroz seriju mjerenja napravljenih višestrukim uzorkovanjem i analiziranjem istog homogenog uzorka. Preciznost se može razmotriti na tri nivoa: ponovljivost, srednja preciznost (unutar laboratorija) i reproducibilnost (između laboratorija).

Ponovljivost izražava preciznost pod istim radnim uvjetima tijekom kratkog vremenskog intervala. Određuje se na minimalno 9 priprema uzorka koje pokrivaju radno područje, pri čemu 3 pripreme uzorka na 3 koncentracijska nivoa ili minimalno 6 priprema na 100% nivou ispitivane koncentracije.

Srednja (intermedijska) preciznost izražava varijacije unutar laboratorija: različiti dani, različiti analitičari, različita oprema, itd. Reproducibilnost izražava varijacije između laboratorija, odnosno različitih radnih uvjeta unutar specificiranih parametara metode.

Preciznost je sastavni dio validacije metoda za određivanje sadržaja i onečišćenja. Preporuka je izražavanje rezultata ispitivanja preciznosti kao standardna devijacija, relativna standardna devijacija (RSD) i interval pouzdanosti.

Limit detekcije

Limit detekcije je najniža koncentracija analita u uzorku koja se može detektirati, ali ne nužno i kvantificirati. Omjer signala i šuma od 3:1 se općenito smatra prihvatljivim.

Limit kvantifikacije

Limit kvantifikacije je najniža koncentracija analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti s odgovarajućom preciznošću i točnošću. Posebno se koristi za određivanje onečišćenja i/ili razgradnih produkata u uzorcima. Ima nekoliko pristupa određivanju limita kvantifikacije ovisno o tome da li je analiza instrumentalna ili nije.

Temeljeno na vizualnoj procjeni – Vizualna procjena limita kvantifikacije se uglavnom koristi kod ne-instrumentalnih metoda iako može biti korištena i kod instrumentalnih metoda. Limit kvantifikacije se općenito određuje analizom uzoraka poznate koncentracije analita utvrđivanjem najnižeg nivoa na kojem se analit može kvantitativno odrediti sa zadovoljavajućom točnosti i preciznosti.

Temeljeno na omjeru signala i šuma – Ovaj način je primjenjiv jedino u slučaju kada se može odrediti šum bazne linije. Određivanje omjera signala i šuma se provodi tako da se uspoređuju mjereni signali uzoraka poznate niske koncentracije analita s onima od slijepe probe i utvrđivanjem najmanje koncentracije kod koje analit može biti pouzdano kvantificiran. Prihvatljiv omjer signala i šuma je 10:1.

Temeljeno na mjerenju standardne devijacije kod određivanja odgovora detektora i nagiba pravca, limit kvantifikacije (LOQ) se računa prema formuli:

$$LOQ = \frac{10\,\sigma}{S}$$

gdje je σ = standardna devijacija odgovora

S = nagib kalibracijskog pravca

Nagib *S* može biti procijenjen iz kalibracijskog pravca analita. Procjena σ može biti napravljena na nekoliko načina, npr.:

Temeljeno na standardnoj devijaciji slijepe probe – Mjerenje veličine odgovora detektora u pozadini se provodi analiziranjem odgovarajućeg broja uzoraka slijepe probe i računanjem standardne devijacije ovih odgovora.

Temeljeno na kalibracijskom pravcu – Kalibracijski pravac mora biti utvrđen mjereći uzorke koji sadržavaju analit u koncentraciji oko limita kvantifikacije. Preostala standardna devijacija regresijske linije ili standardna devijacija y-odsječka može biti uzeta kao standardna devijacija.

Linearnost i područje primjene

Linearnost metode je njezina mogućnost da u zadanom području daje rezultate koji su izravno ili prema definiranoj matematičkoj transformaciji proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Linearnost se prvo uspostavlja vizualno kao graf ovisnosti signala o koncentraciji analita. Ako je procijenjen linearan odnos, potrebno je obraditi rezultate odgovarajućim statističkim metodama (npr. računanjem regresijskog pravca i metodom najmanjih kvadrata).[21] ICH preporučuje minimum 5 koncentracija za određivanje linearnosti. Područje primjene metode je interval između gornje i donje koncentracije analita, uključujući i te granice, za koje je potvrđena prihvatljiva preciznost, točnost i linearnost. Uobičajeno se iskazuje istim jedinicama kao i rezultat analize (npr. u postocima ili ppm)

Robusnost

Robusnost analitičke metode je mjera kapaciteta metode da ostane postojana uvođenjem malenih, ali namjernih promjena u analitički postupak. Može se utvrditi tijekom razvoja analitičke metode. [21]

Validacijski parametri koje je potrebno ispitati prema ICH Q2 smjernicama [20] za određene vrste analitičkih ispitivanja prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Validacijski parametri koje je potrebno ispitati prema ICH Q2 smjernicama za određene vrste analitičkih ispitivanja

Validacijski parametri	Identifikacija	Određivanje onečišćenja	Limit onečišćenja	Sadržaj
Točnost	-	+	-	+
Preciznost				
-Ponovljivost	-	+	-	+
-Srednja preciznost	-	+(1)	-	+(1)
Specifičnost (2)	+	+	+	+
LOD	-	-(3)	+	-
LOQ	-	+	-	-
Linearnost	-	+	-	+
Područje primjene	-	+	-	+

- parametar se najčešće ne evaluira

+ parametar se najčešće evaluira

(1) u slučajevima kada se provodi reproducibilnost, nije potrebno provesti ispitivanje srednje preciznosti

(2) nedostatna specifičnost analitičke metode može biti kompenzirana drugom analitičkom metodom

(3) u određenim slučajevima je potrebno ispitati

Ispitivanje prikladnosti sustava se temelji na konceptu da korištena oprema, elektronika, analitički postupci i uzorci koji se analiziraju čine integralni sustav koji se kao takav može evaluirati. [20]

U tekućinskoj kromatografiji je ispitivanje prikladnosti sustava integralni dio metode i služi osiguranju adekvatnog funkcioniranja kromatografskog sustava. Parametri koji se najčešće koriste u ispitivanju performansi kolone su: djelotvornost, vrijeme zadržavanja, razlučivanje i faktor simetrije. Faktori koji mogu utjecati na kromatografiju uključuju:

- sastav, ionsku jakost, temperaturu i pH mobilne faze
- brzinu protoka mobilne faze, dimenzije kolone, temperaturu kolone i tlak.
- karakteristike stacionarne faze [22]

Validacijska dokumentacija se tipično sastoji od: protokola, ispitivanih podataka i završnog izvještaja. Validacijski protokol treba imati odobrene kriterije prihvatljivosti. Općenito, validacijski protokol treba sadržavati sljedeće podatke: [1]

1. Načelo i cilj metode
2. Popis odgovornosti (uključeni laboratoriji i njihova uloga u validaciji)
3. Kategorizacija metode prema određenim regulatornim smjernicama, npr. ICH ili USP
4. Popis reagensa, uključujući i serijske brojeve te korištenih standarda
5. Ispitivani postupci za procjenu svakog validacijskog parametra i predloženi kriteriji prihvatljivosti
6. Plan ili postupak ako kriteriji prihvatljivosti ne budu ispunjeni
7. Zahtjevi za završni izvještaj

Dodatci:

1. Izvještaj
2. Metoda

Validacija se ne može provoditi sve dok validacijski protokol ne bude odobren. Jednom kada se provedu složeni validacijski eksperimenti, moguće su manje promjene u metodi, što obično zahtijeva dodatnu validaciju (RRF za srodne spojeve, LOQ, itd.), ali može uključivati male izmjene u SST (eng. System suitability test) zahtjevima. Ne bi trebale postojati temeljne promjene koje bi mogle promijeniti načela metodologije ili zahtijevati ponovnu validaciju. [1]

Analitičke metode mogu zahtijevati dodatnu validaciju ili revalidaciju u slučajevima da regulatorne agencije izdaju nove zahtjeve ili kada dolazi do promjene metodologije. Promjene u metodama i dodatne validacijske aktivnosti mogu biti zatražene kada je nastupila neka od navedenih promjena: [1]

1. Promjena instrumenata
2. Promjena u proizvodu
3. Modifikacije metode
4. Promjena analitičara
5. Zastarjela tehnologija

Revalidacija može biti potrebna u slučaju izmjena u sintetskom putu aktivne farmaceutske tvari, izmjene sastava farmaceutskog proizvoda i izmjene analitičkog postupka. Potrebni validacijski koraci provode se ovisno o stupnju izmjene. [1]

Jednom kada proizvod postane komercijalan i rutinski se testira u laboratoriju kontrole kvalitete (QC laboratoriju), može doći do promjena u metodama zbog istraga, optimizacija, novih pikova, valjanosti kolona itd. Značajnost navedenih izmjena se mora evaluirati da bi se utvrdilo da li i u kojoj mjeri je nužna revalidacija metode. Prethodna validacija se razmatra i parametri koji bi potencijalno mogli biti zahvaćeni promjenom u metodi se revalidiraju.[8]

Ako se analitička metoda modificira ili mijenja, proces je potrebno provesti uz korištenje uspostavljenog sustava kontrole izmjena. Nova metodologija trebala bi biti u korelaciji s postojećom metodologijom preko studije koja evaluira podatke analiziranih uzoraka pomoću obje metode.[1]

Primjerice, ako je došlo do promjene u sintetskom putu API-ja, ili je odabran novi dobavljač s drugačijim sintetskim putem, tada bi se trebali evaluirati parametri: specifičnost/selektivnost (pošto bi moglo doći do promjene u profilu onečišćenja), točnost i preciznost. Ako je došlo do promjene u pripremi otopine uzorka, bez promjene u koncentraciji otopine, bit će potrebno ispitati točnost i preciznost, no neće biti nužno ispitati područje, linearnost i robusnost, pošto nema promjene u kromatografskim uvjetima ili koncentraciji otopine uzorka. Za metode za gotove proizvode, uvođenje nove doze ne zahtijeva ispitivanje specifičnosti ili robusnosti, ako je formulacija proizvoda ista. U slučaju da je korišteno novo bojilo, potrebno je napraviti procjenu kako bi se osiguralo da boja ne interferira niti s jednom metodom, kao npr. da ne ko-eluira s nekim drugim kromatografskim pikom, ne veže se za aktivnu tvar. Ako se uvodi nova doza koja je izvan raspona već validiranih doza, tada je potrebno provesti ispitivanja: linearnosti, područja, točnosti, preciznosti. Ako se proizvod reformulira s jednim ili više novih pomoćnih tvari, tada je potrebno provesti ispitivanja: točnosti, preciznosti, specifičnosti/selektivnosti, ali ako nema promjene u koncentraciji API-ja ili kromatografskih uvjeta, tada se linearnost, područje i točnost ne moraju ponovno ispitati. [8]

3.5. Verifikacija analitičkih metoda

Potrebno je osigurati da metode koje se izvode po prvi puta u prihvatnom laboratoriju daju pouzdane rezultate. Verifikacija se sastoji od procijene određenih analitičkih karakteristika s ciljem da se prikupe odgovarajući i relevantni podaci umjesto da se ponavlja cijela validacija. Verifikacija mora sadržavati dokaz da se metoda prikladno koristi u prihvatnom laboratoriju, pod stvarnim uvjetima korištenja. Analitičar mora imati određeno znanje, iskustvo i vještine da razumije i da može provesti farmakopejsku metodu kao što je propisano. [5]

Farmakopejske metode koje su navedene u službenim monografijama su validirane od strane službenih laboratorija. Za farmakopejske metode je važno da svaki pojedini laboratorij provede verifikaciju metode koju namjerava koristiti u svom laboratoriju. [1]

Ako verifikacija farmakopejske metode nije uspješna, možda će biti neophodno razviti i validirati alternativnu metodu. Zahtjevi verifikacije moraju biti temeljeni na procjeni kompleksnosti te metode i materijala koji se analizira tom metodom. Samo one karakteristike koje se smatraju prikladnima za verifikaciju se moraju potvrditi. Na primjer, procjena specifičnosti je ključni parametar za verifikaciju farmakopejske metode. Nadalje, prihvatljiva specifičnost za kromatografske metode može biti verificirana zadovoljenjem parametra (zahtjeva) prikladnosti sustava za razlučivanje (ako je zadano metodom). Međutim, tvar koja se dobije od drugog dobavljača može imati drugačiji profil onečišćenja koji nije obuhvaćen farmakopejskom metodom. Slično tome, pomoćne tvari u gotovom proizvodu također mogu varirati od dobavljača do dobavljača i mogu potencijalno biti uzrok loše selektivnosti/specifičnosti metode, bilo da direktno interferiraju s analitom ili da utječu na pojavu onečišćenja koja nisu ispitana kroz validaciju farmakopejske metode. U takvim slučajevima, može se zahtijevati detaljnija provjera specifičnosti/selektivnosti metode da se potvrdi da je metoda prikladna za svoju namjenu. Prikladnost

metode u stvarnim uvjetima korištenja dodatno se može potvrditi određivanjem limita detekcije, limita kvantifikacije i preciznosti za određivanje onečišćenja. [5]

Postupak verifikacije analitičkih metoda tipično obuhvaća: laboratorijsko osoblje, odobreni verifikacijski protokol, usporedbu podataka, evaluaciju kriterija prihvatljivosti, konačnu dokumentaciju (izvještaj) te korektivne akcije, ako su nužne. [23] Rezultati koji odstupaju od kriterija prihvatljivosti kao i vjerojatan uzrok te korektivne akcije također trebaju biti prikazani u završnom izvještaju. [23]

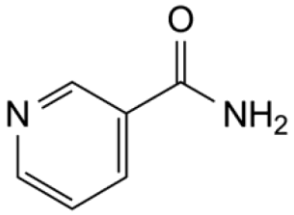
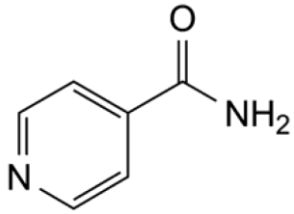
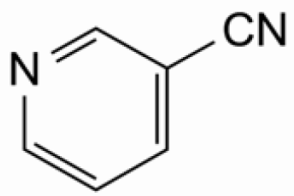
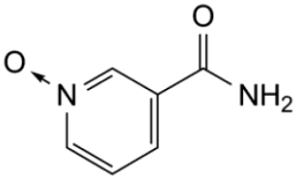
Verifikaciju nije potrebno provesti za osnovne farmakopejske metode koje se rutinski provode, osim ako postoji naznaka da farmakopejska metoda nije prikladna za uzorak koji se analizira. Primjeri osnovnih farmakopejskih metoda uključuju: gubitak sušenjem, ostatak nakon žarenja, različite "mokre" kemijske metode kao što je kiselinski broj i jednostavne instrumentalne metode kao što je određivanje pH vrijednosti. Kod primjene rutinskih postupaka po prvi put, preporuka je da se upotreba metode za svaki novi uzorak razmotri, bilo rukovanje s uzorkom bilo priprema uzorka za analizu. [5]

3.6. Eksperimentalni podaci

3.6.1. Farmakopejska metoda za određivanje srodnih spojeva u nikotinamidu

U pokusima su korištene referentne tvari navedeni u Tablici 2.

Tablica 2. Referentne tvari za određivanje srodnih spojeva u nikotinamidu

Spoj	Strukturna formula
Nikotinamid	
Piridin-4-karboksiamid (Izonikotinamid) (onečišćenje D)	
3-Piridinkarbonitril (onečišćenje B)	
Piridin-3-karboksiamid (Nikotinamid N-oksid) (onečišćenje E)	

Verifikacija je provedena na HPLC instrumentu Agilent Technologies 1200 Series, pri čemu je korištena kromatografska kolona YMC-Pack Pro C18, 150 mm x 4,6 mm, 3 µm. Monografija propisuje korištenje kromatografske kolone sa stacionarnom fazom oktadecilsilil silikagel za kromatografiju s deaktiviranim silanolnim skupinama R (3µm).

Brzina protoka mobilne faze iznosi 1,0 mL/min. Detekcija je vršena pomoću DAD na valnoj duljini od 264 nm. Volumen injektiranja je 20 µL, temperatura kolone i *autosamplera* je podešena na 25°C. Eluiranje je gradijentno, a vrijeme analize iznosi 24 min. Mobilna faza sastoji se od mobilne faze A i mobilne faze B. Prema monografiji se mobilne faze pripremaju na sljedeći način:

Razrijeđeni amonijak R3 se priprema razrjeđivanjem 0,7 g koncentriranog amonijaka vodom za kromatografiju R na volumen od 100 mL.

Mobilna faza A: Priprema se miješanjem 5,0 mL razrijeđene octene kiseline R i 900 mL vode za kromatografiju R, uz dodatak 30 mL razrijeđenog amonijaka R3 i 15 mL acetonitrila R. Smjesa se dopuni do volumena od 1 L dodatkom vode za kromatografiju R.

Mobilna faza B: Priprema se miješanjem acetonitrila R i mobilne faze A u volumnom omjeru 50/50.

Prikladnost kromatografskog sustava ispituje se prema Ph.Eur. 9.2. [24] pri čemu zahtjev za razlučivanje između pikova nikotinamida i onečišćenja D iznosi najmanje 2,0. Kako bi se postiglo razlučivanje (tijekom ispitivanja prikladnosti sustava) bilo je potrebno podesiti pH mobilne faze A, pošto pH vrijednost pripremljene otopine varira sa svakom novom pripremom. Ustanovljeno je da pH vrijednost veća od 4,3 rezultira razlučivanjem manjim od 2,0 (između onečišćenja D i nikotinamida) u odnosu na mobilnu fazu s pH 4,0, pri čemu nisu mijenjani gradijent niti ostali instrumentalni parametri. Prema tome je priprema mobilne faze propisana na sljedeći način:

Razrijeđeni amonijak se priprema razrjeđivanjem 4,2 g koncentriranog amonijaka vodom za kromatografiju R na volumen od 100 mL.

Mobilna faza A: Priprema se miješanjem 5,0 mL razrijeđene octene kiseline R i 900 mL vode za kromatografiju R, uz dodatak 5,0 mL razrijeđenog amonijaka. Smjesa se dopuni do volumena od 1 L

dodatkom vode za kromatografiju R. pH se podesi na 4,10 ± 0,10 (pri čemu optimalna pH vrijednost iznosi 4,00).

Mobilna faza B: Acetonitril

Korišteni razrijeđeni amonijak u pripremi mobilne faze A je 6 puta koncentriraniji od razrijeđenog amonijaka R3 propisanog Ph.Eur. 9.2 [24], no sukladno tome dodan je 6 puta manji volumen te je koncentracija amonijaka u mobilnoj fazi A ostala ista.

Kako bi se postupak izvođenja olakšao, promijenjen je postotak mobilne faze A i mobilne faze B u gradijentu, kao što je prikazano u Tablici 3., ali je konačni postotak svake od komponenti u svakoj točki gradijenta ostao nepromijenjen.

Tablica 3. Izmjena metode za određivanje srodnih spojeva u nikotinamidu u odnosu na monografiju

Kromatografski parametar	**Ph.Eur. 9.2**				**Predložena metoda**			
Gradijentno eluiranje	**t/min**	**% MF A**	**% MF B**	**% ACN u sustavu**	**t/min**	**% MF A**	**% MF B**	**% ACN u sustavu**
	0,0	98	2	2,5	0,0	97,5	2,5	2,5
	2,0	98	2	2,5	2,0	97,5	2,5	2,5
	16	0	100	50,8	16	49,2	50,8	50,8
	16,1	početni sastav			16,1	početni sastav		

Za izračun sadržaja srodnih spojeva korištena je metoda vanjskog standarda.

Ph.Eur. 9.2. [24] propisuje računanje sadržaja srodnih spojeva korištenjem razrijeđenog uzorka kao otopine standarda. Tijekom verifikacije je pripremljena otopina standarda nikotinamida, otapanjem standarda nikotinamida u otapalu, pri čemu je dobivena ista koncentracija (1 µg/mL). Sadržaj onečišćenja izračuna se prema sljedećem izrazu:

$$Onečišćenje(\%) = \frac{A_{imp}}{A_{Nic}} \times 0{,}1$$

Izračun je prikladan ako se otopina standarda priprema razrjeđivanjem otopine uzorka gdje je:

A_{imp} – površina pika onečišćenja u otopini uzorka

A_{Nic} – površina pika nikotinamida u 0,1%-tnoj otopini uzorka (otopini standarda)

Izračun koji je prikladan ako se otopina standarda priprema korištenjem nikotinamida kao referentne tvari:

Izračuna se faktor odgovora (RF) injektiranih otopina standarda pomoću jednadžbe:

$$RF = \frac{A_S}{C}$$

gdje je:

C – koncentracija nikotinamida u otopini standarda (mg/mL)

A_s – površina pika nikotinamida u otopini standarda

Izračuna se srednji faktor odgovora nikotinamida (<RF>) svih injektiranih otopina standarda.

$$Onečišćenje(\%) = \frac{A_{imp} \times V}{< RF > \times m_u} \times 100$$

gdje je:

A_{imp} – površina pika svakog poznatog ili nepoznatog onečišćenja u otopini uzorka

V – volumen otopine uzorka [mL]

<RF> – srednji faktor odgovora nikotinamida u otopinama standarda

m_u – masa uzorka [mg]

Specifikacija onečišćenja zahtijeva:

Pojedinačna nespecificirana onečišćenja: najviše 0,10%

Ukupna onečišćenja: najviše 0,2%

Granica prijavljivanja iznosi 0,05 %.

3.6.2. Farmakopejska metoda za određivanje graničnih vrijednosti formaldehida i acetaldehida u polietilen glikolu 3350

Polietilen glikol 3350 je adicijski polimer etilen-oksida i vode, opće formule $H(OCH_2\ CH_2)_nOH$, gdje „n“ predstavlja prosječan broj oksietilenskih grupa. Prosječna molekulska masa iznosi 3015-3685 g/mol. [25]

U pokusima su korištene referentne tvari navedeni u Tablici 4.

Tablica 4. Referentne tvari za određivanje onečišćenja u polietilen glikolu 3350

Spoj
Formaldehid-2,4-DNPH otopina, 100 µg/mL u acetonitrilu
Acetaldehid-2,4-DNPH otopina, 1000 µg/mL u acetonitrilu

Verifikacija je provedena na HPLC instrumentu Agilent Technologies 1200 Series, pri čemu je korištena kromatografska kolona Agilent Zorbax Eclipse XDB C8, 150 mm x 3,0 mm, 3,5 µm. Stacionarnu fazu čini oktil silan (C_8) kemijski vezan na porozne čestice silikagela.

Brzina protoka mobilne faze iznosi 0,65 mL/min. Detekcija je vršena spektrofotometrijski na valnoj duljini od 360 nm. Volumen injektiranja je 5 µL, temperatura kolone iznosi 30°C, a temperatura *autosamplera* je 8°C. Eluiranje je gradijentno, a vrijeme analize iznosi 16 min.

Mobilna faza se sastoji od mobilne faze A (vode) i mobilne faze B (acetonitrila).

Gradijentni program eluiranja prikazan je u Tablici 5.

Tablica 5. Gradijentni program u HPLC metodi za određivanje onečišćenja u polietilen glikolu 3350

Vrijeme, min	**% MF A**	**% MF B**
0,0	50	50
11,0	0	100
11,01	početni sastav	
16,0	početni sastav	

Prikladnost kromatografskog sustava ispituje se prema USP 40-NF35 S1 [25], pri čemu razlučivanje između pikova formaldehida i acetaldehida u otopini standarda iznosi najmanje 2,0.

Derivatizacija analita:

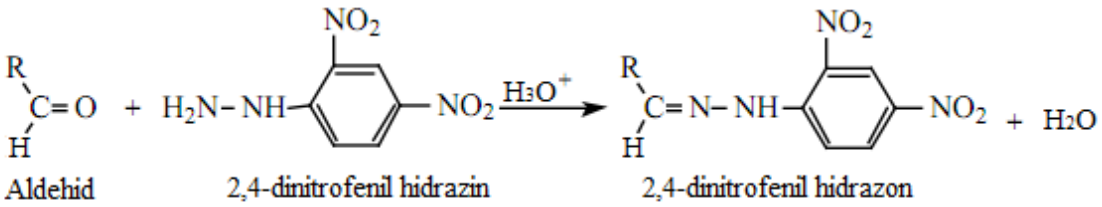
Formaldehid i acetaldehid u uzorku polietilen glikola 3350 određuju se nakon provođenja derivatizacije otopine uzorka s otopinom 2,4-dinitrofenil hidrazina (2,4-DNPH).

2,4-DNPH otopina priprema se tako da se odvaže 250 mg 2,4-DNPH u tikvicu od 50 mL, zatim se doda 20,0 mL acetonitrila i promiješa kružnim pokretima. Nakon toga se doda 3,0 mL koncentrirane klorovodične kiseline te opet promiješa i stavi u ultrazvučnu kupelj dok se krutina ne otopi te dopuni acetonitrilom do oznake.

Otopina uzorka priprema se tako da se odvaže 0,5 g polietilen glikola 3350 u tikvicu od 10 mL, zatim se doda 1,0 mL acetonitrila u tikvicu i promiješa kružnim pokretima dok se uzorak ne otopi. Derivatizacija se provodi dodatkom 2,0 mL pripremljene 2,4-DNPH otopine u tikvicu i miješanjem kružnim pokretima. Otopina se ostavi 15 min da se odvije reakcija te se dopuni acetonitrilom do oznake.

Uobičajeni analitički postupak koji se koristi u određivanju karbonilnih spojeva uključuje reakciju sa 2,4-dinitrofenil hidrazinom (nukleofil) u kiselom mediju pri čemu nastaje 2,4-dinitrofenil hidrazon. Reakcija je

prikazana na Slici 1. Nastali hidrazoni se mogu odvojiti korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). [26]



Slika 1. Reakcija aldehida sa 2,4- dinitrofenil hidrazinom

Izračun sadržaja formaldehida i acetaldehida:

Izračun sadržaja formaldehida i acetaldehida proveden je koristeći formaldehid-2,4-DNPH otopinu i acetaldehid-2,4-DNPH otopinu u pripremi otopine standarda.

Izračuna se faktor odgovora (RF) injektiranih otopina standarda pomoću jednadžbe:

$$RF = \frac{A_S}{C}$$

gdje je:

C – koncentracija formaldehida ili acetaldehida u otopini standarda (mg/mL) (0,00075 mg/mL za formaldehid i 0,006 mg/mL za acetaldehid)

A_s – površina pika formaldehida ili acetaldehida u otopini standarda

Izračuna se srednji faktor odgovora formaldehida i acetaldehida (<RF>) svih injektiranih otopina standarda.

$$Formaldehid/Acetaldehid\ (ppm) = \frac{A^* \times V}{< RF > \times m_u} \times 10^6$$

gdje je:

A – površina pika formaldehida ili acetaldehida u otopini uzorka

*za površinu pika formaldehida u otopini uzorka koristi se korigirana površina (korigirana površina pika formaldehida u otopini uzorka dobiva se oduzimanjem površine interferirajućeg pika iz slijepe probe od površine pika u uzorku). Ako je interferirajući pik u slijepoj probi manji od 10% površine pika formaldehida u standardnoj otopini, nije potrebno provoditi korekciju, a ako je veći, potrebno je provesti korekciju.

V – volumen otopine uzorka [mL]

<RF> – srednji faktor odgovora formaldehida ili acetaldehida u otopinama standarda

m_u – masa uzorka [mg]

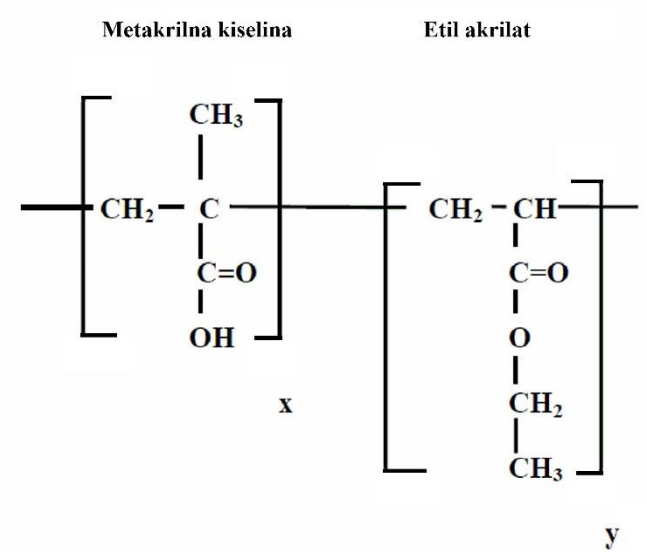
Specifikacija onečišćenja zahtijeva:

Formaldehid: najviše 15 μg/g

Zbroj formaldehida i acetaldehida: najviše 200 μg/g

3.6.3. Farmakopejske metode za određivanje etil akrilata i metakrilne kiseline u kopolimeru metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1) te u 30%-tnoj disperziji kopolimera metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1)

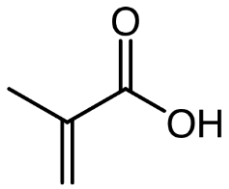
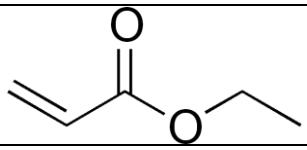
Kopolimer metakrilne kiseline i etil akrilata (Slika 2.) ima srednju relativnu molekulsku masu 250 000. Omjer kiselinskih i esterskih skupina iznosi oko 1:1. Tip A polimera je u obliku kiseline, dok je tip B polimera djelomično neutraliziran pomoću natrijevog hidroksida. Moguće je da sadrži prikladne površinski aktivne tvari, kao npr. natrijev dodecil sulfat i polisorbat 80. 30%-tna disperzija kopolimera metakrilne kiseline i etil akrilata predstavlja disperziju ovog polimera u vodi. [27,28]



Slika 2. Kopolimer metakrilne kiseline i etil akrilata

U pokusima su korištene referentne tvari navedeni u Tablici 6.

Tablica 6. Referentne tvari za određivanje onečišćenja u kopolimeru metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1) te u njegovoj 30%-tnoj disperziji

Spoj	Strukturna formula
Metakrilna kiselina	
Etil akrilat	

Verifikacija je provedena na HPLC instrumentu Shimadzu LC-2010C HT, pri čemu je korištena kromatografska kolona Nucleosil C18 125 x 4,6mm 7µm. Stacionarna faza je oktadecilsilil silikagel za kromatografiju s deaktiviranim silanolnim skupinama.

Mobilna faza pripremljena je miješanjem metanola i vode, kojoj je prethodno podešen pH na 2,0 pomoću koncentrirane fosforne kiseline, u volumnom omjeru: 200:800.

Brzina protoka mobilne faze iznosi 2,0 mL/min. Detekcija je vršena spektrofotometrijski na valnoj duljini od 202 nm. Volumen injektiranja je 20 µL. Eluiranje je izokratno, a vrijeme analize iznosi 12 min.

Prikladnost kromatografskog sustava ispituje se prema Ph.Eur. 9.0. pri čemu zahtjev za razlučivanje između pikova metakrilne kiseline i etil akrilata u kromatogramu otopine standarda iznosi najmanje 5,0.

Za izračun sadržaja etil akrilata i metakrilne kiseline korištena je metoda vanjskog standarda. U pripremi otopina standarda korišteni su metakrilna kiselina i etil akrilat. Izračuna se faktor odgovora (RF) etil akrilata i metakrilne kiseline pomoću jednadžbe:

$$RF = \frac{A_S}{C}$$

gdje je:

C - koncentracija etil akrilata/metakrilne kiseline u otopini standarda (mg/ml)

A_s - površina pika etil akrilata/metakrilne kiseline u otopini standarda

Izračuna se srednji faktor odgovora etil akrilata/metakrilne kiseline (<RF>) svih injektiranih otopina standarda. Sadržaj onečišćenja izračuna se prema izrazu, a gdje je:

$$Etil\ akrilat/metakrilna\ kiselina\ (\%) = \frac{A_{ia} \times V}{< RF > \times m} \times 100$$

V – volumen otopine uzorka (uključujući faktor razrjeđenja) [mL]

m – masa uzorka (ako je analizirani uzorak 30%-tna disperzija kopolimera metakrilne kiseline i etil akrilata, masa uzorka je 30% izmjerene odvage uzorka disperzije) [mg]

A_{ia} – površina pika etil akrilata/metakrilne kiseline u otopini uzorka

<RF> – srednji faktor odgovora etil akrilata/metakrilne kiseline u otopinama standarda

Specifikacija za kopolimer metakrilne kiseline i etil akrilata i za 30%-tnu disperziju kopolimera metakrilne kiseline i etil akrilata zahtijeva:

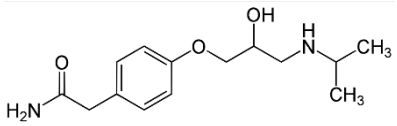
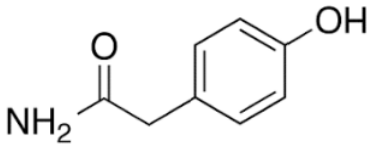
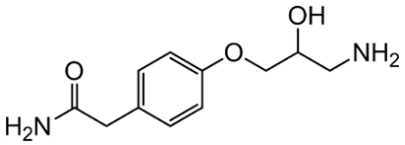
Zbroj sadržaja etil akrilata i metakrilne kiseline: najviše 0,01%

Granica prijavljivanja iznosi 1 ppm

3.6.4. Metoda za određivanje onečišćenja A i onečišćenja J (Ph. Eur.) u farmaceutskom proizvodu koji sadrži djelatnu tvar atenolol

U pokusima su korištene referentne tvari navedeni u Tablici 7.

Tablica 7. Referentne tvari za određivanje onečišćenja u farmaceutskom proizvodu s atenololom

Spoj	Strukturna formula
Atenolol	
Onečišćenje A (Ph. Eur.)	
Onečišćenje J (Ph. Eur.)	

Verifikacija je provedena na HPLC instrumentu Agilent Technologies 1200 Series, pri čemu je korištena kromatografska kolona: Waters Symmetry C18, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm. Stacionarnu fazu čini oktadecilsilil silikagel.

Brzina protoka mobilne faze iznosi 1,0 mL/min. Detekcija je vršena spektrofotometrijski pomoću DAD na valnoj duljini od 226 nm. Volumen injektiranja je 20 µL, temperatura kolone je podešena na 30°C. Eluiranje je izokratno, a vrijeme analize iznosi 50 min za otopine uzorka, slijepu probu i otopinu za određivanje razlučivanja te 20 min za otopine standarda.

Mobilna faza je smjesa metanola, tetrahidrofurana i pufera u volumnim omjerima (180:20:800). pH vrijednost mobilne faze treba iznositi 3,0. Pufer se priprema tako da se 3,4 g kalijevog dihidrogenfosfata

(KH_2PO_4), 0,8 g natrijevog oktansulfonata i 0,4 g tetrabutilamonijevog hidrogensulfata otopi u vodi i dopuni vodom do 1000 mL. pH vrijednost otopine se podesi na 2,7 pomoću koncentrirane fosforne kiseline.

Prikladnost kromatografskog sustava se ispituje pomoću otopine koja se priprema korištenjem standarda Britanske farmakopeje (BP), Atenolol impurity CRS. 5,0 mg standarda se otopi u 0,1 mL dimetil sulfoksida (DMSO) te se razrijedi na volumen od 5 mL mobilnom fazom. Pik bis-etera prethodi piku (dubleta) tercijarnog amina, od kojeg treba biti sasvim odvojen. Kako bi se zadovoljili kriteriji prikladnosti kromatografskog sustava, moguće je podesiti koncentraciju natrijevog oktansulfonata u mobilnoj fazi. Povećanjem koncentracije natrijevog oktansulfonata, vrijeme zadržavanja tercijarnog amina se povećava, dok smanjenje koncentracije natrijevog oktansulfonata značajno smanjuje razlučivanje između pikova bis-etera i tercijarnog amina. Pik koji potječe od DMSO, s relativnim zadržavanjem od 0,27 u odnos na atenolol se zanemaruje.

Za izračun sadržaja onečišćenja korištena je metoda vanjskog standarda. U pripremi otopina standarda korišten je radni standard atenolola. Izračuna se faktor odgovora (RF) injektiranih otopina standarda pomoću jednadžbe:

$$RF = \frac{M_{ST} \times P_{ST}}{100 \times A_{ST} \times V_R}$$

gdje je:

M_{ST} – odvaga standarda [mg]

P_{ST} – sadržaj atenolola u standardu [%]

A_{ST} – površina pika atenolola u otopini standarda

V_R – volumen razrjeđenja [mL]

Izračuna se srednji faktor odgovora atenolola (<RF>) svih injektiranih otopina standarda.

Pojedinačna onečišćenja iskazana u postocima (%) računaju se prema sljedećoj formuli:

$$Onečišćenje(\%) = \frac{A_{ON} \times RF \times V_R \times M_{SR} \times 100}{M_{UZ} \times Q}$$

gdje je :

A_{ON} – površina pika pojedinačnog onečišćenja u otopini uzorka

V_R – volumen razrjeđenja

M_{SR} – prosječna masa pojedinačnog dozirnog oblika farmaceutskog proizvoda koji sadrži atenolol [mg]

M_{UZ} – masa uzorka [mg]

Q – sadržaj atenolola po dozirnoj jedinici

Specifikacija farmaceutskog proizvoda zahtijeva:

Onečišćenje A: najviše 0,2%

Onečišćenje G: najviše 0,5%

Onečišćenje J: najviše 0,2%

Ostala onečišćenja, pojedinačno: najviše 0,2%

Ukupna onečišćenja: najviše: 0,5%

Granica odbacivanja iznosi 0,05%.

4. REZULTATI

4.1. Verifikacija farmakopejske metode za određivanje srodnih spojeva u nikotinamidu

Provedena je verifikacija metode za određivanje srodnih spojeva u nikotinamidu pomoću HPLC-a prema monografiji Europske farmakopeje. [24] Provedene su sljedeća ispitivanja kako bi se potvrdilo da je predložena analitička metoda uspješno implementirana u Kontrolu kvalitete u Plivi:

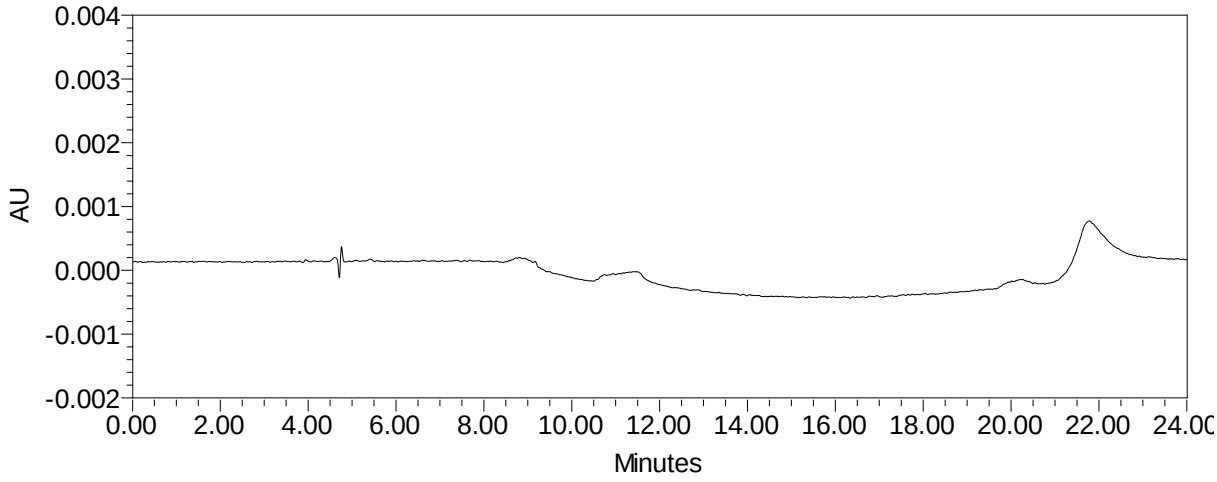
1) Selektivnost

2) Preciznost

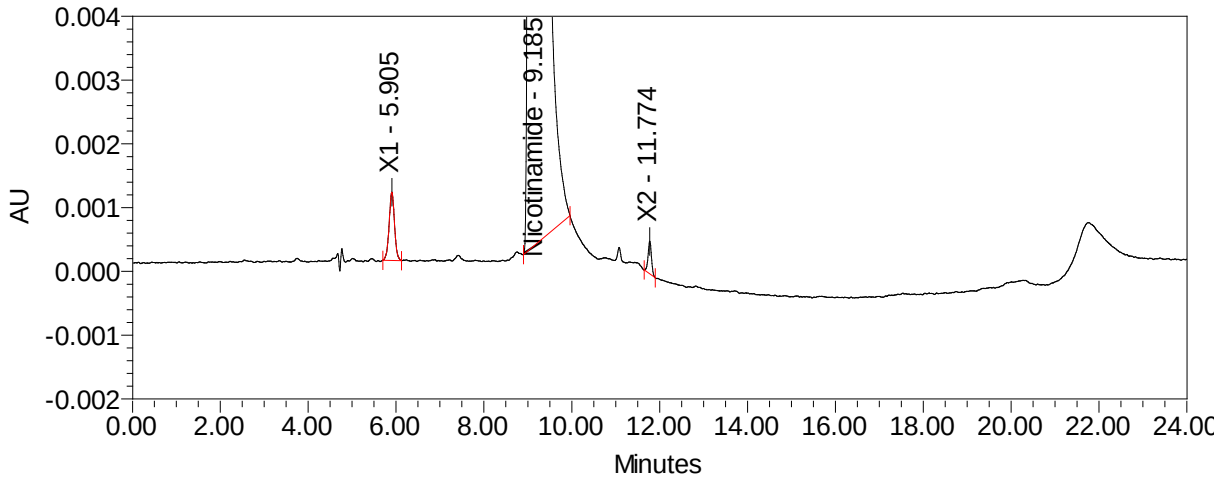
3) Limit kvantifikacije

4) Stabilnost

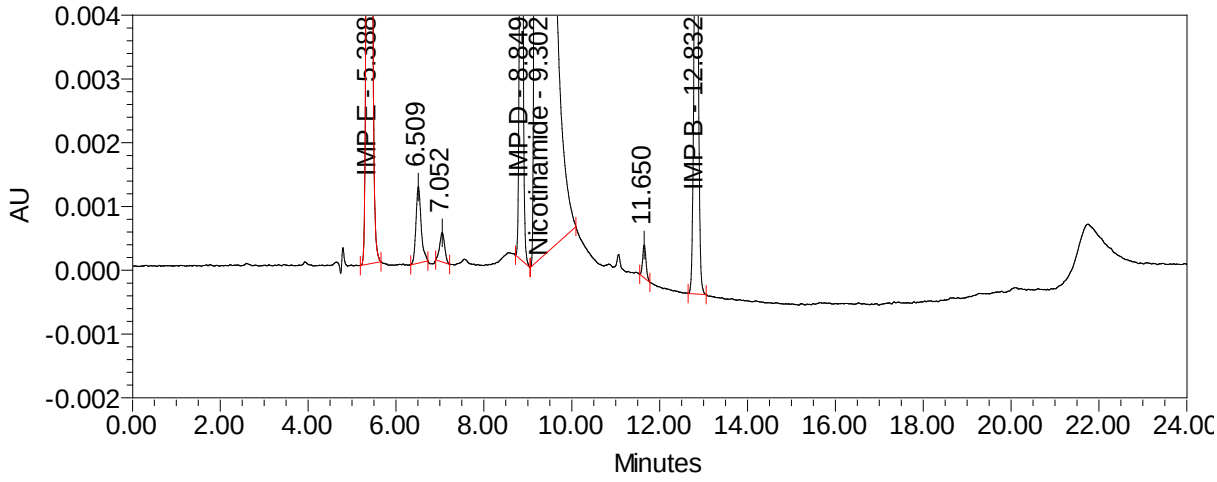
1) Selektivnost je provjerena evaluacijom kromatograma slijepe probe, otopine standarda, otopine uzorka, otopine uzorka cijepljene s dostupnim onečišćenjima te otopina dostupnih onečišćenja. Reprezentativni kromatogrami prikazani su na Slikama 3., 4., 5. x-os označava vrijeme u minutama, y-os signal u apsorpcijskim jedinicama (AU).



Slika 3. Kromatogram slijepe probe



Slika 4. Kromatogram otopine uzorka nikotinamida



Slika 5. Kromatogram otopine uzorka cijepljene s dostupnim onečišćenjima (B, D i E)

2) Preciznost je provjerena koristeći podatke iz ponovljivosti i srednje preciznosti. Pošto je otopina uzorka sadržavala onečišćenje s omjerom signala i šuma (S/N) većim ili jednakim 10, napravljeno je 6 priprema uzoraka bez cijepljenja s onečišćenjima. Srednja preciznost je provjerena koristeći drugu HPLC kolonu, tijekom drugog dana, uz istog analitičara. Rezultati dobiveni ispitivanjem preciznosti za onečišćenja X1 i X2 prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8. Rezultati ispitivanja preciznosti

Verifikacijski parametar	Parametar procjene	Kriterij prihvatljivosti	Rezultati			Status
Ponovljivost 1. dan i 2. dan	Relativna standardna devijacija	≤ 25%	1. dan	X1	1,0%	**Odgovara**
				X2	4,4%	**Odgovara**
			2. dan	X1	1,4%	**Odgovara**
				X2	1,5%	**Odgovara**
Srednja preciznost	Apsolutna razlika srednjih rezultata	NMT 0,03%	X1	0,00 %		**Odgovara**
			X2	0,00 %		**Odgovara**
	Skupna RSD	≤ 25%	X1	1%		**Odgovara**
			X2	3%		**Odgovara**

3) Limit kvantifikacije je provjeren injektiranjem otopine standarda i uzorka tijekom ispitivanja preciznosti. LOQ je utvrđen koristeći omjer signala i šuma (S/N). Dodatno, LOQ je ispitan za dostupna onečišćenja (B, D, E). Zahtjev: S/N na specifikacijskom nivou (0,10%) bi trebao iznositi ≥ 20. Ako to nije postignuto, RSD od 6 injektiranja treba iznositi ≤ 25%. Rezultati su prikazani u Tablici 9.

Tablica 9. Rezultati ispitivanja limita kvantifikacije za onečišćenja u nikotinamidu

Verifikacijski parametar	**Parametar procjene**	**Kriterij prihvatljivosti**	**Rezultati**			**Status**
LOQ	S/N	S/N ≥ 20	**Otopina**	**S/N**	**koncentracija otopine pri kojoj je S/N=10**	
			Otopina standarda - nikotinamid	855	0,012 µg/mL (nivo od 0,0012 %)	**Odgovara**
			Otopina uzorka - X1 onečišćenje	40	0,04 µg/mL (nivo od 0,004%)	**Odgovara**
			Onečišćenje B	217	0,045 µg/mL (nivo od 0,0045 %)	**Odgovara**
			Onečišćenje D	387	0,027 µg/mL (nivo od 0,0027 %)	**Odgovara**
			Onečišćenje E	2526	0,004 µg/mL (nivo od 0,0004 %)	**Odgovara**

4) Stabilnost je provjerena injektiranjem pripremljenih otopina standarda i uzorka nakon određenog vremena i usporedbom sa svježe pripremljenim otopinama standarda. Tijekom ovih eksperimenata, ispitivane otopine su čuvane u *autosampleru* na temperaturi propisanoj metodom.

Razlika u faktorima odgovora otopine standarda nakon 72h i svježe pripremljene otopine iznosi 0,5%, pri čemu kriterij prihvatljivosti iznosi najviše 10%. Apsolutna razlika sadržaja onečišćenja X1 i onečišćenja X2 otopine uzorka nakon 73h u odnosu na svježe pripremljenu otopinu iznosi 0,000% za oba onečišćenja. Kriterij prihvatljivosti iznosi najviše 0,03%

4.2. Verifikacija farmakopejske metode za određivanje graničnih vrijednosti formaldehida i acetaldehida u polietilen glikolu 3350

Provedena je verifikacija metode za određivanje graničnih vrijednosti formaldehida i acetaldehida u polietilen glikolu 3350 pomoću HPLC-a prema monografiji Američke farmakopeje (USP 40-NF35 S1). Provedena su sljedeća ispitivanja kako bi se potvrdilo da je predložena analitička metoda uspješno implementirana u Kontrolu kvalitete u Plivi:

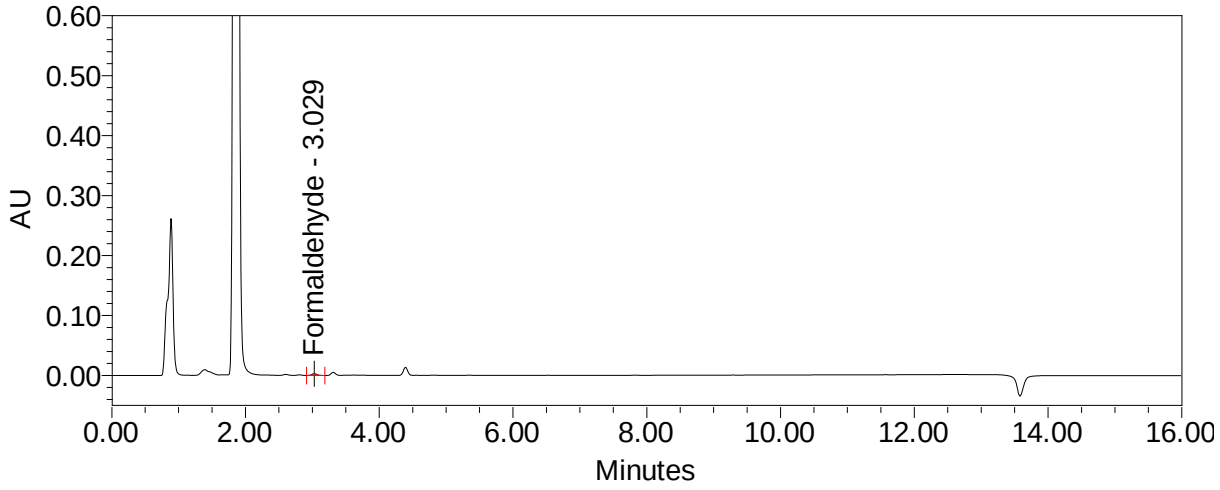
1) Selektivnost

2) Preciznost

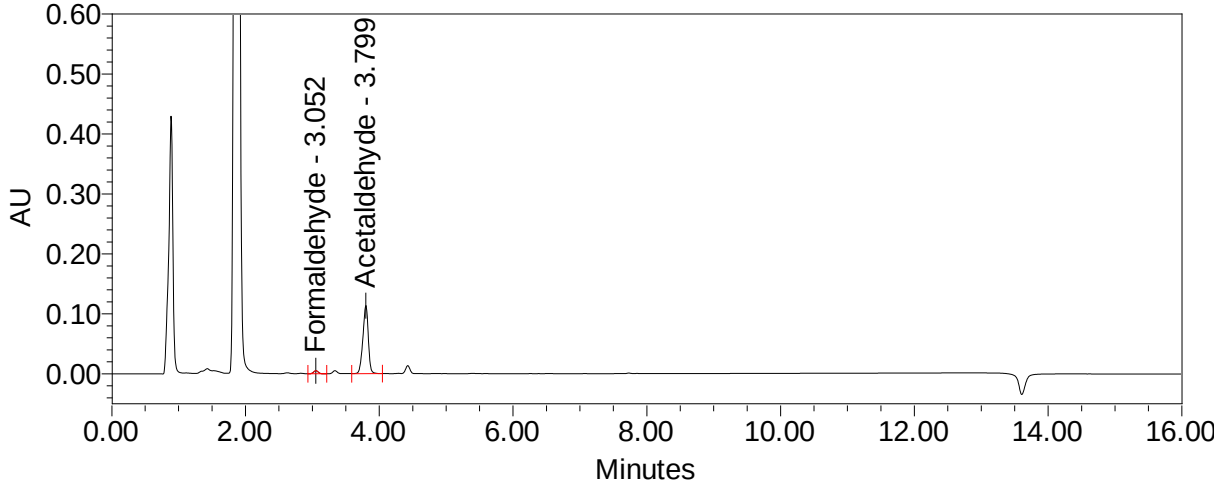
3) Limit kvantifikacije

4) Stabilnost

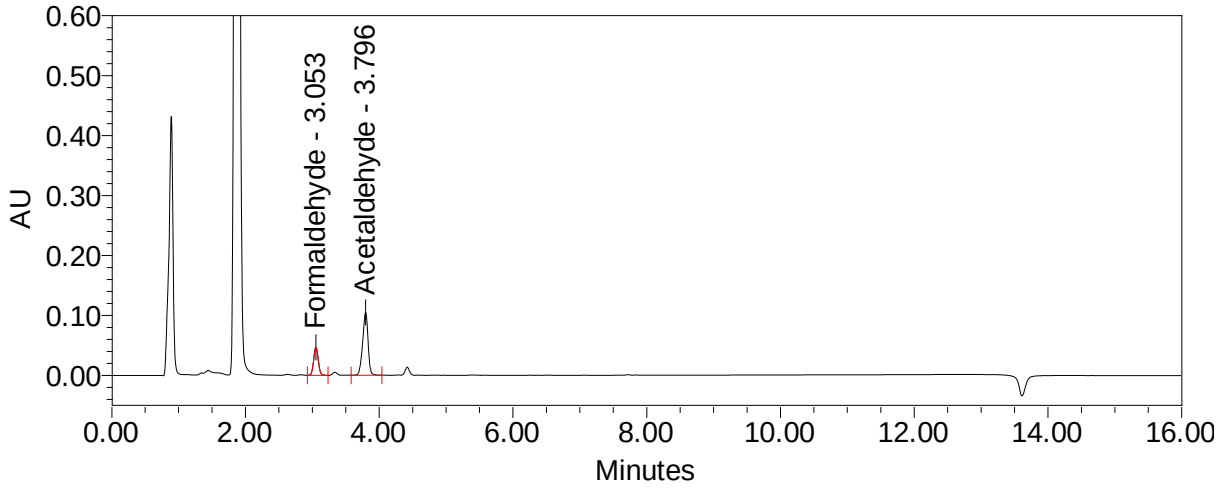
1) Selektivnost je provjerena evaluacijom kromatograma slijepe probe, otopine standarda i otopine uzorka. Reprezentativni kromatogrami prikazani su na Slikama 6., 7., 8. x-os označava vrijeme u minutama, y-os signal u apsorpcijskim jedinicama (AU).



Slika 6. Kromatogram slijepe probe



Slika 7. Kromatogram otopine uzorka



Slika 8. Kromatogram otopine uzorka cijepljene s formaldehidom

2) Preciznost je provjerena koristeći podatke iz ponovljivosti i srednje preciznosti. Pošto je otopina uzorka sadržavala acetaldehid iznad kvantifikacijskog limita (LOQ) i formaldehid ispod kvantifikacijskog limita, napravljeno je 6 priprema uzoraka bez cijepljenja s acetaldehidom, ali cijepljenih s formaldehidom. Prema tome, 6 otopina uzorka je pripremljeno prema metodi opisanoj u monografiji, uz cijepljenje s otopinom formaldehida na nivou od 0,75 µg/mL (15 ppm) te analizirano. Dvije otopine uzorka pripremljene su prema metodi bez cijepljenja.

Srednja preciznost je provjerena koristeći drugu HPLC kolonu, na istom HPLC instrumentu, tijekom drugog dana, uz istog analitičara. Rezultati ispitivanja preciznosti prikazani su u Tablici 10.

Tablica 10. Rezultati ispitivanja preciznosti

Ponovljivost (1. i 2. dan)				
	Kriterij prihvatljivosti	**1. dan**	**2. dan**	**Status**
Acetaldehid				
RSD priprema	≤ 25%	0,1 %	0,2 %	**Odgovara**
Formaldehid				
Analitički prinos	75% - 125%	98,6%	96,3%	**Odgovara**
RSD priprema	≤ 25%	0,6 %	0,2 %	**Odgovara**
Srednja preciznost - Acetaldehid				
Relativna razlika srednjih rezultata (1. i 2. dan)	≤ 25%	0,0%		**Odgovara**
Skupna RSD (1. i 2. dan)	≤ 25%	0,1%		**Odgovara**

3) Limit kvantifikacije je provjeren injektiranjem otopine standarda tijekom ispitivanja preciznosti. Izmjeren je omjer signala i šuma (S/N) za pikove formaldehida i acetaldehida. Izračunata je koncentracija otopine pri kojoj omjer S/N iznosi 10.

Zahtjev: S/N na nivou od 15 ppm za formaldehid i nivou od 120 ppm za acetaldehid bi trebao biti ≥ 20. Ako to nije postignuto, RSD od 6 injektiranja treba iznositi ≤25%. Rezultati su prikazani u Tablici 11.

Tablica 11. Rezultati ispitivanja limita kvantifikacije za formaldehid i acetaldehid

Verifikacijski parametar: LOQ	**Parametar procjene: S/N**	**Kriterij prihvatljivosti: S/N ≥ 20**	**Rezultati**		**Status**
			S/N	**koncentracija otopine pri kojoj je S/N=10**	
Otopina standarda	Formaldehid na nivou od 15 ppm		326	0,023 µg/mL (nivo od 0,46 ppm)	**Odgovara**
	Acetaldehid na nivou od 120 ppm		2014	0,030 µg/mL (nivo od 0,60 ppm)	

4) Stabilnost je provjerena injektiranjem pripremljenih otopina standarda i uzorka nakon određenog vremena i usporedbom sa svježe pripremljenim otopinama standarda. Tijekom ovih eksperimenata, ispitivane otopine su čuvane u *autosampleru* na temperaturi propisanoj metodom.

Relativna razlika u faktorima odgovora otopine standarda nakon 147h i svježe pripremljene otopine iznosi 0,7% za formaldehid i 1,0% za acetaldehid, pri čemu kriterij prihvatljivosti iznosi najviše 10%. Relativna razlika srednjih rezultata sadržaja formaldehida iznosi 11,6%, a acetaldehida 1,9%, u otopini uzorka nakon 144h u odnosu na svježe pripremljenu otopinu Kriterij prihvatljivosti iznosi najviše 25%.

4.3. Verifikacija farmakopejske metode za određivanje etil akrilata i metakrilne kiseline u kopolimeru metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1) te u 30%-tnoj disperziji kopolimera metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1)

Provedena je verifikacija metode za određivanje etil akrilata i metakrilne kiseline u kopolimeru metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1) te u njegovoj 30%-tnoj disperziji u vodi pomoću HPLC-a prema monografijama Europske farmakopeje (Ph.Eur. 9.0) [27,28]. Ispitani su sljedeći parametri kako bi se potvrdilo da je predložena analitička metoda uspješno implementirana u Kontrolu kvalitete u Plivi:

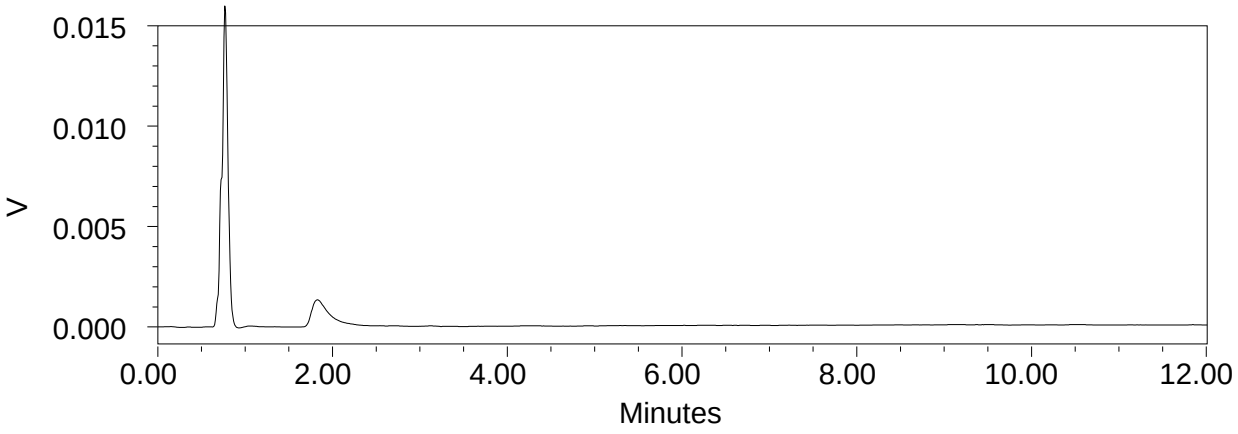
1) Selektivnost

2) Limit kvantifikacije

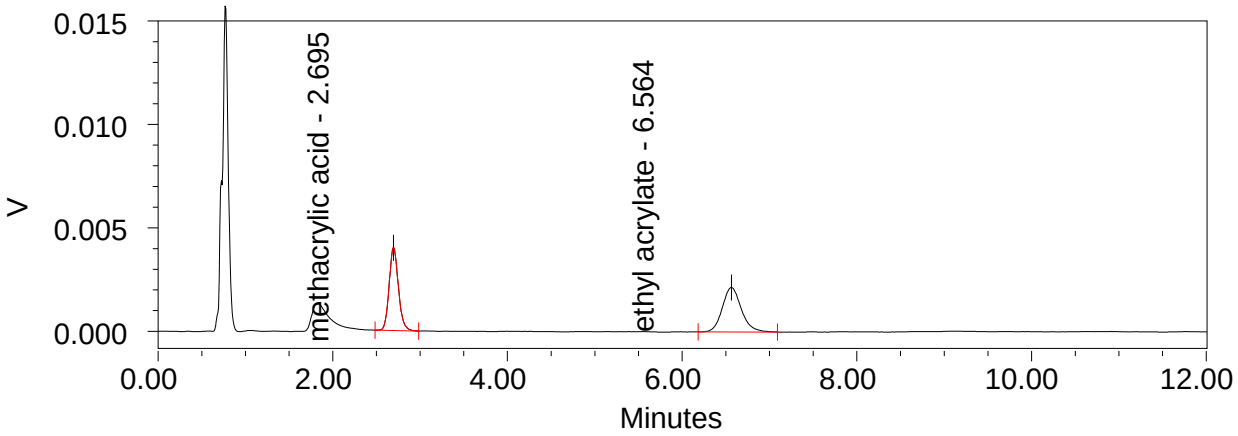
3) Preciznost

4) Stabilnost

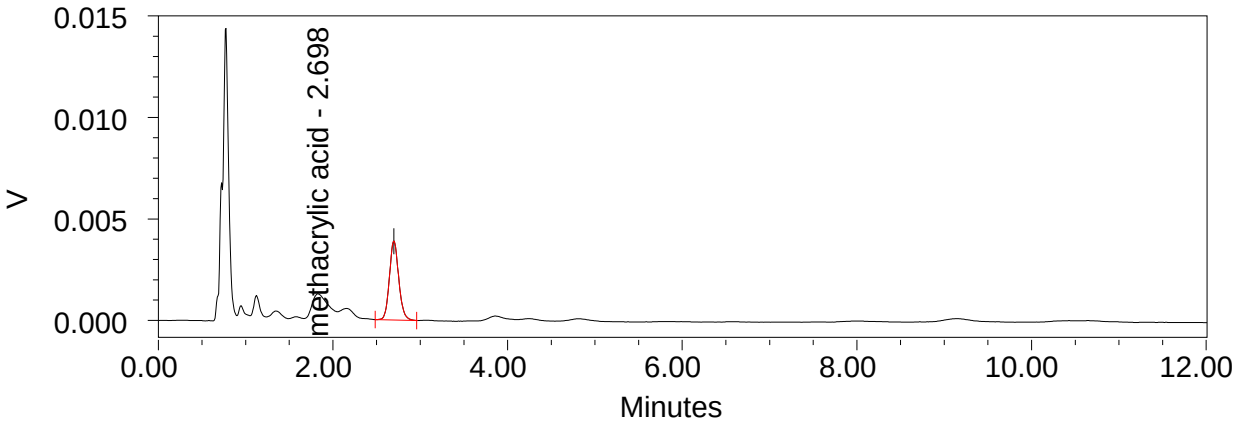
1) Selektivnost je provjerena evaluacijom kromatograma slijepe probe, otopine standarda i otopine uzorka. Reprezentativni kromatogrami su prikazani na Slikama 9., 10., 11., 12. x-os označava vrijeme u minutama, y-os signal u voltima.



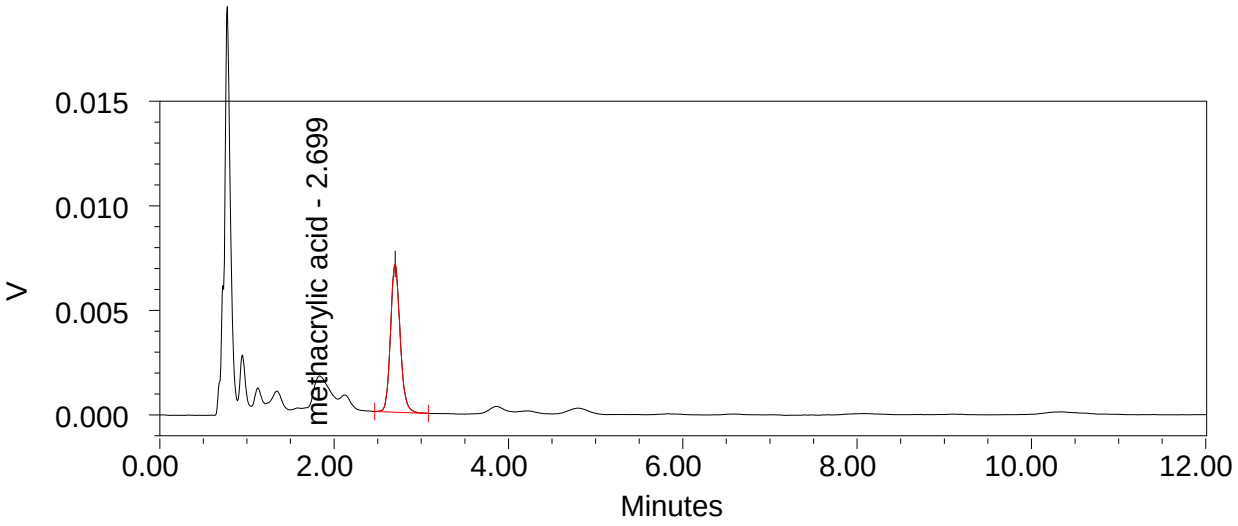
Slika 9. Kromatogram slijepe probe



Slika 10. Kromatogram otopine standarda



Slika 11. Kromatogram otopine uzorka kopolimera metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1)



Slika 12. Kromatogram otopine uzorka 30%-tne disperzije kopolimera metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1)

2) Limit kvantifikacije je provjeren injektiranjem otopine koncentracije 1 ppm (na razini granice prijavljivanja). Određen je omjer signala i šuma (S/N) za metakrilnu kiselinu i etil akrilat te je određen limit kvantifikacije pri kojoj S/N iznosi 10.

Rezultati su prikazani u Tablicama 12. i 13.

Tablica 12. Rezultati ispitivanja limita kvantifikacije za metakrilnu kiselinu i etil akrilat u kopolimeru metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1)

Verifikacijski parametar: LOQ	**Parametar procjene: S/N**	**Kriterij prihvatljivosti: S/N ≥ 10**	**Rezultati**		**Status**
			S/N	**koncentracija otopine pri kojoj je S/N=10**	
Razrijeđena otopina standarda	Metakrilna kiselina na nivou od 1 ppm		28	0,011 µg/mL	**Odgovara**
	Etil akrilat na nivou od 1 ppm		12	0,025 µg/mL	

Tablica 13. Rezultati ispitivanja limita kvantifikacije za metakrilnu kiselinu i etil akrilat u 30%-tnoj disperziji kopolimera metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1)

Verifikacijski parametar: LOQ	**Parametar procjene: S/N**	**Kriterij prihvatljivosti: S/N ≥ 10**	**Rezultati**		**Status**
			S/N	**koncentracija otopine pri kojoj je S/N=10**	
Razrijeđena otopina standarda	Metakrilna kiselina na nivou od 1 ppm		24	0,017 µg/mL	**Odgovara**
	Etil akrilat na nivou od 1 ppm		12	0,033 µg/mL	

3) Preciznost je provjerena koristeći podatke iz ponovljivosti i srednje preciznosti. Pošto su otopina uzoraka kopolimera metakrilne kiseline i etil akrilata te 30%-tne disperzije kopolimera metakrilne kiseline i etil akrilata sadržavale pik metakrilne kiseline iznad limita kvantifikacije, napravljeno je 6 priprema uzoraka kopolimera metakrilne kiseline i etil akrilata te 6 priprema uzoraka 30%-tne disperzije kopolimera metakrilne kiseline i etil akrilata za bez cijepljenja. Srednja preciznost je provjerena koristeći drugu HPLC kolonu, tijekom drugog dana, uz istog analitičara.

Rezultati ispitivanja preciznosti su prikazani u tablicama 14. i 15.

Tablica 14. Rezultati ispitivanja preciznosti za kopolimer metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1)

Ponovljivost (1. i 2. dan)- Metakrilna kiselina				
	Kriterij prihvatljivosti	**1. dan**	**2. dan**	**Status**
Metakrilna kiselina				
RSD priprema	≤ 25%	1,77 %	2,62 %	**Odgovara**
Srednja preciznost - Metakrilna kiselina				
Relativna razlika srednjih rezultata (1. i 2. dan)	≤ 25%	0,8%		**Odgovara**
Skupna RSD (1. i 2. dan)	≤ 25%	2,3%		**Odgovara**

Tablica 15. Rezultati ispitivanja preciznosti za 30%-tnu disperziju kopolimera metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1)

Ponovljivost (1. i 2. dan)- Metakrilna kiselina				
	Kriterij prihvatljivosti	**1. dan**	**2. dan**	**Status**
Metakrilna kiselina				
RSD priprema	≤ 25%	0,55 %	1,45 %	**Odgovara**
Srednja preciznost - Metakrilna kiselina				
Relativna razlika srednjih rezultata (1. i 2. dan)	≤ 25%	4,3%		**Odgovara**
Skupna RSD (1. i 2. dan)	≤ 25%	1,1%		**Odgovara**

4) Stabilnost je provjerena injektiranjem pripremljenih otopina standarda i uzorka nakon određenog vremena i provjerom sa svježe pripremljenim otopinama standarda. Tijekom ovih eksperimenata, ispitivane otopine su čuvane u *autosampleru* na temperaturi propisanoj metodom.

Rezultati ispitivanja stabilnosti su prikazani u tablicama 16. i 17.

Tablica 16. Rezultati ispitivanja stabilnosti za kopolimer metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1)

Parametar	Kriterij prihvatljivosti	Rezultati	Status
Stabilnost otopine standarda			
Metakrilna kiselina			
Razlika u faktorima odgovora	≤ 10%	0,6 % nakon 23 h	**Odgovara**
Etil akrilat			
Razlika u faktorima odgovora	≤ 10%	1,5 % nakon 23 h	**Odgovara**
Parametar	**Kriterij prihvatljivosti**	**Rezultati**	**Status**
Stabilnost otopine uzorka			
Metakrilna kiselina			
Relativna razlika srednjih rezultata	≤ 25%	9,6 % nakon 22 h	**Odgovara**

Tablica 17. Rezultati ispitivanja stabilnosti za 30%-tnu disperziju kopolimera metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1)

Parametar	Kriterij prihvatljivosti	Rezultati	Status
Stabilnost otopine standarda			
Metakrilna kiselina			
Razlika u faktorima odgovora	≤ 10%	0,3 % nakon 21 h	**Odgovara**
Etil akrilat			
Razlika u faktorima odgovora	≤ 10%	0,7 % nakon 21 h	**Odgovara**
Parametar	**Kriterij prihvatljivosti**	**Rezultati**	**Status**
Stabilnost otopine uzorka			
Metakrilna kiselina			
Relativna razlika srednjih rezultata	≤ 25%	0,5 % nakon 21 h	**Odgovara**

4.4. Djelomična validacija metode za određivanje onečišćenja A i onečišćenja J (Ph. Eur.) u farmaceutskom proizvodu koji sadrži djelatnu tvar atenolol

Provedena su sljedeća ispitivanja kako bi se potvrdilo da je predložena analitička metoda prikladna za određivanje onečišćenja A i onečišćenja J, definirana monografijom atenolola u Europskoj farmakopeji,[29] u farmaceutskom proizvodu koji sadrži atenolol, u Kontroli kvalitete u Plivi:

1) Selektivnost

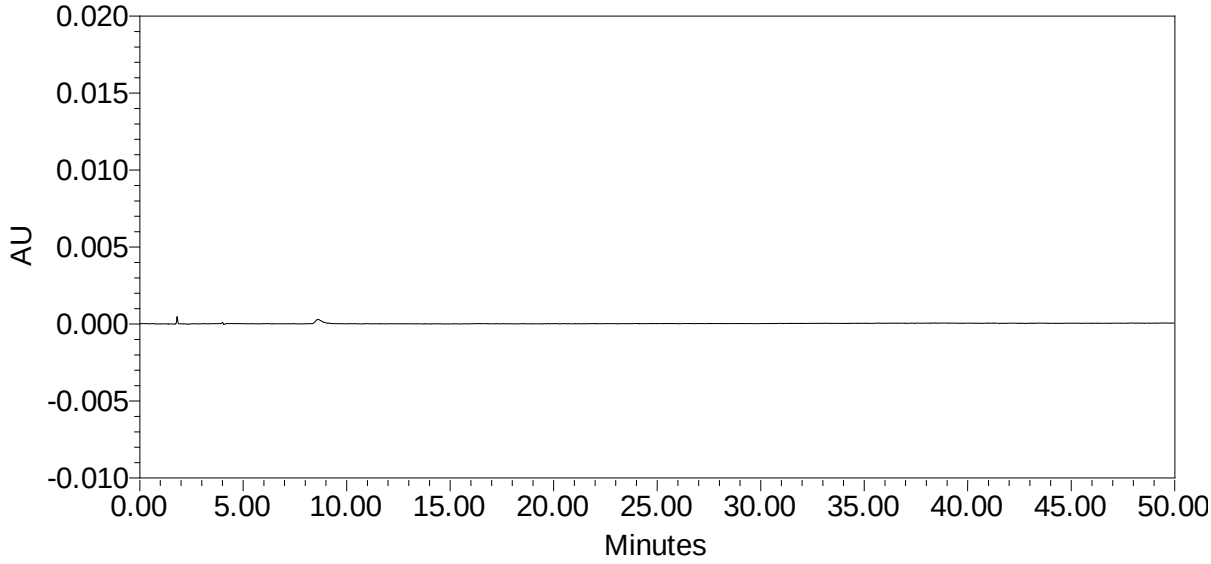
2) Linearnost

3) Limit kvantifikacije

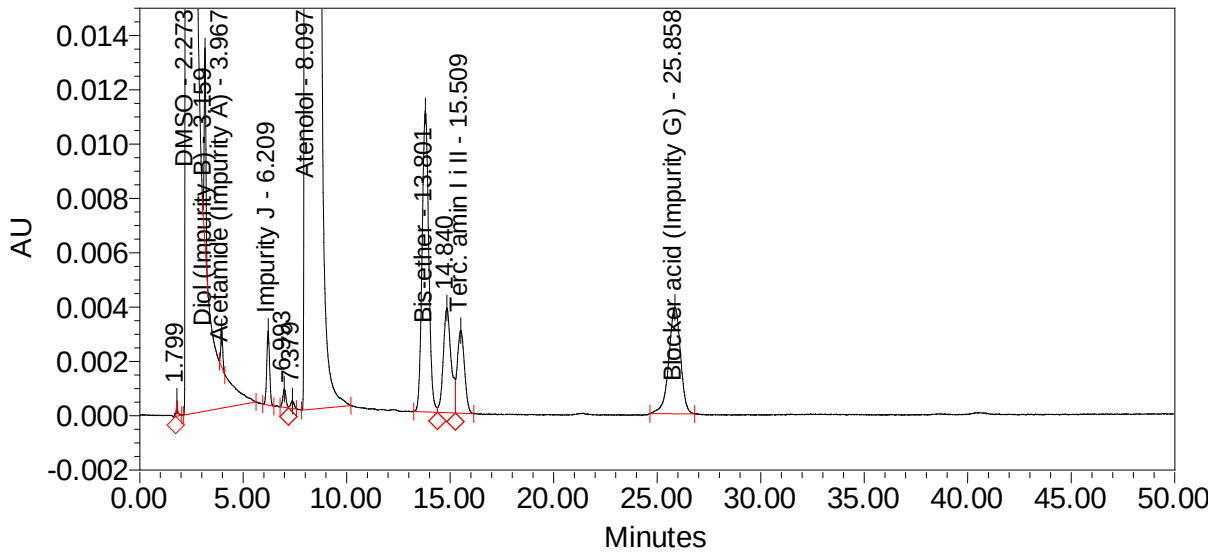
4) Preciznost

5) Točnost

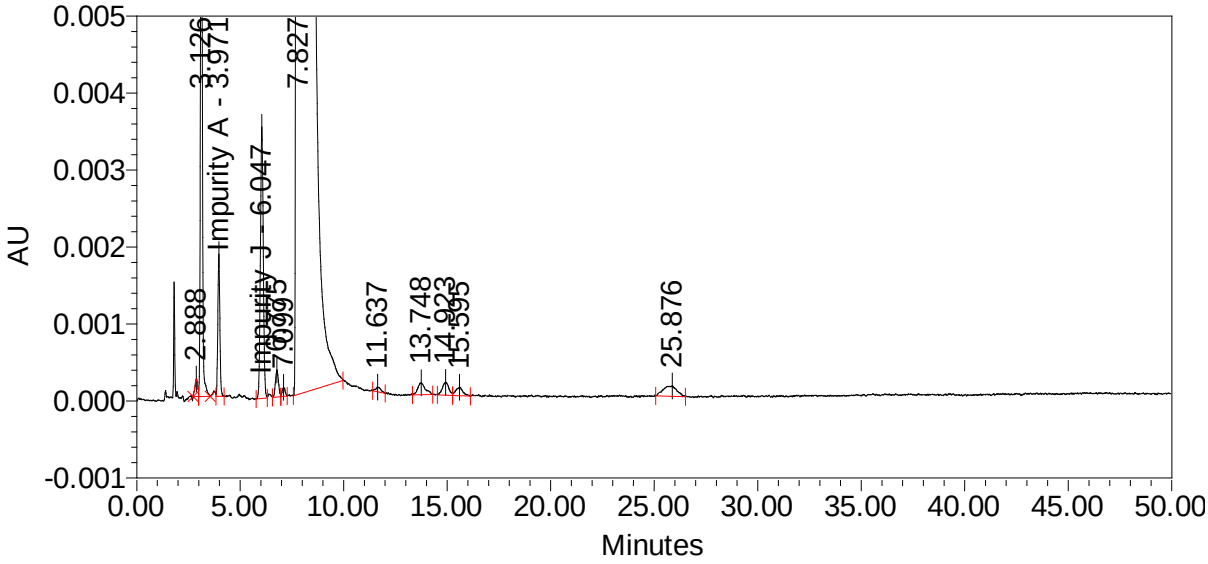
1) Selektivnost je provjerena evaluacijom kromatograma slijepe probe, otopine standarda, otopine za provjeru razlučivanja definiranih kromatografskih vrhova, otopine uzorka, otopine uzorka cijepljene s onečišćenjima A i J na specifikacijskom nivou te otopine za identifikaciju koja sadrži onečišćenja A i J na specifikacijskom nivou. Reprezentativni kromatogrami su prikazani na Slikama 13., 14., 15. x-os označava vrijeme u minutama, y-os signal u apsorpcijskim jedinicama (AU).



Slika 13. Kromatogram slijepe probe



Slika 14. Kromatogram otopine za provjeru razlučivanja definiranih kromatografskih vrhova



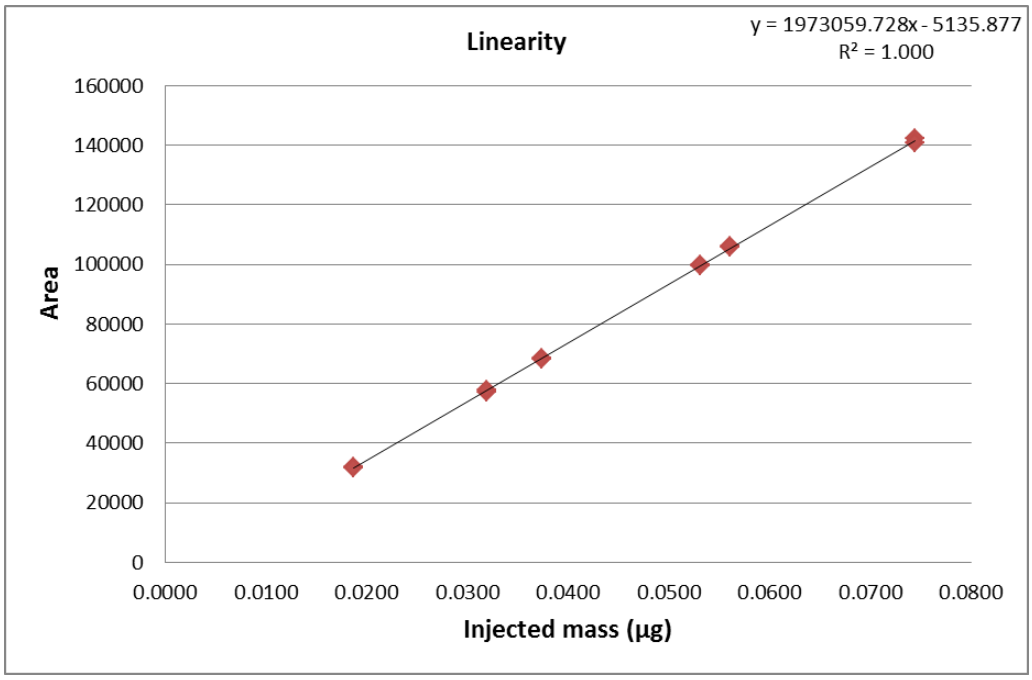
Slika 15. Kromatogram otopine uzorka

2) Linearnost za onečišćenja A i J je ispitana u području od 50% do 175% specifikacijskog nivoa od 0,20% za oba onečišćenja. Standard atenolola je korišten u ispitivanju linearnosti na istom koncentracijskom nivou kao i onečišćenja A i J, u svrhu računanja relativnog faktora odgovora (RRF) onečišćenja A i J. Pripremljena je otopina koja sadrži onečišćenje A i J te atenolol u koncentraciji od 0,002 mg/mL, u duplikatu. Pripremljene su otopine za ispitivanje linearnosti (L1-L6) prema Tablici 18.

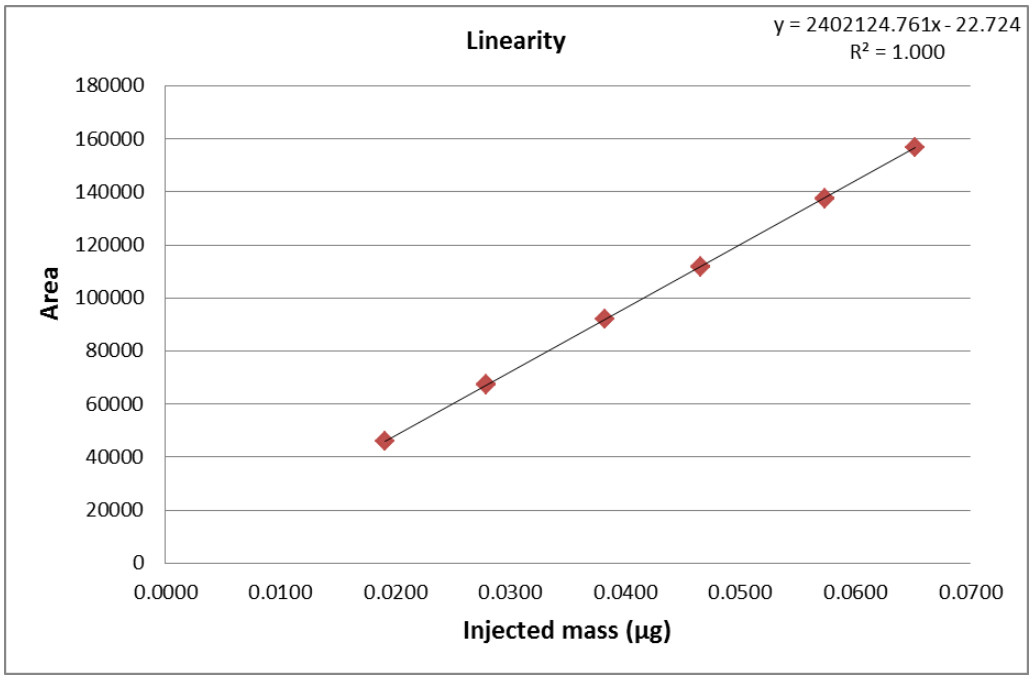
Tablica 18. Otopine standarda atenolola za ispitivanje linearnosti

Koncentracijski nivo	**Volumen injektiranja (µL)**	**Koncentracija (mg/mL)**	**Koncentracijski nivo**
L1	10	0,001	50%
L2	15	0,0015	75%
L3	20	0,002	100%
L4	25	0,0025	125%
L5	30	0,003	150%
L6	35	0,0035	175%

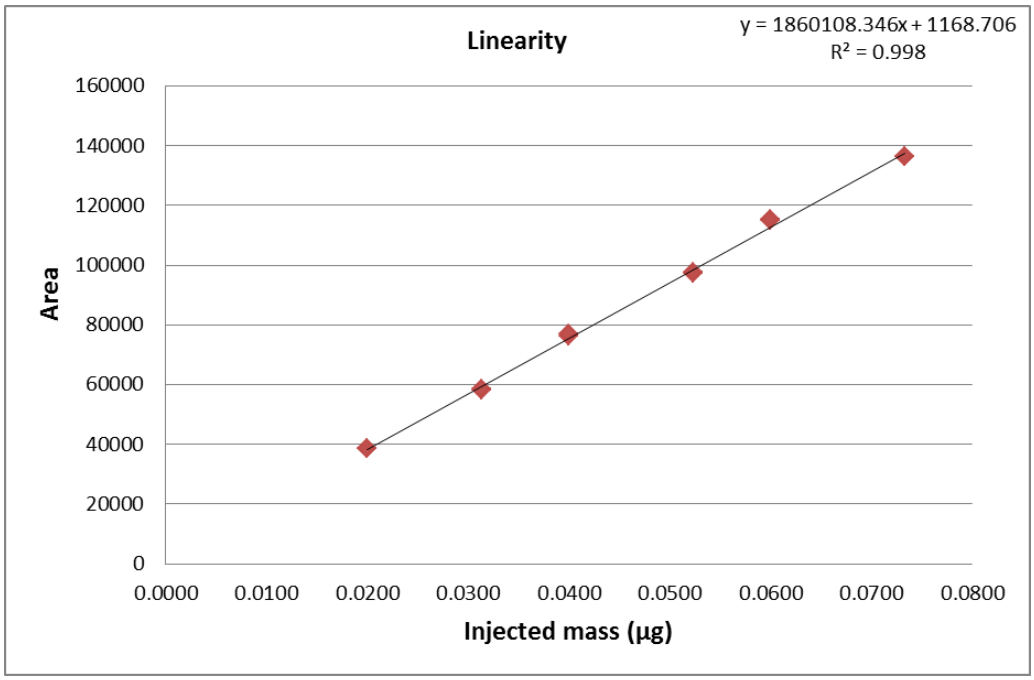
Dobiveni regresijski pravac za atenolol prikazan je na Slici 16., dok su regresijski pravci za onečišćenja prikazani na Slikama 17. i 18. x-os označava injektiranu masu u mikrogramima (µg), y-os označava površinu ispod pika.



Slika 16. Regresijski pravac za atenolol



Slika 17. Regresijski pravac za onečišćenje A



Slika 18. Regresijski pravac za onečišćenje J

Nagibi regresijskih pravaca dobivenih za onečišćenja A i J uspoređeni su s nagibom regresijskog pravca dobivenog od standarda atenolola.

Rezultati ispitivanja linearnosti prikazani su u Tablici 19.

Tablica 19. Rezultati ispitivanja linearnosti

Parametar	**Kriterij prihvatljivosti**	**Rezultati**			**Status**
		Atenolol	**Impurity A**	**Impurity J**	
RSD faktora odgovora	**≤ 10,0%**	3,79 %	0,22 %	1,72 %	**Odgovara**
Korelacijski koeficijent regresijskog pravca (R^2)	**≥ 0,99**	1,000	1,000	0,998	
Srednji relativni faktor odgovora za svaki koncentracijski nivo u odnosu na 100%-tni koncentracijski nivo	**90,0-110,0%**	93,1-103,6%	99,8-100,1%	99,9-103,6%	
Omjer dvostrukih injektiranja	**0,900-1,100**	0,984-1,011	0,994-1,005	0,995-1,001	
y-odsječak / odgovor na 100%-tnoj radnoj koncentraciji X 100	≤ **25%**	-7,5 %	0,0 %	1,6 %	

3) Limit kvantifikacije je određen injektiranjem L1 otopine (Tablica 18.) iz ispitivanja linearnosti. Dodatno su izračunate teoretske koncentracije za otopine s omjerom S/N od 10. Rezultati za omjere S/N, kao i izračunate teoretske koncentracije za omjer S/N od 10 su prikazani u Tablici 20.

Tablica 20. Rezultati ispitivanja limita kvantifikacije

Pik onečišćenja	**Kriterij prihvatljivosti**	**Rezultati**		**Status**
		S/N	**koncentracija otopine pri kojoj je S/N=10**	
Onečišćenje A	Omjer signala i šuma (S/N) na nivou od 0,1% ≥ 10	488	0,0196 µg/mL (nivo od 0,002%)	**Odgovara**
Onečišćenje J		269	0,0372 µg/mL (nivo od 0,004%)	

4) Preciznost je provjerena koristeći podatke iz ponovljivosti i srednje preciznosti za određivanje srodnih spojeva. Preliminarna ispitivanja su pokazala da otopina uzorka sadrži onečišćenja A i J iznad limita kvantifikacije. Napravljeno je 6 priprema otopina uzorka bez cijepljenja s onečišćenjima. Srednja preciznost je provjerena koristeći drugu HPLC kolonu, tijekom drugog dana, uz istog analitičara. Rezultati ispitivanja preciznosti za onečišćenja A i J su prikazani u Tablici 21.

Tablica 21. Rezultati ispitivanja preciznosti

Ponovljivost (1. i 2. dan)	**Kriterij prihvatljivosti**	**Rezultati**		**Status**
		1. dan	**2. dan**	**Odgovara**
Onečišćenje A				
RSD priprema	≤ **25%**	1,4 %	1,0 %	**Odgovara**
Onečišćenje J				
RSD priprema	≤ **25%**	0,8 %	0,8 %	**Odgovara**
Srednja preciznost	**Kriterij prihvatljivosti**	**Rezultati**		**Odgovara**
Apsolutna razlika srednjih rezultata – Onečišćenje A	≤ 0,03%	0,001%		**Odgovara**
Apsolutna razlika srednjih rezultata – Onečišćenje J	≤ 0,03%	0,002%		**Odgovara**

5) Točnost za onečišćenja A i J je ispitivana na nivoima od 0,10%, 0,20% i 0,35%, odnosno od 50% do 175% specifikacijskog limita, cijepljenjem uzorka. Svaki koncentracijski nivo je pripremljen u triplikatu. Također su pripremljene i dvije kontrolne otopine uzorka bez cijepljenja te su pikovi koji eluiraju na vremenima zadržavanja onečišćenja A i J uzeti u obzir i njihove pripadajuće površine oduzete od površina pikova cijepljenih otopina uzorka. Otopina slijepe probe te otopine standarda su pripremljene prema metodi. Rezultati su prikazani u Tablici 22.

Tablica 22. Rezultati ispitivanja točnosti

Nivo onečišćenja (%)	**Kriterij prihvatljivosti**		**Rezultati**		**Status**
			Onečišćenje A	**Onečišćenje J**	
0,10%	Srednji analitički prinos	75-125%	102,9 %	101,7 %	**Odgovara**
	RSD	≤ 25%	1,7 %	2,7 %	
0,20%	Srednji analitički prinos	80-120%	103,4 %	101,4 %	
	RSD	≤ 15%	0,4 %	1,7 %	
0,35%	Srednji analitički prinos	80-120%	105,1 %	102,0 %	
	RSD	≤ 15%	0,2 %	0,4 %	

5. RASPRAVA

5.1. Nikotinamid

Farmakopejska metoda za određivanje srodnih spojeva u nikotinamidu [24] je uspješno verificirana i prikladna je za korištenje u laboratorijima kontrole kvalitete. Rezultati provedene verifikacije su unutar kriterija prihvatljivosti postavljenih verifikacijskim protokolom.

1) Selektivnost: Ispitivanje prikladnosti sustava odgovara kriterijima prihvatljivosti. Kromatografski pikovi onečišćenja i nikotinamida su dobro odvojeni na kromatogramima otopine uzorka. Pikovi iz slijepe probe ne interferiraju s glavnim pikovima iz otopine uzorka. Time je potvrđena je selektivnost metode.

2) Preciznost: Svi kriteriji prihvatljivosti su ispunjeni. Metoda je precizna. Srednji rezultati 6 priprema otopina uzorka tijekom oba dana iznose: 0,016% za nespecificirano onečišćenje (X1) te 0,005% za nespecificirano onečišćenje (X2). Ukupna onečišćenja iznose: 0,02%. Rezultati sadržaja onečišćenja su unutar kriterija prihvatljivosti postavljenih specifikacijom.

3) Limit kvantifikacije: verifikacija limita kvantifikacije zadovoljava kriterije prihvatljivosti za sva ispitana onečišćenja u nikotinamidu.

4) Stabilnost: Otopina standarda nikotinamida je ispunila kriterij prihvatljivosti te je pokazano da je stabilna tijekom najmanje 72h na temperaturi od 25˚C. Otopina uzorka također je ispunila kriterij prihvatljivosti, a utvrđena je stabilnost tijekom najmanje 73h na 25˚C.

5.2. Polietilen glikol 3350

HPLC metoda opisana u Američkoj farmakopeji (USP) za određivanje graničnih vrijednosti formaldehida i acetaldehida u polietilen glikolu 3350 [25] je uspješno verificirana i prikladna je za korištenje

u laboratorijima kontrole kvalitete. Rezultati provedene verifikacije su unutar kriterija prihvatljivosti postavljenih verifikacijskim protokolom.

1) Selektivnost: Ispitivanje prikladnosti sustava odgovara kriterijima prihvatljivosti. Pikovi su dobro odvojeni na kromatogramima otopine uzorka. Detektiran je pik formaldehida u slijepoj probi, no isti je odbačen, pošto mu površina ne prelazi 10% površine pika formaldehida utvrđenog u otopini standarda. Zaključeno je da pikovi u slijepoj probi ne interferiraju s glavnim pikovima iz otopine uzorka. Korekcija s obzirom na prisutnost pika formaldehida u slijepoj probi je uključena u izračun određivanja tog onečišćenja u uzorku polietilen glikola 3350. Provedenim ispitivanjima potvrđena je selektivnost metode.

2) Preciznost: Svi kriteriji prihvatljivosti su ispunjeni. Metoda je precizna. Srednji rezultati sadržaja acetaldehida na 6 priprema otopina uzorka za 1. dan ispitivanja preciznosti iznose: 58,8 ppm, a za 2. dan iznose 58,4 ppm. Rezultati su unutar kriterija prihvatljivosti postavljenih specifikacijom.

3) Limit kvantifikacije: verifikacija limita kvantifikacije zadovoljava kriterije prihvatljivosti za formaldehid i acetaldehid.

4) Stabilnost: Otopina standarda je ispunila kriterij prihvatljivosti te je pokazano da je stabilna tijekom najmanje 147h na temperaturi od 8˚C. Otopina uzorka je ispunila kriterij prihvatljivosti te je utvrđena njezina stabilnost tijekom najmanje 144h na 8˚C.

5.3. Kopolimer metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1) i 30%-tna disperzija kopolimera metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1)

Verifikacija je uspješno provedena za HPLC metode opisane u Ph. Eur. za određivanje etil akrilata i metakrilne kiseline u kopolimeru metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1) te u 30%-tnoj disperziji kopolimera metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1) [27,28].

1) Selektivnost: Ispitivanje prikladnosti sustava odgovara kriterijima prihvatljivosti. Pikovi metakrilne kiseline i etil akrilata dobro su odvojeni na kromatogramima otopine uzorka kopolimera i njegove 30% disperzije kao i otopine standarda te su dovoljno dobro odvojeni od pikova u slijepoj probi. Potvrđena je selektivnost metode.

2) Limit kvantifikacije: verifikacija limita kvantifikacije zadovoljava kriterije prihvatljivosti za oba ispitivana onečišćenja.

3) Preciznost: Svi kriteriji prihvatljivosti su ispunjeni. Metoda je precizna. Napravljeni su izračuni sadržaja koristeći setove standarda pripremljene prema obje monografije (kopolimer metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1) te 30%-tna disperzija kopolimera metakrilne kiseline i etil akrilata(1:1)) za oba ispitivana materijala. Kriteriji prihvatljivosti su ispunjeni te će se u metodi propisati korištenje standardne otopine, na način pripreme naveden u monografiji kopolimera metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1) zbog pojednostavljenja analize.

Srednji rezultati 6 priprema otopina uzorka za oba dana za sadržaj metakrilne kiseline iznose 0,001% u kopolimeru metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1) te 0,002% u 30%-tnoj disperziji kopolimera metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1). Rezultati su unutar kriterija prihvatljivosti postavljenih specifikacijom.

4) Stabilnost: Obje otopine standarda su ispunile kriterije prihvatljivosti te je utvrđena stabilnost tijekom najmanje 23h za otopinu standarda kopolimera metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1) odnosno 21h za otopinu standarda 30%-tne disperzije na temperaturi od 25˚C. Otopina uzorka za kopolimer metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1) je ispunila kriterij prihvatljivosti te je utvrđena stabilnost tijekom najmanje 22h na 25˚C. Otopina uzorka za 30%-tnu disperziju je ispunila kriterij prihvatljivosti te je utvrđena stabilnost tijekom najmanje 21h na 25˚C.

5.4. Farmaceutski proizvod koji sadrži djelatnu tvar atenolol

Uspješno je provedena djelomična validacija metode za određivanje onečišćenja A i onečišćenja J, opisana u monografiji Europske farmakopeje za atenolol,[29] za kontrolu kvalitete farmaceutskog proizvoda koji sadrži djelatnu tvar atenolol.

1) Selektivnost: Ispitivanje prikladnosti sustava odgovara kriterijima prihvatljivosti. Pikovi onečišćenja A i J su dobro odvojeni na kromatogramima otopine uzorka i ne interferiraju s drugim pikovima onečišćenja niti s pikom atenolola. Pikovi iz slijepe probe ne interferiraju s pikovima od interesa iz otopine uzorka. Potvrđena je selektivnost metode.

2) Linearnost: Rezultati pokazuju da je metoda linearna za onečišćenja A i J u ispitivanom području. Relativni faktor odgovora (RRF) onečišćenja A iznosi 1,217, a RRF onečišćenja J iznosi 0,943. Pošto su obje vrijednosti unutar raspona 0,8-1,2[22], u budućim analizama će se onečišćenja A i J računati bez korekcijskog faktora.

3) Limit kvantifikacije: verifikacija limita kvantifikacije oba onečišćenja zadovoljava kriterije prihvatljivosti.

4) Preciznost: Svi kriteriji prihvatljivosti su ispunjeni. Metoda je precizna. Srednji rezultati 6 priprema otopina uzorka za oba dana iznose: onečišćenje A: 0,03%, onečišćenje J: 0,10%, onečišćenje G: 0,02%, najveće nespecificirano onečišćenje: 0,13% i ukupna onečišćenja: 0,3%

5) Točnost: Prikazani rezultati pokazuju da je metoda točna za određivanje onečišćenja A i J u ispitivanom području. Rezultati sadržaja onečišćenja su unutar kriterija prihvatljivosti postavljenih specifikacijom.

6. ZAKLJUČAK

Uspješno su provedene verifikacije farmakopejskih HPLC metoda za određivanje onečišćenja u farmaceutskim tvarima, kao i djelomična validacija HPLC metode za određivanje srodnih spojeva u farmaceutskom proizvodu.

U verifikaciji Ph. Eur. metode za određivanje srodnih spojeva u nikotinamidu ispitani su validacijski parametri: selektivnost, preciznost, limit kvantifikacije te stabilnost otopina. Prilikom verifikacije USP metode za određivanja graničnih vrijednosti formaldehida i acetaldehida u polietilen glikolu 3350 ispitani su parametri: selektivnost, preciznost, limit kvantifikacije te stabilnost otopina. Tijekom verifikacije Ph. Eur. metoda za određivanje monomera etil akrilata i metakrilne kiseline u kopolimeru metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1) i 30%-tnoj disperziji kopolimera metakrilne kiseline i etil akrilata (1:1) ispitani su validacijski parametri: selektivnost, limit kvantifikacije, preciznost te stabilnost otopina. Djelomična validacija analitičke metode za određivanje srodnih spojeva u farmaceutskom proizvodu koji sadrži djelatnu tvar atenolol uključuje provjeru parametara: selektivnost, linearnost, limit kvantifikacije, preciznost i točnost.

Sve metode su zadovoljile kriterije prihvatljivosti postavljene validacijskim/verifikacijskim protokolima i kao takve su prikladne za korištenje u laboratorijima kontrole kvalitete.

Rezultati provedenih ispitivanja bit će korišteni u farmaceutskoj industriji, pri čemu će verificirane farmakopejske metode za određivanje onečišćenja u djelatnoj tvari i pomoćnim tvarima te validirana metoda za određivanje srodnih spojeva u farmaceutskom proizvodu biti rutinski primjenjivane u analitici ovih proizvoda u laboratorijima kontrole kvalitete.

Provedena ispitivanja na uzorcima navedenih tvari daju uvid u profil onečišćenja ispitivanih tvari te je njihova kvaliteta ocijenjena kao odgovarajuća, a kao takve su pogodne za izradu farmaceutskih oblika.

Rezultati dodatne validacije analitičke metode za određivanje srodnih spojeva u farmaceutskom proizvodu, u svrhu uvođenja novih specificiranih onečišćenja potvrđuju da je postojeća metoda prikladna za analizu tog proizvoda u skladu s novom specifikacijom.

7. LITERATURA

1. Ahuja S., Scypinski S. (editors) Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis., Volume III of Separation Science and Technology, San Diego: Academic Press, 2001. str. 2, 349, 411-438
2. Shabir G. A., Lough W. J., Arain S. A., Bradshaw T. K., Evaluation and Application of Best Practice in Analytical Method Validation, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, (2007) 30: 3, 311 -333
3. ICH Q3A(R2): Impurities in New Drug Substances, Current Step 4 version dated 25 October 2006.
4. ICH Q3B(R2): Impurities in New Products, Current Step 4 version dated 2 June 2006.
5. United States Pharmacopoeia 40 - National Formulary 35, Supplement 1, Chapter <1226> Verification of Compendial Procedures
6. European Pharmacopoeia, Elaboration & Revision, Elaboration, URL: http://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-elaboration-revisions-606.html. (09.04.2018.)
7. Konieczka P., The Role of and the Place of Method Validation in the Quality Assurance and Quality Control (QA/QC) System, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, (2007) 37: 3, 173 -190
8. Huynh-Ba K (editor) Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development., Regulations, Methodologies, and Best Practices, New York: Springer, 2009. str. 174
9. ICH Q6A: Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances, Current Step 4 version dated 6 October 1999.
10. ICH Q4B: Evaluation and Recommendation of Pharmacopoeial Texts for Use in the ICH Regions, Current Step 4 version dated 1 November 2007.
11. ICH Q1A(R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products, Current Step 4 version dated 6 February 2003.
12. United States Pharmacopoeia 40 - National Formulary 35, Supplement 1, Chapter <1086> Impurities in Drug Substances and Drug Products
13. Guidance for Industry ANDAs: Impurities in Drug Products, URL: http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm072861.pdf (01.08.2018.)

14. Prajapati P., Agrawal Y. K., Analysis and impurity identification in pharmaceuticals, *Reviews in analytical chemistry*, (2014); 33: 2, 123–133
15. Zaza S., Lucini S. M., Sciascia F. i sur., Recent Advances in the Separation and Determination of Impurities in Pharmaceutical Products, *Instrumentation Science & Technology*, (2015), 43: 2,182-196
16. Harvey D. Modern analytical chemistry McGraw Hill: Boston, 2000., str. 578-586
17. Watson, D. G., Pharmaceutical Analysis, Edinburgh: Churchill Livingstone, Elsevier Limited, 1999., str. 168, 239-240
18. United States Pharmacopoeia 40 - National Formulary 35, Supplement 1, Chapter <621> Chromatography
19. Kazakevich Y., LoBrutto R. (editors), HPLC for pharmaceutical scientists, Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2007., str. 654-657
20. ICH Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Current Step 4 version, Parent Guideline dated 27 October 1994 (Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 1996 incorporated in November 2005).
21. United States Pharmacopoeia 40 - National Formulary 35, Supplement 1, Chapter <1225> Validation of Compendial Procedures
22. European Pharmacopoeia 9th edition, Chapter 2.2.46 Chromatographic Separation Techniques
23. Swartz M. E., Krull I. S. Validation, Qualification, or Verification?, *LCGC*,(2005), 23: 10, 1100-1109
24. European Pharmacopoeia 9th edition, Supplement 9.2, Monograph: Nicotinamide
25. United States Pharmacopoeia 40 - National Formulary 35, Supplement 1, Monograph: Polyethylene Glycol 3350
26. da Cunha Veloso M. C., da Silva V. M., Santos G. V., de Andrade J.B., Determination of Aldehydes in Fish by High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatographic Science*, (2001), 39: 5, 173-176
27. European Pharmacopoeia 9th edition, Monograph: Methacrylic acid – ethyl acrylate copolymer (1:1)
28. European Pharmacopoeia 9th edition, Monograph: Methacrylic acid – ethyl acrylate copolymer (1:1) dispersion 30 per cent
29. European Pharmacopoeia 9th edition, Supplement 9.1, Monograph: Atenolol

8. POPIS KRATICA

2,4-DNPH (engl. *2,4-Dinitrophenylhydrazine*) – 2,4-dinitrofenil hidrazin

ACN (engl. *Acetonitrile*) – Acetonitril

API (engl. *Active Pharmaceutical Ingredient*) – Aktivna ljekovita supstancija

AU (engl. *Absorption unit*) – Apsorpcijska jedinica

BP (engl. *British Pharmacopoeia*) – Britanska farmakopeja

CLND (engl. *Chemiluminescence nitrogen detector*) – Kemiluminiscencijski detektor

CRS (engl. *Chemical reference standard*) – Kemijska poredbena tvar

DAD (engl. *Diode Array Detector*) – Detektor s nizom fotosenzitivnih dioda

DMSO (engl. *Dimethyl sulfoxide*)– Dimetil sulfoksid

ELSD (engl. *Evaporative light-scattering detector*) – Detektor raspršenja svjetla u uparenom uzorku

EWG (engl. *Expert Working Group*) – Stručna radna skupina

GMP (engl. *Good Manufacturing Practice*) – Dobra proizvođačka praksa

HPLC (engl. *High Performance Liquid Chromatography*) – Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

ICH (engl. *International Conference on Harmonization*) – Međunarodna konferencija o harmonizaciji

LOD (engl. *Limit of Detection*) – Limit detekcije

LOQ (engl. *Limit of Quantification*) – Limit kvantifikacije

MF (engl. *Mobile phase*) – Mobilna faza

NF (engl. *National formulary*) – Američka farmakopeja pomoćnih tvari

PDG (engl. *Pharmacopoeial Discussion Group)* – Farmakopejska diskusijska grupa

Ph. Eur. (engl. *European Pharmacopoeia*) – Europska farmakopeja

QC (engl. *Quality Control*) – Kontrola kvalitete

RF (engl. *Response factor*) – Faktor odgovora

RRF (engl. *Relative response factor*) – Relativni faktor odgovora

RSD (engl. *Relative Standard Deviation*) – Relativna standardna devijacija

S (engl. *Supplement*) – Dodatak

S/N (engl. *Signal-to-noise ratio*) – Omjer signala i šuma

SST (engl. *System suitability test*) – Ispitivanje prikladnosti sustava

USP (engl. *United States Pharmacopoeia*) – Američka farmakopeja

UV (engl. *Ultraviolet*) – Ultraljubičasto

VIS (engl. *Visible*) – Vidljivo