

Validacija postupka čišćenja proizvodnog pogona nakon proizvodnje farmaceutskih oblika s citotoksičnim djelatnim tvarima

Šipek, Kristijan

Professional thesis / Završni specijalistički

2023

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:081991>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-08**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Kristijan Šipek

VALIDACIJA POSTUPKA ČIŠĆENJA PROIZVODNOG POGONA NAKON PROIZVODNJE
FARMACEUTSKIH OBLIKA S CITOTOKSIČNIM DJELATNIM TVARIMA

Specijalistički rad

Zagreb, 2023. godina

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Kristijan Šipek

VALIDACIJA POSTUPKA ČIŠĆENJA PROIZVODNOG POGONA NAKON PROIZVODNJE
FARMACEUTSKIH OBLIKA S CITOTOKSIČNIM DJELATNIM TVARIMA

Specijalistički rad

Zagreb, 2023. godina

PSS studij: Poslijediplomski specijalistički studij Razvoj lijekova

Mentor rada: Prof.dr.sc. Biljana Nigović

Specijalistički rad obranjen je dana 01.09.2023. godine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof.dr.sc. Ana Mornar Turk, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet
2. prof.dr.sc. Biljana Nigović, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet
3. dr.sc. Maja Lusina Kregar, znanstvena suradnica, HALMED

Rad ima 98 listova

Istraživanje je provedeno u Pliva Hrvatska d.o.o. u sklopu projekta dekontaminacije proizvodnog pogona zbog prenamjene istog u druge proizvodne svrhe. Specijalistički rad izrađen je na temelju provedenog projekta pod mentorstvom prof.dr.sc. Biljane Nigović na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem Pliva Hrvatska d.o.o. na ustupljenim resursima i podacima prikupljenim tijekom provedbe ovog istraživanja. Hvala mentorici prof.dr.sc. Nigović na uloženom vremenu, stručnom vođenju i prenesenom znanju tijekom izrade ovog specijalističkog rada. Također, zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj podršci tijekom cijelog mog obrazovanja.

SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja u okviru ovog specijalističkog rada bio je razviti i validirati analitičke metode za određivanje ostataka djelatnih tvari 6-merkaptopurin i valganciklovir hidroklorid na površinama od različitih materijala. Upotrebom razvijenih i validiranih, analitičnih metoda i korištenjem definiranih postupaka čišćenja proizvodne opreme, proizvodnih, ali i neproizvodnih prostorija te vanjskih/nekontaktnih dijelova opreme i uređaja provesti dekontaminaciju pogona za proizvodnju citotoksičnih lijekova te dokumentirano dokazati da su kontaminanti 6-merkaptopurin i valganciklovir hidroklorid uklonjeni ispod propisanog kriterija prihvatljivosti s obuhvaćenih površina. Uspješno završen postupak čišćenja jamstvo je sigurne prenamjene prostorija, opreme i uređaja u druge proizvodne svrhe.

MATERIJALI I METODE

Citotoksični lijekovi zaustavljaju proliferaciju stanica u određenom ciklusu njihova rasta. Primjenjuju se u borbi protiv brzo rastućih stanica poput stanica karcinoma, ali i kod autoimunih oboljenja poput različitih vrsta artritisa. Citotoksični lijekovi su visoko potentne tvari koje zahtijevaju posebne postupke tijekom proizvodnje te preventivne mjere tijekom profesionalne izloženosti. Također, visok stupanj opreza zahtjeva i provedba redovnih postupaka čišćenja proizvodne opreme i prostora, a posebice u slučaju prenamjene istih u druge proizvodne svrhe.

Razvoj i validacija dviju HPLC metoda za određivanje ostataka 6-merkaptopurina i valganciklovir hidroklorida na površinama nakon čišćenja u proizvodnom pogonu SOO2B, Pliva Hrvatska d.o.o. provedena je u skladu s internim protokolima i ICH smjernicama. Validacijom HPLC metoda za analizu 6-merkaptopurina i valganciklovir hidroklorida ispitivana je njihova selektivnost, linearnost, točnost, stabilnost otopina i prikupljenih uzoraka briseva te odgovarajući limiti detekcije i kvantifikacije.

Određene su najkritičnije lokacije na kojima je proveden postupak uzorkovanja po završetku postupka čišćenja uključujući proizvodnu opremu, proizvodne i neproizvodne prostorije te vanjske/nekontaktne dijelove uređaja. Svako mjesto uzorkovanja označeno je jedinstvenom oznakom za daljnje praćenje i evaluaciju tijekom postupka.

U sklopu provedbe postupka dekontaminacije iz proizvodnog pogona je uklonjena sva jednonamjenska i teško čistljiva oprema, pomoćni pribor i pomagala. Navedena oprema izuzeta je iz postupka uzorkovanja u svrhu praćenja dekontaminacije zbog prethodno navedenih karakteristika te velikog stupnja rizika od unakrsne kontaminacije. Na ostaloj demontiranoj, proizvodnoj opremi, uređajima i pomoćnim sredstvima provedeno je više uzastopnih ciklusa čišćenja proizvodnog pogona i sve opreme te uzorkovanje i analiza uzoraka prikupljenih briseva s definiranih, reprezentativnih lokacija nakon svakog provedenog dekontaminacijskog čišćenja. Uzastopno čišćenje i uzorkovanje provodilo se sve do postizanja definiranih kriterija prihvatljivosti, odnosno vrijednosti rezultata analiza manjih ili jednakih limitu detekcije validiranih HPLC metoda za analizu 6-merkaptopurina i valganciklovir hidroklorida.

Nakon postizanja definiranih kriterija prihvatljivosti za sve definirane stavke u postupku čišćenja pristupilo se završnoj fazi dekontaminacije koja je uključivala demontažu filtera proizvodnih prostorija. Potom je provedeno završno čišćenje i uzorkovanje lokacija skidanja filtera s ciljem konačne provjere stanja kontaminacije ostacima 6-merkaptopurina i valganciklovir hidroklorida.

RASPRAVA

Validacijom HPLC metoda za analizu 6-merkaptopurina i valganciklovir hidroklorida ispitana je i dokazana je njihova selektivnost, linearnost, točnost, stabilnost otopina i prikupljenih uzoraka briseva te odgovarajući limiti detekcije i kvantifikacije.

Provedena je evaluacija dobivenih rezultata analiza uzoraka HPLC metodama za određivanje 6-merkaptopurina i valganciklovir hidroklorida te donijet konačan zaključak o uspješnosti provedbe postupaka čišćenja proizvodnog pogona citotoksičnih lijekova.

Postupak čišćenja proizvodnog pogona nakon proizvodnje citotoksičnih proizvoda predstavljao je projekt koji zahtjeva opsežan, precizan i savjestan rad, detaljistički pristup, analitičko i proizvodno iskustvo, inženjerski pristup, poznavanje kemijskih svojstava analiziranih spojeva i potencijalnih interakcija, a predstavljao je nesvakidašnji te vrlo specifičan farmaceutsko-inženjerski izazov.

ZAKLJUČAK

Validacija čišćenja proizvodnog pogona nakon proizvodnje farmaceutskih oblika s citotoksičnim djelatnim tvarima (dekontaminacijski postupak) provedena je uzastopnim čišćenjem svih obuhvaćenih prostorija i vanjskih/nekontaktne površine uređaja te njihovim uzorkovanjem sve do postizanja analitičkih rezultata manjih ili jednakih limitima detekcije validiranih analitičkih metoda za određivanje 6-merkaptopurina i valganciklovir hidroklorida.

Na osnovu svih dobivenih rezultata, proizvodne, neproizvodne prostorije i vanjske/nekontaktne površine uređaja u pogonu SOO2B smatraju se uspješno dekontaminirane od ostataka kontaminanata 6-merkaptopurina i valganciklovir hidroklorida. Provedena validacija čišćenja pogona, kao i sam dekontaminacijski postupak, smatraju se uspješno završenim te je moguća sigurna prenamjena svih prostorija i uređaja u druge proizvodne svrhe.

SUMMARY

AIM OF THE PAPER

The aim of the research was to develop and validate analytical methods for determining the residues of the active substances 6-mercaptopurine and valganciclovir hydrochloride on surfaces made of different materials. Onwards, using developed and validated analytical methods and using defined procedures for cleaning production equipment, production and non-production rooms and external/non-contact parts of equipment and devices, carry out decontamination process of the pharmaceutical plant for the production of cytotoxic drugs and document that the contaminants 6-mercaptopurine and valganciclovir hydrochloride have been removed below prescribed acceptance limits. A successfully completed decontamination procedure is a guarantee of safe repurposing of rooms, equipment and devices for other production purposes.

MATERIALS AND METHODS

Cytotoxic drugs stop the proliferation of cells in a certain cycle of their growth. They are used in the fight against rapidly growing cells such as cancer cells, but also in autoimmune diseases such as different types of arthritis. Cytotoxic drugs are highly potent substances that require special procedures during production and preventive measures during occupational exposure. Also, a high degree of caution is required while implementing the regular procedures for production equipment and premises cleaning, especially in the case of their repurposing for other production activities.

Development and validation of two HPLC methods for the determination of 6-mercaptopurine and valganciclovir hydrochloride residues on surfaces after cleaning in the production plant SOO2B, Pliva Croatia d.o.o. was performed in accordance with internal protocols and ICH guidelines. Validation procedure of HPLC methods for the analysis of 6-mercaptopurine and valganciclovir hydrochloride tested their selectivity, linearity, accuracy, stability of solutions and swab samples and finally, their detection and quantification limits.

The most critical locations were determined where the sampling procedures were carried out after the performed cleaning, including production equipment, production and non-production rooms, and external/non-contact parts of the devices. Each sampling location was assigned a unique code for further monitoring and evaluation during the procedure.

As part of the decontamination process, all single-purpose and difficult-to-clean equipment, accessories and auxiliary equipment were removed from the production plant. The mentioned equipment is excluded from the sampling procedure due to the aforementioned characteristics and the high degree of cross-contamination risk. On the rest of the dismantled production equipment, devices and auxiliary equipment, several consecutive cycles of cleaning were carried out, as well as sampling and analysis of swab samples collected from defined, representative locations after each performed decontamination cleaning. Consecutive cleaning and sampling were carried out until the defined acceptance limits were achieved, i.e. the values of the analysis results lower than or equal to the detection limit of the validated HPLC methods for the analysis of 6-mercaptopurine and valganciclovir hydrochloride.

After achieving the defined acceptance limits for all defined items in the cleaning process, the final phase of decontamination was performed, which included dismantling the filters of the production premises. After that, final cleaning and sampling of filter removal locations was carried out with the aim to verify the final state of contamination.

DISCUSSION

Validation procedure of HPLC methods for the analysis of 6-mercaptopurine and valganciclovir hydrochloride tested and proved their selectivity, linearity, accuracy, stability of solutions and swab samples, detection and quantification limits.

An evaluation of the obtained results of the samples analysis using HPLC methods for the determination of 6-mercaptopurine and valganciclovir hydrochloride was performed and final conclusion on the success of the cleaning procedures of the cytotoxic drugs production plant was made.

The process of cleaning the plant after the production of cytotoxic products was a project that required extensive, precise and conscientious work, a detailed approach, analytical and production experience, an engineering approach, knowledge of the chemical properties of the analysed compounds and potential interactions and it represented an unusual and very specific pharmaceutical-engineering challenge.

CONCLUSION

Cleaning validation of the plant after the production of pharmaceutical forms with cytotoxic active substances (decontamination procedure) was carried out by successive cleaning of all production and non-production rooms and external/non-contact surfaces of the devices and their sampling until achieving analytical results lower than or equal to the detection limits of validated analytical methods for the determination of 6-mercaptopurine and valganciclovir hydrochloride.

Based on all the obtained results, the production, non-production rooms and external/non-contact surfaces of the devices in the SOO2B plant are considered to be successfully decontaminated from the residues of 6-mercaptopurine and valganciclovir hydrochloride contaminants. The performed cleaning validation as well as the decontamination procedure itself are considered to be successfully completed, and, therefore, safe repurposing of all rooms and devices for other production purposes is possible.

SADRŽAJ

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA | 1 |
| 1.1. | Uvod u problematiku istraživanja | 1 |
| 1.2. | Validacija analitičkih metoda | 3 |
| 1.2.1. | Selektivnost/specifičnost | 5 |
| 1.2.2. | Točnost | 5 |
| 1.2.3. | Preciznost | 6 |
| 1.2.4. | Limit detekcije / Limit kvantifikacije..... | 7 |
| 1.2.5. | Linearnost i područje primjene..... | 8 |
| 1.2.6. | Robusnost | 9 |
| 1.3. | Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti | 12 |
| 1.4. | Validacija čišćenja..... | 16 |
| 1.4.1. | Uzorkovanje opreme | 17 |
| 1.4.2. | Kriteriji prihvatljivosti za ostatak kontaminanata na površinama | 19 |
| 2. | CILJ ISTRAŽIVANJA..... | 27 |
| 3. | MATERIJALI I METODE..... | 28 |
| 3.1.1. | Razvoj i validacija HPLC metode za određivanje 6-merkaptopurina | 28 |
| 3.2. | Razvoj i validacija HPLC metode za određivanje valganciklovir hidroklorida | 29 |
| 3.3. | Procjena kritičnosti prostora..... | 30 |
| 3.3.1. | Procjena kritičnosti proizvodnih prostora..... | 30 |
| 3.3.2. | Procjena kritičnosti neproizvodnih prostora..... | 33 |
| 3.4. | Procjena kritičnosti djelatnih tvari..... | 34 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.5. | Čišćenje prostorija i opreme | 37 |
| 3.6. | Uzorkovanje prostorija i vanjskih / nekontaktnih dijelova opreme..... | 39 |
| 4. | REZULTATI..... | 40 |
| 4.1. | Rezultati razvoja i validacije HPLC metode za određivanje 6-merkaptopurina | 40 |
| 4.1.1. | Selektivnost | 40 |
| 4.2. | Rezultati razvoja i validacije HPLC metode za određivanje valganciklovir hidroklorida | 51 |
| 4.2.1. | Selektivnost | 51 |
| 4.2.2. | Linearnost..... | 56 |
| 4.2.3. | Limit kvantifikacije / detekcije..... | 58 |
| 4.3. | Rezultati procjene kritičnosti prostorija | 62 |
| 4.3.1. | Rezultati procjene kritičnosti proizvodnih prostorija | 62 |
| 4.3.2. | Rezultati procjene kritičnosti neproizvodnih prostorija | 63 |
| 4.4. | Određivanje lokacija uzorkovanja..... | 64 |
| 4.5. | Rezultati procjene kritičnosti djelatnih tvari i određivanje kriterija prihvatljivosti..... | 66 |
| 4.5.1. | Rezultati procjene kritičnosti djelatne tvari 6-merkaptopurin | 66 |
| 4.5.2. | Rezultati procjene kritičnosti djelatne tvari valganciklovir hidroklorid..... | 67 |
| 4.5.3. | Određivanje kriterija prihvatljivosti za ostatak djelatne tvari..... | 68 |
| 4.6. | Rezultati provedenih uzorkovanja..... | 68 |
| 5. | RASPRAVA..... | 78 |
| 6. | ZAKLJUČAK | 81 |
| 7. | LITERATURA..... | 82 |
| 8. | ŽIVOTOPIS | 85 |

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Uvod u problematiku istraživanja

Zahtjevi dobre proizvođačke prakse (engl. *Good manufacturing practice, GMP*) pred farmaceutske industrije postavljaju visoke standarde vezane uz postupke čišćenja proizvodne opreme i prostora te osiguranje visokog stupnja minimalizacije rizika za sprječavanje unakrsne kontaminacije.

U skladu sa zahtjevima dobre proizvođačke prakse za sve postupke čišćenja potrebno je provesti procjenu i utvrditi varijabilne čimbenike za učinkovitost čišćenja te provesti izračune prihvatljivih ostataka kontaminanata na površinama. Validaciju čišćenja potrebno je provesti na relevantnom broju uzastopnih ciklusa kako bi se potvrdila učinkovitost postupka čišćenja. ^[1] Sve analitičke metode koje se primjenjuju tijekom aktivnosti vrednovanja postupka čišćenja moraju biti validirane s utvrđenim limitima detekcije i kvantifikacije. ^[2] Proizvodni prostor i oprema moraju biti dizajnirani i korišteni tako da odgovaraju operacijama koje treba izvesti, a raspored i dizajn moraju biti takvi da smanjuju rizik od pogreške i omogućavaju učinkovito čišćenje. ^[3] Ponekad je potrebno namijeniti cijeli proizvodni pogon / prostor za proizvodnju drugih farmaceutskih proizvoda te potom provesti validiran postupak čišćenja. Ovisno o riziku, potrebno je provesti validaciju čišćenja i površina koje nisu u kontaktu s proizvodom, pratiti zrak u prostorima te potvrditi učinkovitost mjera protiv kontaminacije zrakom i / ili mehaničkim prijenosom. Provedbu postupaka čišćenja potrebno je evidentirati s ciljem dokazivanja uspješne provedbe. ^[4]

Zbog sve većih zahtjeva u određivanju ostataka kontaminanata na kontaktnim, ali i nekontaktnim površinama opreme i prostora razvijaju se nove, sve preciznije, analitičke metode. Ubrzani razvoj modernih analitičkih tehnologija rezultirao je mogućnostima razvoja izrazito selektivnih i osjetljivih analitičkih metoda koje mogu odgovoriti na ove zahtjeve.

6-Merkaptopurin je purinski analog koji inhibira sintezu purina te posljedično i sintezu DNA i RNA. Koristi se za terapiju malignih i nemalignih stanja zbog svojeg citotoksičnog i imunosupresivnog djelovanja. [5]

Valganciklovir hidroklorid je antivirusik za prevenciju CMV (citomegalovirus) infekcije u osoba rizičnih za razvoj CMV bolesti, osoba u kojih je izvršena transplantacija solidnog organa te osoba oboljelih od HIV-infekcije. [6] Također se primjenjuje za održavanje liječenja CMV bolesti nakon, parenteralnom terapijom postignute, stabilizacije bolesti.

Budući da oba lijeka pripadaju skupini citotoksika, provedba redovnih postupaka čišćenja proizvodne opreme i prostora zahtjeva visok stupanj opreza. Nakon prestanka proizvodnje citotoksičnih lijekova u proizvodnom pogonu potrebno je provesti dekontaminacijski postupak, odnosno proces čišćenja proizvodnog pogona zbog prenamjene prostora u druge proizvodne svrhe. Validacija procesa čišćenja proizvodnog pogona predstavlja dokumentiranu evidenciju da odabrana metoda čišćenja udovoljava regulatornim zahtjevima za čistoću opreme na način da mjereni parametri ne prelaze dozvoljene granice. [7, 8] Validacija čišćenja provodi se da bi se izbjegla kontaminacija sljedećeg farmaceutskog proizvoda zbog ostataka djelatne farmaceutske tvari ili pomoćne tvari iz prethodnog proizvoda. [9] Kontaminirani farmaceutski proizvod mogu i mikrobiološka onečišćenja, različiti materijali korišteni u proizvodnji ili sredstava korištena za čišćenje, primjerice detergentsi. Mjesta uzorkovanja na opremi trebaju uključivati najnedostupnije prostore na opremi koji se teško čiste. Najčešće metode uzorkovanja u validaciji čišćenja su bris i ispirak. [10] Uzorkovanje brisom uključuje mehaničko skidanje analita s površine pomoću adsorptivnih materijala. Uzorkovanje ispirkom ne uključuje mehanički proces na površini materijala već se skuplja zadnji uzorak tekućine u procesu čišćenja ili specifični uzorak nakon čišćenja za potrebe validacije čišćenja.

Analitičke metode primijenjene za određivanje analita u postupcima čišćenja opreme u proizvodnji u farmaceutskoj industriji moraju zadovoljiti određene kriterije. ^[11] Prije svega analitičke metode za tu svrhu trebaju imati niže granice detekcije jer trebaju detektirati i odrediti analit u niskim koncentracijama koje odgovaraju postavljenom kriteriju prihvatljivosti, a moraju detektirati i odrediti analit u prisutnosti drugih sastojaka koji se mogu naći u uzorku. ^[12] Metode tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography, HPLC*) često se koriste u analitici određivanja ostataka kontaminanata zbog svoje visoke selektivnosti i osjetljivosti. ^[13, 14] Sastavnice uzorka tijekom analize različito se zadržavaju na stacionarnoj fazi ovisno o polarnosti ispitivanih analita. Razvijene HPLC metode za određivanje analita u postupcima čišćenja moraju biti validirane. Validacija analitičkih metoda potvrđuje i dokumentira da je korištena metoda u određenom analitičkom ispitivanju prikladna za namijenjenu upotrebu te jamči da će u propisanim uvjetima dati valjane rezultate. ^[15] Prema regulatornim zahtjevima dobre proizvođačke prakse i dobre laboratorijske prakse (engl. *Good laboratory practice, GLP*) postupci validacije analitičkih metoda postali su obveza. Analitička metoda razvija se i validira sve dok validacijski parametri ne zadovolje zahtjeve predviđene određenim propisima. Validacijski parametri koji se određuju su točnost, preciznost, specifičnost / selektivnost, limit detekcije, limit kvantifikacije, linearnost i radno područje te izdržljivost (robusnost).

1.2. Validacija analitičkih metoda

Provedbom validacija analitičkih metoda dobivamo dokumentirani dokaz o prikladnosti iste za pojedinu svrhu. ^[15] Validacijom metoda potvrđujemo sigurnost u točnost rezultata dobivenih tom metodom. Validiraju se nestandardne metode, nove metode razvijene u laboratoriju, standardne metode izvan njihovog radijusa te modificirane standardne metode (bilo promjenom procesa, instrumenta, analita ili matrice uzorka).

Načela dobre proizvođačke prakse definiraju nužnu provedbu validacija analitičkih metoda koje koristimo u farmaceutskoj industriji neovisno o njihovoj svrsi ^[16] te nam, između ostalog, provedeni postupak daje i informacije koje su potrebne za dobivanje odobrenja za stavljanje lijeka u promet od regulatornih tijela.

[14]

Prilikom provedbe postupka validacije analitičkih metoda farmaceutske kompanije suočavaju se s problematikom različitosti validacijskih zahtjeva koje moraju primijeniti za regulatorne prijave ovisno o mjestu gdje se nalazi određeno regulatorno tijelo. Tako da recimo prijava određenog farmaceutskog pripravka regulatornim tijelima u Europi, Japanu i SAD-u zahtjeva primjenu ICH kriterija validacije metoda. S druge strane, prijava tog istog pripravka od strane istog proizvođača u nekom drugom dijelu svijeta zahtjeva primjenu lokalnih smjernica tog područja. Postupak prijave time postaje skuplji i kompleksniji zbog izdavanja dokumentacije, osposobljavanja radnog osoblja, itd. Iz prethodno opisanog postoji potreba usklađivanja (harmonizacije) različitih validacijskih smjernica prema ICH smjernicama.

[14]

Validacijski parametri koji bi se trebali evaluirati, prema definiranom u ICH Q2 smjernicama ^[15] su:

- točnost,
- preciznost (ponovljivost, srednja preciznost i reproducibilnost),
- specifičnost/selektivnost,
- limit detekcije (LOD),
- limit kvantifikacije (LOQ),
- linearnost i područje primjene
- robusnost (izdržljivost).

1.2.1. Selektivnost/specifičnost

Selektivnost je svojstvo metode da razlikuje analit koji se određuje u smjesi ili matrici uzorka od drugih tvari. Pojam selektivnost preporučuje IUPAC, ali se u farmaceutskoj industriji koristi pojam specifičnost ili analitička specifičnost. ^[17] Iako se vrlo često poistovjećuju, to su dva različita svojstva metode.

Specifična metoda je ona kojom se može odrediti samo jedan specifičan analit, a selektivna je ona kojom se istovremeno može odrediti više komponenata koje pri određivanju ne smetaju jedna drugoj. Selektivnost pokazuje koliko se određenom metodom može odrediti željeni analit uz interferenciju drugih tvari sa sličnim karakteristikama. Interferencije mogu pojačavati ili smanjivati signale koji se pripisuju analitu.

Ukoliko nije moguće postići zadovoljavajuću selektivnost, odnosno specifičnost metode prema nekom analitu, potrebno je koristiti dvije ili više metoda kako bi se postigla potrebna razina razlikovanja analita i interferencija. Pri određivanju selektivnosti / specifičnosti, koriste se identifikacijski testovi i testovi onečišćenja, posebno u farmaceutskoj industriji i to pri kromatografskoj analizi lijekova, razgradnih produkata ^[18]

1.2.2. Točnost

Točnost predstavlja stupanj podudarnosti između rezultata ispitivanja i prihvaćene referentne vrijednosti. 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.

1.2.3. Preciznost

Preciznost analitičkog postupka pokazuje ponovljivost rezultata kroz seriju mjerenja napravljenih višestrukim uzorkovanjem i analiziranjem istog homogenog uzorka. Njome potvrđujemo sigurnost u točnost rezultata dobivenih određenom metodom. Preciznost se može razmotriti na tri nivoa: ponovljivost, srednja preciznost (unutar laboratorija) i reproducibilnost (između laboratorija).^[18]

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. Računa se prema jednadžbi:

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n s_i^2}{n}}$$

pri čemu je s_i standardno odstupanje za svaku seriju mjerenja za različite vremenske razmake, a n broj vremenskih razmaka.^[18]

Srednja (intermedijska) preciznost predstavlja neslaganja unutar laboratorija u nekom neodređenom vremenskom periodu, a koja su posljedica promjene uvjeta kao što su promjena reagensa, analitičara ili instrumenata / opreme. Računa se kao standardno odstupanje prema sljedećim jednadžbama:

$$s_b = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2}{n-1}}$$

$$\bar{\bar{x}} = \frac{\sum_{i=1}^n \bar{x}_i}{n}$$

Reproducibilnost pak predstavlja preciznost dobivenu u istom laboratoriju pod propisanim, unaprijed određenim uvjetima u određenim, opravdanim vremenskim razmacima. Reproducibilnost se promatra u slučaju standardizacije analitičke metode, a uključuje ispitivanje u najmanje dva laboratorija. Računa se kao standardno odstupanje prema jednadžbi:

$$s_R = \sqrt{s_m^2 - s_r^2 \frac{n-1}{n}}$$

pri čemu je s_m^2 standardno odstupanje svih laboratorija koji sudjeluju u procjeni reproducibilnosti. Za isti broj rezultata ispitivanja standardno odstupanje jednako je:

$$s_m^2 = \frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p (\hat{y}_i - \hat{m})^2$$

gdje p predstavlja broj laboratorija, \hat{y}_i je srednja vrijednost za i -ti laboratorij, a \hat{m} predstavlja opću srednju vrijednost rezultata svih laboratorija koji sudjeluju u procjeni reproducibilnosti. Izračunava se prema jednadžbi:

$$\hat{m} = \frac{\sum_{i=1}^p n_i \bar{y}_i}{\sum_{i=1}^p n_i}$$

pri čemu je n_i broj rezultata i -tog laboratorija koji sudjeluje u procjeni reproducibilnosti. [19]

1.2.4. Limit detekcije / Limit kvantifikacije

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 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 točnošću i preciznošću.

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 slijepa 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, a S nagib kalibracijskog pravca.

Nagib S može biti procijenjen iz kalibracijskog pravca analita. Procjena σ može biti napravljena na nekoliko sljedećih načina.

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.

1.2.5. 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).^[20] ICH preporučuje minimalno 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 u ppm).

1.2.6. Robusnost

Robusnost ili izdržljivost analitičke metode je mjera kapaciteta metode da ostane stabilna prilikom uvođenja malih, namjernih promjena u analitički postupak. Može se utvrditi tijekom razvoja analitičke metode. Procjena robusnosti nužna je tijekom razvoja metode, a ovisi o samoj metodi. Potrebno je dokazati da metoda daje dobre rezultate unosenjem promjena u uvjete ispitivanja.

Robusnost se ispituje tako da se uvode promjene uvjeta analize određenom metodom i istražuje se njihov utjecaj na rezultate analize. Na taj je način moguće utvrditi koje varijable imaju najveći utjecaj na metodu. Takve varijable je potrebno strogo kontrolirati prilikom izvođenja eksperimenata validiranim metodama. [20]

Validacijski parametri koje je potrebno ispitati prema ICH Q2 smjernicama [15] 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. ^[15]

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. ^[21]

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: ^[22]

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 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 i Dodatci: 1. Izvještaj i 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 (engl. *System suitability test*) zahtjevima. Ne bi trebale postojati temeljne promjene koje bi mogle promijeniti načela metodologije ili zahtijevati ponovnu validaciju. [22]

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: [22]

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. [22]

Jednom kada proizvod postane komercijalan i rutinski se ispituje u laboratoriju kontrole kvalitete (QC laboratoriju) može doći do promjena u metodama zbog istraga, optimizacija, novih kromatografskih pikova, valjanosti kolona, itd. Značajnost navedenih izmjena se mora evaluirati da bi se utvrdilo je 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. [23]

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.^[22]

Primjerice, ako je došlo do promjene u sintetskom putu djelatne tvari 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, biti će potrebno ispitati točnost i preciznost, no neće biti nužno ispitati područje, linearnost i robusnost budući da 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 koeluiru 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 djelatne tvari ili kromatografskih uvjeta, tada se linearnost, područje i točnost ne moraju ponovno ispitati.^[23]

1.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

U tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography, HPLC*) tekući ili kruti uzorak otapa se u prikladnom otapalu te potom prolazi kroz kromatografsku kolonu nošen tekućom mobilnom fazom. Razdvajanje komponenti na kromatografskoj koloni zasniva se na interakcijama stacionarne faze i samog analita, a to uključuje procese poput adsorpcije, razdiobe, ionske izmjene, odvajanje temeljem veličine čestica (engl. *Size exclusion*) kao i interakcijama mobilne faze i analita.^[24]

Kromatografske kolone se u većini slučajeva izrađuju od nehrđajućeg čelika s unutrašnjim promjerom 2,1 mm – 4,6 mm te duljinom od 30 mm – 300 mm. Kolone su punjene česticama poroznog silikagela veličine 3 μm – 10 μm koje mogu imati nepravilan ili sferični oblik. ^[24] Silikagel je najčešće korišteno punilo u kolonama koje se koriste u kromatografiji normalnih faza. Mehanizam zadržavanja se temelji na adsorpciji polarnih grupa molekula na polarne grupe stacionarne faze. Kolone s oktadecilsilil silikagelom najčešće se koriste pri 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 silikagel kao stacionarnu fazu dok će lipofilnija mobilna faza brže eluirati spoj s obrnuto-fazne kolone. ^[25] Danas se oko 75 % HPLC analitičkih metoda temelji na obrnuto-faznoj kromatografiji, kako zbog sigurnosnih razloga korištenjem nepolarnih otapala, tako i zbog razlike u pripremi uzorka u odnosu na kromatografiju normalnih faza. ^[22]

Oprema (instrumenti) na provedbu HPLC analiza se sastoje od spremnika s mobilnom fazom, pumpe koja tjera mobilnu fazu kroz sustav pod visokim tlakom, injektora koji dostavlja uzorak u mobilnu fazu, kromatografske kolone, detektora te jedinice za prikupljanje podataka. ^[20]

Postupak analize se 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. ^[20]

Najzastupljeniji HPLC detektori se temelje na spektroskopskom mjerenju, uključujući UV / Vis apsorpciju i fluorescenciju. Korištenjem UV / Vis detektora dobiva se kromatogram s prikazom ovisnosti apsorpcije o vremenu eluiranja. Volumen protočne ćelije kreće se u intervalu 1 μ l – 10 μ l, a duljina optičkog puta je 0,2 cm – 1 cm. Ograničenje je to da mobilna faza ne smije jako apsorbirati na valnoj duljini mjerenja. ^[24] UV / Vis detektori mogu biti fiksne valne duljine, varijabilnih valnih duljina ili detektori s diodnim nizom (engl. *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. ^[26]

Detektor varijabilnih valnih duljina koristi deuterijsku ili ksenonsku lampu kao izvor svjetlosti, a željena valna duljina se izolira pomoću monokromatora. DAD provodi istodobno mjerenje apsorpcije kao funkcije vremena eluiranja i određenog raspona valnih duljina. Tako se dobiva UV spektar za svaki eluirani kromatografski pik. ^[26]

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 smanjena ili prekinuta. ^[26]

Nešto učestaliji detektori su i oni temeljeni na elektrokemijskom mjerenju kao npr. amperometrija, voltometrija, kulometrija i konduktometrija. ^[24] Elektrokemijska detekcija može se koristiti za ionske spojeve ili spojeve koji 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. ^[26]

Kod analita koji nemaju značajan kromofor, potrebno je koristiti druge vrste detektora kao što su: detektori indeksa refrakcije, detektori raspršenja svjetlosti (engl. *Evaporating light-scattering detector; ELSD*), detektori specifični za elemente, elektrokemijski i maseni detektori. ^[26]

Detektori indeksa refrakcije prate promjene u indeksu refrakcije mobilne faze koji se događa zbog prisutnosti otopljenih molekula analita. ^[26] Detektori indeksa refrakcije su gotovo univerzalni te se mogu primijeniti za gotovo sve komponente, ali imaju slabiji limit detekcije: 100 ng – 1 µg injektiranog analita. ^[24]

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. ^[26]

Kemiluminiscencijski detektor (CLND) je vrlo selektivan i osjetljiv. Ako analit sadrži barem jedan atom dušika, može biti detektiran. ^[26]

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. ^[25] Spektrometri masa spregnuti s HPLC instrumentima imaju dobru detekcijsku granicu, tipično 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. ^[24]

1.4. Validacija čišćenja

Validacija čišćenja predstavlja dokumentirani program kojim se dokazuje efikasnost i reproducibilnost propisanih postupaka čišćenja te se provjerava njihova primjena. ^[1]

Svrha validacije čišćenja je dokumentirati i s visokim stupnjem sigurnosti dokazati da propisani postupak čišćenja uklanja ostatke djelatne tvari (engl. *Active pharmaceutical ingredient, API*), sredstva za čišćenje i dezinfekciju te mikrobiološke kontaminante s površine proizvodne opreme ispod prethodno propisanog kriterija prihvatljivosti. ^[1]

Validacija čišćenja mora se provesti za svaku kontaktanu površinu proizvodne opreme uključujući i manju opremu te pomoćni pribor. Svaka validacija čišćenja pojedine proizvodne opreme nakon najgoreg slučaja proizvoda tzv. *worst case* proizvoda mora biti provedena na minimalno 3 uzastopna ciklusa čišćenja ukoliko drugačiji pristup nije detaljno opravdan u referentnoj dokumentaciji validacije čišćenja. ^[1]

Studijom validacije čišćenja višenamjenske opreme mora se dokazati uklanjanje ostataka djelatne tvari, sredstva za čišćenje i dezinfekciju te mikrobioloških kontaminanata ispod unaprijed definiranih kriterija prihvatljivosti.

U slučaju da se višenamjenska oprema čisti bez upotrebe sredstava za čišćenje, studijom validacije čišćenja mora se dokazati samo uklanjanje ostataka djelatne tvari i mikrobiološke kontaminacije ispod unaprijed definiranih kriterija prihvatljivosti. Studija validacije čišćenja višenamjenske opreme mora biti provedena nakon najmanje tri uzastopna čišćenja *worst case* proizvodne opreme od ciljanog *worst case* proizvoda. Ukoliko se *worst case* proizvod ne proizvodi na *worst case* proizvodnoj opremi po potrebi se provode dvije ili više studija validacije čišćenja na pojedinoj opremi, tj. grupi opreme. ^[27]

U slučaju jednonamjenske opreme (engl. *Dedicated equipment*) namijenjene za proizvodnju samo jednog proizvoda (s istom djelatnom tvari ili tvarima) u sklopu validacije čišćenja mora se dokazati samo uklanjanje sredstva za čišćenje i dezinfekciju te mikrobiološke kontaminacije ispod kriterija prihvatljivosti.

Novi trendovi u programe studija validacije čišćenja sve češće uključuju i određivanje djelatne tvari na jednonamjenskoj opremi s ciljem kontrole i praćenje kretanja zaostatka kontaminacije koje potječe od nagomilavanja djelatne tvari. U slučaju da se jednonamjenska oprema čisti bez upotrebe sredstava za čišćenje studija validacije čišćenja samo mora dokazati uklanjanje mikrobiološke kontaminacije ispod kriterija prihvatljivosti.

Studije validacije čišćenja provode se prikupljanjem uzoraka s kritičnih dijelova proizvodne opreme te njihovom analizom pogodnom analitičkom metodom. Kritičnost dijelova opreme te odabir mjesta uzorkovanja se provodi na temelju poznavanja dizajna i postupaka rada opreme, materijala izrade kontaktnih površina te dodatno, ukoliko postoje podaci, na temelju iskustva čišćenja opreme. Za svu proizvodnu opremu koja je po svojem dizajnu, konstrukciji, materijalu izrade načinu rada i primjeni ista ili slična, iste je klase i podklase te se čisti prema istoj proceduri čišćenja, kad god je primjenjivo, moguće je primijeniti načelo matriksiranja opreme (engl. *Bracketing approach*). Matriksiranjem opreme odabire se ona oprema koja će zbog svoje najveće površine, najkritičnijih mjesta za čišćenje ili nekog drugog logički opravdanog razloga, biti predstavnik grupe opreme u svrhu validacije čišćenja. [27]

1.4.1. Uzorkovanje opreme

Metode uzorkovanja koje se koriste u svrhu validacije čišćenja temelje se na procjeni kritičnosti i dizajna opreme te na vrsti eventualno prisutnog kontaminanta koji se želi detektirati.

1.4.1.1. Metoda uzorkovanja briseva

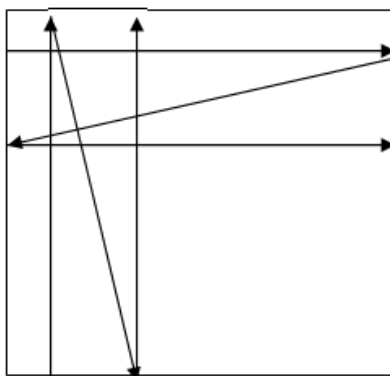
Metoda uzorkovanja briseva koristi se kada se na određenoj površini žele detektirati ostaci djelatnih tvari, ostaci sredstava za čišćenje i dezinfekciju odnosno mikrobiološka kontaminacija. Predstavlja direktnu i preferiranu metodu uzorkovanja različitih površina pa tako i površina opreme koju je moguće demontirati i čije su kontaktne površine i kritična mjesta dostupna za uzorkovanje. [1, 27]

Prilikom uzorkovanja ovom metodom u dokumentaciji studije validacije čišćenja jasno se definira tip korištenog brisa, pogodno otapalo za uzorkovanje kao i ostali pomoćni pribor te ambalaža za uzorkovanje i čuvanje uzorka do trenutka pripreme istog za početak analize.

Uzorkuje se tako da se štapić s tupferom izvadi iz epruvete ili druge odgovarajuće ambalaže, umoči u otapalo definirano metodom analize brisa, ocijedi višak otapala te se prebriše ispitivana površina. Veličina površine koju je potrebno uzorkovati definirana je u referentnoj dokumentaciji validacije čišćenja, a u praksi to najčešće iznosi 100 cm² (10 x 10 cm) za određivanje ostatka djelatnih tvari, detergenta i dezinficijensa te 25 cm² za određivanje mikrobiološke kontaminacije.

Bris ravnih površina uzima se laganim pritiskom tupfera na površinu najprije smjerom lijevo na desno pa zatim od dolje prema gore.

Uz rotaciju tupfera, uzorkuje se prema shemi na Slici 1.



Slika 1. Shema uzorkovanja briseva s ravnih površina

Bris neravnih površina uzima se tako da se s površina koje imaju zaobljene ili neravne plohe uzorkovanje provede prebrisavanjem definirane površine štapićem s tupferom u dva okomita smjera, a kritični dijelovi se prebrišu posebno.

Po završetku svakog uzorkovanja štapić s tupferom se vrati u originalnu ambalažu, ako postoji u sklopu brisa, ili u prikladnu pripremljenu ambalažu (najčešće staklena bočica) te se uzorak dobro zatvori.

Prije uzorkovanja briseva propisanih studijom validacije čišćenja potrebno je prikupiti i uzorak slijepa probe brisa (negativna kontrola), osim kod uzorkovanja za mikrobiološku analizu gdje se slijepa proba uzorkuje na kraju postupka uzorkovanja.

1.4.1.2. Metoda uzorkovanja ispiraka

Metoda uzorkovanja ispiraka koristi se u slučaju površina nedostupnih za uzorkovanje metodom brisa, umjesto ili dodatno uz primjenu uzorkovanja metodom brisa. Koristi se kada se žele detektirati ostaci istih kontaminanata kao i kod metode uzorkovanja brisevima. Metoda se temelji na propuštanju, sakupljanju i analizi medija za završno ispiranje preko površine na kojoj se želi detektirati ciljani kontaminant. Vrsta i volumen medija za ispiranje, površina koja se ispire, pribor te količina uzorka koju je potrebno prikupiti u određenu ambalažu definirana je u referentnoj dokumentaciji validacije čišćenja. [27]

Uzorkovanje ispiraka može se provesti na način da se željena površina ispire pročišćenom vodom ili vodom za injekcije nakon završenog procesa čišćenja. Ispirak se prikuplja u definiranu vrstu ambalaže. Kao slijepa proba (negativna kontrola) uzima se uzorak pročišćene vode ili vode za injekcije koja je korištena za ispiranje.

1.4.2. Kriteriji prihvatljivosti za ostatak kontaminanata na površinama

Kriterijima prihvatljivosti definirana je maksimalna dozvoljena količina ostatka kontaminanta na površini opreme, kao i mikrobiološkog onečišćenja, a koja neće kontaminirati sljedeći proizvod te je prihvatljiva za sigurnost pacijenta i kvalitetu lijeka.

Prilikom definiranja kriterija prihvatljivosti pozornost treba obratiti na to da isti mora biti:

- praktičan, primjenjiv i logično zasnovan,
- dokaziv i provjerljiv,
- provediv,
- znanstveno objašnjiv. [27]

1.4.2.1. Kriterij prihvatljivosti vizualno čisto

Kriterij prihvatljivosti vizualno čiste opreme je prvi i osnovni kriterij koji se primjenjuje u studijama validacije čišćenja. Predstavlja preduvjet za pristupanje daljnjem uzorkovanju pogodnom metodom te analitičkom određivanju zaostalih kontaminanata na površinama. [1]

1.4.2.2. Kriterij prihvatljivosti za djelatne tvari

Postoje različiti pristupi izračuna kriterija prihvatljivog ostatka djelatne tvari na površini, no oni koje danas definiraju smjernice dobre proizvođačke prakse su prema pristupu ne više od ADE (engl. *Acceptable daily exposure approach, ADE*) odnosno ne više od 1/1000 minimalne dnevne terapijske doze (engl. *Lowest therapeutic dose approach with safety factor 1000*). Kao kriterij prihvatljivosti uzima se onaj stroži od spomenuta dva pristupa.

Za briseve opreme:

U slučaju da je ADE manji od 1/1000 minimalne dnevne terapijske doze prihvatljivi ostatak djelatne tvari na površini računa se prema pristupu ne više od ADE vrijednosti prema formuli:

$$A [\mu\text{g}/\text{brisu}] = \frac{\text{ADE} [\text{mg}]}{C [\text{mg}]} \times \frac{D [\text{cm}^2]}{E [\text{cm}^2]} \times F [\text{kg}] \times 10^9 \times R$$

gdje je:

A – maksimalno dozvoljena količina kontaminanta po brisu [$\mu\text{g}/\text{brisu}$],

ADE – dopušteno dnevno izlaganje djelatne tvari prethodnog proizvoda [mg],

C – težina dozirnog oblika u koju ulazi maksimalna dnevna dozvoljena doza sljedećeg proizvoda [mg],

D – površina brisa [cm²],

E – kontaktna površina vlaka opreme na kojoj se proizvodi proizvod [cm²],

F – minimalna veličina serije sljedećeg proizvoda [kg],

10⁹ je faktor za pretvorbu kg u µg,

R – postotak iskorištenja s brisa i površine, *recovery* faktor, uračunava se prilikom izražavanja rezultata analize. [27, 28]

U slučaju da je ADE veći od 1/1000 minimalne dnevne terapijske doze prihvatljivi ostatak djelatne tvari na površini računa se prema pristupu ne više od 1/1000 minimalne dnevne terapijske doze prema formuli:

$$A \text{ [}\mu\text{g/brisu]} = \frac{B \text{ [mg]} / 1000}{C \text{ [mg]}} \times \frac{D \text{ [cm}^2\text{]}}{E \text{ [cm}^2\text{]}} \times F \text{ [kg]} \times 10^9 \times R$$

gdje je:

A – maksimalno dozvoljena količina kontaminanta po brisu [µg/brisu],

B – minimalna dnevna terapijska doza prethodnog proizvoda [mg],

C – težina dozirnog oblika u koju ulazi maksimalna dnevna dozvoljena doza sljedećeg proizvoda [mg],

D – površina brisa [cm²],

E – kontaktna površina vlaka opreme na kojoj se proizvodi proizvod [cm²],

F – minimalna veličina serije sljedećeg proizvoda [kg],

10⁹ je faktor za pretvorbu kg u µg,

R – postotak iskorištenja s brisa i površine, *recovery* faktor, uračunava se prilikom izražavanja rezultata analize. [27, 28]

Za ispirke opreme:

U slučaju da je ADE manji od 1/1000 minimalne dnevne terapijske doze prihvatljivi ostatak djelatne tvari računa se prema formuli:

$$A [\mu\text{g/ispirku}] = \frac{\text{ADE [mg]}}{C [\text{mg}]} \times \frac{D [\text{cm}^3]}{E [\text{cm}^3]} \times F [\text{kg}] \times 10^9$$

gdje je:

A – maksimalno dozvoljena količina kontaminanta po ispirku [$\mu\text{g/ispirku}$],

ADE – dopušteno dnevno izlaganje djelatne tvari prethodnog proizvoda [mg],

C – težina dozirnog oblika u koju ulazi maksimalna dnevna dozvoljena doza sljedećeg proizvoda [mg],

D – volumen ispirka [cm^3],

E – volumen vode za ispiranje opreme prilikom uzimanja ispirka, ovisan o opremi [cm^3],

F – minimalna veličina serije sljedećeg proizvoda [kg],

10^9 je faktor za pretvorbu kg u μg . [27, 28]

U slučaju da je ADE veći od 1/1000 minimalne dnevne terapijske doze prihvatljivi ostatak djelatne tvari računa se prema formuli:

$$A [\mu\text{g/ispirku}] = \frac{B [\text{mg}] / 1000}{C [\text{mg}]} \times \frac{D [\text{cm}^3]}{E [\text{cm}^3]} \times F [\text{kg}] \times 10^9$$

gdje je:

A – maksimalno dozvoljena količina kontaminanta po ispirku [$\mu\text{g/ispirku}$],

B – minimalna dnevna terapijska doza prethodnog proizvoda [mg],

C – težina dozirnog oblika u koju ulazi maksimalna dnevna dozvoljena doza sljedećeg proizvoda [mg],

D – volumen ispirka [cm^3],

E – volumen vode za ispiranje opreme prilikom uzimanja ispirka, ovisan o opremi [cm^3],

F – minimalna veličina serije sljedećeg proizvoda [kg],

10^9 je faktor za pretvorbu kg u μg . [27, 28]

U slučajevima kada se ne raspolaze podacima o ADE, minimalnoj terapijskoj dozi ili vrsti kontaminanta izračun za prihvatljivi ostatak na površini se kad god je primjenjivo bazira na pristupu: 10 ppm-a tj. ne više od 10 mg kontaminanta u 1 kg sljedećeg proizvoda (engl. *10 ppm approach*), a računa se prema formuli:

Za briseve opreme:

$$A [\mu\text{g}/\text{brisu}] = \frac{10 [\text{mg}] \text{ kontaminanata}}{1 [\text{kg}] \text{ sljed. proizvoda}} \times \frac{D [\text{cm}^2]}{E [\text{cm}^2]} \times F [\text{kg}] \times 10^3 \times R$$

gdje je:

A – maksimalno dozvoljena količina kontaminanta [mg/brisu],

D – površina brisa [cm²],

E – kontaktna površina opreme [cm²],

F – minimalna veličina serije sljedećeg proizvoda [kg],

10³ je faktor za pretvorbu mg u μg,

R – postotak iskorištenja s brisa i površine, *recovery* faktor. [27, 28]

Za ispirke opreme:

$$A [\mu\text{g}/\text{ispirku}] = \frac{10 [\text{mg}] \text{ kontaminanata}}{1 [\text{kg}] \text{ sljed. proizvoda}} \times \frac{D [\text{cm}^3]}{E [\text{cm}^3]} \times F [\text{kg}] \times 10^3$$

gdje je:

A – maksimalno dozvoljena količina kontaminanta [mg/ispirku],

D – volumen ispirka [cm³],

E – volumen vode za ispiranje opreme prilikom uzimanja ispirka [cm³],

F – minimalna veličina serije sljedećeg proizvoda [kg],

10³ je faktor za pretvorbu mg u μg. [27, 28]

1.4.2.3. Kriterij prihvatljivosti za detergente i dezinficijense

Prihvatljivi ostatak sredstava za čišćenje i dezinfekciju na površini opreme računa se na temelju ADE vrijednosti za detergente za koje je dostupan podatak prema formuli:

Za briseve opreme:

$$A [\mu\text{g}/\text{brisu}] = \frac{\text{ADE} [\text{mg}]}{C [\text{mg}]} \times \frac{D [\text{cm}^2]}{E [\text{cm}^2]} \times F [\text{kg}] \times 10^9 \times R$$

gdje je:

A – maksimalno dozvoljena količina kontaminanta po brisu [$\mu\text{g}/\text{brisu}$],

ADE – dozvoljeno dnevno izlaganje detergenta / dezinficijensa [mg],

C – težina dozirnog oblika u koju ulazi maksimalna dnevna dozvoljena doza sljedećeg proizvoda [mg],

D – površina brisa [cm^2],

E – kontaktna površina vlaka opreme na kojoj se proizvodi proizvod u kontaktu s deterгентom / dezinficijensom [cm^2],

F – minimalna veličina serije sljedećeg proizvoda [kg],

10^9 je faktor za pretvorbu kg u μg ,

R – postotak iskorištenja s brisa i površine, *recovery* faktor, računa se prilikom izražavanja rezultata analize. ^[27, 28]

Za detergente i dezinficijense koji su već dugi niz perioda u upotrebi i za koji nisu dostupni podaci o ADE vrijednosti, prihvatljivi ostatak sredstva za čišćenje i dezinfekciju na površini opreme bazira se na toksičnosti sredstava za čišćenje i dezinfekciju – LD50 pristup sa sigurnosnim faktorom 10 000 (engl. *Lethal dose 50 approach with safety factor 10 000*), a računa se prema formuli:

$$A [\mu\text{g}/\text{brisu}] = \frac{B [\text{mg}/\text{kg}] \times C [\text{kg}] / 1000}{D [\text{mg}]} \times \frac{E [\text{cm}^2]}{F [\text{cm}^2]} \times G [\text{kg}] \times 10^9 \times R$$

gdje je:

A – maksimalno dozvoljena količina ugljika po brisu [$\mu\text{g}/\text{brisu}$],

B – LD50 oralno za štakore tj. smrtna doza za 50 % oralno testiranih štakora [mg/kg],

C – prosječna masa čovjeka [kg],

D – težina dozirnog oblika u koju ulazi maksimalna dnevna dozvoljena doza sljedećeg proizvoda [mg],

E – površina brisa [cm^2],

F – kontaktna površina opreme [cm^2],

G – minimalna veličina serije sljedećeg proizvoda [kg],

10^9 je faktor za pretvorbu kg u μg ,

R – postotak iskorištenja s brisa i površine, *recovery* faktor

Za ispirke opreme, kada je to primjenjivo, kriterij prihvatljivosti ispiraka opreme je jednak USP i Ph.Eur.

kriterijima za završni medij za pranje. [27, 28]

1.4.2.4. Kriterij prihvatljivosti za mikrobiološku kontaminaciju

Za briseve opreme:

Za proizvodnu opremu u proizvodnim pogonima čvrstih, oralnih, farmaceutskih oblika primjenjuje se jedinstveni kriterij prihvatljivosti mikrobiološke kontaminacije:

$$A = 25 \text{ CFU/brisu}$$

***Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* ne smiju biti prisutne.**

gdje je:

A – maksimalno dozvoljena količina kontaminanta po brisu površine najmanje 25 cm^2 [CFU/brisu].

Definirani kriterij je generalno prihvaćen kriterij mikrobiološke kontaminacije kontaktnih površina opreme. Kriterij je u skladu i stroži od zahtjeva za mikrobiološku čistoću proizvoda te granice akcije za mikrobiološku čistoću nekontaktnih površina opreme u prostorijama klase D čistoće zraka.

Za proizvodnu opremu u proizvodnim pogonima polučvrstih i tekućih farmaceutskih oblika primjenjuje se jedinstveni kriterij prihvatljivosti mikrobiološke kontaminacije:

$$A = 15 \text{ CFU/brisu}$$

***Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* ne smiju biti prisutne.**

gdje je:

A – maksimalno dozvoljena količina kontaminanta po brisu površine najmanje 15 cm² [CFU/brisu].

Definirani kriterij je generalno prihvaćen kriterij mikrobiološke kontaminacije kontaktnih površina opreme. Kriterij je u skladu i stroži od zahtjeva za mikrobiološku čistoću proizvoda te granice akcije za mikrobiološku čistoću nekontaktnih površina opreme u prostorijama klase C čistoće zraka.

Za opremu koja se koristi za proizvodnju sterilnih lijekova, a koja se nakon čišćenja termički obrađuje i sterilizira, jedinstveni kriterij prihvatljivosti mikrobiološke kontaminacije se ne primjenjuje već se u sklopu studije validacije čišćenja definira mikrobiološko opterećenje opreme prije termičke obrade odnosno sterilizacije. Dodatno, svi mikroorganizmi izolirani tijekom studije moraju biti identificirani.

Za ispirke opreme:

Kriterij prihvatljivosti ispiraka opreme za detekciju mikrobiološke kontaminacije jednaki je specifikaciji za završni medij za ispiranje opreme prema USP i Ph. Eur.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja u okviru ovog specijalističkog rada bio je razviti i validirati analitičke metode za određivanje ostataka djelatnih tvari 6-merkaptopurina i valganciklovir hidroklorida na površinama od različitih materijala.

Upotrebom razvijenih i validiranih, analitičnih metoda i korištenjem definiranih postupaka čišćenja proizvodne opreme, proizvodnih, ali i neproizvodnih prostorija te vanjskih / nekontaktnih dijelova opreme i uređaja provesti dekontaminaciju pogona za proizvodnju citotoksičnih lijekova te dokumentirano dokazati da su kontaminanti 6-merkaptopurin i valganciklovir hidroklorid uklonjeni ispod propisanog kriterija prihvatljivosti s obuhvaćenih površina.

Uspješno završen postupak čišćenja jamstvo je sigurne prenamjene prostorija, opreme i uređaja u druge proizvodne svrhe.

3. MATERIJALI I METODE

3.1.1. Razvoj i validacija HPLC metode za određivanje 6-merkaptopurina

U svrhu provedbe projekta dekontaminacije razvijena je i validirana HPLC metoda za određivanje ostataka 6-merkaptopurina na površinama proizvodnih prostora i opreme. Postupak je proveden na instrumentu Agilent 1200 SL, kromatografska kolona ZORBAX SB-C8, 50 x 4,6 mm, ispunjena 1,8 µm česticama stacionarne faze. Za detekciju je korišten DAD detektor (325 nm BW 8 nm; Ref.: 420 nm BW 20 nm). Validacija metode provedena je prema internim protokolima u skladu s odobrenim Plivinim postupkom validacije metoda kao i svim ostalim primjenjivim Plivinim operativnim postupcima.

Provedena je validacija sljedećih parametara:

- selektivnost,
- limit kvantifikacije,
- linearnost,
- točnost,
- stabilnost uzoraka.

Prilikom razvoja i validacije HPLC metode za određivanje ostataka 6-merkaptopurina korišteni su uzorci i materijali navedeni u Tablici 2.

Tablica 2. Korišteni uzorci i materijali tijekom validacije metode za 6-merkaptopurin

| Uzorci i materijali | Naziv / Koncentracija / Površina |
|---|----------------------------------|
| Bris za uzorkovanje | TW TEXWIPE TX716 / - / - |
| Površina – čelik | - / - / 1 dm ² |
| Površina – poliuretan | - / - / 1 dm ² |
| Površina – poliamid | - / - / 1 dm ² |
| Površina – anodizirani aluminijski | - / - / 1 dm ² |
| Placebo | - / - / - |
| Detergent – DP5 | - / 1,0 % / - |
| Detergent – limunska kiselina | - / 1,0 % / - |
| Detergent / Dezinficijens – Plivasept | - / 1,0 % / - |
| Detergent / Dezinficijens – Asepsol EKO | - / 1,0 % / - |
| Djelatna tvar – 6-merkaptopurin | Serijski Br.: 1544476 |

3.2. Razvoj i validacija HPLC metode za određivanje valganciklovir hidroklorida

U svrhu provedbe projekta dekontaminacije također je razvijena i validirana HPLC metoda za određivanje ostataka valganciklovir hidroklorida na površinama proizvodnih prostora i opreme. Postupak je proveden na instrumentu Agilent 1200 SL, kromatografska kolona ZORBAX Eclipse XDB-C18, 30 x 2,1 mm, ispunjena 1,8 µm česticama stacionarne faze. Za detekciju je korišten fluorescencijski detektor (λ (Ex): 260 nm, λ (Em): 380 nm). Validacija metode provedena je prema s internim protokolima u skladu s odobrenim Plivinim postupkom validacije metoda kao i svim ostalim primjenjivim Plivinim operativnim postupcima.

Provedena je validacija sljedećih parametara:

- selektivnost,
- limit kvantifikacije,
- linearnost,
- točnost,
- stabilnost uzoraka.

Prilikom razvoja i validacije HPLC metode za određivanje ostataka valganciklovir hidroklorida korišteni su uzorci i materijali navedeni u Tablici 3.

Tablica 3. Korišteni uzorci i materijali tijekom validacije metode za određivanje valganciklovir hidroklorida

| Uzorci i materijali | Naziv / Koncentracija / Površina |
|--|---|
| Bris za uzorkovanje | TW TEXWIPE TX716 / - / - |
| Površina – čelik | - / - / 1 dm ² |
| Površina – poliuretan | - / - / 1 dm ² |
| Površina – poliamid | - / - / 1 dm ² |
| Površina – anodizirani aluminij | - / - / 1 dm ² |
| Placebo | - / - / - |
| Detergent – DP5 | - / 0,01 % / - |
| Djelatna tvar – valganciklovir hidroklorid | Serijski Br.: 22001208 |

3.3. Procjena kritičnosti prostora

Pogon Suhi oralni oblici 2, dio B (nadalje SOO2B) predstavljao je namjenski pogon za proizvodnju citotoksičnih proizvoda. Zbog prestanka proizvodnje citotoksičnih proizvoda u prethodno navedenom pogonu proveden je dekontaminacijski postupak zbog prenamjene prostora.

Dekontaminacija proizvodnih prostorija i vanjskih / nekontaktnih površina uređaja u pogonu SOO2B provedena je u skladu s internom metodologijom pristupa validaciji čišćenja za suhe oralne oblike, a svrha provedene validacije čišćenja bila je dokumentirano potvrditi da su kontaminanti 6-merkaptopurin i valganciklovir hidroklorid, kao jedina dva proizvoda koja su se proizvodila u SOO2B, uklonjene s površina proizvodnih prostorija i vanjskih / nekontaktnih površina uređaja.

Prostorije u pogonu SOO2B su označene brojčanom oznakom primjerice Pb001 ili Pb101, gdje Pb označava „Part b“, prva znamenka označava kat na kojem se prostorija nalazi (0 označava prizemlje), a druge dvije redni broj prostorije. Prilikom provedbe postupka prostorije su razvrstane u dvije osnovne skupine: Proizvodni i neproizvodni prostori

3.3.1. Procjena kritičnosti proizvodnih prostora

U Tablici 4. dan je popis svih proizvodnih prostorija obuhvaćenih validacijom čišćenja na kojima je proveden postupak dekontaminacije. Kao proizvodne prostorije definirani su oni prostori u kojima su se provodile proizvodne aktivnosti, prostori korišteni za skladištenje čistih dijelova i opreme kao i pomoćne prostorije (prostori za pranje i čišćenje dijelova opreme).

Tablica 4. Popis proizvodnih prostorija obuhvaćenih validacijom čišćenja u SOO2B

| Oznaka prostorije | Naziv prostorije |
|-------------------------|-------------------------------------|
| Prizemlje, SOO2B | |
| Pb013 | Primarno opremanje |
| Pb014 | Sekundarno opremanje |
| 1. kat, SOO2B | |
| Pb108 | Prostor za čuvanje materijala |
| Pb110 | Prostor za vaganje materijala |
| Pb111 | Prostor za vaganje materijala |
| Pb112 | Vaganje API-a, sijanje, granulacija |
| Pb113 | Prostor za IPC |
| Pb114 | Kapsuliranje |
| Pb115 | Oblaganje |
| Pb115a | Oblaganje |
| Pb116 | Tabletiranje |
| Pb117 | Kompaktiranje |
| Pb118 | Višenamjenska soba |
| Pb119 | Praonica |
| Pb120 | Čisto spremište |

Cijeli objekt treba promatran je kao jedan „otok“ zaštićen zračnim propusnicima koji su zajednički za sve proizvodne prostorije i čistim hodnikom. Razlike tlakova, „*interlocking*“ i dekontaminacijski postupci osiguravaju zadržavanje eventualne kontaminacije unutar objekta.

U svaku proizvodnu prostoriju se ne ulazi kroz pojedinačni propusnik već se zajednički propusnik nalazi na ulazu u proizvodnu cjelinu – proizvodni prostor 1. kat i proizvodni prostor Prizemlje. Proizvodni prostor na 1. katu sastoji se od prostorija za vaganje pomoćnih sirovina, pripremu smjese za tabletiranje, tabletiranje, oblaganje te višenamjenskih prostorija. U prizemlju se nalazi prostor za primarno i sekundarno pakiranje poluproizvoda.

U prostorijama je propisano čišćenje:

- poda, stropa, zidova, vrata, staklenih površina,
- panela prostorije s pokazivačima temperature, relativne vlage i razlike tlakova u prostoriji,
- panela uređaja s priključcima za struju te otvorom za otpad,
- namještaja (stol, stolac, police, ormari),
- sudopera u propusniku za osoblje i propusniku za materijale,
- tuša za dekontaminaciju,
- cijevi za odsis prašine i zraka,
- cijevi za pročišćenu vodu,
- dizala binova i spremnika, stanice za sijanje, uređaja za homogenizaciju,
- slivnika i odvoda.

Prostorije i nekontaktni dijelovi uređaja se čiste tako da se usiše prašina (ukoliko je primjenjivo), nakon toga se prebrisavaju krpom umočenom u otopinu odgovarajućeg detergenta te ispiru prebrisavanjem krpom umočenom u vodu. Sve površine se dezinficiraju prebrisavanjem krpom umočenom u otopinu dezinficijensa.

Po završetku proizvodnje proizvoda u proizvodnoj prostoriji se čisti:

- pod, strop, zidovi, panel, vrata, staklene površine, nekontaktne površine namještaja u prostoriji (stol, stolac, police, ormari),
- sudoper, kada, cijevi za pročišćenu vodu i cijevi za odsis (gdje je to primjenjivo),
- mijenja se filter na odsisu (gdje je to primjenjivo).

3.3.2. Procjena kritičnosti neproizvodnih prostora

U Tablici 5. dan je popis svih neproizvodnih prostorija obuhvaćenih validacijom čišćenja na kojima je proveden postupak dekontaminacije.

Tablica 5. Popis neproizvodnih prostorija obuhvaćenih validacijom čišćenja u SOO2B

| Oznaka prostorije | Naziv prostorije |
|-------------------------|--|
| Prizemlje, SOO2B | |
| Pb002 | Muška garderoba |
| Pb003 | WC (muški) |
| Pb004 | Zračni prostor (airlock) za osoblje (muški) |
| Pb006 | Ženska garderoba |
| Pb007 | WC (ženski) |
| Pb008 | Zračni prostor (airlock) za osoblje (ženski) |
| Pb009 | Hodnik prizemlje |
| Pb011a | Zračni prostor (airlock) za osoblje 1 |
| Pb011b | Zračni prostor (airlock) za osoblje 2 |
| Pb011c | Zračni prostor (airlock) za osoblje 3 |
| Pb011d | Zračni prostor (airlock) za osoblje 4 |
| Pb012a | Zračni prostor (airlock) za materijal 1 |
| Pb012b | Zračni prostor (airlock) za materijal 2 |
| Pb012c | Tuš s izmaglicom |
| Pb015 | Vaganje otapala |
| Pb020 | Skladište |
| Pb022 | Spremište |
| 1. kat, SOO2B | |
| Pb010/Pb101 | Stubište |
| Pb102 | Hodnik |
| Pb021/Pb103 | Dizalo D3 |
| Pb105a | Zračni prostor (airlock) za materijal 1 |
| Pb105b | Zračni prostor (airlock) za materijal 2 |
| Pb105c | Tuš s izmaglicom |
| Pb106a | Zračni prostor (airlock) za osoblje 1 |
| Pb106b | Zračni prostor (airlock) za osoblje 2 |
| Pb106c | Zračni prostor (airlock) za osoblje 3 |
| Pb106d | Zračni prostor (airlock) za osoblje 4 |
| Pb107 | Hodnik |

Pojedine neproizvodne prostorije su prilikom uzorkovanja objedinjene u jedan prostor. Prostorije su objedinjene na temelju svoje funkcije, dizajna i veličine te se uzorci prikupljeni u pojedinoj prostoriji smatraju reprezentativnim za cjelinu prostora.

Na sve neproizvodne prostorije primjenjuju se isti postupci čišćenja kao oni opisani u točki 3.3.1. Procjena kritičnosti proizvodnih prostora.

3.4. Procjena kritičnosti djelatnih tvari

Prilikom procjene kritičnosti pojedine djelatne tvari sa stajališta validacije čišćenja u obzir su uzeti i evaluirani različiti dostupni podaci o karakteristikama djelatne tvari, formulaciji lijeka te proizvodnom i postupku opremanja (pakiranja) lijeka kako bi se temeljem provedene evaluacije donio zaključak o ukupnoj kritičnosti pojedine djelatne tvari sa stajališta validacije čišćenja.

Prilikom evaluacije podataka o samoj djelatnoj tvari najveći doprinos daju podaci o:

- **Topljivost djelatne tvari u vodi** – primaran izvor podataka o topljivosti su monografije dostupnih farmakopeja: Europska farmakopeje (Ph. Eur.), Američka farmakopeja (USP), Britanska farmakopeja (BP) i slično. Ukoliko djelatna tvari nije farmakopejska pretražene su dostupne specifikacije djelatne tvari. Ukoliko i tamo nisu bile dostupne potrebe informacije provodi se ispitivanje topljivosti po Ph. Eur. metodi u vlastitom laboratoriju Kontrole kvalitete (engl. *Quality control; QC*). Temeljem provedenog ispitivanja topljivosti djelatnoj tvari se pridružuje odgovarajuća ocjena koja ovisi o topljivosti molekule u vodi. U Tablici 6. prikazani su razredi ocjena u intervalu 1 – 7 koji se temelje na topljivosti djelatne tvari u vodi tj. na potrebnom volumenu vode da bi se otopio 1 g djelatne tvari.

Tablica 6. Ocjene djelatnih tvari temeljem njihove topljivosti u vodi

| Ocjena | Topljivost (prema Ph. Eur.) | Okvirni volumen vode u mililitrima na gram tvari |
|--------|--|--|
| 1 | Vrlo lako topljiv (engl. <i>very soluble</i>) | manje od 1 ml |
| 2 | Lako topljiv (engl. <i>freely soluble</i>) | od 1 ml do 10 ml |
| 3 | Topljiv (engl. <i>soluble</i>) | od 10 ml do 30 ml |
| 4 | Djelomično topljiv (eng. <i>sparingly soluble</i>) | od 30 ml do 100 ml |
| 5 | Slabo topljiv (engl. <i>slightly soluble</i>) | od 100 ml do 1000 ml |
| 6 | Vrlo slabo topljiv (engl. <i>very slightly soluble</i>) | od 1000 ml do 10000 ml |
| 7 | Praktički netopljiv (engl. <i>practically insoluble</i>) | više od 10000 ml |

- **Potentnost i djelovanje djelatne tvari** – primaran izvor podataka su upute o lijeku (MOCK) ili tzv. „*package leaflet*“ (PLfD) te izvori poput Sigurnosnog lista (engl. *Material safety data sheet*) i Rx liste.
- **Toksičnost djelatne tvari** – temeljem dostupnih podataka i provedenih toksikoloških studija evaluiran je podatak o OHC kategoriji (engl. *Occupational health categorization*) i ADE vrijednosti (engl. *Acceptable daily exposure*) djelatne tvari.

Procjena kritičnosti formulacije lijeka i proizvodnog postupka provodi se analizom kompletne formulacije lijeka prema referentnoj proizvodnoj dokumentaciji te analizom proizvodne opreme i njezinih kritičnih, kontaktnih dijelova. U obzir se uzima i čistljivost kompletne formulacije. Temeljem prethodno opisanog lijeku se dodjeljuje odgovarajuća ocjena kako je definirano u Tablicama 7. i 8.

Tablica 7. Ocjena formulacije lijeka pri procjeni kritičnosti za validaciju čišćenja

| Formulacija lijeka | Ocjena |
|---|---|
| Formulacija bazirana na punilima netopljivim u vodi | 1 |
| Formulacija bazirana većinom na punilima netopljivim u vodi | 2 |
| Formulacija bazirana većinom na punilima topljivim u vodi | 3 |
| Formulacija bazirana na punilima topljivim u vodi | 4 |
| Formulacija bazirana na djelatnoj tvari | Ocjena topljivosti djelatne tvari / 2, zaokruženo na nižu vrijednost |
| Formulacija bazirana na djelatnoj tvari i punilima netopljivim u vodi | |
| Formulacija bazirana na djelatnoj tvari i punilima topljivim u vodi | |
| Faktori za smanjenje ocjene: | / |
| Gore navedeno, proizvod sadrži arome u sastavu granulata / smjese | -1 |
| Gore navedeno, sadrži boju u sastavu granulata / smjese | |
| Gore navedeno, sadrži arome i boju u sastavu granulata / smjese | |

Tablica 8. Ocjena čistljivosti formulacije lijeka pri procjeni kritičnosti za validaciju čišćenja

| Čistljivost formulacije lijeka | Ocjena |
|---------------------------------------|---------------|
| Standardno čistljiv | 3 |
| Novi proizvod bez iskustva | 2 |
| Teško čistljiv proizvod | 1 |

Procjena kritičnosti postupka opremanja (pakiranja) lijeka u obzir uzima kritičnost pojedinog farmaceutskog oblika te mu se temeljem toga dodjeljuje odgovarajuća ocjena (definirano u Tablici 9.).

Tablica 9. Ocjena postupka opremanja lijeka pri procjeni kritičnosti za validaciju čišćenja

| Farmaceutski oblik | Ocjena |
|-------------------------------------|---------------|
| Prašak, tableta ili kapsula | 1 |
| Filmom obložena tableta ili dražeja | 0 |

Primjenom opisanih kriterija provedena je procjena kritičnosti djelatnih tvari 6-markaptopurina i valganciklovir hidroklorida. Svakoj djelatnoj tvari pridružena je odgovarajuća ocjena temeljena na karakteristikama djelatne tvari, formulaciji lijeka te proizvodnom i postupku opremanja (pakiranja) lijeka te je donesen zaključak o kritičnosti djelatne tvari.

3.5. Čišćenje prostorija i opreme

U sklopu provedbe postupka dekontaminacije iz pogona je uklonjen sav jednonamjenski pomoćni pribor, teško čistljive i / ili jednonamjenske cijevi, crijeva i filteri. Navedena oprema izuzeta je iz postupka uzorkovanja za dekontaminaciju budući da je uklonjena iz pogona prije ili tijekom dekontaminacijskog čišćenja. Također, sve oplate koje štite tehničke dijelove strojeva i opreme, kućišta filtera kao i ostala velika pomoćna oprema (npr. cijevi ruku lokalnih otprašivača) rastavljene su od strane educiranog osoblja na svoje manje, sastavne dijelove te je na dijelovima istih provedeno dekontaminacijsko čišćenje.

U skladu s prethodno navedenim na svim proizvodnim, ali i neproizvodnim prostorijama te vanjskim / nekontaktnim dijelovima određene su najkritičnije lokacije na kojima su provedena uzorkovanja po završetku dekontaminacijskog čišćenja. Uzastopno čišćenje i uzorkovanje je provedeno sve do postizanja definiranih kriterija prihvatljivosti, odnosno \leq limita detekcije validiranih, analitičkih metoda.

Prilikom dekontaminacije pogona SOO2B čišćenje je provedeno prema:

- internom radnom propisu za čišćenje proizvodnih prostora u pogonu SOO2,
- internom radnom propisu za čišćenje neproizvodnih prostorija u pogonu SOO2.

Čišćenje proizvodne opreme također je provedeno prema odgovarajućim internim procedurama čišćenja za pojedinu opremu dok se popis opreme koja je obuhvaćena dekontaminacijskim čišćenjem nalazi u Tablici 10.

Tablica 10. Popis proizvodne opreme obuhvaćene validacijom čišćenja tijekom dekontaminacije pogona

| Prostor | Tehnološka primjena | Tip / Proizvođač – Model |
|----------------|----------------------------|--|
| Pb013 | Primarno opremanje | Linija za opremanje u bočice / King TB4 Linija za opremanje u bočice / RELCO MCS2 |
| | Primarno opremanje | Linija za opremanje u blistere / Pentapack SP200 |
| Pb111 | Vaganje | Mettler Toledo IND560x Mettler Toledo IND560x |
| Pb112 | Vaganje djelatne tvari | Glovebag Glovebox |
| | Granulacija | H5 / Aeromatic PMA 150/ MP3/4-K2-F1 |
| | Priprema otopina | Priprema granulacijske tekućina / Aeromatic-Del Cioppo 30 litara |
| | Rukovanje materijalima | Servolift stanica za podizanje |
| | Procesna kontrola | Vlagomjer |
| | Rukovanje materijalima | Frewitt HammerWitt |
| | Vaganje | Mettler Toledo IND560x |
| Pb113 | Procesna kontrola | Mettler Toledo XP 204 SA |
| | Vaganje gotovog proizvoda | Mettler Toledo IND690 |
| | Vaganje gotovog proizvoda | Mettler Toledo IND690 |
| | Procesna kontrola | Pharmatest PTZ-S |
| | Procesna kontrola | Pharmatest PTF-DR |
| | Procesna kontrola | Erweka TBH 325 D |
| | Procesna kontrola | Caliper GI-1311.2 Mitutoyo CD-P15P |
| | Procesna kontrola | Pomično mjerilo GI-1311.1 BEHR |
| | Procesna kontrola | Retsch AS 200 vibrator |
| Pb115 | Oblaganje | Stroj za oblaganje / Glatt GMPCII |
| | Upravljanje materijalima | Servolift dizalo spremnika |
| | Procesna kontrola | Mettler Toledo XP 204 SA |
| | Priprema otopina | Spremnika za pripremu suspenzije za oblaganje / Glatt FB30 |
| Pb116 | Tabletiranje | Stroj za tabletiranje / Fette 2090c |
| | Upravljanje materijalima | Servolift dizalo spremnika |
| Pb117 | Kompaktiranje | Kompaktor / Fitzpatrick IR 220 |
| Pb119 / Pb120 | Pranje | Stroj za pranje dijelova opreme / Belimed PH 860.2-2ST |
| Mobilna oprema | Mlin | Konusni mlin / Frewitt ConiWitt200 |
| Mobilna oprema | Mlin | Uređaj za sijanje / Frewitt TurboWitt C20 |

| Prostor | Tehnološka primjena | Tip / Proizvođač – Model |
|----------------|----------------------------|--|
| Mobilna oprema | Spremnici | Servolift spremnik 100 l |
| Mobilna oprema | Spremnici | Servolift spremnik 200 l |
| Mobilna oprema | API spremnik | HAPI Servolift spremnik 10 l |
| Mobilna oprema | Pomoćna oprema | Sonda za uzorkovanje Oprema za transport dijelova Manje posude Platforme Pomoćna oprema SB ventila |
| Pb120 | Ručna sita | Frewitt |
| Pb120 | Okviri ručnih sita | Frewitt |
| Pb120 | Coniwitt sita | Frewitt |
| Pb120 | Turbowitt sita | Frewitt |
| Pb120 | Hammerwitt sita | Hammerwitt |

3.6. Uzorkovanje prostorija i vanjskih / nekontaktnih dijelova opreme

U Tablici 11. navedeni su svi potrebni postupci, materijali, pomoćna sredstva i tehnike koje je potrebno slijediti prilikom pripreme i provedbe postupka uzorkovanja određenih najkritičnijih lokacija u sklopu postupka dekontaminacije pogona SOO2B.

Tablica 11. Priprema za uzorkovanje

| KONTAMINANT | 6-MERKAPTOPURIN | VALGANCIKLOVIR |
|--|---|---|
| VRSTA BRISA | Texwipe TX 716 | Texwipe TX 716 |
| PRIPREMA BRISEVA | Nije potrebna | Briseve ispirati vodom dok kromatogram ekstrakta nije slobodan od interferencija na RT valganciklovira te na kraju jednom ispirati s metanolom i osušiti. |
| OTAPALO ZA UZORKOVANJE | EtOH + H ₂ O, 50 + 50 (v + v) | Voda |
| TEHNIKA UZORKOVANJA | 2 mokra + 1 suhi bris | 2 mokra + 1 suhi bris |
| SUŠENJE BRISEVA NAKON UZORKOVANJA | 1 sat pri 60°C | / |
| STABILNOST UZORAKA (SUHI BRIS) | Bris je stabilan najmanje 24 sata, ako se čuva pri 4°C. | Uzorci su nestabilni i moraju se analizirati odmah po uzorkovanju. |

4. REZULTATI

4.1. Rezultati razvoja i validacije HPLC metode za određivanje 6-merkaptopurina

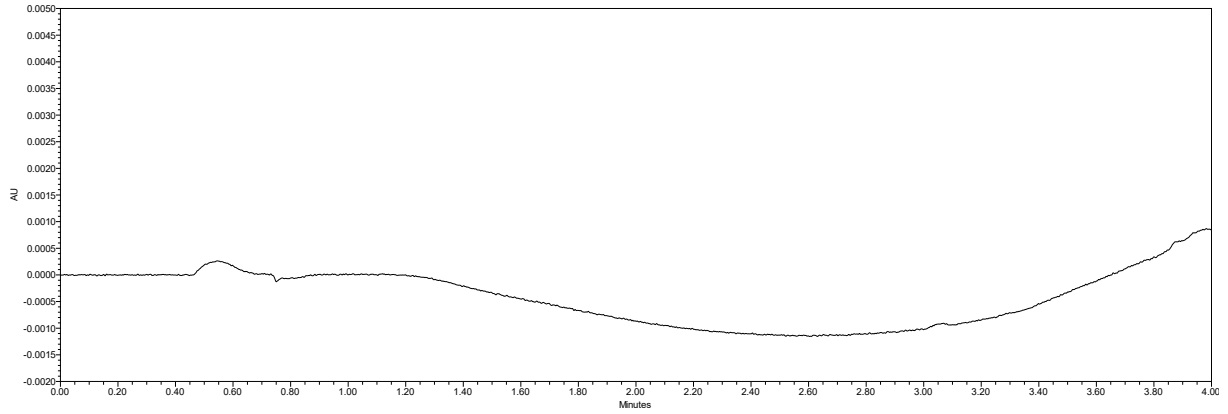
4.1.1. Selektivnost

Prilikom ispitivanja selektivnosti metode za određivanje ostataka 6-merkaptopurina na površinama korištene su otopine uzoraka navedene u Tablici 12.:

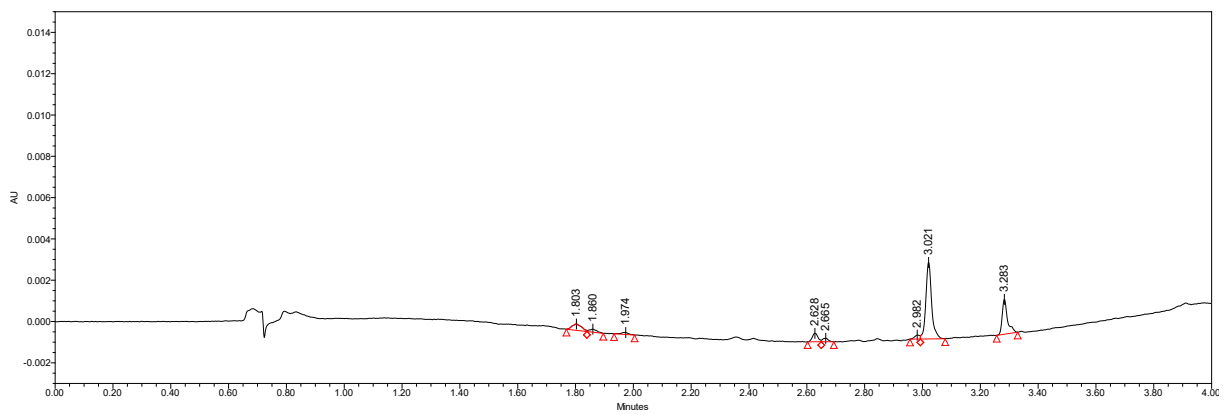
Tablica 12. Popis otopina za provedbu ispitivanja selektivnosti

| Otopina |
|--|
| Slijepa proba – diluent |
| Bris |
| Površina od čelika |
| Površina od poliuretana |
| Površina od poliamida |
| Površina od anodiziranog aluminijsa |
| Djelatna tvar 6-merkaptopurin |
| Placebo suspenzija – kromatogram placebo suspenzije dobiven je ubrizgavanjem placebo komponenti iz smjese. Placebo je pripremljen prema formulaciji definiranoj u proizvodnoj dokumentaciji i potom razrijeđen prema specificiranom zahtjevu za djelatnu tvar. |
| Detergent – DP5 |
| Detergent – limunska kiselina |
| Detergent – Plivasept |
| Detergent – Asepsol EKO |

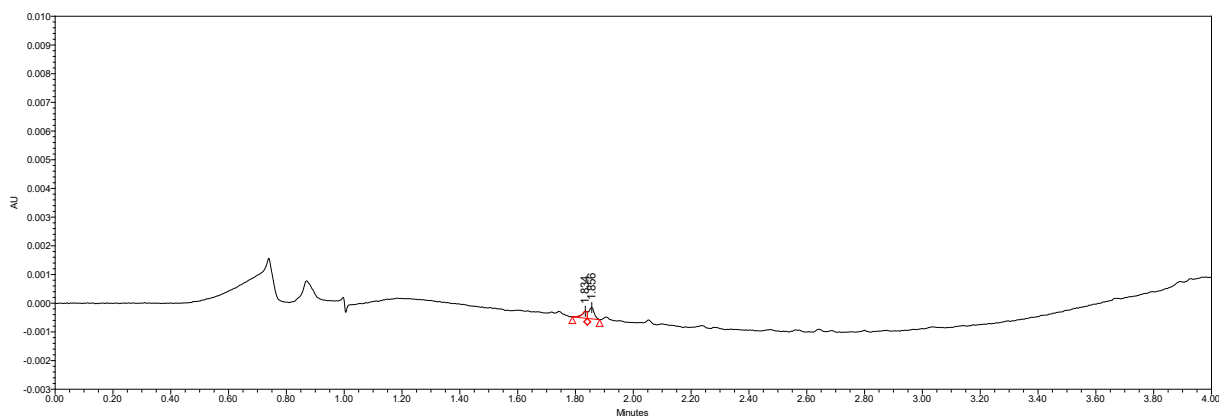
Po provedenom ispitivanju selektivnosti metode dobiveni su reprezentativni kromatogrami testiranih uzoraka otopina navedenih u Tablici 12. Reprezentativni kromatogrami prikupljeni provedbom studije selektivnosti prikazani su u nastavku na Slikama 2. do 13. Kromatogramima je prikazano da je pik djelatne tvari dobro odvojen od bilo kojeg drugog pika iz otopina koje su bile dio studije selektivnosti.



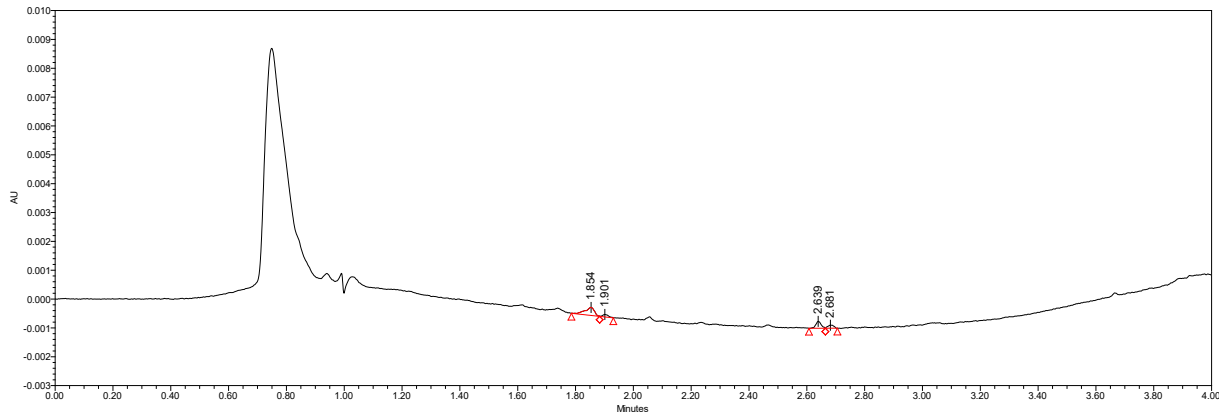
Slika 2. Kromatogram slijepe probe – diluenta



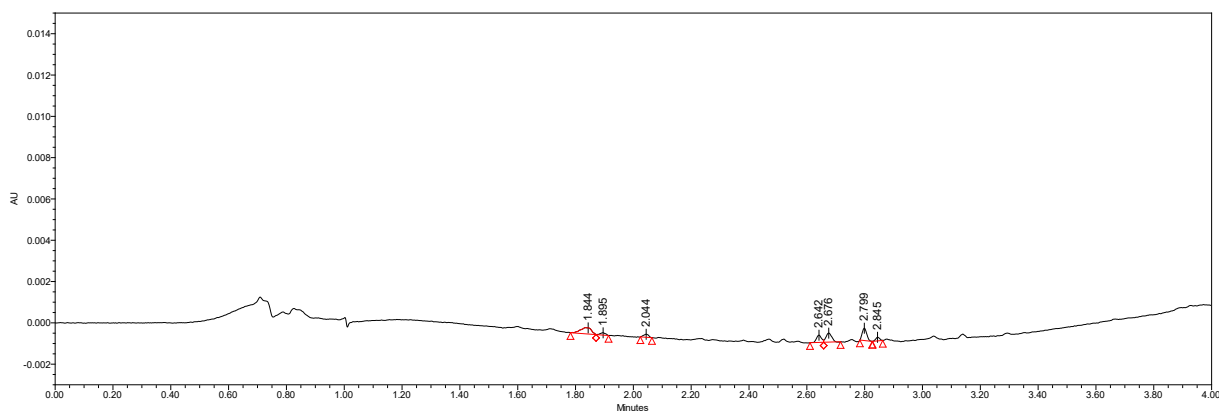
Slika 3. Kromatogram brisa



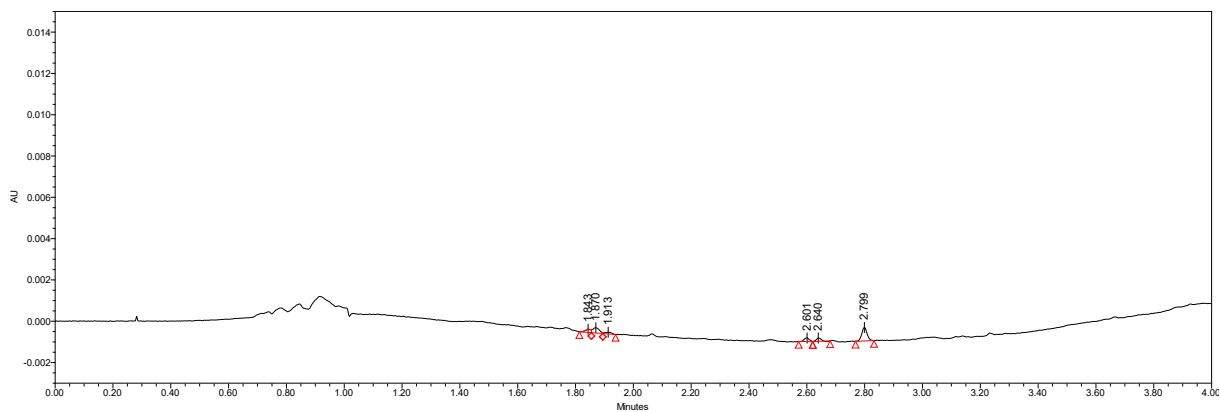
Slika 4. Kromatogram dobiven uzorkovanjem površine od čelika



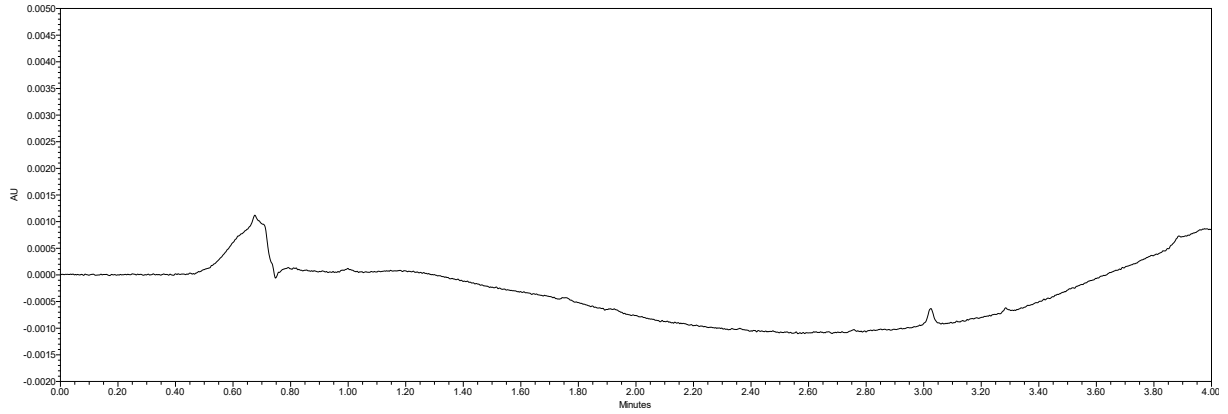
Slika 5. Kromatogram dobiven uzorkovanjem površine od poliuretana



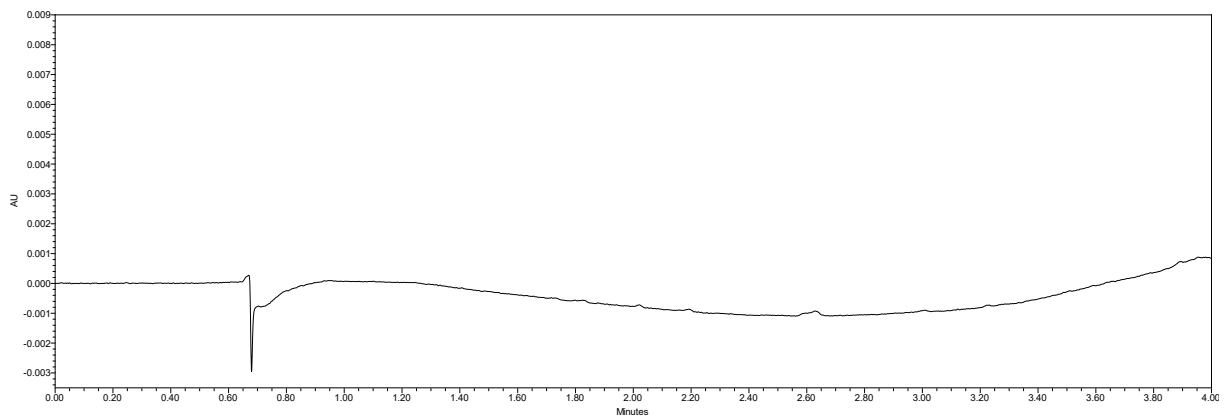
Slika 6. Kromatogram dobiven uzorkovanjem površine od poliamida



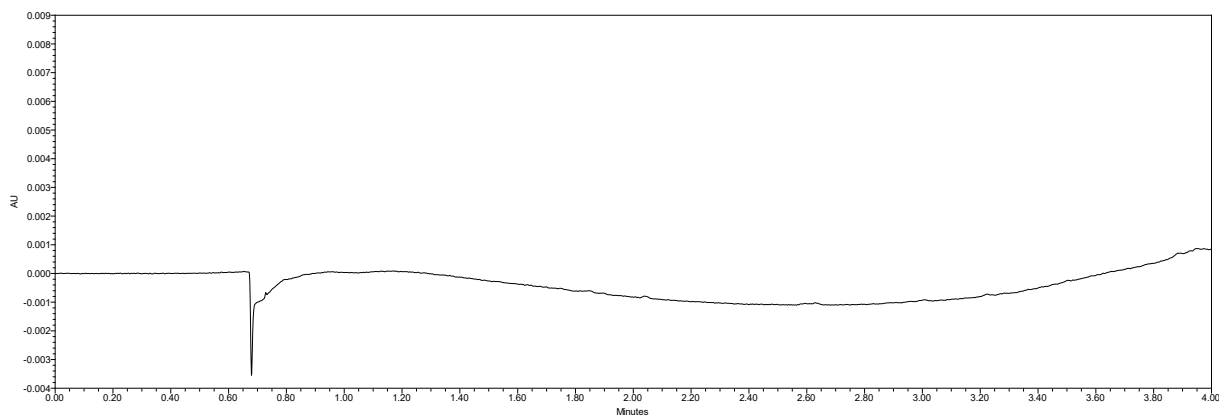
Slika 7. Kromatogram dobiven uzorkovanjem površine od anodiziranog aluminija



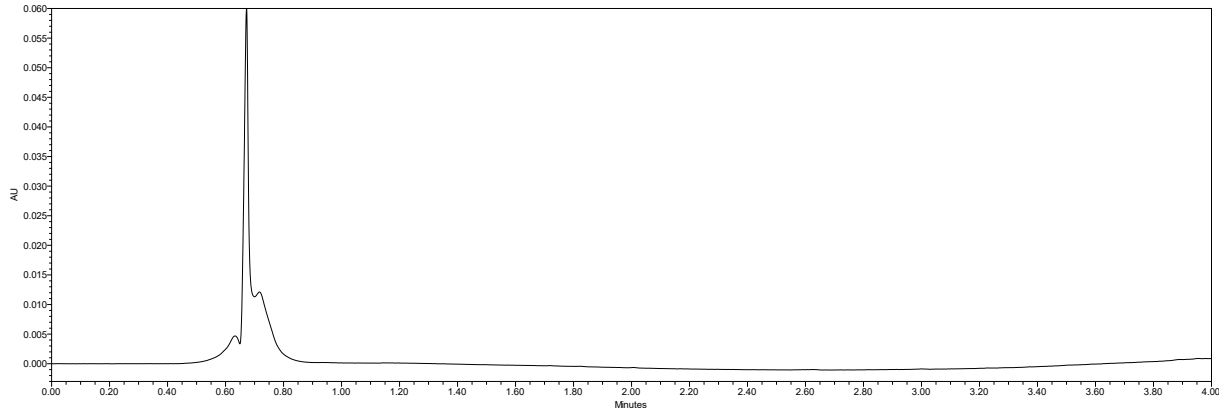
Slika 8. Kromatogram placebo suspenzije



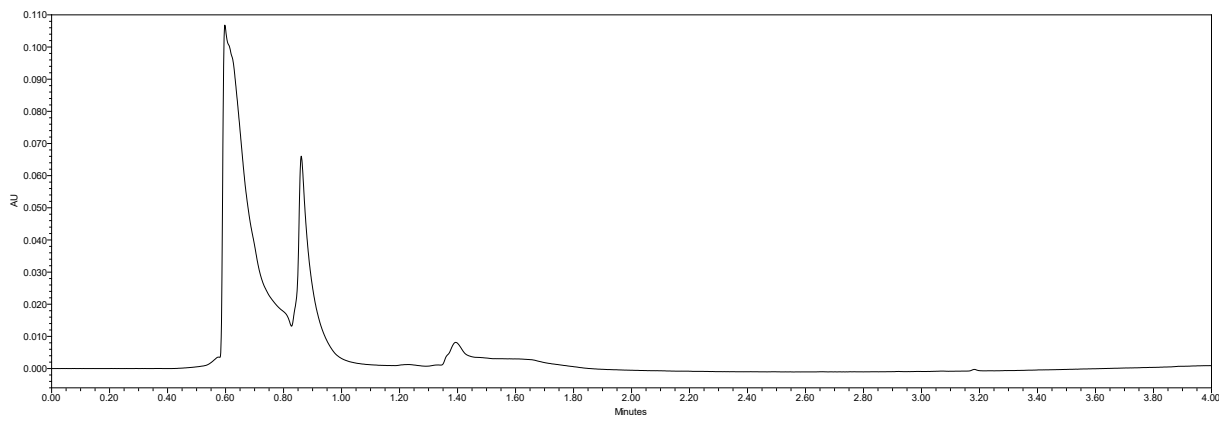
Slika 9. Kromatogram detergenta DP5



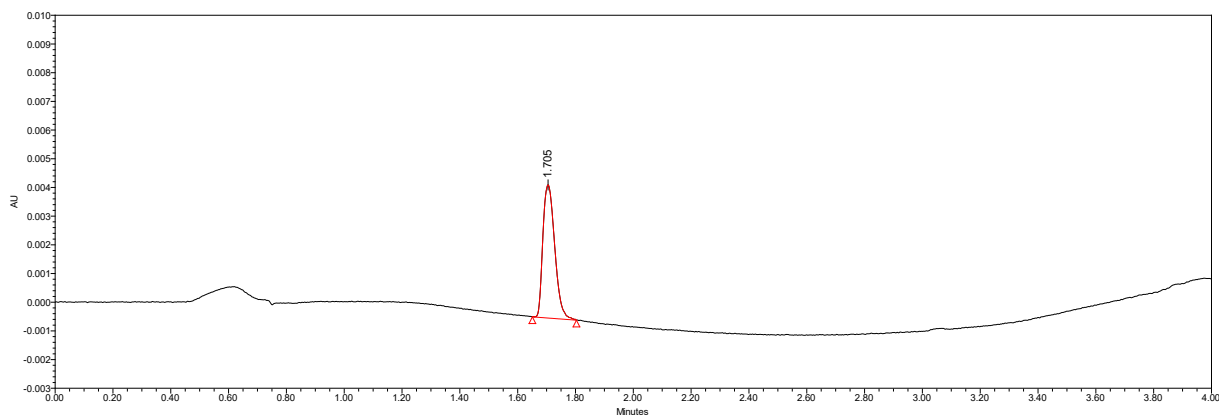
Slika 10. Kromatogram detergenta / dezinficijensa Plivasept



Slika 11. Kromatogram detergenta / dezinficijensa Asepsol EKO



Slika 12. Kromatogram detergenta limunske kiseline



Slika 13. Kromatogram otopine standarda 6-merkaptopurina

Iz prikazanih kromatograma zaključuje se da je metoda selektivna. Preglednom Slika 2. do 13. vidljivo je da pik djelatne tvari je dobro odvojen od bilo kojeg drugog pika dobivenog ubrizgavanjem otopina koje su bile dio studije selektivnosti (Tablica 12.).

4.1.1.1. Linearnost

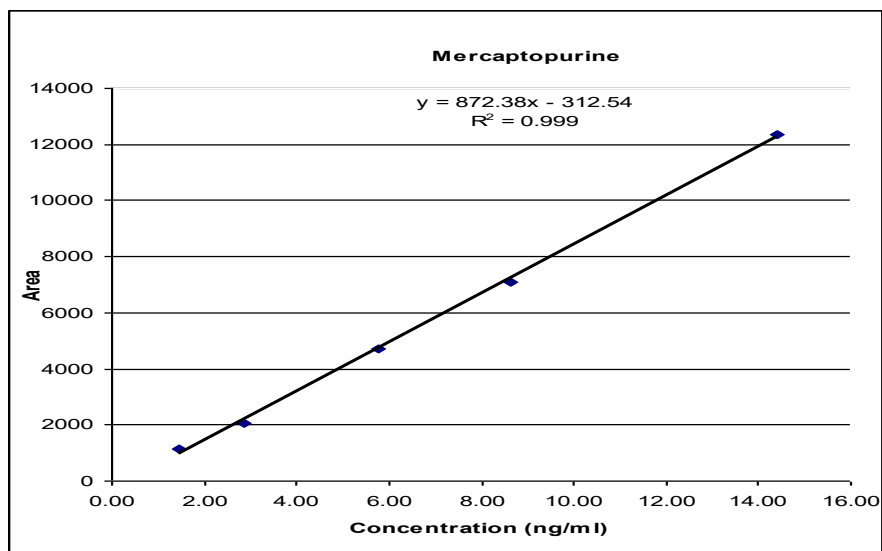
Tijekom ispitivanja linearnosti primijenjeni su sljedeći kriteriji prihvatljivosti:

- korelacijski koeficijent ne manji od 0,99,
- srednji faktori relativnog odgovora (RRF) za svaku razinu koncentracije 6-merkaptopurina ne variraju za više od 100 ± 10 % od srednjeg faktora odgovora pri radnoj koncentraciji (razina od 100 %).

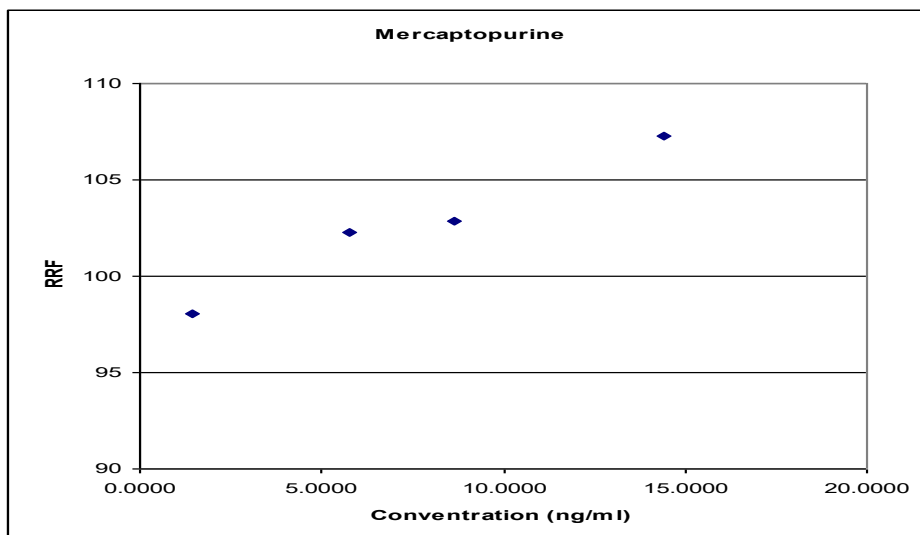
Rezultati ispitivanja linearnosti metode za određivanje 6-merkaptopurina prikazani su u nastavku u Tablici 13 i Slikama 14. i 15. Pregledom navedenog je potvrđena linearnost odgovora metode u intervalu od 1,4 ng/ml do 14,4 ng/ml. Posljednja točka za ispitivanje linearnosti L6, koncentracije 21 ng/ml nije zadovoljila kriterije prihvatljivosti te je naknadnim analizama koncentracija standardnih otopina i otopina za točnost korigirana da bude u linearnom rasponu.

Tablica 13. Rezultati ispitivanja linearnosti metode za određivanje 6-merkaptopurina

| Otopina | c / ng/ml | Područje 1 | Područje 2 | Srednja vrijednost područja | Srednja vrijednost RF | RRF |
|------------------------------------|-----------|------------|------------|-----------------------------|-----------------------|-----|
| L1 | 1,4393 | 1131 | 1124 | 1128 | 783 | 98 |
| L2 | 2,8786 | 2069 | 2048 | 2059 | 715 | 90 |
| L3 | 5,7572 | 4719 | 4689 | 4704 | 817 | 102 |
| L4 | 8,6358 | 7119 | 7072 | 7096 | 822 | 103 |
| L5 | 14,3930 | 12342 | 12320 | 12331 | 857 | 107 |
| Korelacijski koeficijent, R | | | | 0,9990 | | |
| Odsječak | | | | – 313 | | |
| Nagib | | | | 872 | | |
| Status | | | | Prolazno | | |



Slika 14. Dijagram linearnosti za 6-merkaptopurin



Slika 15. Dijagram relativnih faktora odgovora u odnosu na koncentraciju 6-merkaptopurina

4.1.1.2. Limit kvantifikacije / detekcije

Limit kvantifikacije i detekcije 6-merkaptopurina je ispitan u sklopu studije linearnosti metode. Rezultati su prikazani u Tablici 14. u nastavku. Kriterij prihvatljivosti za limit kvantifikacije dobiveni omjer signala i šuma trebao bi biti najmanje 10:1 za pik merkaptopurina u otopini L1. Ispitivanjem je utvrđeno da je metoda dovoljno osjetljiva obzirom na svoju svrhu.

Tablica 14. Rezultati ispitivanja limita kvantifikacije i detekcije 6-merkaptopurina

| Djelatna tvar | c (ng/ml) | Omjer signala i šuma (S/N ratio) | Procijenjeni LOD (ng/ml; S/N = 3) |
|-----------------|-----------|----------------------------------|-----------------------------------|
| 6-merkaptopurin | 1,4393 | 15 | 0,2879 |

4.1.1.3. Točnost i preciznost

Za ispitivanje točnosti i preciznosti metode pripremljena su po tri seta uzoraka od tri različite koncentracije. Pomoću pipete (s promjenjivim volumenom 10 µl – 100 µl i 100 µl – 1000 µl) nanoseno je 85 µl, 120 µl i 150 µl otopine na 1 dm² površine od različitih materijala (čelik, poliuretan, poliamid ...). Potom su ispitivane površine osušene. Mjesta na koja su nanoseni uzorci otopina su pobrisani s dva vlažna brisa (umočena u diluent – etanol + H₂O, 50 + 50 (v + v)) i potom s jednim suhim brisem. Vrhovi briseva su prebačeni u odgovarajuću bočicu i potom sušeni 60 minuta na 60°C. Nakon sušenja, u svaku bocu je dodano 5 ml diluenta (metanol + H₂O, 100 + 900 (v + v)) i iste su potom mućkane na mućkalici u trajanju od 60 minuta.

Primijenjeni su sljedeći kriteriji prihvatljivosti:

- analitički povrat (engl. *recovery*) unutar svake razine koncentracije treba biti ne manji od 50 %,
- RSD između različitih uzoraka unutar iste razine koncentracije treba biti ne manje od 25 %.

Po završetku analize dobiveni su sljedeći rezultati ispitivanja točnosti i preciznosti metode, a isti su prikazani u Tablicama 15., 16., 17. i 18. Ispitivanjima je utvrđeno da metoda daje rezultate analitičkog povrata koji su unutar definiranog kriterija prihvatljivosti (ne manji od 50 %).

Tablica 15. Rezultati analitičkog povrata za 6-merkaptopurin s površine od čelika

| Razina | Količina / ng/ml | | Analitički povrat / % | | Prosječni analitički povrat / % | | RSD / % | |
|--------|------------------|--------------|-----------------------|--------------|---------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| | Analitičar 1 | Analitičar 2 | Analitičar 1 | Analitičar 2 | Analitičar 1 | Analitičar 2 | Analitičar 1 | Analitičar 2 |
| L1 | 8,2635 | 8,1253 | 83 | 67 | 84 | 85 | 2 | 21 |
| | | | 84 | 87 | | | | |
| | | | 86 | 103 | | | | |
| L2 | 11,6662 | 11,4710 | 85 | 51 | 87 | 71 | 4 | 24 |
| | | | 85 | 81 | | | | |
| | | | 91 | 79 | | | | |
| L3 | 14,5827 | 14,3388 | 80 | 84 | 81 | 90 | 4 | 9 |
| | | | 79 | 99 | | | | |
| | | | 84 | 86 | | | | |

Tablica 16. Rezultati analitičkog povrata za 6-merkaptopurin s površine od poliamida

| Razina | Količina / ng/ml | | Analitički povrat / % | | Prosječni analitički povrat / % | | RSD / % | |
|--------|------------------|--------------|-----------------------|--------------|---------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| | Analitičar 1 | Analitičar 2 | Analitičar 1 | Analitičar 2 | Analitičar 1 | Analitičar 2 | Analitičar 1 | Analitičar 2 |
| L1 | 8,2635 | 8,1253 | 94 | 88 | 92 | 98 | 2 | 9 |
| | | | 93 | 105 | | | | |
| | | | 90 | 101 | | | | |
| L2 | 11,6662 | 11,4710 | 85 | 88 | 85 | 92 | 5 | 3 |
| | | | 80 | 94 | | | | |
| | | | 89 | 93 | | | | |
| L2 | 14,5827 | 14,3388 | 77 | 93 | 87 | 93 | 10 | 7 |
| | | | 92 | 86 | | | | |
| | | | 91 | 98 | | | | |

Tablica 17. Rezultati analitičkog povrata za 6-merkaptopurin s površine od anodiziranog aluminijsa

| Razina | Količina / ng/ml | | Analitički povrat / % | | Prosječni analitički povrat / % | | RSD / % | |
|--------|------------------|--------------|-----------------------|--------------|---------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| | Analitičar 1 | Analitičar 2 | Analitičar 1 | Analitičar 2 | Analitičar 1 | Analitičar 2 | Analitičar 1 | Analitičar 2 |
| L1 | 8,2635 | 8,1253 | 73 | 70 | 91 | 63 | 17 | 11 |
| | | | 104 | 60 | | | | |
| | | | 95 | 57 | | | | |
| L2 | 11,6662 | 11,4710 | 94 | 60 | 84 | 63 | 14 | 7 |
| | | | 88 | 61 | | | | |
| | | | 71 | 69 | | | | |
| L3 | 14,5827 | 14,3388 | 91 | 82 | 84 | 79 | 7 | 3 |
| | | | 79 | 77 | | | | |
| | | | 83 | 78 | | | | |

Tablica 18. Rezultati analitičkog povrata za 6-merkaptopurin s površine od poliuretana

| Razina | Količina / ng/ml | | Analitički povrat / % | | Prosječni analitički povrat / % | | RSD / % | |
|--------|------------------|--------------|-----------------------|--------------|---------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| | Analitičar 1 | Analitičar 2 | Analitičar 1 | Analitičar 2 | Analitičar 1 | Analitičar 2 | Analitičar 1 | Analitičar 2 |
| L1 | 8,2635 | 8,1253 | 97 | 86 | 86 | 85 | 11 | 6 |
| | | | 80 | 80 | | | | |
| | | | 80 | 90 | | | | |
| L2 | 11,6662 | 11,4710 | 97 | 96 | 101 | 80 | 4 | 19 |
| | | | 106 | 66 | | | | |
| | | | 101 | 78 | | | | |
| L3 | 14,5827 | 14,3388 | 96 | 80 | 94 | 79 | 5 | 5 |
| | | | 97 | 83 | | | | |
| | | | 88 | 75 | | | | |

U Tablici 19. prikazani su najniži postoci analitičkog povrata i faktori korekcije dobiveni ispitivanjem točnosti i preciznosti metode.

Tablica 19. Vrijednosti najnižih analitičkih povrata s površine i korekcijskih faktora

| Djelatna tvar | Materijal | Min. analitički povrat (%) | Korekcijski faktor |
|-----------------|----------------------|----------------------------|--------------------|
| 6-merkaptopurin | Čelik | 51 | 0,51 |
| | Poliamid | 77 | 0,77 |
| | Anodizirani aluminij | 57 | 0,57 |
| | Poliuretan | 66 | 0,66 |

4.1.1.4. Stabilnost uzoraka

Prilikom određivanja stabilnosti uzoraka 6-merkaptopurina primijenjeni su kriteriji prihvatljivosti prikazani u Tablici 20.

Tablica 20. Kriteriji prihvatljivosti za stabilnost standarda, otopine uzorka i brisa uzorka

| Otopina | Parametar | Kriterij prihvatljivosti |
|------------------------|------------|--------------------------|
| Uzorak brisa | Razgradnja | Ne više od 10 % |
| Uzorak otopine | | |
| Kalibracijski standard | | |

Ispitivanjem stabilnosti dobiveni su rezultati prikazani u Tablici 21.

Tablica 21. Sažetak rezultata studije stabilnosti za 6-merkaptopurin

| Otopina | Vrijeme (h) | Razgradnja (%) |
|-----------------|-------------|----------------|
| Standard* | 96 | 8 |
| Uzorak otopine* | 96 | 8 |
| Uzorak brisa** | 24 | 7 |

*Otopina standarda i otopina uzorka pohranjene su u autosampleru na 20°C.

**Uzorci briseva pohranjeni su u hladnjaku na 4°C.

Iz navedenog je zaključeno da su otopina standarda i uzorak otopine stabilni najmanje 96 sati, a da su uzorci briseva stabilni najmanje 24 sata. Prethodno navedeno prikazano je u Tablici 22.

Tablica 22. Stabilnost uzoraka

| Djelatna tvar | Stabilnost uzoraka | | |
|-----------------|---------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| | Standard, t = 20°C | Uzorak otopine, t = 20°C | Suhi bris, t ≈ 4°C |
| 6-merkaptopurin | Najmanje 96 h / 4 dana | Najmanje 96 h / 4 dana | Najmanje 24 h / 1 dan |

Analitička metoda za određivanje 6-merkaptopurina nakon čišćenja proizvodnih prostora i opreme uspješno je validirana prema referentnim postupcima i definiranim kriterijima prihvatljivosti. Temeljem provedenog postupka razvijena metoda je prikladna za upotrebu tijekom postupka dekontaminacije.

4.2. Rezultati razvoja i validacije HPLC metode za određivanje valganciklovir hidroklorida

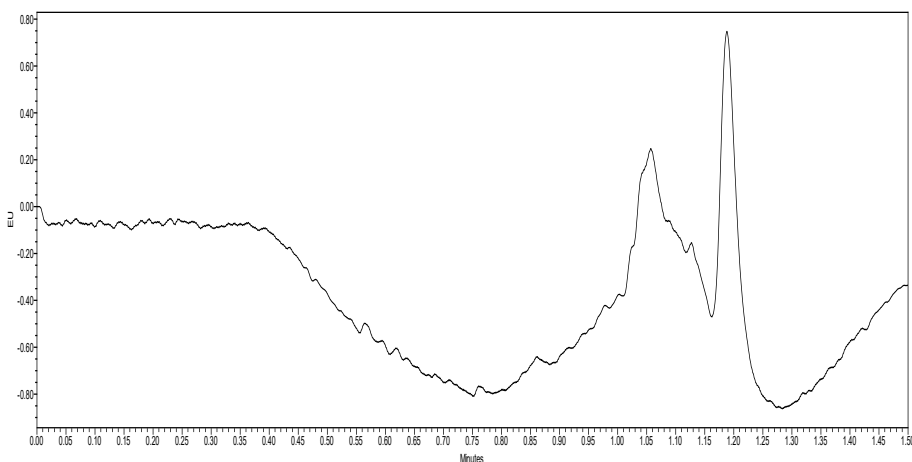
4.2.1. Selektivnost

Prilikom ispitivanja selektivnosti metode za određivanje ostataka valganciklovir hidroklorida na površinama korištene su otopine uzoraka navedene u Tablici 23.:

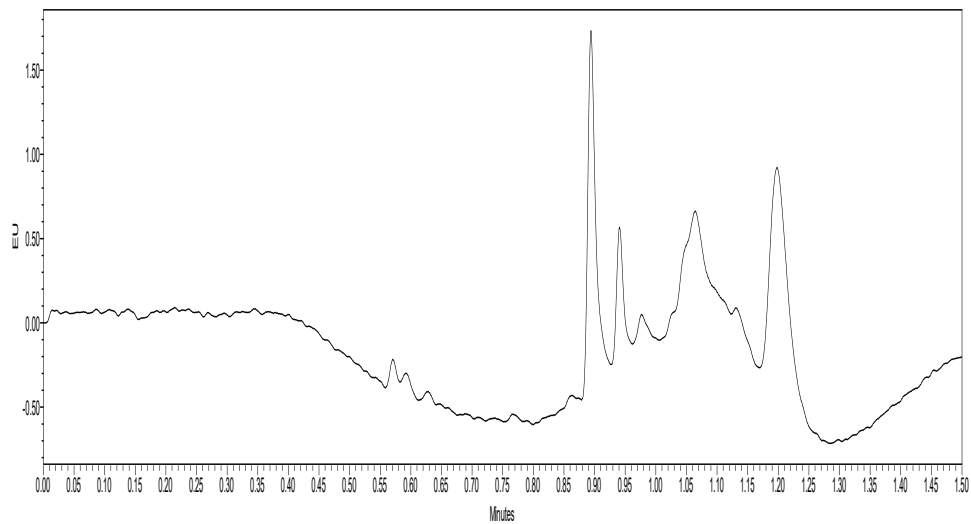
Tablica 23. Popis otopina za provedbu ispitivanja selektivnosti

| Otopina |
|--|
| Slijepa proba – diluent |
| Bris |
| Površina od čelika |
| Površina od poliuretana |
| Površina od poliamida |
| Površina od anodiziranog aluminijsa |
| Djelatna tvar 6-merkaptopurin |
| Placebo suspenzija – kromatogram placebo suspenzije dobiven je ubrizgavanjem placebo komponenti iz smjese. Placebo je pripremljen prema formulaciji definiranoj u proizvodnoj dokumentaciji i potom razrijeđen prema specificiranom zahtjevu za djelatnu tvar. |
| Detergent – DP5 |

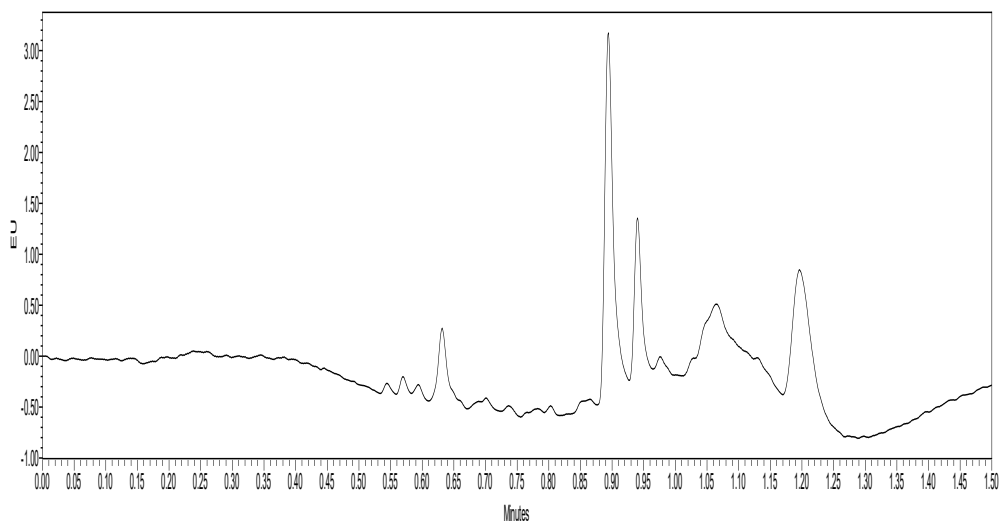
Po provedenom ispitivanju selektivnosti metode dobiveni su reprezentativni kromatogrami ispitivanih uzoraka otopina navedenih u Tablici 23. Reprezentativni kromatogrami prikupljeni provedbom studije selektivnosti prikazani su u nastavku na Slikama 16. do 24. Kromatogramima je prikazano da je pik djelatne tvari dobro odvojen od bilo kojeg drugog pika iz otopina koje su bile dio studije selektivnosti.



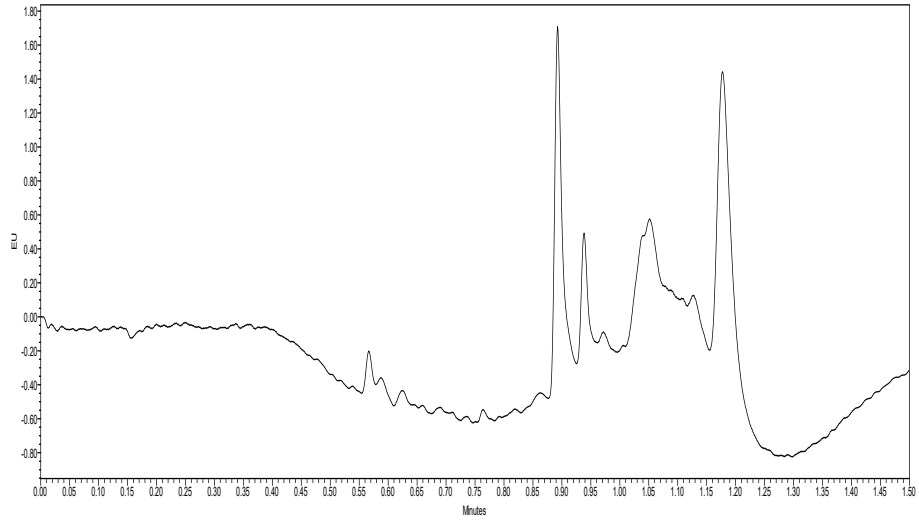
Slika 16. Kromatogram slijepe probe – diluenta



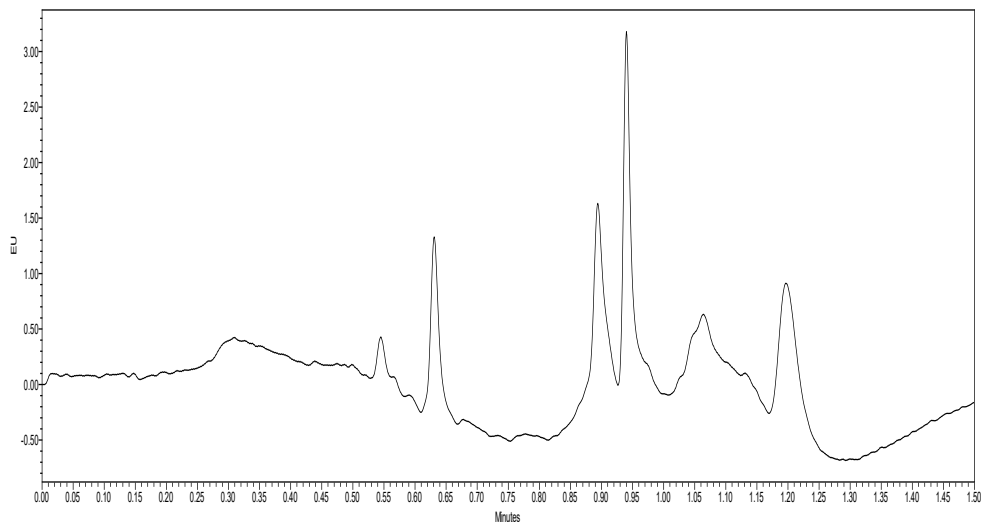
Slika 17. Kromatogram brisa



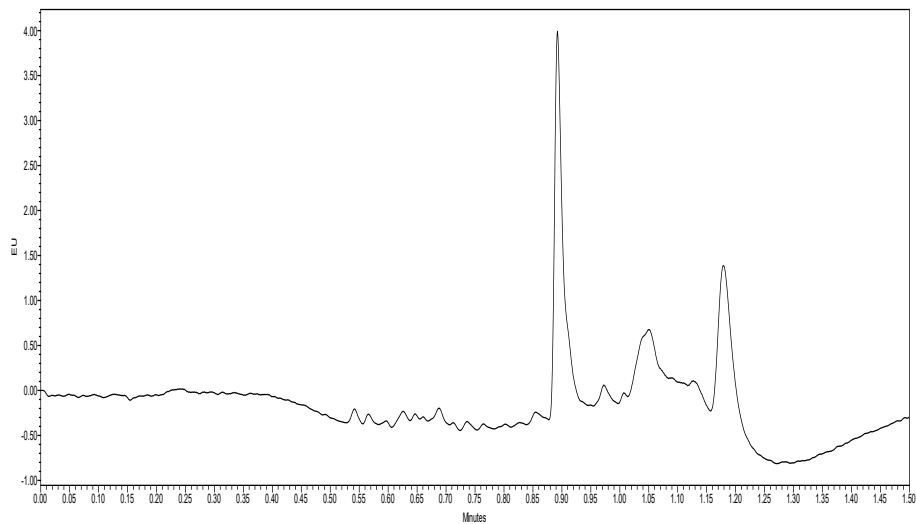
Slika 18. Kromatogram površine od čelika



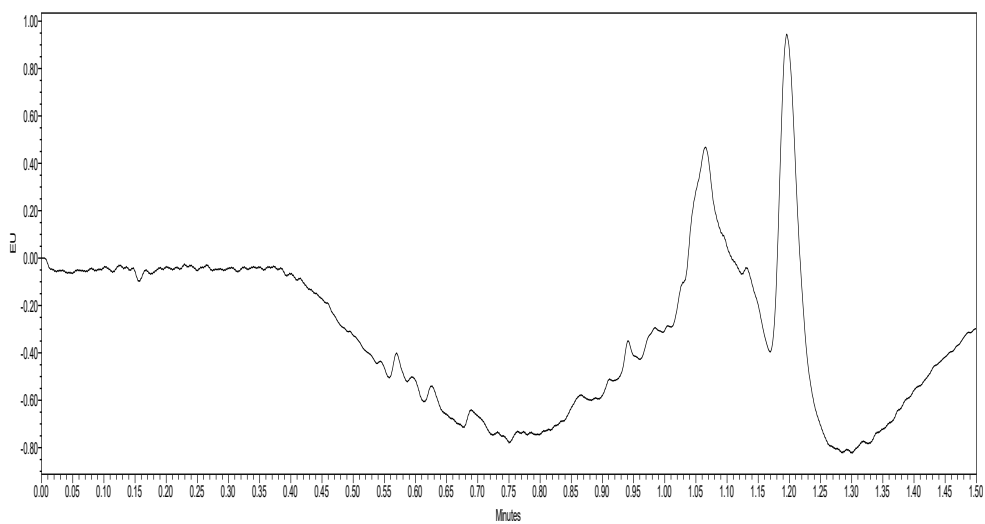
Slika 19. Kromatogram površine od poliuretana



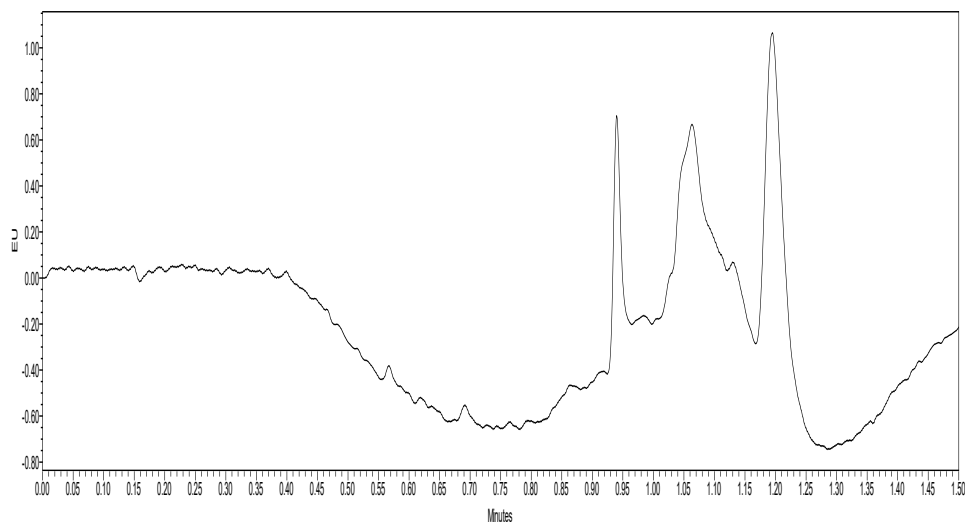
Slika 20. Kromatogram površine od poliamida



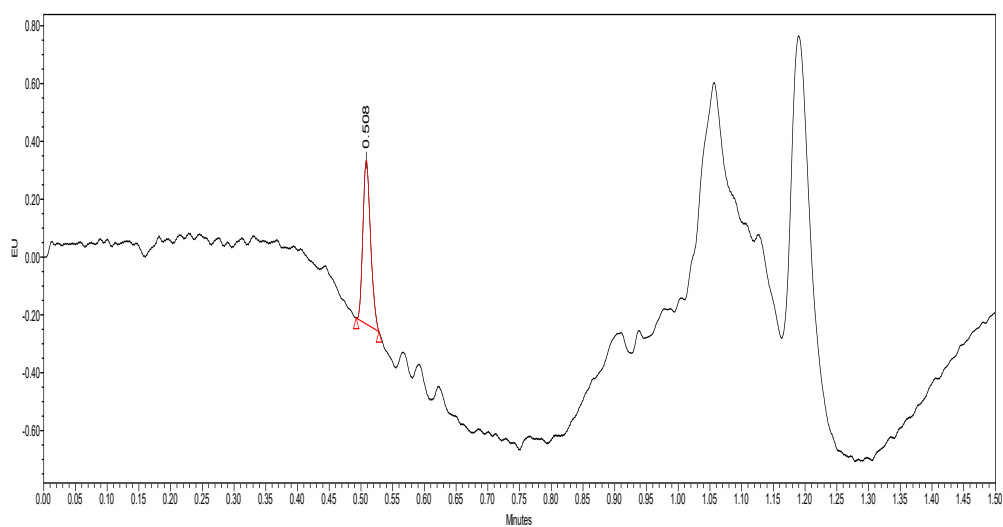
Slika 21. Kromatogram površine od anodiziranog aluminija



Slika 22. Kromatogram placebo suspenzije



Slika 23. Kromatogram detergenta DP5



Slika 24. Kromatogram otopine standarda valganciklovir hidroklorida

Iz prikazanih kromatograma zaključuje se da je metoda selektivna. Preglednom Slika 16. do 24. vidljivo je da pik djelatne tvari dobro odvojen od bilo kojeg drugog pika dobivenog ubrizgavanjem otopina koje su bile dio studije selektivnosti (Tablica 23.).

4.2.2. Linearnost

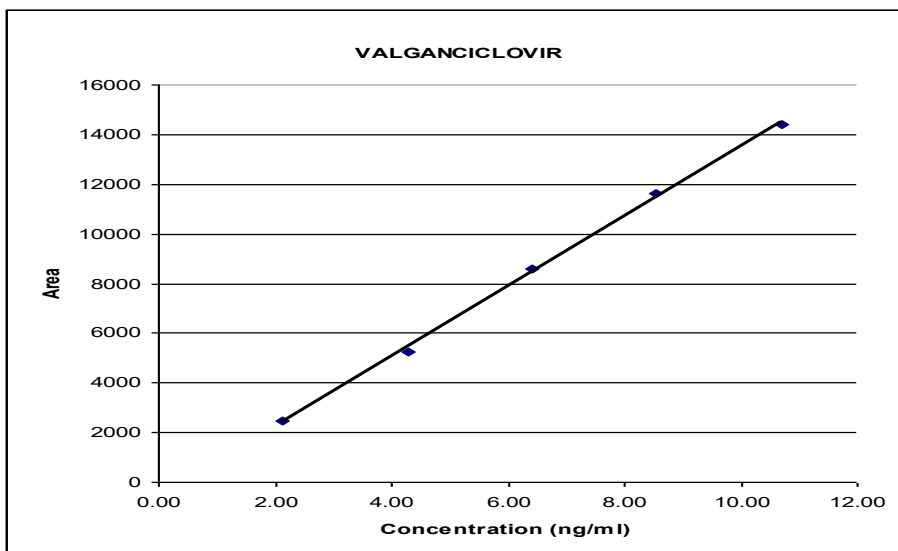
Kriteriji prihvatljivosti za ispitivanje linearnosti su bili:

- korelacijski koeficijent ne manji od 0,99,
- srednji faktori relativnog odgovora (RRF) za svaku razinu koncentracije ne variraju za više od $100 \pm 10 \%$ od srednjeg faktora odgovora pri radnoj koncentraciji (razina od 100 %).

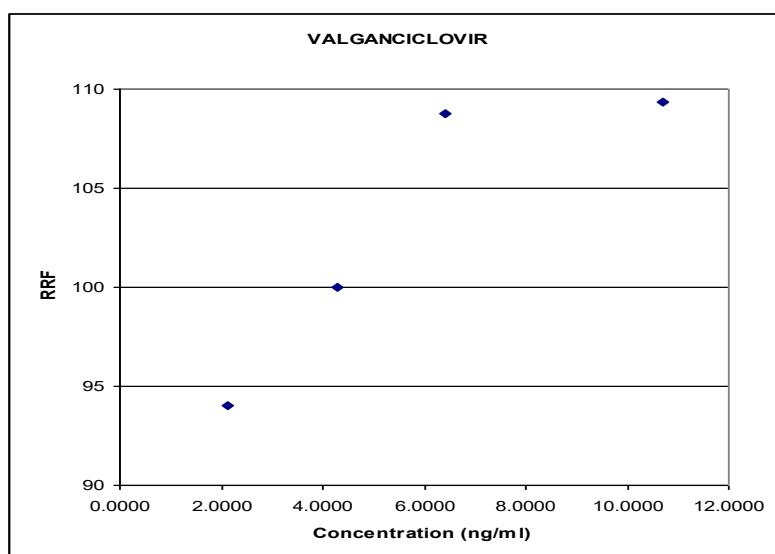
Rezultati ispitivanja linearnosti metode za valganciklovir hidroklorid prikazani su u nastavku u Tablici 24 i Slikama 25. i 26. Pregledom navedenog zaključeno je da je ispitivanjem potvrđena linearnost odgovora metode u intervalu od 2 ng/ml do 10 ng/ml.

Tablica 24. Rezultati ispitivanja linearnosti metode za valganciklovir hidroklorid

| Otopina | c / ng/ml | Područje 1 | Područje 2 | Srednja vrijednost područja | Srednja vrijednost RF | RRF |
|------------------------------------|-----------|-----------------|------------|-----------------------------|-----------------------|-----|
| L1 | 2,1370 | 2506 | 2443 | 2474 | 1158 | 94 |
| L2 | 4,4110 | 5205 | 5319 | 5262 | 1231 | 100 |
| L3 | 6,4110 | 8557 | 8615 | 8586 | 1339 | 109 |
| L4 | 8,5480 | 11632 | 11595 | 11613 | 1359 | 110 |
| L5 | 10,6850 | 14536 | 14234 | 14385 | 1346 | 109 |
| Korelacijski koeficijent, R | | 0,9991 | | | | |
| Odsječak | | - 587 | | | | |
| Nagib | | 1412 | | | | |
| Status | | Prolazno | | | | |



Slika 25. Dijagram linearnosti za valganciklovir hidroklorid



Slika 26. Dijagram relativnih faktora odgovora u odnosu na koncentraciju valganciklovir hidroklorida

4.2.3. Limit kvantifikacije / detekcije

Limit kvantifikacije i detekcije valganciklovir hidroklorida je ispitan u sklopu studije linearnosti metode. Rezultati su prikazani u Tablici 25. u nastavku. Kriterij prihvatljivosti za limit kvantifikacije dobiveni omjer signala i šuma trebao bi biti najmanje 10:1 za pik valganciklovir hidroklorida u otopini L1. Ispitivanjem je utvrđeno da je metoda dovoljno osjetljiva obzirom na svoju svrhu.

Tablica 25. Rezultati ispitivanja limita kvantifikacije i detekcije valganciklovir hidroklorida

| Djelatna tvar | c (ng/ml) | Omjer signala i šuma (S/N ratio) | Procijenjeni LOD (ng/ml; S/N = 3) |
|----------------------------|-----------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Valganciklovir hidroklorid | 2,171 | 5 | 1 ng/ml 5 ng/brisu |

4.2.3.1. Točnost i preciznost

Za ispitivanje točnosti i preciznosti metode pripremljena su po tri seta uzoraka od tri različite koncentracije. Pomoću pipete (s promjenjivim volumenom 100 μ l – 1000 μ l) nanoseno je 100 μ l, 170 μ l i 230 μ l otopine na 1 dm² površine od različitih materijala (čelik, poliuretan, poliamid ...). Potom su ispitivane površine osušene. Mjesta na koja su nanoseni uzorci otopina su pobrisani s dva vlažna brisa (umočena u diluent – vodu) i potom s jednim suhim brisem. Vrhovi briseva su prebačeni u odgovarajuću bočicu. U svaku bočicu je dodano 5 ml diluenta (vode) i iste su potom mućkane na mućkalici u trajanju od 30 minuta.

Primijenjeni su sljedeći kriteriji prihvatljivosti:

- analitički povrat (engl. *recovery*) unutar svake razine koncentracije treba biti ne manji od 50 %,
- RSD između različitih uzoraka unutar iste razine koncentracije treba biti ne manje od 25 %.

Po završetku analize dobiveni su sljedeći rezultati ispitivanja točnosti i preciznosti metode, a isti su prikazani u Tablicama 26., 27., 28. i 29. Ispitivanjima je utvrđeno da metoda daje rezultate analitičkog povrata koji su unutar definiranog kriterija prihvatljivosti (ne manji od 50 %).

Tablica 26. Rezultati analitičkog povrata za valganciklovir hidroklorid s površine od čelika

| Razina | Količina / ng/5 ml | | Analitički povrat / % | | Prosječni analitički povrat / % | | RSD / % | |
|--------|--------------------|--------------|-----------------------|--------------|---------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| | Analitičar 1 | Analitičar 2 | Analitičar 1 | Analitičar 2 | Analitičar 1 | Analitičar 2 | Analitičar 1 | Analitičar 2 |
| L1 | 3,1710 | 3,0390 | 78 | 82 | 66 | 84 | 21 | 2 |
| | | | 51 | 86 | | | | |
| | | | 70 | 84 | | | | |
| L2 | 5,3907 | 5,1663 | 57 | 64 | 56 | 59 | 6 | 9 |
| | | | 52 | 54 | | | | |
| | | | 59 | 59 | | | | |
| L3 | 7,2933 | 6,9897 | 68 | 68 | 71 | 63 | 5 | 10 |
| | | | 75 | 55 | | | | |
| | | | 69 | 65 | | | | |

Tablica 27. Rezultati analitičkog povrata za površinu od poliamida

| Razina | Količina / ng/5 ml | | Analitički povrat / % | | Prosječni analitički povrat / % | | RSD / % | |
|--------|--------------------|--------------|-----------------------|--------------|---------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| | Analitičar 1 | Analitičar 2 | Analitičar 1 | Analitičar 2 | Analitičar 1 | Analitičar 2 | Analitičar 1 | Analitičar 2 |
| L1 | 3,1710 | 3,0390 | 87 | 81 | 94 | 76 | 7 | 5 |
| | | | 95 | 74 | | | | |
| | | | 100 | 73 | | | | |
| L2 | 5,3907 | 5,1663 | 79 | 66 | 95 | 73 | 15 | 9 |
| | | | 98 | 78 | | | | |
| | | | 108 | 74 | | | | |
| L3 | 7,2933 | 6,9897 | 90 | 76 | 97 | 74 | 12 | 3 |
| | | | 91 | 72 | | | | |
| | | | 110 | 73 | | | | |

Tablica 28. Rezultati analitičkog povrata za površinu od anodiziranog aluminijsa

| Razina | Količina / ng/5 ml | | Analitički povrat / % | | Prosječni analitički povrat / % | | RSD / % | |
|--------|--------------------|--------------|-----------------------|--------------|---------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| | Analitičar 1 | Analitičar 2 | Analitičar 1 | Analitičar 2 | Analitičar 1 | Analitičar 2 | Analitičar 1 | Analitičar 2 |
| L1 | 3,1710 | 3,0390 | 80 | 71 | 88 | 71 | 8 | 2 |
| | | | 92 | 72 | | | | |
| | | | 93 | 70 | | | | |
| L2 | 5,3907 | 5,1663 | 96 | 92 | 93 | 73 | 2 | 23 |
| | | | 93 | 68 | | | | |
| | | | 91 | 59 | | | | |
| L3 | 7,2933 | 6,9897 | 98 | 62 | 101 | 64 | 3 | 4 |
| | | | 104 | 63 | | | | |
| | | | 100 | 68 | | | | |

Tablica 29. Rezultati analitičkog povrata za površinu od poliuretana

| Razina | Količina / ng/5 ml | | Analitički povrat / % | | Prosječni analitički povrat / % | | RSD / % | |
|--------|--------------------|--------------|-----------------------|--------------|---------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| | Analitičar 1 | Analitičar 2 | Analitičar 1 | Analitičar 2 | Analitičar 1 | Analitičar 2 | Analitičar 1 | Analitičar 2 |
| L1 | 3,1710 | 3,0390 | 86 | 73 | 78 | 71 | 5 | 10 |
| | | | 79 | 75 | | | | |
| | | | 69 | 63 | | | | |
| L2 | 5,3907 | 5,1663 | 95 | 75 | 92 | 75 | 9 | 6 |
| | | | 91 | 70 | | | | |
| | | | 90 | 79 | | | | |
| L3 | 7,2933 | 6,9897 | 95 | 73 | 94 | 73 | 3 | 0 |
| | | | 95 | 73 | | | | |
| | | | 92 | 73 | | | | |

U Tablici 30. prikazani su najniži postoci analitičkog povrata i faktori korekcije dobiveni ispitivanjem točnosti i preciznosti metode.

Tablica 30. Vrijednosti najnižih analitičkih povrata s površine i korekcijskih faktora

| Djelatna tvar | Materijal | Min. recovery (%) | Korekcijski faktor |
|----------------------------|----------------------|-------------------|--------------------|
| Valganciklovir hidroklorid | Čelik | 51 | 0,51 |
| | Poliamid | 66 | 0,66 |
| | Anodizirani aluminij | 59 | 0,59 |
| | Poliuretan | 63 | 0,63 |

4.2.3.2. Stabilnost uzoraka

Prilikom određivanja stabilnosti uzoraka valganciklovir hidroklorida primijenjeni su kriteriji prihvatljivosti navedeni u Tablici 31.

Tablica 31. Kriteriji prihvatljivosti za stabilnost standarda, otopine uzorka i brisa uzorka

| Otopina | Parametar | Kriterij prihvatljivosti |
|------------------------|------------|--------------------------|
| Uzorak brisa | Razgradnja | Ne više od 10 % |
| Uzorak otopine | | |
| Kalibracijski standard | | |

Dobiveni su sljedeći rezultati:

Tablica 32. Sažetak rezultata studije stabilnosti za valganciklovir hidroklorid

| Otopina | Vrijeme (h) | Razgradnja (%) |
|-----------------|-------------|----------------|
| Standard* | / | / |
| | 4 | 9 |
| Uzorak otopine* | / | / |
| | 4 | 13 |
| Uzorak brisa | / | / |

*Otopina standarda i otopina uzorka pohranjene su u autosampleru na 5°C.

Iz navedenog je zaključeno sve otopine (standard, otopina, bris) trebaju biti svježe pripremljene.

Prethodno navedeno prikazano je u Tablici 33.

Tablica 33. Stabilnost uzoraka

| Djelatna tvar | Stabilnost uzoraka | | |
|----------------------------|----------------------|----------------------------|-----------------------|
| | Standard, t = 5°C | Uzorak otopine, t = 5°C | Suhi bris, t ≈ 4°C |
| Valganciklovir hidroklorid | Svježe pripremljen | | |

Analitička metoda za određivanje valganciklovir hidroklorida nakon čišćenja proizvodnih prostora i opreme uspješno je validirana prema referentnim postupcima i definiranim kriterijima prihvatljivosti. Temeljem provedenog postupka razvijena HPLC metoda je prikladna za upotrebu tijekom postupka dekontaminacije.

4.3. Rezultati procjene kritičnosti prostorija

4.3.1. Rezultati procjene kritičnosti proizvodnih prostorija

Kao kritična mjesta sa stajališta moguće unakrsne kontaminacije, a time i mjesta uzorkovanja, definirani su:

- pod prostorije,
- zid prostorije,
- filteri – kućište filtera,
- vrata – kvaka,
- stolac – sjedalo,
- nekontaktna površina uređaja u prostoriji.

S obzirom na količinu prašine tijekom proizvodnje i pranja uređaja u Tablici 34. definirana je kritičnost proizvodnih prostorija.

Tablica 34. Procjena kritičnosti proizvodnih prostorija

| Namjena prostorije | Procjena kritičnosti prostorije |
|---|--|
| Vaganje pomoćnih tvari: Pb111 | Vaganje pomoćnih tvari se odvija ručno u PE vreće. Postoji minimalno prašenje prilikom punjenja. |
| Vaganje API-a: Pb112 | Vaganje API-a se odvija u izolatoru za vaganje, Glovebag, zatvorenom sustavu pomoću kojeg je prašenje potpuno onemogućeno. Važe se u PE vreće ili preko sustava aktivnog i pasivnog ventila u prihvatne spremnike. Prašnje tijekom proizvodnje je minimalno. |
| Granulacija: Pb112 | Uređaj za granulaciju H5 se puni i prazni ručno. Zahvaljujući „sampling port“- u na uređajima za vrtložnu sprej granulaciju, nema potrebe za otvaranjem uređaja tijekom proizvodnje. Vezivo se priprema uz ručno usipavanje sirovina (u pravilu pomoćnih tvari) u spremnike. Postoji minimalno prašenje prilikom punjenja i pražnjenja stroja. |
| Sijanje: Pb112 | Sijanje se u odvija u zatvorenom sustavu, besprašno. Uređaji za sijanje se pune preko sustava aktivnog i pasivnog ventila izravno iz bina ili spremnika te se na isti način prazne, dakle sijanje se odvija iz bina u bin, odnosno iz spremnika u spremnik. Prašnje tijekom proizvodnje je minimalno. |

| Namjena prostorije | Procjena kritičnosti prostorije |
|---|--|
| Kompaktiranje: Pb117 | Kompaktiranje se provodi na način da se kompaktor puni ručno, a prazni u spremnik obložen PE vrećom koja je pričvršćena za uređaj. Postoji minimalno prašenje prilikom punjenja. |
| Tabletiranje: Pb116 | Uređaji za tabletiranje se pune preko sustava aktivnog i pasivnog ventila izravno iz bina ili spremnika. Tijekom tabletiranja dolazi do prašenja u samom stroju za tabletiranje koje je reducirano na minimum spojem stroja na centralni otprašivač, a sam uređaj je zatvoren tijekom rada. Tablete izlaze iz stroja kroz vertikalni zatvoreni otprašivač koji je spojen na centralno otprašivanje, čime je prašenje svedeno na minimum. Tablete se sakupljaju izravno iz stroja u spremnike. S obzirom na prašenje tijekom proizvodnje, kao i zaprašenost samog stroja za tabletiranje, prostorije za tabletiranje se smatraju kritičnima sa stajališta prašenja. |
| Oblaganje: Pb115 | U fazi oblaganja prašenje je minimalno iz razloga što je proizvod komprimiran u obliku jezgre, a iz uređaja izlaze obložene tablete. Prašenje tijekom proizvodnje je minimalno. |
| Priprema suspenzija za oblaganje: Pb115 | Suspenzija za oblaganje se priprema u prostorijama za oblaganje. Suspenzije se pripremaju uz ručno usipavanje sirovina (u pravilu pomoćnih tvari) u spremnike pri čemu je prašenje minimalno, a ukoliko se dodaje aktivna supstancija, ona se važe u kabinetu za vaganje i dodaje uz miješanje. Prašenje tijekom proizvodnje je minimalno. |
| Opremanje: Pb013, Pb014 | U fazi primarnog pakiranja, prašenje ne postoji ili je minimalno, iz razloga što je proizvod komprimiran u tablete, obložen ili u obliku kapsule. U fazi sekundarnog pakiranja, prašenje ne postoji jer je proizvod zatvoren u primarno pakiranje. Prašenje tijekom proizvodnje je minimalno. |

4.3.2. Rezultati procjene kritičnosti neproizvodnih prostorija

Neproizvodne prostorije nisu izložene direktnim proizvodnim aktivnostima niti manipulaciji proizvodima već služe kao tranzitni prostori za osoblje kroz prostore pogona ili kao pomoćne prostorije za pojedina pomoćna sredstva i materijale. Iz navedenog zaključuje se da prašenje ne postoji te je rizik od moguće unakrsne kontaminacije minimalan.

Neovisno o opisanom, prilikom određivanja kritičnih mjesta uzorkovanja primijenjen je isti princip kritičnosti kao i kod proizvodnih prostorija s ciljem maksimalnog nadzora kontaminacije kroz čitav pogon.

4.4. Određivanje lokacija uzorkovanja

Obzirom na provedenu procjenu kritičnosti i rizika od unakrsne kontaminacije u proizvodnim i neproizvodnim prostorijama određene su najkritičnije lokacije s kojih su prikupljeni uzorci briseva tijekom dekontaminacijskog postupka pogona SOO2B. U Tablici 35. prikazane su oznake lokacije proizvodnih i neproizvodnih prostorija u ovisnosti o materijalu izrade.

Tablica 35. Oznake lokacija uzorkovanja proizvodnih i neproizvodnih prostorija

| Lokacija | Oznaka brisa | Materijal izrade | Recovery faktor za izračun |
|-----------------|--------------|------------------------------|---------------------------------------|
| Pod | B1-PROST | Polimerni premaz | Meke plastike i silikoni (poliuretan) |
| Zid | B2A-PROST | Staklo | Čelici (nehrđajući čelik 316L) |
| | B2B-PROST | Aluminij presvučen polimerom | Tvrde plastike (poliamid) |
| Rešetka filtera | B3-PROST | Plastika | Tvrde plastike (poliamid) |
| Stolac | B5-PROST | Plastificirani lim | Tvrde plastike (poliamid) |

Podovi u pogonu su tzv. „dulex“ podovi, koji se sastoje od mješavina pijeska i ljepila premazane s više slojeva različitih premaza, odnosno specijalnih polimera. Prilikom analize, u izračun je kao *worst case recovery* faktor uračunat *recovery* faktor za meke plastike i silikone.

Čiste stijene u proizvodnim prostorijama su također posebne izrade kako bi bile inertne i lako čistljive. Sastoje se od aluminija presvučenog plastificiranim slojem, odnosno specijalnim polimerom. Prilikom analize, u izračun je kao *worst case recovery* faktor uračunat *recovery* faktor za tvrde plastike.

Recovery faktori za pojedine materijale navedeni su u točkama razvoja i validacije analitičkih metoda za 6-markaptopurin i valganciklovir hidroklorid (4.1.1.4. i 4.2.1.4.)

U svakoj od prostorija obuhvaćenih uzorkovanjem gdje postoji određena oprema ili uređaji lokacije su označene kako je definirano u Tablici 36.

Tablica 36. Oznake lokacija uzorkovanja vanjskih površina uređaja u proizvodnim i neproizvodnim prostorijama

| Lokacija | Oznaka brisa | Materijal izrade | <i>Recovery faktor za izračun</i> |
|--------------------------|---------------------|-------------------------|--|
| Vanjska površina uređaja | B6A-PROST | Pleksiglas | Tvrde plastike (poliamid) |
| | B6B-PROST | Nehrđajući čelik | Čelici (nehrđajući čelik 316L) |

Dodatno, dekontaminacijom cilj je bio uzorkovanjima obuhvatiti što više površina kako bi se dobio što detaljniji uvid u stanje kontaminacije raspodijeljene u prostoru. Stoga su u svakoj od prostorija provedena uzorkovanja dodatnih mjesta. U Tablici 37. definirane su oznake dodatnih mjesta uzorkovanja ovisno o materijalu izrade.

Tablica 37. Oznake lokacija dodatnih mjesta uzorkovanja u proizvodnim i neproizvodnim prostorijama

| Lokacija | Oznaka brisa | Materijal izrade | <i>Recovery faktor za izračun</i> |
|----------------------------|---------------------|-------------------------|--|
| Dodatna mjesta uzorkovanja | B1-NONCON | Čelik i staklo | Čelici (nehrđajući čelik 316L) |
| | B2-NONCON | Plastika | Tvrde plastike (poliamid) |
| | B3-NONCON | Meka plastika | Meke plastike i silikoni (poliuretan) |
| | B4-NONCON | Aluminij, legure | Legure (eloksirani aluminij) |

4.5. Rezultati procjene kritičnosti djelatnih tvari i određivanje kriterija prihvatljivosti

4.5.1. Rezultati procjene kritičnosti djelatne tvari 6-merkaptopurin

Temeljem provedene procjene kritičnosti djelatne tvari 6-merkaptopurin sa stajališta validacije čišćenja gdje su u obzir uzeti i evaluirani različiti dostupni podaci o karakteristikama djelatne tvari, formulaciji lijeka te proizvodnom postupku i postupku opremanja (pakiranja) lijeka, djelatnoj tvari su dodijeljene odgovarajuće ocjene kritičnosti kako je prikazano u Tablici 38. Zaključeno je da se radi o citotoksičnom proizvodu kritičnom za validaciju čišćenja sa stajališta topljivosti, čistljivosti i djelovanja lijeka na svoj opremi koja se koristi za proizvodnju proizvoda.

Tablica 38. Procjena kritičnosti 6-merkaptopurina sa stajališta validacije čišćenja

| Osobina | Opis | | | |
|---|---|---|----------|---------------|
| Topljivost | Praktički netopljiv u vodi ^[29] | | | |
| Potentnost | Minimalna dnevna terapijska doza 50 mg (1,0 mg/kg/dan) Maksimalna dnevna dozvoljena doza 250 mg (5,0 mg/kg/dan) Minimalna i maksimalna dnevna doza izračunate su uzimajući u obzir masu osobe od 50 kg. ^[30] | | | |
| Djelovanje | Imunosupresiv, citotoksičan proizvod | | | |
| Toksičnost | OHC – 5 ADE – 1 µg/dan (OHC, <i>Toxicology Reports</i>) | | | |
| Ocjena kritičnosti proizvoda sa stanovišta validacije čišćenja | | | | |
| SVOJSTVO | | VRIJEDNOST | | OCJENA |
| Topljivost | Aktivne komponente u vodi | Praktički netopljiv u vodi | 1 | (A) |
| Čistljivost | Prema topljivosti formulacije lijeka | Formulacija bazirana na punilima netopljivim u vodi | 1 | (B) |
| | Prema iskustvu | Teško čistljiv proizvod | 1 | (C) |
| UKUPNA OCJENA KRITIČNOSTI – PROIZVODNJA (D = A + B+ C) | | | 3 | (D) |
| Kritičnost proizvoda u fazi pakiranja | | Film obložena tableta | 0 | (E) |
| UKUPNA OCJENA KRITIČNOSTI – PAKIRANJE (F = D x E) | | | 0 | (F) |

4.5.2. Rezultati procjene kritičnosti djelatne tvari valganciklovir hidroklorid

Temeljem provedene procjene kritičnosti djelatne tvari valganciklovir hidroklorid sa stajališta validacije čišćenja gdje su u obzir su uzeti i evaluirani različiti dostupni podaci o karakteristikama djelatne tvari, formulaciji lijeka te proizvodnom postupku i postupku opremanja (pakiranja) lijeka, djelatnoj tvari su dodijeljene odgovarajuće ocjene kritičnosti kako je prikazano u Tablici 39. Zaključeno je da se radi o citotoksičnom proizvodu kritičnom za validaciju čišćenja sa stajališta djelovanja lijeka na svoj opremi koja se koristi za proizvodnju proizvoda.

Tablica 39. Procjena kritičnosti valganciklovir hidroklorida sa stajališta validacije čišćenja

| Osobina | Opis | | | |
|--|---|---|-----------|------------|
| Topljivost | Lako topljiv u vodi (određeno u QC-u) | | | |
| Potentnost | Minimalna dnevna terapijska doza 450 mg Maksimalna dnevna dozvoljena doza 1 800 mg ^[31] | | | |
| Djelovanje | Antivirotik | | | |
| Toksičnost | OHC – 4 ADE 90 µg/dan (ADE) | | | |
| Ocjena kritičnosti proizvoda sa stanovišta validacije čišćenja | | | | |
| SVOJSTVO | | VRIJEDNOST | OCJENA | |
| Topljivost | Aktivne komponente u vodi | Lako topljiv u vodi | 6 | (A) |
| Čistljivost | Prema topljivosti formulacije lijeka | Formulacija bazirana na API-u i punilima topljivim u vodi | 3 | (B) |
| | Prema iskustvu | Teško čistljiv proizvod | 1 | (C) |
| UKUPNA OCJENA KRITIČNOSTI – PROIZVODNJA (D = A + B+ C) | | | 10 | (D) |
| Kritičnost proizvoda u fazi pakiranja | | Film obložena tableta | 0 | (E) |
| UKUPNA OCJENA KRITIČNOSTI – PAKIRANJE (F = D x E) | | | 0 | (F) |

4.5.3. Određivanje kriterija prihvatljivosti za ostatak djelatne tvari

Neovisno o metodama izračuna definiranim u točki 1.4.2.2. tijekom ovog istraživanja primijenjeni su strožiji kriteriji prihvatljivosti od onih dobivenih izračunom, a to su limiti detekcije razvijenih analitičkih metoda. Usporedba kriterija prihvatljivosti dobivenih izračunom i vrijednosti limita detekcije dani su u Tablici 40.

Tablica 40. Kriteriji prihvatljivosti za ostatak djelatnih tvari na površinama

| Djelatna tvar | Kriterij prihvatljivosti Izračun* | Kriterij prihvatljivosti LOD analitičke metode |
|----------------------------|--------------------------------------|---|
| 6-merkaptopurin | 0,180 µg/brisu | 0,00144 µg/brisu |
| Valganciklovir hidroklorid | 101,56 µg/brisu | 0,005 µg/brisu |

*Izračunato prema formuli iz točke 1.4.2.2.:

$$A [\mu\text{g/brisu}] = \frac{ADE [\text{mg}]}{C [\text{mg}]} \times \frac{D [\text{cm}^2]}{E [\text{cm}^2]} \times F [\text{kg}] \times 10^9 \times R$$

Određivanje ostatka detergenata, dezinficijensa i mikrobiološke kontaminacije nije obuhvaćeno ovim istraživanjem već je planirano njihovo određivanje prije ponovne upotrebe proizvodnog pogona u određenu svrhu.

4.6. Rezultati provedenih uzorkovanja

U Tablicama 41. i 42. dani su postupci i kriteriji prihvatljivosti pri analizi prikupljenih uzoraka na ostatke 6-merkaptopurina i valganciklovir hidroklorida uz navedene pojedinosti o vrsti uzorkovanih površina, oznakama briseva i odgovarajućim vrijednostima analitičkog povrata tih površina.

Tablica 41. Postupci i kriteriji prihvatljivosti pri analizi prikupljenih uzoraka na ostatke 6-merkaptopurina

| KONTAMINAT | | 6-MERKAPTOPURIN | |
|--|---------------------------------|---|------------------------|
| LIMIT DETEKCIJE | | 0,00144 µg/brisu | |
| KRITERIJ PRIHVATLJIVOSTI | | ≤ LOD (0,00144) µg 6-merkaptopurina/brisu | |
| Iskoristivost metode (<i>recovery</i>) | Tip površine | Bris | <i>Recovery faktor</i> |
| | Čelici (nehrđajući čelik 316 L) | B2A, B6B-PROST-API B1-NONCON-API | 0,51 |
| | Tvrde plastike (poliamid) | B2B, B3, B5, B6A-PROST-API B2-NONCON-API | 0,77 |
| | Meke plastike (poliuretan) | B1-PROST-API B3-NONCON-API | 0,66 |
| | Legure (eloksirani aluminij) | B4-NONCON-API | 0,57 |

Tablica 42. Postupci i kriteriji prihvatljivosti pri analizi prikupljenih uzoraka na ostatke valganciklovir hidroklorida

| KONTAMINAT | | VALGANKIKLOVIR HIDROKLORID | |
|--|---------------------------------|---|------------------------|
| LIMIT DETEKCIJE | | 0,005 µg/brisu | |
| KRITERIJ PRIHVATLJIVOSTI | | ≤ LOD (0,005) µg Valganciklovira/brisu | |
| Iskoristivost metode (<i>recovery</i>) | Tip površine | Bris | <i>Recovery faktor</i> |
| | Čelici (nehrđajući čelik 316 L) | B2A, B6B-PROST-API B1-NONCON-API | 0,51 |
| | Tvrde plastike (poliamid) | B2B, B3, B5, B6A-PROST-API B2-NONCON-API | 0,66 |
| | Meke plastike (poliuretan) | B1-PROST-API B3-NONCON-API | 0,63 |
| | Legure (eloksirani aluminij) | B4-NONCON-API | 0,59 |

Prilikom izražavanja rezultata analize obavezno je uračunata iskoristivost metode tj. *recovery faktor* s odgovarajuće površine. U slučaju da oprema ne zadovoljava navedene kriterije prihvatljivosti za pojedinu djelatnu tvar, oprema je ponovno očišćena po definiranim propisima sve do zadovoljavanja postavljenih kriterija prihvatljivosti.

U Tablicama 43. i 44. prikazani su zbirni rezultati dobiveni analizom prikupljenih briseva s površina prostorija i vanjskih / nekontaktnih površina uređaja na ostatke 6-merkaptopurina i valganciklovir hidroklorida.

Nakon provedenog potpunog uzorkovanja svih lokacija i dobivanja zadovoljavajućih rezultata analiza prikupljenih uzoraka pristupilo se finalnoj fazi postupka dekontaminacije. U svim proizvodnim i neproizvodnim prostorijama demontirani su i iz pogona uklonjeni visoko učinkoviti filteri (H13) koji su se nalazili na prostornim odsisima. Po završetku prethodno opisanog postupka pristupilo se finalnom dekontaminacijskom čišćenju cijelog pogona. Kako bi se potvrdilo da demontažom filtera u prostore pogona nije ponovno unesena kontaminacija provedeno je uzorkovanje najbližih lokacija mogućem izvoru kontaminacije, a to su bili ulazi u odsisne kanale. U Tablici 45. prikazani su sumarni rezultati po provedenom finalnom uzorkovanju odsisa prostorija.

U istoj tablici vidljivo je da je prostorija Pb119 ponovno u potpunosti uzorkovana na svim lokacijama. Ovdje se radi o Praonici koja je korištena za manipulaciju sredstvima za čišćenje te otpadnom vodom nakon čišćenja po skidanju svih odsisnih filtera. Nakon provedbe svih planiranih aktivnosti i temeljem dobivenih rezultata analiza utvrđen je uspješno proveden postupak dekontaminacije pogona SOO2B.

Tablica 43. Zbirni rezultati analiza prikupljenih briseva u proizvodnim prostorijama

| Prostorija | Oznake prikupljenih briseva | | | | Kriterij prihvatljivosti | |
|--------------|---|--|--|---------------------------|--|---|
| | | | | | 6-merkaptopurin | Valganciklovir |
| | Prostorija | Vanjska površina uređaja | Dodatna mjesta uzorkovanja | Broj uzorkovanih lokacija | ≤0,00144 µg 6-merkaptopurina/brisu (DA/NE) | ≤0,005 µg Valganciklovira/brisu (DA/NE) |
| Pb013 | B1-PROST-API B2A-PROST-API B3-PROST-API B5-PROST-API | B6B-PROST-API/1 B6B-PROST-API/2 B6A-PROST-API/3 | B1-NONCON-API/1 B1-NONCON-API/2 B1-NONCON-API/3 B1-NONCON-API/4 B1-NONCON-API/5 | 2 x 12 = 24 | DA | DA |
| Pb014 | B1-PROST-API B2A-PROST-API | N/P | B1-NONCON-API/1 | 3 | DA | DA |
| Pb015 | B1-PROST-API | B6B-PROST-API/1 B6B-PROST-API/2 | N/P | 3 | DA | DA |
| Pb108 | B1-PROST-API B2A-PROST-API B3-PROST-API | B6B-PROST-API/1 B6B-PROST-API/2 B6B-PROST-API/3 | N/P | 6 | DA | DA |
| Pb110 | B1-PROST-API B2A-PROST-API B3-PROST-API B5-PROST-API | B6B-PROST-API/1 B6B-PROST-API/2 B6B-PROST-API/3 B6A-PROST-API/4 | B1-NONCON-API/1 B2-NONCON-API/1 | 10 | DA | DA |
| Pb111 | | | | | | |
| Pb112 | B1-PROST-API B2A-PROST-API B3-PROST-API B5-PROST-API | B6B-PROST-API/1 B6B-PROST-API/2 B6B-PROST-API/3 B6B-PROST-API/4 B6B-PROST-API/5 B6B-PROST-API/6 | B1-NONCON-API/1 B1-NONCON-API/2 B1-NONCON-API/3 B1-NONCON-API/4 B1-NONCON-API/5 B1-NONCON-API/6 | 42 | DA | DA |

| Prostorija | Oznake prikupljenih briseva | | | | Kriterij prihvatljivosti | |
|--------------|---|--|---|---------------------------|--|---|
| | | | | | 6-merkaptopurin | Valganciklovir |
| | Prostorija | Vanjska površina uređaja | Dodatna mjesta uzorkovanja | Broj uzorkovanih lokacija | ≤0,00144 µg 6-merkaptopurina/brisu (DA/NE) | ≤0,005 µg Valganciklovira/brisu (DA/NE) |
| | | B6B-PROST-API/7 B6B-PROST-API/8 B6B-PROST-API/9 | B1-NONCON-API/7 B1-NONCON-API/8 B1-NONCON-API/9 B1-NONCON-API/10 B1-NONCON-API/11 B1-NONCON-API/12 B1-NONCON-API/13 B1-NONCON-API/14 B1-NONCON-API/15 B1-NONCON-API/16 B1-NONCON-API/17 B1-NONCON-API/18 B1-NONCON-API/19 B1-NONCON-API/20 B1-NONCON-API/21 B1-NONCON-API/22 B1-NONCON-API/23 B1-NONCON-API/24 B1-NONCON-API/25 B2-NONCON-API/1 B3-NONCON-API/1 B3-NONCON-API/2 B3-NONCON-API/3 | | | |
| Pb113 | B1-PROST-API B2A-PROST-API B3-PROST-API B5-PROST-API | B6B-PROST-API/1 B6B-PROST-API/2 B6B-PROST-API/3 B6A-PROST-API/4 B6A-PROST-API/1 B6B-PROST-API/2 B6A-PROST-API/3 B6B-PROST-API/4 | B1-NONCON-API/1 B1-NONCON-API/2 B1-NONCON-API/3 B1-NONCON-API/4 B2-NONCON-API/1 B1-NONCON-API/1 | 18 | DA | DA |
| Pb114 | B1-PROST-API B2A-PROST-API | B6B-PROST-API/1 B6A-PROST-API/2 | B1-NONCON-API/1 B1-NONCON-API/2 | 24 | DA | DA |

| Prostorija | Oznake prikupljenih briseva | | | | Kriterij prihvatljivosti | |
|---------------|---|--|---|---------------------------|--|---|
| | | | | | 6-merkaptopurin | Valganciklovir |
| | Prostorija | Vanjska površina uređaja | Dodatna mjesta uzorkovanja | Broj uzorkovanih lokacija | ≤0,00144 µg 6-merkaptopurina/brisu (DA/NE) | ≤0,005 µg Valganciklovira/brisu (DA/NE) |
| | B3-PROST-API B5-PROST-API | B6B-PROST-API/3 B6B-PROST-API/4 | B1-NONCON-API/3 B1-NONCON-API/4 B1-NONCON-API/5 B1-NONCON-API/6 B1-NONCON-API/7 B1-NONCON-API/8 B1-NONCON-API/9 B1-NONCON-API/10 B1-NONCON-API/11 B1-NONCON-API/12 B1-NONCON-API/13 B1-NONCON-API/14 B1-NONCON-API/15 B1-NONCON-API/16 | | | |
| Pb115 | B1-PROST-API B2A-PROST-API B3-PROST-API B5-PROST-API | B6B-PROST-API/1 B6B-PROST-API/2 B6A-PROST-API/3 B6A-PROST-API/4 | B1-NONCON-API/1 B1-NONCON-API/2 B1-NONCON-API/3 B1-NONCON-API/4 B1-NONCON-API/5 | 13 | DA | DA |
| Pb115a | B1-PROST-API B2A-PROST-API B3-PROST-API | N/P | N/P | 3 | DA | DA |
| Pb116 | B1-PROST-API B2A-PROST-API B3-PROST-API B5-PROST-API | B6B-PROST-API/1 B6B-PROST-API/2 B6B-PROST-API/3 B6A-PROST-API/4 | B1-NONCON-API/1 B1-NONCON-API/2 B1-NONCON-API/3 | 11 | DA | DA |
| Pb117 | B1-PROST-API B2A-PROST-API B3-PROST-API | B6B-PROST-API/1 B6B-PROST-API/2 B6B-PROST-API/3 | B1-NONCON-API/1 B1-NONCON-API/2 B1-NONCON-API/3 | 9 | DA | DA |

| Prostorija | Oznake prikupljenih briseva | | | | Kriterij prihvatljivosti | |
|--------------|---|--|--|---------------------------|--|---|
| | | | | | 6-merkaptopurin | Valganciklovir |
| | Prostorija | Vanjska površina uređaja | Dodatna mjesta uzorkovanja | Broj uzorkovanih lokacija | ≤0,00144 µg 6-merkaptopurina/brisu (DA/NE) | ≤0,005 µg Valganciklovira/brisu (DA/NE) |
| Pb118 | B1-PROST-API B2A-PROST-API B3-PROST-API B5-PROST-API | B6B-PROST-API/1 B6B-PROST-API/2 B6B-PROST-API/3 B6A-PROST-API/4 | B1-NONCON-API/1 B1-NONCON-API/2 | 10 | DA | DA |
| Pb119 | B1-PROST-API B2A-PROST-API B3-PROST-API | B6B-PROST-API/1 B6A-PROST-API/2 | B1-NONCON-API/1 B1-NONCON-API/2 B1-NONCON-API/3 B1-NONCON-API/4 | 2 x 9 =18 | DA | DA |
| Pb120 | B1-PROST-API B2A-PROST-API | N/P | B1-NONCON-API/1 B1-NONCON-API/2 | 4 | DA | DA |

Tablica 44. Zbirni rezultati analiza prikupljenih briseva u neproizvodnim prostorijama

| Prostorija | Oznake prikupljenih briseva | | | | Kriterij prihvatljivosti | |
|--------------------|--|---|---|---------------------------|--|---|
| | Prostorija | Vanjska površina uređaja | Dodatna mjesta uzorkovanja | Broj uzorkovanih lokacija | 6-merkaptopurin | Valganciklovir |
| | | | | | ≤0,00144 µg 6-merkaptopurina/brisu (DA/NE) | ≤0,005 µg Valganciklovira/brisu (DA/NE) |
| Pb002 | B1-PROST-API B2A-PROST-API | B6A-PROST-API/1 | N/P | 5 | DA | DA |
| Pb003 | | B6A-PROST-API/2 | | | | |
| Pb004 | | B6B-PROST-API/3 | | | | |
| Pb006 | B1-PROST-API B2A-PROST-API | B6A-PROST-API/1 | N/P | 5 | DA | DA |
| Pb007 | | B6A-PROST-API/2 | | | | |
| Pb008 | | B6B-PROST-API/3 | | | | |
| Pb009 | B1-PROST-API B2A-PROST-API B3-PROST-API | N/P | B1-NONCON-API/1 | 4 | DA | DA |
| Pb010/Pb101 | B1-PROST-API/1 B1-PROST-API/2 B1-PROST-API/3 | N/P | B1-NONCON-API/1 B1-NONCON-API/2 B1-NONCON-API/3 B1-NONCON-API/4 B1-NONCON-API/5 | 8 | DA | DA |
| Pb011a | B1-PROST-API B2A-PROST-API | B6B-PROST-API/1 B6B-PROST-API/2 | B1-NONCON-API/1 | 9 | DA | DA |
| Pb011b | | | B1-NONCON-API/2 | | | |
| Pb011c | | | B3-NONCON-API/1 | | | |
| Pb011d | | | B3-NONCON-API/2 B3-NONCON-API/3 | | | |
| Pb012a | B1-PROST-API B2A-PROST-API | B6B-PROST-API/1 | B1-NONCON-API/1 | 5 | DA | DA |
| Pb012b | | | B3-NONCON-API/1 | | | |
| Pb012c | | | | | | |
| Pb020 | B1-PROST-API B2A-PROST-API | N/P | B1-NONCON-API/1 B1-NONCON-API/2 | 4 | DA | DA |
| Pb022 | B1-PROST-API | B6B-PROST-API/1 B6B-PROST-API/2 B6B-PROST-API/3 | N/P | 4 | DA | DA |

| Prostorija | Oznake prikupljenih briseva | | | | Kriterij prihvatljivosti | |
|--------------------|---|--|------------------------------------|---------------------------|--|---|
| | | | | | 6-merkaptopurin | Valganciklovir |
| | Prostorija | Vanjska površina uređaja | Dodatna mjesta uzorkovanja | Broj uzorkovanih lokacija | ≤0,00144 µg 6-merkaptopurina/brisu (DA/NE) | ≤0,005 µg Valganciklovira/brisu (DA/NE) |
| Pb102 | B1-PROST-API | B2A-PROST-API B6B-PROST-API | N/P | 3 | DA | DA |
| Pb021/Pb103 | B1-PROST-API B2A-PROST-API | B6B-PROST-API/1 B6B-PROST-API/2 B6B-PROST-API/3 B6B-PROST-API/4 | N/P | 6 | DA | DA |
| Pb105a | B1-PROST-API | B2A-PROST-API B6B-PROST-API | N/P | 3 | DA | DA |
| Pb105b | | | | | | |
| Pb105c | | | | | | |
| Pb106a | B1-PROST-API | B2A-PROST-API B6B-PROST-API | N/P | 3 | DA | DA |
| Pb106b | | | | | | |
| Pb106c | | | | | | |
| Pb106d | | | | | | |
| Pb107 | B1-PROST-API B2A-PROST-API B3-PROST-API | N/P | B1-NONCON-API/1 B1-NONCON-API/2 | 5 | DA | DA |

Tablica 45. Rezultati finalne dekontaminacije nakon uklanjanja odsisnih filtera u proizvodnim i neproizvodnim prostorijama

| Prostorija | Oznake prikupljenih briseva | Broj uzorkovanih lokacija | Kriterij prihvatljivosti | |
|------------|--|---------------------------|--|---|
| | | | 6-merkaptopurin | Valganciklovir |
| | | | ≤0,00144 µg 6-merkaptopurina/brisu (DA/NE) | ≤0,005 µg Valganciklovira/brisu (DA/NE) |
| Pb009 | B1-NONCON-API/2 | 1 | DA | DA |
| Pb013 | B1-NONCON-API/6 B1-NONCON-API/7 B1-NONCON-API/8 B1-NONCON-API/9 | 4 | DA | DA |
| Pb107 | B1-NONCON-API/4 B1-NONCON-API/5 | 2 | DA | DA |
| Pb108 | B1-NONCON-API/1 | 1 | DA | DA |
| Pb110 | B1-NONCON-API/2 | 1 | DA | DA |
| Pb111 | B1-NONCON-API/3 | 1 | DA | DA |
| Pb112 | B1-NONCON-API/26 B1-NONCON-API/27 | 2 | DA | DA |
| Pb113 | B1-NONCON-API/2 | 1 | DA | DA |
| Pb114 | B1-NONCON-API/17 | 1 | DA | DA |
| Pb115 | B1-NONCON-API/6 | 1 | DA | DA |
| Pb115a | B1-NONCON-API/1 | 1 | DA | DA |
| Pb116 | B1-NONCON-API/4 | 1 | DA | DA |
| Pb117 | B1-NONCON-API/4 | 1 | DA | DA |
| Pb118 | B1-NONCON-API/3 | 1 | DA | DA |
| Pb120 | B1-NONCON-API/1 | 1 | DA | DA |
| Pb119 | B1-PROST-API B2A-PROST-API B3-PROST-API B6B-PROST-API/1 B6A-PROST-API/2 B1-NONCON-API/1 B1-NONCON-API/2 B1-NONCON-API/3 B1-NONCON-API/4 B1-NONCON-API/5 | 10 | DA | DA |

5. RASPRAVA

Proveden je razvoj i validacija HPLC metoda za određivanje ostataka 6-merkaptourina i valganciklovir hidroklorida na površinama u proizvodnom pogonu.

Validacijom analitičke metode za djelatnu tvar 6-merkaptopurin utvrđeno je da je metoda selektivna. Pik djelatne tvari je dobro odvojen od bilo kojeg drugog pika dobivenog ubrizgavanjem otopina koje su bile dio studije selektivnosti. Tijekom ispitivanja limita kvantifikacije / detekcije utvrđeno je da je metoda dovoljno osjetljiva obzirom na svoju svrhu. Nadalje, ispitivanjem je potvrđena linearnost odgovora metode u rasponu koncentracija od 1,4 ng/ml do 14,4 ng/ml te je utvrđeno da metoda daje rezultate analitičkog povrata koji su unutar definiranog kriterija prihvatljivosti (ne manje od 50 %). Također, ispitivanjem stabilnost uzoraka zaključeno je da su otopina standarda i uzorak otopine stabilni najmanje 96 sati, a uzorci briseva najmanje 24 sata. U Tablici 46. dan je sažetak rezultata provedenog razvoja i validacije metode za određivanje 6-merkaptopurina.

Tablica 46. Sažetak rezultata validacije metode za 6-merkaptopurin

| Parametar | Rezultat | Kriterij prihvatljivosti | Odgovara / Ne odgovara |
|-----------------------------|---|---|------------------------|
| Selektivnost | Pik od interesa (pik uzorka) dobro je odvojen od vrijednosti pikova koji pripadaju diluentu, brisu, površinama koje se čiste, detergentima i placebo suspenziji. | Bez interferencije između pika uzorka i pikova koji pripadaju diluentu, brisu, površinama koje se čiste, detergentima i placebo suspenziji. | Odgovara |
| Limit kvantifikacije | Injektirana otopina (1,4393 ng/ml, s omjerom S/N = 15) Procijenjeni LOD s omjerom S/N = 3 je 0,2879 ng/ml | Limit kvantifikacije, % treba zadovoljiti najnižu specificiranu koncentraciju definiranu testom linearnosti (50 % od zahtjeva specifikacije). | Odgovara |
| Linearnost | Linearnost u rasponu koncentracija: 1,4 ng/ml – 14,4 ng/ml R = 0,9990 RRF (%) = 90 % - 107 % | Korelacijski koeficijent je ne manji od 0,99. Srednji faktori relativnog odgovora (RRF) za svaku razinu koncentracije ne variraju za više od 100 ± 10 % od srednjeg faktora odgovora pri radnoj koncentraciji (razina od 100 %). | Odgovara |
| Točnost | Čelik: RSD _{max} = 24 %, Recovery _{min} = 51 % Poliamid: RSD _{max} = 10 %, Recovery _{min} = 77 % Anodizirani aluminij: RSD _{max} = 17 %, Recovery _{min} = 57 % Poliuretan: RSD _{max} = 19 %, Recovery _{min} = 66 % | RSD između različitih uzoraka unutar iste razine koncentracije treba biti ne manje od 25 %. Analitički prinos unutar svake razine koncentracije treba biti ne manji od 50 %. | Odgovara |
| Stabilnost uzoraka | Otopina standarda i uzorak otopine stabilni su najmanje 96 sati, a uzorci briseva su stabilni najmanje 24 sata. | Razgradnja uzoraka (otopina standarda, uzorka i uzorak brisa) ne više od 10 %. | Odgovara |

Validacijom analitičke metode za djelatnu tvar valganciklovir hidroklorid utvrđeno je da je metoda selektivna. Pik djelatne tvari je dobro odvojen od bilo kojeg drugog pika dobivenog ubrizgavanjem otopina koje su bile dio studije selektivnosti. Tijekom ispitivanja limita kvantifikacije / detekcije utvrđeno je da je metoda dovoljno osjetljiva obzirom na svoju svrhu. Nadalje, ispitivanjem je potvrđena linearnost odgovora metode u rasponu koncentracija od 2 ng/ml do 10 ng/ml te je utvrđeno da metoda daje rezultate analitičkog povrata koji su unutar definiranog kriterija prihvatljivosti (ne manji od 50 %). Također, ispitivanjem stabilnost uzoraka zaključeno je da sve otopine moraju biti svježe pripremljene. U Tablici 47. dan je sažetak rezultata provedenog razvoja i validacije metode za određivanje valganciklovir hidroklorida.

Tablica 47. Sažetak rezultata validacije metode za valganciklovir hidroklorid

| Parametar | Rezultat | Kriterij prihvatljivosti | Odgovara / Ne odgovara |
|-----------------------------|---|---|------------------------|
| Selektivnost | Kromatografski pik od interesa (pik uzorka) dobro je odvojen od vrijednosti pikova koji pripadaju diluentu, brisu, površinama koje se čiste, detergentima i placebo suspenziji. | Bez interferencije između pika uzorka i pikova koji pripadaju diluentu, brisu, površinama koje se čiste, detergentima i placebo suspenziji. | Odgovara |
| Limit kvantifikacije | Injektirana otopina (2,171 ng/ml, s omjerom S/N = 5 ili 11 ng/brisu) Procijenjeni LOD s omjerom S/N = 3 je 1 ng/ml ili 5 ng/brisu | Limit kvantifikacije, % treba zadovoljiti najnižu specificiranu koncentraciju definiranu testom linearnosti (50 % od zahtjeva specifikacije). | Odgovara |
| Linearnost | Linearnost u rasponu koncentracija: 2 ng/ml – 10 ng/ml R = 0,9991 RRF (%) = 94 % - 110 % | Korelacijski koeficijent je ne manji od 0,99. Srednji faktori relativnog odgovora (RRF) za svaku razinu koncentracije ne variraju za više od 100 ± 10 % od srednjeg faktora odgovora pri radnoj koncentraciji (razina od 100 %). | Odgovara |
| Točnost | Čelik: RSD _{max} = 22 %, Recovery _{min} = 51 % Poliamid: RSD _{max} = 15 %, Recovery _{min} = 66 % Anodizirani aluminij: RSD _{max} = 23 %, Recovery _{min} = 59 % Poliuretan: RSD _{max} = 11 %, Recovery _{min} = 63 % | RSD između različitih uzoraka unutar iste razine koncentracije treba biti ne manje od 25 %. Analitički prinos unutar svake razine koncentracije treba biti ne manji od 50 %. | Odgovara |
| Stabilnost uzoraka | Sve otopine trebaju biti svježe pripremljene. | Razgradnja uzoraka (otopina standarda, uzorka i uzorak brisa) ne više od 10 %. | Odgovara |

Provedena je procjena kritičnosti svake proizvodne i neproizvodne prostorije. Detaljno su razmotreni svi faktori koji utječu na vjerojatnost pojave unakrsne kontaminacije. Obzirom na provedenu procjenu kritičnosti i rizika od unakrsne kontaminacije u proizvodnim i neproizvodnim prostorijama određene su najkritičnije lokacije s kojih su prikupljeni uzorci briseva tijekom dekontaminacijskog postupka pogona SOO2B. Svakoj lokaciji uzorkovanja pridružena je odgovarajuća oznaka radi lakšeg raspoznavanja i kasnije evaluacije rezultata.

Provedena je procjena kritičnosti djelatnih tvari 6-merkaptopurin i valganciklovir hidroklorid sa stajališta validacije čišćenja. Prilikom procjene kritičnosti pojedine djelatne tvari u obzir su uzeti i evaluirani različiti dostupni podaci o karakteristikama djelatne tvari, formulaciji lijeka te proizvodnom postupku i postupku opremanja (pakiranja) temeljem koji je donesen zaključak o ukupnoj kritičnosti pojedine djelatne tvari. Zaključeno je da 6-merkaptopurin predstavlja citotoksičan proizvod kritičan za validaciju čišćenja sa stajališta topljivosti, čistljivosti i djelovanja lijeka na svoj opremi koja se koristi za proizvodnju proizvoda, a valganciklovir hidroklorid je također citotoksičan proizvod kritičan za validaciju čišćenja sa stajališta djelovanja lijeka na svoj opremi koja se koristi za proizvodnju proizvoda. Kao kriteriji prihvatljivosti za ostatak djelatnih tvari na površinama određeni su najstroži uvjeti, a to su limiti detekcije razvijenih analitičkih metoda (6-merkaptopurin: 0,00144 µg/brisu; valganciklovir hidroklorid: 0,005 µg/brisu).

Prilikom dekontaminacije pogona SOO2B čišćenje je provedeno prema internim radnim propisima za čišćenje proizvodnih i neproizvodnih prostorija u pogonu. Čišćenje proizvodne opreme također je provedeno prema odgovarajućim internim procedurama čišćenja za pojedinu opremu. Uzastopno čišćenje i uzorkovanje je provođeno sve do postizanja definiranih kriterija prihvatljivosti, odnosno rezultata \leq limitima detekcije validiranih analitičkih metoda za određivanje 6-merkaptopurina i valganciklovir hidroklorida.

6. ZAKLJUČAK

Validacija čišćenja proizvodnog pogona nakon proizvodnje farmaceutskih oblika s citotoksičnim djelatnim tvarima (dekontaminacijski postupak) provedena je uzastopnim čišćenjem svih obuhvaćenih prostorija i vanjskih / nekontaktnih površina uređaja te njihovim uzorkovanjem sve do postizanja analitičkih rezultata manjih ili jednakih limitu detekcije validiranih analitičkih metoda za određivanje 6-merkaptopurina i valganciklovir hidroklorida.

Dekontaminacija pogona SOO2B provedena je na ukupno 15 proizvodnih i 28 neproizvodnih prostorija. Uzorkovanje za praćenje stanja kontaminacije nakon svakog provedenog ciklusa čišćenja provedeno je na više od 250 različitih lokacija određenih kao najkritičnije. Kako bi se zadovoljili postavljeni kriteriji prihvatljivosti validacija čišćenja tijekom dekontaminacije pogona SOO2B provedena je nakon prosječno 3 ciklusa čišćenja.

Povedenim istraživanjem dokumentirano je dokazano da su kontaminanti 6-merkaptopurin i valganciklovir hidroklorid uklonjeni ispod propisanog kriterija prihvatljivosti (limiti detekcije analitičkih metoda) s površina proizvodnih i neproizvodnih prostorija te vanjskih / nekontaktnih površina uređaja u pogonu SOO2B.

Na osnovu svih dobivenih rezultata, proizvodne, neproizvodne prostorije i vanjske / nekontaktne površine uređaja u pogonu SOO2B smatraju se uspješno dekontaminirane od ostataka kontaminanata 6-merkaptopurina i valganciklovir hidroklorida. Provedena validacija čišćenja pogona, kao i sam dekontaminacijski postupak smatraju se uspješno završenim te je moguća sigurna prenamjena svih prostorija i uređaja u druge proizvodne svrhe.

7. LITERATURA

1. EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use, Annex 15: Qualification and Validation, (2015), 11 – 12
2. EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use, Annex 15: Qualification and Validation, (2015), 11
3. EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use, Part 1, Chapter 3: Premises and Equipment, (2014), 2
4. EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use, Part 1, Chapter 5: Production, (2014), 5 – 6
5. Korelitz B.I., Expert opinion: experience with 6-mercaptopurine in the treatment of inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*, (2013), 19 : 2979 – 2984
6. Curran M., Noble S., Valganciclovir. *Drugs*. (2001); 61: 1145 – 1150
7. Ramandi S.L., Asgharian R., Determination of cleaning limits considering toxicological risk evaluation to minimize the risk of cross contamination, *Iranian journal of pharmaceutical research*, (2021), 20: 175 – 185
8. Dammann U.P., Cleaning validation. *Pharmazeutische industrie*, (2011), 73: 178 – 182
9. Pawar H.A., Benerjeel N.D., Pawar S., Pawar P., Current perspectives on cleaning validation in pharmaceutical industry: A scientific and risk based approach, *International journal of pharmaceutical and psychopharmacological research*, (2011), 1: 8 – 16
10. Murthy DN, Chitra K, A review article on cleaning validation, *International journal of pharmaceutical sciences and research*, (2013), 4: 3317 – 3327
11. Penugonda C.S.G., Life cycle approach to cleaning validation, *International journal of pharmaceutical sciences and research*, (2017), 8: 1558 – 1570
12. Fonte A.N.B., Legro M.P., Cespedes Y.R., Simple and fast RP-HPLC method for the determination of prednisolone sodium phosphate, prednisolone, atropine, and homatropine as residuals in cleaning validation of industrial pharmaceutical equipment, *Journal of liquid chromatography and related technologies*, (2013), 36: 213 – 228

13. 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: 173 – 190
14. 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 and related technologies*, (2007), 30:3 311 – 333
15. 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)
16. 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.
17. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* 2nd Edition, Eurachem, 2014.
18. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.
19. E. Trogrlić, A. Strineka, D. Sekulić, *Međulaboratorijska ispitivanja i njihova primjena*, Vol. 61, *Građevinar*, Zagreb, 2009., str. 643 - 654.
20. *United States Pharmacopoeia 40 – National Formulary 35, Supplement 1, Chapter <1225> Validation of Compendial Procedures*
21. *European Pharmacopoeia 9th edition, Chapter 2.2.46 Chromatographic Separation Techniques*
22. 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
23. Huynh-Ba K (editor) *Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development.*, Regulations, Methodologies, and Best Practices, New York: Springer, 2009. str. 174
24. Harvey D. *Modern analytical chemistry* McGraw Hill: Boston, 2000., str. 578 – 586
25. Watson, D. G., *Pharmaceutical Analysis*, Edinburgh: Churchill Livingstone, Elsevier Limited, 1999., str. 168, 239 – 240
26. Kazakevich Y., LoBrutto R. (editors), *HPLC for pharmaceutical scientists*, Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2007., str. 654 – 657

27. Parental Drug Association Inc., PDA Technical Report No. 29 (Revised 2012), Points to Consider for Cleaning Validation, 2012., 10 – 17, 24 – 53
28. Active Pharmaceutical Ingredients Committee, Guidance on Aspects of Cleaning Validation in Active Pharmaceutical Ingredient Plants, Revision April 2019 (updated in February 2021), 2021., 7 – 16, 31 – 47
29. Ph.Eur. Monograph 0096
30. <http://www.drugs.com/dosage/mercaptopurine.html>
31. Uputa o lijeku, Valganciclovir-ratiopharm 450 mg tablete