

# Validacija HPLC-DAD metode za analizu onečišćenja iz gumenih čepova u infuzijskim otopinama

---

**Dorić, Lorena**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:792627>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-27**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Lorena Dorić**

**VALIDACIJA HPLC-DAD METODE ZA  
ANALIZU ONEČIŠĆENJA IZ GUMENIH  
ČEPOVA U INFUZIJSKIM OTOPINAMA**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

*Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod  
stručnim vodstvom prof.dr.sc. Ane Mornar Turk.*

*Zahvaljujem mentorici prof.dr.sc. Ani Mornar Turk na utrošenom trudu i vremenu te svima  
koji su me podržavali kroz cijelo obrazovanje.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Infuzijske otopine .....	2
1.1.1. Definicija infuzijskih otopina.....	2
1.1.2. Povijest primjene infuzijskih otopina.....	2
1.1.3. Ambalaža infuzijskih otopina .....	3
1.2. Onečišćenja iz ambalaže.....	3
1.2.1. Definicija onečišćenja iz ambalaže .....	3
1.2.2. Identifikacija i kvantifikacija onečišćenja iz ambalaže.....	4
1.2.3. Sigurnost primjene farmaceutskih pripravaka zbog onečišćenja iz ambalaže .....	6
1.2.4. Regulativa vezana uz onečišćenja iz ambalaže.....	8
1.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti .....	9
1.3.1. Karakteristike metode .....	9
1.3.2. Dijelovi uređaja.....	10
1.3.3. Detektori .....	13
1.4. Validacija analitičke metode.....	14
1.4.1. Važnost validacije analitičke metode.....	14
1.4.2. Parametri za validaciju analitičke metode .....	15
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	18
3. MATERIJALI I METODE .....	20
3.1. Materijali .....	21
3.1.1. Kemikalije.....	21
3.1.2. Uzorci.....	21
3.1.3. Pribor.....	21
3.1.4. Radni instrumenti.....	21
3.1.5. Programski alati .....	22
3.2. HPLC-DAD metoda .....	22
3.2.1. Priprema matične otopine .....	22
3.2.2. Priprema uzoraka .....	23
3.2.3. Priprema otopina za određivanje parametara validacije .....	23
3.2.4. Parametri metode .....	24
3.2.5. Validacija analitičke metode.....	24
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	25
4.1. Validacija analitičke metode.....	26

4.1.1. Granica dokazivanja i granica određivanja.....	26
4.1.2. Linearnost .....	27
4.1.3. Točnost.....	28
4.1.4. Preciznost.....	29
4.1.5. Izdržljivost .....	30
4.2. Kromatografska analiza onečišćenja .....	32
4.2.1. Kromatografska svojstva ispitivanog onečišćenja .....	32
4.2.2. Analiza uzoraka infuzijskih otopina .....	32
5. ZAKLJUČAK .....	37
6. LITERATURA .....	39
7. SAŽETAK / SUMMARY.....	43
8. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....	46
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	

# **1. UVOD**

## 1.1. Infuzijske otopine

### 1.1.1. Definicija infuzijskih otopina

Infuzije se definiraju kao izotonične sterilne vodene otopine ili emulzije čija je kontinuirana faza voda za injekcije (lat. *Aqua pro injectione*). To su pripravci za parenteralnu primjenu koje je najčešće potrebno primjenjivati u velikim volumenima pa stoga ne smiju sadržavati konzervanse. Također, infuzijske otopine su naočigled bistre i gotovo ne sadrže okom vidljive čestice (<https://pheur.edqm.eu/home>). Infuzijske otopine dijele na kristaloidne i koloidne (Graham, 1861), pri čemu su kristaloidne otopine one čije sastavnice mogu proći kroz polupropusnu membranu, a koloidne otopine sadrže veće sastavnice derivirane iz plazme ili polusintetske molekule koje ne mogu proći kroz polupropusnu membranu. Kristaloidne otopine su jeftinije te su češće u primjeni (Finfer i sur., 2018).

### 1.1.2. Povijest primjene infuzijskih otopina

Početak primjene infuzijskih otopina datira iz 1830-ih godina. U Velikoj Britaniji u to doba započinje epidemija kolere, a kao potencijalni postupci koji pomažu u liječenju prepoznati su ispuštanje krvi i povraćanje. Ti postupci dovode do gubitka tekućine iz tijela oboljelih, a ispuštanje krvi pravdalo se činjenicom da su liječnici u krvi oboljelih uočavali netipične promjene. Imajući na umu veliki gubitak tjelesnih tekućina u bolesnika te činjenicu da se manjak tekućina nije nadoknađivao, 1831. godine doktor William Brooke O'Shaughnessy uočava da u krvi umrlih nedostaje vode i alkalnih sastavnica te uviđa potrebu za nadoknadom izgubljene tekućine kako bi došlo do regulacije sastava krvi. Kao jednu tehniku postizanja spomenutog predlaže ubrizgavanje mlakih vodenih otopina izravno u vene oboljelih te tako prvi put medicinskoj javnosti obznanjuje potencijalnu vrijednost primjene infuzijskih otopina.

Godinu dana kasnije, 1832. godine, doktor Robert Lewins prvi je put zabilježio provedbu primjene infuzijske otopine. U svojim pismima opisao je kako je doktor Thomas Latta oboljelima od kolere intravenski primjenjivao solnu otopinu. Trenutni rezultati primjene infuzije bili su zadovoljavajući, no ipak nije smanjena smrtnost pacijenata jer je infuzija često bila primjenjivana pacijentima na samrti i to prerijetko, a same otopine bile hipotonične i nesterilne (Cosnett, 1989).

Unatoč ranim saznanjima o benefitima primjene infuzijskih otopina, njihova primjena nije postala dio standardne prakse sve do prve polovice 20. stoljeća. Danas je primjena infuzijskih otopina jedna od najčešće upotrebljivanih terapijskih intervencija kod akutno oboljelih pacijenata (Finfer i sur., 2018).

### 1.1.3. Ambalaža infuzijskih otopina

Unatoč tome što se kroz povijest pri razvoju farmaceutskih proizvoda najviše pažnje pridavalo samoj formulaciji, velika je važnost i ambalaže s kojom je farmaceutski oblik u neposrednom kontaktu. Za izradu ambalaže infuzijskih otopina uglavnom se koriste staklo, plastika i guma, a ispravan odabir i kakvoća materijala nužni su za nenarušavanje integriteta konačnog proizvoda (Sacha i sur., 2010). Sve do 1950-ih godina isključivo se staklo koristilo kao primarni materijal za izradu spremnika parenteralnih pripravaka, no s vremenom dolazi do potrebe za upotrebom novih materijala s obzirom da je osviještena činjenica da iz stakla i gumenih čepova kemikalije prelaze i onečišćuju parenteralne pripravke (Wesley, 2000) te da staklo nije inertan materijal (Schaut i Weeks, 2017). Stalni tehnološki napredak odražava se i u potrebi industrije da postojećim materijalima koji su u redovnoj uporabi poboljša performanse, kao primjerice staklo kojem je poboljšana kemijska stabilnost (Boltres i sur., 2016).

## 1.2. Onečišćenja iz ambalaže

### 1.2.1. Definicija onečišćenja iz ambalaže

Pri kontaktu formulacije s ambalažom, moguće je da dođe do kemijske interakcije koja rezultira prelaskom tvari koje sačinjavaju ambalažu u samu formulaciju. Spomenute tvari mogu predstavljati ugrozu sigurnosti krajnjih korisnika farmaceutskih proizvoda zbog potencijalne toksičnosti same kemikalije ili potencijala stupanja u interakcije s tvarima koje su ishodno prisutne u formulaciji (Sacha i sur., 2010). Regulatorni zahtjevi smjernica Dobre proizvođačke prakse (engl. *Good manufacturing practice*, GMP) (<https://health.ec.europa.eu>) koje izdaje Europska agencija za lijekove (engl. *European medicines agency*, EMA) nalažu kako ambalaža ne smije stupanjem u bilo kakve reakcije predstavljati ugrozu bilo kojeg aspekta kvalitete ili sigurnosti lijeka. U spomenutom dokumentu pružena je i definicija onečišćenja iz ambalaže, pri



čemu se razlikuju tvari iz ambalaže koje u formulaciju mogu prijeći u prisutnosti odgovarajućeg otapala ili pri povišenim temperaturama (engl. *extractables*) i one tvari koje prelaze u formulaciju zbog interakcije između sastavnice formulacije i ambalaže pri normalnim uvjetima (engl. *leachables*).

Jedan od materijala iz kojih onečišćenja mogu prelaziti u otopinu je guma. Već od početka 20. stoljeća obrađena guma se redovito upotrebljava u medicinskoj industriji zbog svojih posebnih svojstva poput elastičnosti, otpornosti, mogućnosti da služi kao barijera plinovima i parama te generalnoj kemijskoj kompatibilnosti. Kako bi guma imala zadovoljavajuća svojstva, ishodnom materijalu se dodaju kemikalije poput vulkanizirajućih agensa, aktivatora, plastifikatora, lubrikanata itd. pri povišenim vrijednostima temperature i tlaka. Svi ovi kemijski agensi, njihove nečistoće i produkti razgradnje potencijalno mogu prijeći u formulaciju i tako postati njena onečišćenja (Jenke i sur., 2013). Guma iz čepova može s infuzijskim otopinama stupati u interakcije na četiri različita načina, a to su adsorpcija neke sastavnice na gumu, apsorpcija sastavnice u gumu, permeacija sastavnice kroz gumu te naposljetku prelazak sastavnica iz gume u formulaciju. Primjer tvari koje prelaze iz gume u formulaciju su 2-merkaptobenzotiazol, 2-merkaptobenzimidazol, cink, aluminij, nitrozamini itd. Jedan od načina na koji se može smanjiti mogućnost prelaska tvari iz čepova u otopinu je da se dodirna površina čepa i infuzijske otopine obloži nekim od dostupnih polimera (Sacha i sur., 2010).

### 1.2.2. Identifikacija i kvantifikacija onečišćenja iz ambalaže

Identifikacija i kvantifikacija onečišćenja koja u infuzijske otopine prelaze iz ambalaže nužna je kako bi se mogla odrediti konačna sigurnost primjene farmaceutskog pripravka. Kako bi se provjerilo jesu li farmaceutski oblik i ambalaža kompatibilni, provode se kontrolirane ekstrakcijske studije na ambalaži ili migracijske studije na farmaceutskom obliku. Pritom se u uzorcima najčešće kromatografskim metodama traže onečišćenja koja se potom identificiraju i kvantificiraju. Identifikacija je nužna kako bi se pobliže mogla ustanoviti svojstva onečišćenja, a određivanje koncentracije kako bi se mogla odrediti konačna sigurnost primjene uzevši u obzir sve parametre. Ipak, u obzir treba uzeti i točnost i pouzdanost dobivenih rezultata ovisno o upotrijebljenim metodama i količinom prikupljenih podataka.

Kako bi se kemijski spoj identificirao nije dovoljno samo provesti analitička ispitivanja, potrebno je i dobivene podatke interpretirati i usporediti s već dostupnim podacima. O količini podataka i pouzdanosti upotrijebljenih analitičkih metoda ovisit će i pouzdanost rezultata identifikacije. Američka farmakopeja (engl. *United States Pharmacopeia*, USP) (2023) i Institut za istraživanje kvalitete proizvoda (engl. *Product Quality Research Institute*, PQRI) koriste četiri kategorije pouzdanosti identifikacije, pri čemu je prepoznata manjkavost podjele te stoga Jenke (2020) predlaže klasifikaciju na pet kategorija. Usporedba navedenih podjela te kriteriji za svrstavanje u pojedine kategorije vidljivi su u *Tablici 1*.

**Tablica 1.** Usporedba klasifikacija identifikacije

Kategorija	Hijerarhija identifikacije prema Jenkeu (2020)	USP <1663> (2023)
1	Neidentificiran - nedovoljno informacija za predlaganje strukture ili identiteta	Kategorija se ne koristi
2	Djelomična identifikacija - dovoljno informacija za predlaganje strukture, ali nedovoljno za potvrdu identiteta	Provizorna identifikacija - prikupljeni podaci odgovaraju svojstvima grupe spojeva
3	Provizorna identifikacija - dovoljno informacija za predlaganje identiteta	Kategorija se ne koristi
4	Identifikacija sa sigurnošću - dovoljno informacija koje potvrđuju predloženi identitet	Identifikacija sa sigurnošću - provizorna identifikacija koja je poduprta dodatnim informacijama koje isključuju sve osim najslabijih srodnih struktura
5	Potvrđen identitet - dovoljno informacija za nedvojbenu potvrdu identiteta	Potvrđen identitet - potvrda s masenim spektrom ili vremenom zadržavanja standarda

Određivanje koncentracije onečišćenja bitno je kako bi se ustanovila konačna izloženost krajnjeg korisnika. U idealnom slučaju, za svako onečišćenje bi se izrađivala kalibracijska krivulja s odgovarajućim standardom, no s obzirom na veliki broj potencijalnih onečišćenja iz ambalaže, to bi bilo nepraktično. Međunarodna organizacija za standardizaciju (engl.

*International Organisation for Standardisation, ISO*) je u dokumentu ISO 10993-18:2020 ([www.iso.org](http://www.iso.org)) iznijela kategorizaciju kvantifikacije na 3 stupnja, a to su procijenjena kvantitativna koncentracija, semikvantitativna analiza i kvantitativna analiza. Ukoliko se koncentracija analita dobije na osnovu podataka analize nekog zamjenskog analita bez da se u obzir uzme razlika u analitičkim odgovorima među analitima, radi se o procijenjenoj koncentraciji. Ako se pak uzme u obzir razlika u analitičkim odgovorima između traženog i zamjenskog analita, riječ je o semikvantitativnoj analizi. Kvantitativna analiza podrazumijeva određivanje koncentracije uz pomoć kalibracijske krivulje i referentnog standarda.

### 1.2.3. Sigurnost primjene farmaceutskih pripravaka zbog onečišćenja iz ambalaže

Zbog potvrde o sigurnosti primjene krajnjeg proizvoda, potrebna je toksikološka evaluacija onečišćenja koja u formulaciju dopijevaju iz ambalaže. Opseg ispitivanja ovisi o putu i dugotrajnosti primjene te formulaciji pripravka (Broschard i sur., 2016). U svrhu objedinjenja dostupnih informacija i promicanja budućih istraživanja, 2007. godine osnovana je udruga ELSIE (engl. *The Extractables and Leachables Safety Information Exchange Consortium*). Cilj udruge je promicati razvoj djelotvornih, ali ujedno i sigurnih proizvoda za čije je vrijeme proizvodnje i skladištenja vođena briga i o onečišćenjima iz ambalaže. Za vrijeme prvih godina djelovanja udruge, članovi su nastojali razviti protokole koji bi mogli biti primjenjivi za veliki broj pripravaka uzimajući u obzir najčešće korištene materijale u izradi ambalaže farmaceutskih pripravaka. To je rezultiralo nastankom baze koja sadržava podatke o sigurnosti više od 500 spojeva. Sadržani podaci uključuju informacije o kemijskim svojstvima, akutnoj i kroničnoj toksičnosti, mutagenosti i karcinogenosti, reproduktivnoj toksičnosti te apsorpciji, distribuciji, metabolizmu i eliminaciji spoja. U drugom kvartalu 2023. godine planira se objavljivanje proširene baze podataka koja će, uz podatke o toksikološkoj sigurnosti spoja, sadržavati i podatke o izvornim materijalima, ambalaži farmaceutskih proizvoda i medicinskim proizvodima. Proširena baza bit će nadopunjena i podacima iz vanjskih studija ([www.elsiedata.org](http://www.elsiedata.org)).

Metodologija procjene sigurnosti koju podupiru Broschard i suradnici (2016) predložena je od strane Instituta za istraživanje kvalitete proizvoda u njihovim smjernica (<https://pqri.org>) a to je da se nakon karakterizacijskih studija onečišćenja kreira lista svih prisutnih onečišćenja, a ona koja su u uzorku prisutna u koncentraciji većoj od ugovorene

dozvoljene trebaju dobiti potvrdu identiteta te biti prijavljena toksikologu koji potom vrši dodatna istraživanja za proizvod. Prag se može odrediti na osnovu niza parametara kao što su dobna skupina pacijenata, put primjene, trajanje primjene, farmaceutski oblik pripravka itd. U svrhu toksikološke procjene, mjerene koncentracije onečišćenja preračunavaju se u vrijednosti dnevne izloženosti te se na temelju toga i toksikološkog profila kemijskog spoja procjenjuje rizik primjene. Koncepti koje je razvio PQRI odnosili su se na isključivo na oralne inhalacijske i nazalne lijekove, ali nema razloga zbog kojih se ti koncepti ne bi mogli ekstrapolirati i na analize ostalih farmaceutskih proizvoda s visokim rizikom stupanja u interakcije između formulacije i ambalaže, odnosno parenteralnih pripravaka i oftalmika (Paskiet i sur., 2013). Međutim, imajući na umu nedostatak regulative oko ove vrste onečišćenja, često se događa da za određeno onečišćenje manjka podataka o toksikološkom i sigurnosnom profilu. U tim slučajevima potrebno je provesti dodatne studije ili procijeniti potencijalnu toksičnost alternativnim metodama, npr. in silico strukturalnom usporedbom s postojećim spojevima u bazi (Broschard i sur., 2016).

Kromatografske analize su najčešće korištene metode za ispitivanje onečišćenja te se razlikuju dvije vrste kromatografskih ispitivanja organskih uzoraka, a to su ciljna i *screening* ispitivanja. Ciljna ispitivanja podrazumijevaju da se uzorak ispituje na prisutnost točno određenog onečišćenja s ciljem određivanja koncentracije, dok se *screening* ispitivanja koriste kako bi se pribavilo što više informacija o prisutnim onečišćenjima koja se naknadno moraju identificirati i kvantificirati. Analitičkim metodama akumuliraju se podaci o analitima, a krajnji zaključci rezultat su interpretacije dobivenih rezultata. Sukladno s tim, greške u identifikaciji ili kvantifikaciji određenog analita mogu biti rezultat pogreške u metodi, pogreške pri interpretaciji rezultata ili kombinacija navedenih čimbenika. S obzirom na ogroman potencijal različitosti onečišćenja, nemoguće je razviti jednu *screening* metodu odnosno primijeniti jednu tehniku koja bi obuhvatila sve vrste onečišćenja koji potječu iz ambalaže. U studijama se stoga primjenjuje niz komplementarnih, preklapajućih i samostalnih tehnika. Nijedna tehnika nije sveobuhvatna pa pri analizama može doći do toga da se prisutnost nekog analita jednostavno previdi. To se može dogoditi ako određeno onečišćenje ne daje analitički odgovor primijenjenom tehnikom ili ako odgovor nije prepoznat zbog odgovora drugih tvari prisutnih u ispitivanom matriksu. Razvijanje baze podataka za relevantna onečišćenja može smanjiti učestalost pogreški vezanih uz previde, identifikaciju i kvantifikaciju te pomoći pri optimizaciji parametara analitičkih tehnika kako bi odgovorile zahtjevima i potrebama određene analize. Takve baze podataka trebale bi sadržavati osnovne informacije o onečišćenju, njegov maseni

spektar, podatke o vremenu zadržavanja na određenoj koloni te faktore odgovora, a bilo bi poželjno da sadrže i podatke o kemijskim svojstvima, izvoru i upotrebi analita te informacije nužne za procjenu sigurnosti (Christiaens i sur., 2020).

#### 1.2.4. Regulatorna vezana uz onečišćenja iz ambalaže

U brojnim ISO standardima i smjernicama objavljenim od strane Europske agencije za lijekove i Američke Agencije za hranu i lijekove (engl. *U.S. Food and Drug Administration, FDA*) spominju se onečišćenja koja potječu iz ambalaže, no niti jedan dokument u potpunosti ne obuhvaća problematiku spomenute vrste onečišćenja (Broschard i sur., 2016).

Zbog potrebe za harmonizacijom zahtjeva regulatornih tijela i farmaceutske industrije među državama diljem svijeta, 1990. godine osnovano je Međunarodno vijeće za harmonizaciju (engl. *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH*). Kroz mnoštvo objavljenih dokumenata spomenuto regularno tijelo nastoji ujednačiti zahtjeve država koje prednjače u razvoju farmaceutika, tj. država Europske unije, Sjedinjenih Američkih Država i Japana kako bi se, između ostalog, olakšala i registracija lijekova u različitim državama zbog uniformnih zahtjeva o potrebnim testiranjima prije stavljanja lijeka na tržište (Ohno, 2002).

Međunarodno vijeće za harmonizaciju do sada je izdalo niz smjernica koje se odnose na onečišćenja. ICH Q3A smjernice referiraju se na onečišćenja u novim ljekovitim tvarima ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)), ICH Q3B na onečišćenja u novim ljekovitim proizvodima ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)), ICH Q3C na ostatna otapala ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)), ICH Q3D na elementarna onečišćenja ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)) te ICH M7 na mutagena onečišćenja ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)). Kroz godine prepoznata je potreba za razvojem novih smjernica čija će tema biti upravo onečišćenja koja potječu iz ambalaže (engl. *extractables* i *leachables*). U lipnju 2019. godine potvrđeno je kako će Međunarodno vijeće za harmonizaciju početi raditi na objavljivanju smjernica na spomenutu temu, a u srpnju 2020. godine potvrđen je konačan koncept i poslovni plan razvoja ICH Q3E smjernica (<https://database.ich.org>). Nedostatak smjernica za procjenu i kontrolu onečišćenja iz ambalaže prepoznat je kao globalni problem koji se odražava na farmaceutsku industriju i regulatorna tijela koja nemaju ujednačene i prethodno postavljene kriterije. Krajnja posljedica je potencijalna odgoda registracije lijeka u određenoj državi te manjak dostupnosti lijeka pacijentima. Razvojem i implementacijom ovih

smjernica želi se adresirati nepostojanje konsenzusa u već postojećim smjernicama te farmakopejama. Također, cilj je odrediti pragove za prijavljivanje i identificiranje takve vrste onečišćenja uzimajući u obzir put primjene i indikaciju lijeka te izloženost pacijenta onečišćenju. Smjernice će se referirati i na generalnu procjenu sigurnosti te eventualnim potrebama za dodatnim studijama. Imajući na umu već postojeće ICH smjernice vezane uz onečišćenja, jedan od ciljeva je i napraviti da ICH Q3E smjernicu budu komplementarne postojećima. Smjernice će obuhvaćati kemijske, biološke i biotehnoške proizvode uključujući kombinacije lijeka i uređaja, no neće se odnositi isključivo na medicinske uređaje. Prema sadašnjem planu, ICH Q3E smjernice trebale bi postati važeće u svibnju 2025. godine.

Također, ICH smjernice već se u postojećim dokumentima referiraju se i na potrebu praćenja tvari koje iz ambalaže mogu prijeći u formulaciju, posebno ističući važnost kontrole u parenteralnim pripravcima. Pritom je u smjernicama ICH Q6A, Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)) specificirano da ukoliko se nakon kontinuirano provedenih analiza ustanovi da tvari koje u formulaciju prelaze iz ambalaže ne prelaze koncentraciju koja bi ih činila nesigurnima, nije potrebno i dalje provoditi iste analize. Pri svakoj promjeni neke sastavnice ambalaže ili formulacije potrebno je reevaluirati situaciju.

### **1.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti**

#### **1.3.1. Karakteristike metode**

Kromatografske tehnike spadaju u najčešće korištene analitičke tehnike u farmaceutskim analizama, a temelje se na razdjeli analita između mobilne i stacionarne faze. U slučaju tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC), mobilna faza je tekućina koja se pod tlakom pumpa u kolonu koja sadrži čestice stacionarne faze promjera 3-10  $\mu\text{m}$ . Ovisno o kemijskim svojstvima, različiti analiti stupaju u različite interakcije s mobilnom i stacionarnom fazom, a posljedica toga je različita duljina zadržavanja analita u koloni. Ovisno o polarnosti stacionarne i mobilne faze razlikuju se dva tipa razdjelnih HPLC kromatografija, a to su normalna fazna i obrnuta (reverzna) fazna. Normalna fazna kromatografija podrazumijeva da su čestice stacionarne faze polarne te njihove polarne strukturne komponente stupaju u međumolekulske interakcije s polarnim sastavnicama uzorka, a mobilna faza je nepolarna. Najčešće upotrjebljavana

stacionarna faza za normalnu faznu kromatografiju je silika gel. Suprotno navedenom, za obrnutu faznu kromatografiju potrebni su nepolarna stacionarna faza i polarna mobilna faza, a kao stacionarna faza najčešće se koriste kemijski modificirane inačice silika gela poput oktadecilnih lanaca vezanih za silanolne skupine silika gela. Takva stacionarna faza dobiva se reakcijom silanizacije pri čemu se oktadecil silan veže na slobodne hidroksilne skupine silika gela te tako stacionarnu fazu čini hidrofobnom. Uz prethodno navedene stacionarne faze koje su najčešće u uporabi, koriste se i razne druge vrste među kojima su razne inačice silikagela i organski polimeri koji se najčešće koriste s mobilnim fazama na bazi vode. Prednosti organskih polimera su stabilnost u velikom pH rasponu, a nedostatak su cijena i generalna nekompatibilnost s lipofilnim mobilnim fazama.

HPLC metoda ima brojnih prednosti koje ju čine jednom od najčešće korištenih analitičkih tehnika. Prvenstveno, to je mogućnost analize brojnih vrsta analita poput nehlapljivih i termolabilnih tvari, polarnih i nepolarnih analita kao i molekula male ali i velike mase. Također, ova metoda je precizna i automatizirana te se u usporedbi s drugim metodama najintenzivnije razvija zbog novih potreba u analitici raznovrsnih uzoraka. Metodu je moguće prilagoditi i modificirati za razne analite zbog dostupnosti brojnih detektora i kolona te ju time učiniti selektivnom. S druge strane, nedostaci HPLC metode su činjenica da je nužna obrada uzorka prije analize farmaceutskih oblika kako bi se djelatne tvari ekstrahirale iz matriksa. Također, postoji manjak cjenovno pristupačnih detektora za analizu analita koji ne sadrže kromofore. Naposljetku, zbog potrošnje velike količine organskih otapala, ova metoda nije u potpunosti ekološki prihvatljiva (Watson, 1999).

### 1.3.2. Dijelovi uređaja

Osnovni dijelovi kromatografa prikazani su na *Slici 1*. Ukoliko su komponente odvojene, radi se o modularnom sustavu koji je često dizajniran tako da se dijelovi mogu slagati jedan na drugoga kao što je prikazano na slici lijevo. Druga vrsta je integrirani sustav koji podrazumijeva da su svi elementi kromatografa sadržani u jednom pretincu.

Prvi korak HPLC metode uključuje crpljenje mobilne faze iz spremnika u pumpu. Spremnici mobilne faze najčešće su načinjeni od stakla, osim ako analiza ne zahtjeva drugačije uvjete. Spremnici su najčešće stakleno laboratorijsko posuđe ili staklene boce. Mobilna faza ne smije sadržavati onečišćenja pa je stoga potrebno provesti i filtraciju mobilne faze prije

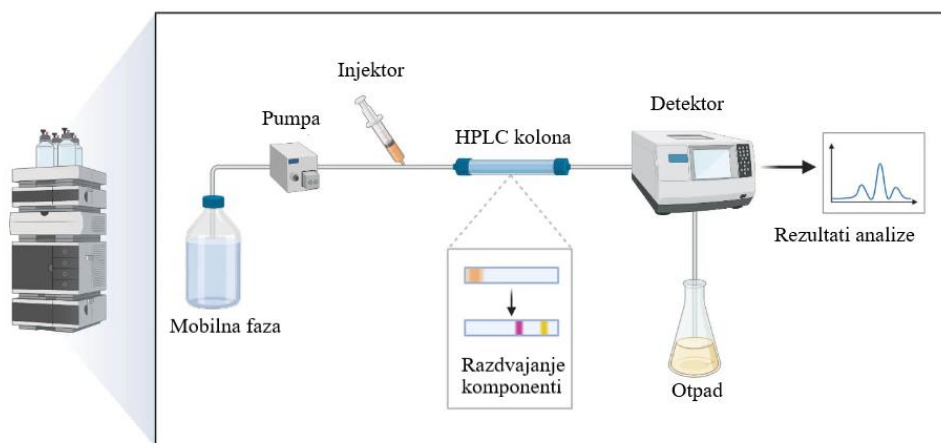
punjenja u spremnik ukoliko nije prethodno filtrirana na kraju proizvodnog procesa. Komercijalno dostupne HPLC mobilne faze su preferirane te su filtrirane kroz submikronske filtere čija veličina pora najčešće iznosi 0,2  $\mu\text{m}$ . Također, mobilna faza ne bi smjela sadržavati mjehuriće zraka jer oni interferiraju sa sustavom uzrokujući potencijalne nedosljednosti u radu pumpe ili analitičkim odgovorima detektora. Mjehurići se iz mobilne faze mogu ukloniti postupkom otplinjavanja (engl. *degassing*). Preporučljivo je otplinjavati mobilne faze jer su često zasićene zrakom pa mogu otpuštati plinove već pri malim promjenama tlaka. Otplinjavanje se najčešće postiže unošenjem helija u mobilnu fazu ili uporabom vakuuma. Kako bi se mobilna faza i uzorak mogli prenositi kroz cijelu aparaturu, potrebne su i prikladne kapilare i prijanjajući dijelovi aparature. Pravilan izbor je nužan kako bi se izbjeglo proširenje volumena kolone i posljedično potencijalno ugrožavanje procesa separacije. Razlikuju se dijelovi prikladni za vrijednosti tlaka manje od otprilike 7 bara te oni prikladni za korištenje i pri većim vrijednostima tlaka od 7 bara.

Nadalje, pumpa je sastavni dio kromatograma koji omogućava da mobilna faza i uzorak prođu kroz kolonu. Većina komercijalno dostupnih HPLC pumpi prilagođena je za rad pri vrijednostima tlaka do 400 bara, ali za potrebe rutinskih svakodnevnih analiza najčešće su potrebne vrijednosti tlaka u rasponu 150 - 200 bara. Varijacije recipročnih klipnih pumpi (engl. *reciprocating piston pump*) su najčešće u upotrebi kao dijelovi HPLC sustava. Spomenute pumpe rade na principu da se zbog rotacije pumpinog motora klip učestalo pomiče naprijed i nazad u glavi pumpe što omogućuje prvotno punjenje praznog prostora glave pumpe mobilnom fazom, a potom pražnjenje istog. Ulazni i izlazni povratni ventili reguliraju protok mobilne faze, a od polimera načinjena brtva pumpe onemogućuje curenje mobilne faze iz glave pumpe. Idući korak u analizi je injektiranje određene količine uzorka za analizu u mobilnu fazu koja je pod tlakom nakon izlaska iz pumpe. Kod starijih varijanta instrumenta uzorci su se injektirali ručno, no zbog velike količine uzorka u analitičkim laboratorijima te potrebne preciznosti kako se ne bi ugrozili rezultati analize, razvijeni su sustavi za automatsko uzorkovanje (engl. *autosamplers*) koji olakšavaju rad analitičara te osiguravaju i preciznost postupka. Svaki uzorak se stavlja u zasebnu vijalu i smješta na pločicu za uzorke. Vijale su najčešće staklene, a zatvorene su čepom i prevlakom najčešće načinjenih od silikonske gume ili teflonskog filma. Uzorak je moguće izvaditi na više načina, a to je da je igla za uzorkovanje pokretna i sama dolazi do željene vijale, da se uzorci nalaze na rotacijskoj podlozi koja dovodi željenu vijalu do igle te da je sustav podešen da donese željenu vijalu do igle. Također, važno je vrijeme koje je autosampleru potrebno da izvrši ciklus uzimanja uzorka, injektiranja u kolonu i pripreme za



iduće uzorkovanje. Smatra se prihvatljivo ukoliko je taj ciklus kraći od 5 % vremena koje je uzorku potrebno da eluira iz kolone. Uzorak potom ulazi u kolonu gdje se njegove sastavnice razdjeljuju između stacionarne i mobilne faze ovisno o svojim kemijskim svojstvima. S obzirom na to koliko temperatura kolone utječe na razdvajanje analita u koloni i na generalnu selektivnost metode, preporučljivo je da svaka kolona ima sustav za zagrijavanje, a najčešće korišteni sustavi su blok grijači koji pružaju koloni izravan izvor topline, zračne kupelji i Peltier grijači koji željenu temperaturu postižu uz pomoć predgrijača, odnosno kapilarnih cjevčica koje su ugrađene u aluminijske grijače. Pri izlasku analita iz kolone detektor bilježi određeni analitički odgovor, a potom se svi podaci obrađuju.

S obzirom na napredak tehnologije, prikupljanje podataka analize i upravljanje parametrima analize objedinjeni su, tako da uređaj i softver obavljaju sve zadatke uniformno. Kromatografski sustavi stoga mogu obavljati mnogo zadataka kao što je primjerice pomoć pri razvijanju prikladne metode za analizu određenog pripravka uporabom računalnih simulacija. Takvim pristupom štede se i vrijeme i kemikalije, a povećava se efikasnost. Potom, kroz njih je moguće upravljati čitavim sustavom u vidu promjene bilo kojeg parametra analize, a postavke određene metode mogu se spremirati za daljnju upotrebu. Jedna od najvažnijih uloga kromatografskih sustava je prikupljanje i obrada informacija, što podrazumijeva prikupljanje svih podataka o parametrima analize i konverziju svakog analognog i digitalnog signala detektora u prikaz iz kojeg analitičari mogu iščitati potrebne informacije. Nadalje, ovakvi sustavi podataka često su u mogućnosti samostalno generirati izvještaje bez upotrebe vanjskih programskih paketa. Također, sustavi su najčešće isprogramirani tako da pohranjuju podatke koje zahtijevaju regulatorne agencije, što smanjuje posao analitičara (Snyder i sur., 2010).



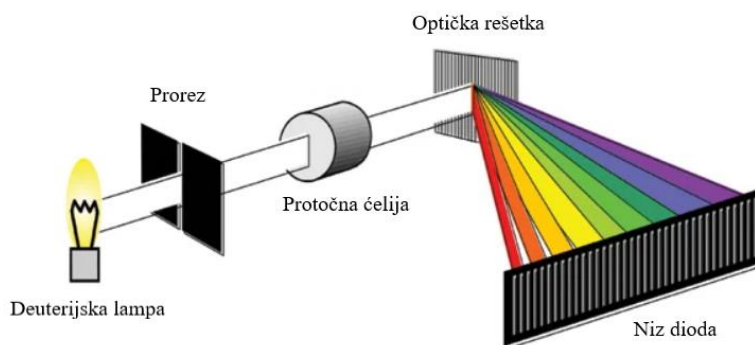
**Slika 1.** Dijelovi HPLC uređaja (prilagođeno i preuzeto iz <https://www.chromatographyonline.com>)

### 1.3.3. Detektori

Kao što je već prikazano, detektor je sastavni dio kromatograma. Neki od detektora koji se redovito koriste u HPLC analizama su elektrokemijski detektor (ECD), fluorescencijski detektor, ELSD detektor (engl. *Evaporating light scattering detector*), maseni detektor te naposljetku detektor korišten u analizi opisanoj u ovom radu, detektor s nizom dioda (engl. *Diode array detektor*, DAD) koji je također poznat pod nazivom detektor s nizom fotodioda (engl. *Photodiode array detektor*, PDA). Kako bi se taj detektor mogao koristiti u analizi, ispitivane tvari moraju sadržavati kromofor, odnosno strukturnu sastavnicu koja im omogućuje apsorpciju UV-Vis zračenja (Watson, 1999).

Princip rada detektora je mjerenje određenog svojstva ispitivane eluirajuće tvari iz kojeg se naposljetku može računanjem doći do vrijednosti koncentracije ili mase analita u uzorku. Za razliku od UV-Vis detektora koji mjeri vrijednost apsorbancije na samo jednoj prethodno izabranoj valnoj duljini, detektor s nizom dioda istovremeno pokriva čitavo UV područje. Pritom se po završetku analize dobiva cijeli UV spektar svakog pika u kromatogramu što olakšava identifikaciju pikova. *Slika 2.* prikazuje način rada DAD detektora pri čemu čitav spektar deuterijske lampe prolazi kroz optički prorez i kroz protočnu ćeliju. Nakon izlaska iz protočne ćelije, svjetlost se dispergira na optičkoj rešetki te potom pada na niz dioda koje mjere intenzitet svjetlosti na svakoj valnoj duljini (Dong, 2006). Signal od svake pojedinačne diode se obrađuje te se na osnovu tih podataka generira spektar. Detektor se također može podesiti tako da prikuplja podatke o apsorbanciji za jednu ili više pojedinačnih valnih duljina ili da prikuplja čitave spektre (Snyder i sur., 2010). Većina DAD detektora sadrži niz koji se sastoji od 512 - 1024 dioda koje omogućavaju spektralnu rezoluciju od otprilike 1 nm. Uz osnovne kromatografske i spektralne podatke o ispitivanim uzorcima koje je moguće dobiti nakon završetka analiza, DAD detektor pruža i informacije iz kojih je programskom obradom moguće dobiti 3D spektralne prikaze, podatke o vrijednosti valne duljine apsorpcijskog maksimuma određene komponente te informacije o čistoći pikova. S obzirom da detektor prikuplja podatke o čitavom spektru za više točaka kroz cijelu širinu pika, moguće je procijeniti čistoću pika ovisno o usporedbi apsorpcijskih spektara pika na vrhu, gdje je najmanja šansa interferencije onečišćenja, te na ulaznoj i silaznoj putanji pika u blizini baze. Ukoliko su spektri jednaki u različitim točkama pika, radi se o čistom piku. Također, ponekad se na kromatografu ne može jasno ustanoviti pridonosi li nekom kromatografskom piku samo jedna komponenta ili je taj pik rezultat eluacije više tvari u kratkom vremenskom periodu. U tom slučaju, promatrajući spektre

dobivene na različitim vremenima moguće je ustanoviti je li pik sastavljen od više komponenti koje različite valne duljine apsorbiraju različitim intenzitetom. Razvoj ovih detektora ide u smjeru daljnjeg povećanja osjetljivosti uporabom optičkih vlakana u dizajnu protočnih ćelija pri čemu se produžava optički put bez povećanja šuma i kromatografske disperzije. Oblaganjem optičkih vlakana reflektivnim polimerima moguće je razviti vrlo male optičke ćelije s dugačkim optičkim putevima i izvrsnim disperzivnim karakteristikama. Također, povećana osjetljivost detektora može se postići proširenjem optičkog proreza, dok se sužavanjem postiže povećana spektralna rezolucija (Dong, 2006).



**Slika 2.** Princip rada detektora s nizom dioda (preuzeto i prilagođeno iz Dong, 2019)

## 1.4. Validacija analitičke metode

### 1.4.1. Važnost validacije analitičke metode

Validacija analitičkih postupaka postala je neizostavni dio razvoja analitičkih metoda, a služi tome kako bi se odredilo i dokumentiralo je li pojedina analitička metoda prikladna za određenu primjenu (Snyder i sur., 2010). Njena važnost ustanovila se već 1987. godine, kada je Američka Agencija za hranu i lijekove iznijela definiciju validacije. Izvorno se provodila samo u kontekstu regulacije proizvodnih procesa, no uskoro se pojam širi te dolazi do potrebe za validacijom analitičkih metoda korištenih za testiranje farmaceutskih proizvoda (Ermer i Nethercote, 2015). S vremenom su postupci validacije analitičkih postupaka postali obaveza, kao što nalažu regulatorni zahtjevi Dobre proizvođačke prakse. U GMP aneksu 15 (<https://health.ec.europa.eu>) koji se bavi temama kvalifikacije i validacije jasno je navedeno da je validaciju analitičkih postupaka potrebno provoditi za sve farmaceutske oblike i to i pri prvotnom razvoju metode i pri promjeni bilo kojeg parametra prethodno validirane metode.

Također, s obzirom na potrebu usklađivanja zahtjeva i definicija i u ovom području, Međunarodno vijeće za harmonizaciju izdalo je smjernice ICH Q2(R1) (<https://database.ich.org>) koje detaljnije opisuju parametre i metodologiju validacije analitičkih postupaka te predlažu kako se izvode i interpretiraju ispitivanja. Također, objavljen je nacrt nove verzije prethodno spomenutih smjernica ICH Q2(R2) ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)) jer je potrebno uskladiti sadržaj sa smjernicama ICH Q14 ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)) koje se referiraju na razvoj analitičkih postupaka, a u novu verziju će biti uključene i novosti u primjeni analitičkih postupaka. Parametri koji su u ICH smjernicama definirani kao sastavni dio validacije analitičke metode su točnost, preciznost, specifičnost, granica dokazivanja, granica određivanja, linearnost, koncentracijsko područje i izdržljivost.

#### 1.4.2. Parametri za validaciju analitičke metode

Točnost (engl. *accuracy*) predstavlja podudaranje prihvaćenih referentnih vrijednosti za ispitivani uzorak i rezultata dobivenih analizom. Izražava se kao analitički prinos (engl. *recovery*), odnosno omjer mjerene vrijednosti u uzorku i referentne vrijednosti. Točnost je potrebno određivati u više točaka u rasponu koncentracijskog područja metode, a smjernice predlažu da bi minimalan broj uzoraka trebao biti devet, što podrazumijeva po tri mjerenja za tri vrijednosti koncentracije unutar područja metode.

Preciznost (engl. *precision*) ukazuje na stupanj poklapanja rezultata analize nakon opetovanih mjerenja iz istog homogenog uzorka pri nepromijenjenim uvjetima, a najčešće se izražava kao relativna standardna devijacija (engl. *Relative standard deviation*, RSD, %). Preciznost analitičke metode iskazuje se kao ponovljivost (engl. *repeatability*), srednja preciznost (engl. *intermediate precision*) i obnovljivost (engl. *reproducibility*). Ponovljivost podrazumijeva sposobnost metode da generira iste rezultate analize na istom uzorku u kratkom vremenskom intervalu pri identičnim uvjetima provođenja. Uzorci za ispitivanje ponovljivosti trebali bi biti iz čitavog koncentracijskog područja (primjerice triplikati uzoraka za tri vrijednosti koncentracije), no procjena se može napraviti i iz analize šest uzoraka iste koncentracije. Srednja preciznost odnosi se na sposobnost metode da generira iste rezultate analize na istom uzorku, ali pod različitim uvjetima u laboratoriju poput promjene analitičara, instrumenta ili dana analize. Obnovljivost pak podrazumijeva mogućnost dobivanja istih rezultata na istim uzorcima koristeći iste metode, ali u različitim laboratorijima. S obzirom na učestalost suradnje među različitim laboratorijima, vrlo je bitno ustanoviti mogu li se rezultati analize replicirati i

u drugim laboratorijima. Uz pojam preciznosti vezuje se i pojam otpornosti (engl. *ruggedness*) koji je definiran u Američkoj farmakopeji, a ne koristi se u ICH smjernicama. Taj pojam odnosi se na mogućnost ponovljivosti rezultata uz promjenu raznih vanjskih faktora metoda koji učestalo variraju od laboratorija do laboratorija i od analitičara do analitičara.

Specifičnost (engl. *specificity*) je sposobnost metode da nedvojbeno razlikuje određeni analit u prisutnosti drugih komponenti uzorka pri čemu se u obzir uzimaju potencijalne interferencije od strane drugih aktivnih i pomoćnih tvari, onečišćenja, razgradnih produkata itd.

Granica dokazivanja (engl. *limit of detection*, LOD) predstavlja najnižu koncentraciju analita u uzroku koja se određenom metodom može detektirati, ali ne i kvantificirati, a granica određivanja (engl. *limit of quantification*, LOQ) je vrijednost najniže koncentracije analita koja se u uzorku može kvantificirati s prihvatljivom razinom preciznosti i točnosti. Spomenute vrijednosti mogu se odrediti na 3 načina. Prvi način je određivanje oba limita pomoću omjera signala i šuma, pri čemu se uspoređuju signali uzoraka koji sadrže analit u poznatoj niskoj koncentraciji i signali slijepe probe. Prihvatljivi omjer signala i šuma za određivanje granice dokazivanja je 3:1, a za određivanje granice određivanja je 10:1. Slijedeći način na koji je moguće izračunati LOD [1] i LOQ [2] je preko navedenih izraza,

$$LOD = \frac{3,3\sigma}{a} \quad [1] \qquad LOQ = \frac{10\sigma}{a} \quad [2]$$

pri čemu  $\sigma$  predstavlja standardnu devijaciju signala, a  $a$  predstavlja nagib kalibracijskog pravca. Ukoliko metoda zahtjeva točno određenu vrijednost preciznosti, odnosno relativne standardne devijacije, iz grafa ovisnosti preciznosti izražene pomoću RSD o koncentraciji moguće je odrediti LOQ na način da se za traženu vrijednost relativne standardne devijacije na osi y pridružuje vrijednost koncentracije na osi x koja je u konačnici predstavlja vrijednost LOQ.

Linearnost (engl. *linearity*) je iskazana kao sposobnost metode da u uzorcima u određenom koncentracijskom intervalu producira analitičke odgovore koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita te se najčešće iskazuje kao neka varijacija nagiba regresijskog pravca poput koeficijenta korelacije ( $r$ ).

Koncentracijsko područje (engl. *range*) podrazumijeva raspon između donje i gornje koncentracije analita koju je moguće odrediti s prihvatljivom preciznošću, točnošću i linearnošću. Smjernice nalažu kako bi se za određivanje linearnosti i koncentracijskog područja trebalo provoditi s uzorcima na najmanje pet koncentracija.

Izdržljivost (engl. *robustness*) je definirana kao sposobnost metode da producira prihvatljive rezultate čak i kada su neki eksperimentalni uvjeti modificirani. Namjernom malom promjenom određenih parametara analize dolazi se do informacija o tome koliko takva promjena utječe na rezultate analize te se na temelju toga donose zaključci o pouzdanosti metode u svrhu svakodnevnog korištenja (Snyder i sur., 2010).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Infuzijske otopine pripadaju u skupinu farmaceutskih proizvoda s visokim rizikom stupanja u interakcije između formulacije i ambalaže. Spomenute interakcije mogu rezultirati prelaskom tvari iz ambalaže u formulaciju te onečišćavanjem iste. Onečišćenja koja potječu iz ambalaže mogu predstavljati ugrozu sigurnosti krajnjeg korisnika, pogotovo kada se uzme u obzir parenteralni put primjene infuzijskih otopina. Ovaj rad izrađen je s ciljem razvoja i validacije analitičke metode za kvantifikaciju onečišćenja koje u infuzijske otopine prelazi iz gumenih čepova, pri čemu je analizirano 37 uzoraka HPLC-DAD metodom.



### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije

- Standard onečišćenja (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Sjedinjene Američke Države)
- Metanol, 99,9 % čistoće (Honeywell, Charlotte, NC, Sjedinjene Američke Države)
- Mravlja kiselina, 97,5 - 98,5 % čistoće (Supelco, Inc, St. Louis, MO, Sjedinjene Američke Države)
- Natrijev hidroksid, 0,1 M(Supelco, Inc, St. Louis, MO, Sjedinjene Američke Države)
- Ultra-čista voda pročišćena s uređajem WaterPro (Labconco, Kansas City, MI, Sjedinjene Američke Države)

#### 3.1.2. Uzorci

U svrhu izrade ovog rada analizirano je 37 uzoraka infuzijskih otopina.

#### 3.1.3. Pribor

- Laboratorijsko posuđe za pripremu standardnih otopina, klasa A (odmjerne tikvice od 50 mL i 100 mL) (DEM, Kastav, Hrvatska)
- Tamne vijale (Agilent Technology, Santa Clara, CA, Sjedinjene Američke Države)
- Automatske pipete (100 µl-5 mL), (Ranin instrument LLC, Oakland, CA, Sjedinjene Američke Države)
- Kolona za HPLC, XBridge C18, veličina čestica 2,5 µm, duljina kolone 3,0 mm x 50 mm (Waters Corporation, Milford, MA, Sjedinjene Američke Države)

#### 3.1.4. Radni instrumenti

- Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti Agilent 1260 Infinity (Agilent Technology, Santa Clara, CA, Sjedinjene Američke Države)
  - Otplinjavač 1260 HiP Degasser, G4225A (Agilent Technology, Santa Clara, CA, Sjedinjene Američke Države)
  - Binarna pumpa 1260 Bin Pump, G1312B (Agilent Technology, Santa Clara, CA, Sjedinjene Američke Države)

- Autosampler 1260 HiP ALS, G1367E (Agilent Technology, Santa Clara, CA, Sjedinjene Američke Države)
- Termostat 1290 Thermostat, G13330B (Agilent Technology, Santa Clara, CA, Sjedinjene Američke Države)
- Termostatirani odjeljak kolone 1290 TCC, G1316C (Agilent Technology, Santa Clara, CA, Sjedinjene Američke Države)
- 1260 Infinity II Diode Array Detector WR, G7115A (Agilent Technology, Santa Clara, CA, Sjedinjene Američke Države)
- Analitička vaga AG245 (Mettler Toledo, Columbus, OH, Sjedinjene Američke Države)
- Sustav za pročišćavanje vode WaterPro (Labconco, Kansas City, MI, Sjedinjene Američke Države)
- Ultrazvučna kupelj Elmasonic XtraTT (Elma Schmidbauer, Singen, Njemačka)

### 3.1.5. Programski alati

- OpenLab ChemStation (Agilent Technology, Santa Clara, CA, Sjedinjene Američke Države)
- Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft, Seattle, WA, Sjedinjene Američke Države)

## 3.2. HPLC-DAD metoda

### 3.2.1. Priprema matične otopine

Za pripremu matične otopine potrebno je na analitičkoj vagi izvagati 10 mg standarda onečišćenja te potom odvagu prenijeti u odmjernu tikvicu od 500,0 mL. Kako bi se analit otopio, potrebno je u tikvicu dodati otprilike 200 mL pročišćene vode, 5,0 mL 0,1 M natrijevog hidroksida te otopinu sonicirati uz zagrijavanje na ultrazvučnoj kupelji. Kada se analit u potpunosti otopi, potrebno je nadopuniti otopinu u odmjernoj tikvici do ukupnog volumena od 500 mL. Koncentracija standarda onečišćenja u tako pripremljenoj otopini iznosi 20 µg/mL. S obzirom da je u provedbi analitičke tehnike vagano 9,987 mg standarda onečišćenja, korigirana vrijednost koncentracije onečišćenja u matičnoj otopini iznosi 19,97 µg/mL.

### 3.2.2. Priprema uzoraka

Analizirano je 37 uzoraka infuzijskih otopina te nije potrebna nikakva daljnja obrada uzoraka. Izravno iz izvorne ambalaže pipetira se 1,0 mL uzorka i prenosi u vijale koje potom odlaze u kromatograf na analizu. Svi uzorci prolaze *screening* kojim se determinira sadrže li pojedini uzorci analizirano onečišćenje čije je vrijeme zadržavanja otprilike 3 minute.

### 3.2.3. Priprema otopina za određivanje parametara validacije

Otopine za izradu kalibracijske krivulje u svrhu određivanja linearnosti metode kreću se u rasponu koncentracije 3,99 - 19,97 ng/mL. Za pripravu takvog koncentracijskog niza prvo je potrebno razrijediti matičnu otopinu 100 puta na način da se 1,0 mL matične otopine prenese u odmjernu tikvicu od 100,0 mL te nadopuni pročišćenom vodom. Koncentracija standarda onečišćenja u razrijeđenoj otopini je 199,7 ng/mL. Otopine za izradu koncentracijske krivulje pripremaju se pipetiranjem volumena razrijeđene otopine navedenih u *Tablici 2.* u odmjerne tikvice od 50,0 mL te nadopunjavanjem tikvica pročišćenom vodom.

**Tablica 2.** Volumeni razrijeđene otopine potrebni za pripravu otopina željene koncentracije

Broj radne otopine	Volumen razrijeđene otopine / mL	Koncentracija / ng/mL
1.	1	3,99
2.	2	7,99
3.	3	11,98
4.	4	15,98
5.	5	19,97

Za ispitivanje točnosti korištene su radne otopine broj 1, 3 i 5, dok je za ispitivanje preciznosti prvog i drugog dana te izdržljivosti metode korištena isključivo radna otopina broj 3. Za određivanje granice dokazivanja i granice određivanja matična otopina se razrjeđivala sve do postizanja ciljanog omjera signala i šuma.

### 3.2.4. Parametri metode

Kada su svi uzorci pripremljeni i ispitirani u vijale, prenose se na kromatograf Agilent 1260 Infinity koji provodi metodu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti na koloni XBridge C18, pri čemu je veličina čestica stacionarne faze 2,5  $\mu\text{m}$ , a duljina kolone 3,0 mm x 50 mm. U sklopu ove metode provodi se izokratna elucija, a pri izlasku iz kolone analiti se detektiraju primjenom detektora s nizom dioda. Parametri metode prikazani su u *Tablici 3*.

**Tablica 3.** Parametri metode

<b>Volumen injektiranja</b>	40,00 $\mu\text{L}$
<b>Mobilna faza</b>	20%-tni metanol + 0,1%-tna mravlja kiselina
<b>Brzina protoka mobilne faze</b>	0,500 mL/min
<b>Temperatura kolone</b>	25 $^{\circ}\text{C}$
<b>Duljina trajanja analize</b>	5 min

### 3.2.5. Validacija analitičke metode

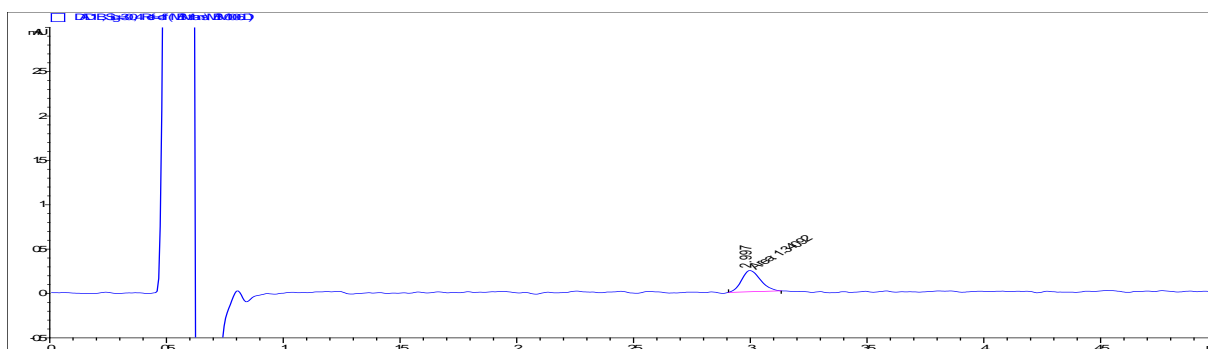
Opisana metoda validirana je prema smjernicama ICH Q2(R2) (engl. *Validation of analytical procedures*), pri čemu su ispitani parametri: granica dokazivanja, granica određivanja, linearanost, točnost, preciznost prvog i drugog dana te izdržljivost.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

## 4.1. Validacija analitičke metode

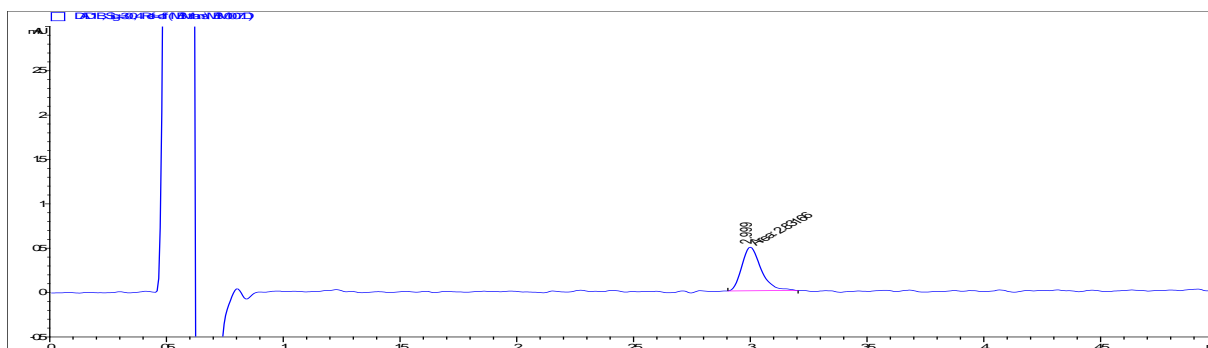
### 4.1.1. Granica dokazivanja i granica određivanja

Granica dokazivanja (LOD) i granica određivanja (LOQ) utvrđene su na način da se matična otopina razrjeđivala dok nisu postignuti ciljani omjeri signala i šuma. U slučaju granice dokazivanja, matična otopina razrijeđena je 10 000 puta pri čemu je omjer signala i šuma iznosio 5,7:1, što je zadovoljavajući omjer za granicu dokazivanja pa ona stoga iznosi 2,00 ng/mL. Kromatogram spomenute analize prikazan je na *Slici 3*.



**Slika 3.** Kromatogram analize pri kojoj je određena granica dokazivanja (LOD)

U svrhu utvrđivanja granice dokazivanja, omjer signala i šuma 12,9:1 postignut je razrjeđenjem matične otopine 5 000 puta. Koncentracija tako razrijeđene otopine iznosila je 3,99 ng/mL pa je ta vrijednost ujedno i granica određivanja. Kromatogram ove analize prikazan je na *Slici 4*.



**Slika 4.** Kromatogram analize pri kojoj je određena granica određivanja (LOQ)

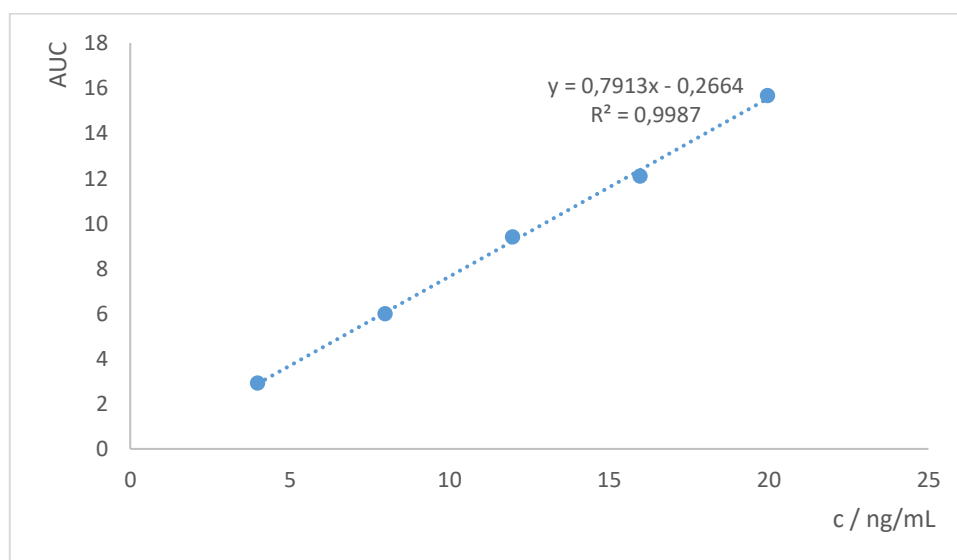
#### 4.1.2. Linearnost

Linearnost je određena analizom radnih otopina 1 - 5, pri čemu je svaki pik onečišćenja ručno integriran, a vrijednosti površine ispod krivulje (engl. *area under the curve*, AUC) vidljive su u *Tablici 4*.

**Tablica 4.** Podaci dobiveni pri određivanju linearnosti

Broj radne otopine	$c_{TEO}$ / ng/mL	AUC	$c_{EXP}$ / ng/mL	Analitički prinos / %
1	3,99	2,91093	4,02	100,53
2	7,99	5,99915	7,92	99,12
3	11,98	9,4023	12,22	101,98
4	15,98	12,1016	15,63	97,83
5	19,97	15,6626	20,13	100,80

Na temelju dobivenih vrijednosti izrađuje se graf ovisnosti površine ispod krivulje o teoretskoj koncentraciji onečišćenja. Regresijski pravac dobiven na osnovu rezultata analize vidljiv je na *Slici 5*.



**Slika 5.** Grafički prikaz ovisnosti površine ispod krivulje o koncentraciji

Jednadžba dobivenog regresijskog pravca je  $y = 0,7913x - 0,2664$ . Koeficijent determinacije ( $R^2$ ) iznosi 0,9987, a koeficijent korelacije ( $r$ ) drugi je korijen od vrijednosti  $R^2$  te iznosi 0,99935. Pritom je zadovoljen uvjet da koeficijent korelacije mora biti veći od 0,999.



Uvrštavajući dobivene vrijednosti površine ispod krivulje u jednadžbu pravca, moguće je izračunati eksperimentalne vrijednosti koncentracije onečišćenja ( $c_{EXP}$ ) kao što je vidljivo u Tablici 4. Analitički prinos (engl. *recovery*) iznosi omjer eksperimentalno određene i teoretske koncentracije analita kao što je vidljivo u izrazu [3].

$$R (\%) = \frac{c(\text{eksperimentalna})}{c(\text{teoretska})} * 100 \quad [3]$$

#### 4.1.3. Točnost

Točnost metode određivana je na tri vrijednosti koncentracije, odnosno na najnižoj, srednjoj i najvišoj vrijednosti koncentracijskog područja. Za svaku vrijednost koncentracije uzimani su uzorci u triplikatu, a do podataka o  $c_{EXP}$  i analitičkom prinosu dolazilo se na način analogan onom opisanom u prethodnom odlomku. Dobiveni podaci prikazani su u *Tablici 5*.

**Tablica 5.** Podaci dobiveni pri određivanju točnosti

Broj radne otopine	$c_{TEO}$ / ng/mL	AUC	$c_{EXP}$ / ng/mL	R / %	$\bar{R}$ / %	SD	RSD / %
		2,80153	3,88	97,07			
1.	3,99	2,78179	3,85	96,44	97,01	0,533091	0,549
		2,81531	3,89	97,50			
		9,27376	12,06	100,62			
3.	11,98	9,50826	12,35	103,09	101,10	1,800116	1,781
		9,17619	11,93	99,59			
		15,117	19,44	97,35			
5.	19,97	15,2397	19,60	98,13	98,52	1,401734	1,423
		15,547	19,98	100,07			

Kao što je vidljivo iz tabličnog prikaza, prosječne vrijednosti analitičkog prinosa za navedene koncentracije kreću se u rasponu 97,01 - 101,10% što se smatra zadovoljavajućim rezultatom. Vrijednosti standardne devijacije i relativne standardne devijacije ilustriraju mjeru raspršenosti rezultata oko srednje vrijednosti.

#### 4.1.4. Preciznost

Preciznost je određivana prvi i drugi radni dan. Prvi radni dan šest puta se mjerila koncentracija za uzorke radne otopine 3, a rezultati su prikazani u *Tablici 6*.

**Tablica 6.** Podaci dobiveni pri određivanju preciznosti 1. radni dan

Broj radne otopine	$c_{TEO}$ / ng/mL	AUC	$c_{EXP}$ / ng/mL	R / %	$\bar{R}$ / %	SD	RSD / %
3.	11,98	9,31921	12,11	101,10	99,81	1,178613	1,181
		9,13227	11,88	99,13			
		9,33383	12,13	101,25			
		9,12301	11,87	99,03			
		9,05955	11,79	98,36			
		9,21199	11,98	99,97			

Rezultati analize ukazuju kako je vrijednost relativne standardne devijacije 1,181 %, što znači da su rezultati raspršeni oko srednje vrijednosti za taj postotak. Kako bi se ustanovilo varira li preciznost ovisno o danu analize, provedeno je određivanje preciznosti i drugi radni dan, pri čemu se koncentracije radne otopine 3 mjerila u triplikatu. Dobiveni rezultati prikazani su u *Tablici 7*.

**Tablica 7.** Podaci dobiveni pri određivanju preciznosti 2. radni dan

Broj radne otopine	$c_{TEO}$ / ng/mL	AUC	$c_{EXP}$ / ng/mL	R / %	$\bar{R}$ / %	SD	RSD / %
3.	11,98	9,26128	12,04	100,49	99,64	0,821848	0,825
		9,10562	11,84	98,85			
		9,17688	11,93	99,60			

Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je kako je drugi radni dan vrijednost relativne standardne devijacije iznosila 0,825 %, što je manje nego vrijednost dobivena pri analizi prvog

radnog dana. Dobiveni rezultati su zadovoljavajući pa se stoga metoda smatra preciznom za navedeni koncentracijski raspon.

#### 4.1.5. Izdržljivost

Ispitivanja izdržljivosti metode provodila su se promjenom tri parametra analize: promjenom temperature kolone, promjenom brzine protoka mobilne faze i promjenom sastava mobilne faze. Za sva ispitivanja izdržljivosti koristili su se uzroci radne otopine 3, a praćeni parametar je vrijeme zadržavanja analita u koloni (engl. *retention time*,  $t_R$ ).

U svrhu ispitivanja utjecaja promjene temperature kolone na razdiobu, uzorci su analizirani pri promjeni temperature kolone za 1 °C u odnosu na standardnu temperaturu kolone od 25 °C. Rezultati dobiveni analizom prikazani su u *Tablici 8*. Vidljivo je kako se vrijeme zadržavanja analita u koloni smanjuje što je temperatura u koloni veća te kako je razlika u površinama ispod krivulje manja između mjerenja na 24 °C i 25 °C, nego između 25 °C i 26 °C.

**Tablica 8.** Podaci dobiveni pri određivanju izdržljivosti promjenom temperature kolone

T / °C	AUC	$t_R$ / min	$\overline{AUC}$	SD	RSD / %
24	8,75579	3,044	8,627025	0,182101	2,111
25	8,49826	2,980			
26	8,9177	2,914	8,70798	0,296589	3,406

Pri slijedećem ispitivanju izdržljivosti, parametar koji se mijenjao bila je brzina protoka mobilne faze u rasponu  $\pm 0,01$  mL/min od standardne vrijednosti 0,500 mL/min. Dobiveni rezultati prikazani su u *Tablici 9.*, pri čemu je vidljivo da se analit kraće zadržava u koloni kada je brzina protoka mobilne faze veća. Također, vidljivo je da je razlika u vrijednosti površina ispod krivulja nešto manja pri usporedbi rezultata analiza provedenih uz brzine protoka od 0,490 mL/min i 0,500 mL/min, nego uz brzine od 0,500 mL/min i 0,510 mL/min.

**Tablica 9.** Podaci dobiveni pri određivanju izdržljivosti promjenom brzine protoka mobilne faze

<b>Brzina protoka mobilne faze / mL/min</b>	<b>AUC</b>	<b>t<sub>R</sub> / min</b>	<b><math>\overline{\text{AUC}}</math></b>	<b>SD</b>	<b>RSD / %</b>
<b>0,490</b>	8,68011	3,039	8,589185	0,128587	1,497
<b>0,500</b>	8,49826	2,980			
<b>0,510</b>	8,71285	2,914	8,605555	0,151738	1,763

Iduće ispitivanje izdržljivosti provodi se promjenom sastava mobilne faze. Za standardno provođenje metode koristila se mobilna faza koju sačinjava 20 % metanola i 0,1 % mravlje kiseline, a za potrebe ispitivanja izdržljivosti udio metanola u mobilnoj fazi mijenjao se u rasponu  $\pm 1$  %. Dobiveni rezultati prikazani su u *Tablici 10*. I povećanjem i smanjenjem udjela metanola u mobilnoj fazi malo je smanjeno vrijeme zadržavanja analita u koloni, a razlika u površini ispod krivulje manja je pri usporedbi rezultata dobivenih nakon smanjenja udjela metanola u sastavu mobilne faze.

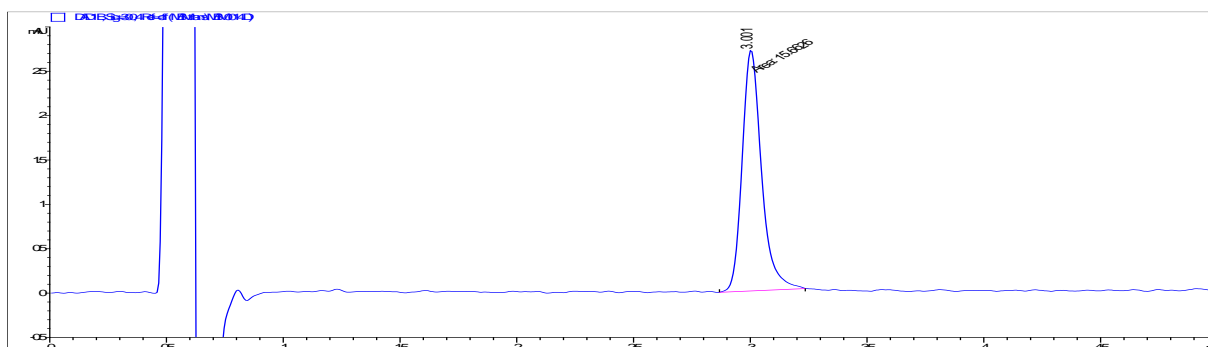
**Tablica 10.** Podaci dobiveni pri određivanju izdržljivosti promjenom udjela metanola u mobilnoj fazi

<b>Udio metanola u mobilnoj fazi / %</b>	<b>AUC</b>	<b>t<sub>R</sub> / min</b>	<b><math>\overline{\text{AUC}}</math></b>	<b>SD</b>	<b>RSD / %</b>
<b>19</b>	8,8103	2,954	8,65428	0,220646	2,550
<b>20</b>	8,49826	2,980			
<b>21</b>	8,67583	2,974	8,587045	0,125561	1,462

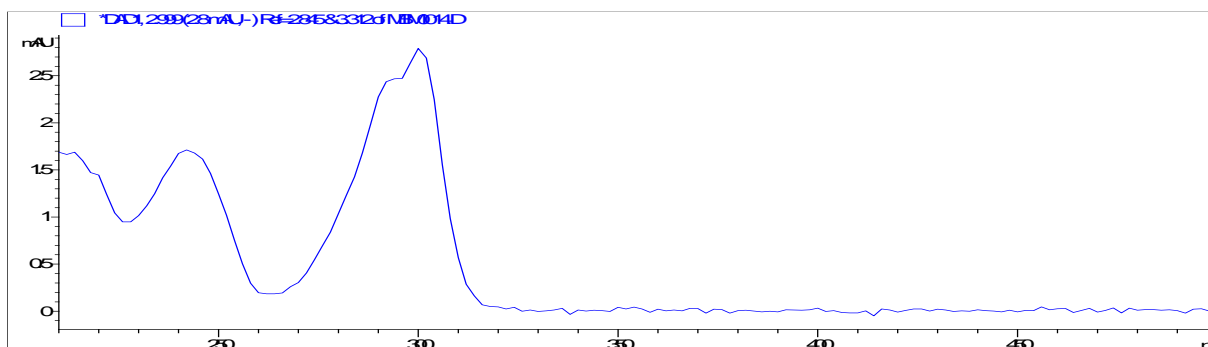
## 4.2. Kromatografska analiza onečišćenja

### 4.2.1. Kromatografska svojstva ispitivanog onečišćenja

Kromatografskom analizom ispitivanog onečišćenja validiranom metodom dobiven je kromatogram prikazan na *Slici 6.*, iz koje je vidljivo da je vrijeme zadržavanja ispitivanog analita oko 3 minute. Na *Slici 7.* prikazan je UV-Vis spektar te je vidljiv maksimum apsorpcije na valnoj duljini od 300 nm na kojoj analizirano onečišćenje ima apsorpcijski maksimum.



**Slika 6.** Kromatogram radne otopine onečišćenja



**Slika 7.** UV-Vis spektar onečišćenja

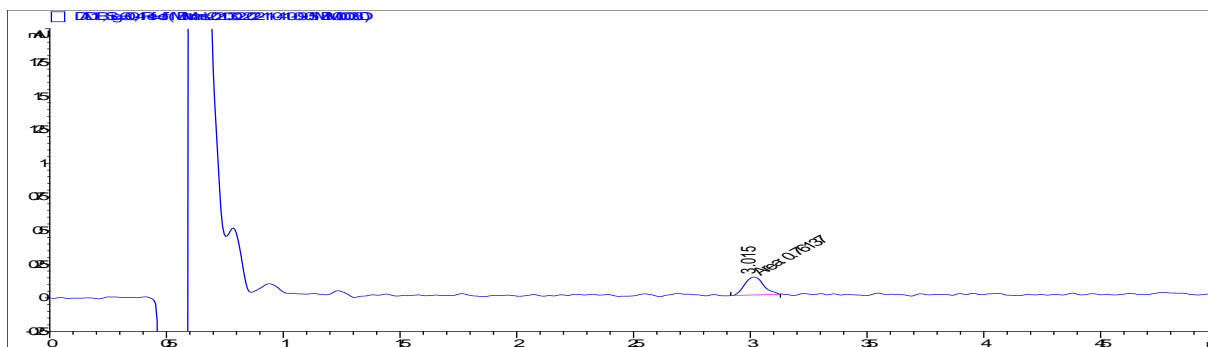
### 4.2.2. Analiza uzoraka infuzijskih otopina

Nakon što su svi uzorci infuzijskih otopina prošli *screening* kako bi se utvrdilo sadržje li pik koji odgovara ispitivanom onečišćenju, ustanovljeno je da 7 od ukupno 37 uzoraka sadrži spomenuto onečišćenje. Kako bi se onečišćenje u svakom uzorku kvantificiralo, svaki uzorak pušten na kolonu u triplikatu po prethodno validiranoj metodi koja zadovoljava zahtjeve

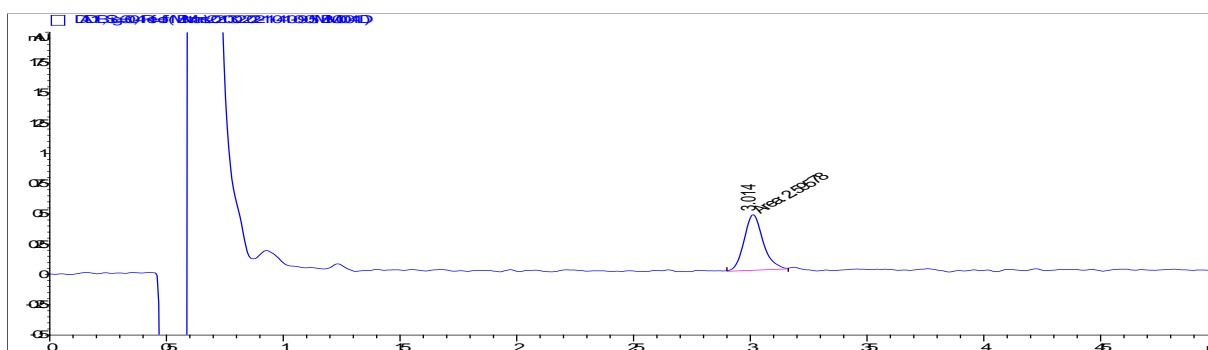
točnosti, preciznosti i linearnosti. Dobiveni rezultati prikazani su u *Tablici 11.*, a kromatogrami pojedinih uzoraka prikazani su na *Slikama 8. - 14.*

**Tablica 11.** Podaci dobiveni pri analizi uzoraka infuzijskih otopina

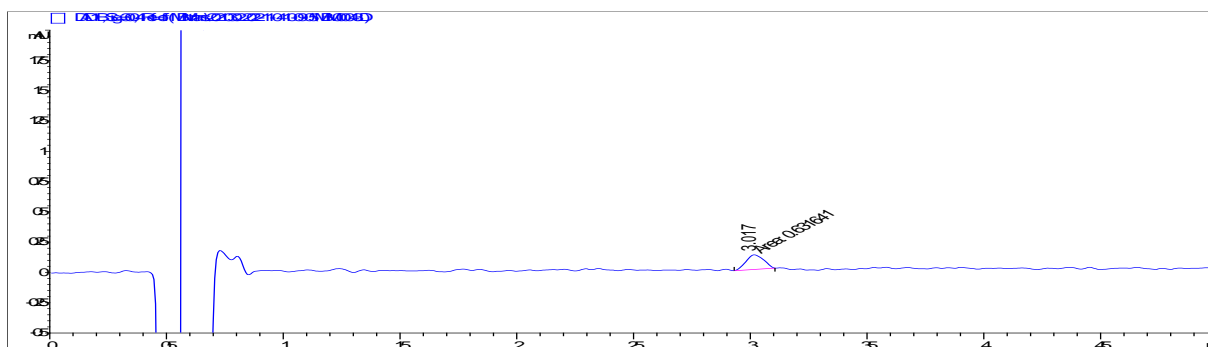
<b>Broj uzorka</b>	<b>AUC</b>	<b>c<sub>EXP</sub> / ng/mL</b>	<b><math>\bar{c}</math> <sub>EXP</sub> / ng/mL</b>
	0,732278	1,262	
<b>16</b>	0,709818	1,234	1,265
	0,76137	1,299	
	2,50536	3,503	
<b>17</b>	2,54247	3,550	3,557
	2,59578	3,617	
	0,608396	1,106	
<b>23</b>	0,631641	1,135	1,108
	0,590695	1,083	
	0,787124	1,331	
<b>24</b>	0,724559	1,252	1,357
	0,910499	1,487	
	0,361731	0,794	
<b>25</b>	0,296342	0,711	0,743
	0,30597	0,723	
	7,78104	6,379	
<b>27</b>	4,84766	6,463	6,454
	4,89436	6,522	
	2,37019	3,332	
<b>33</b>	2,32467	3,274	3,359
	2,48077	3,472	



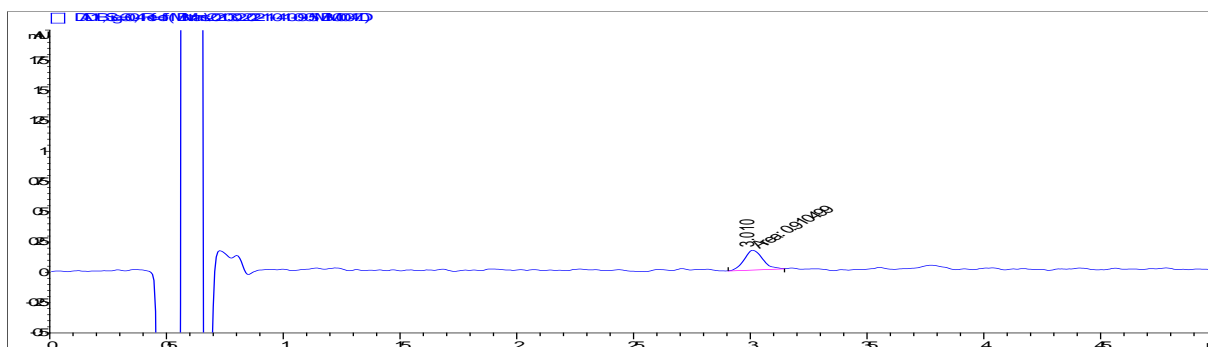
Slika 8. Kromatogram uzorka 16



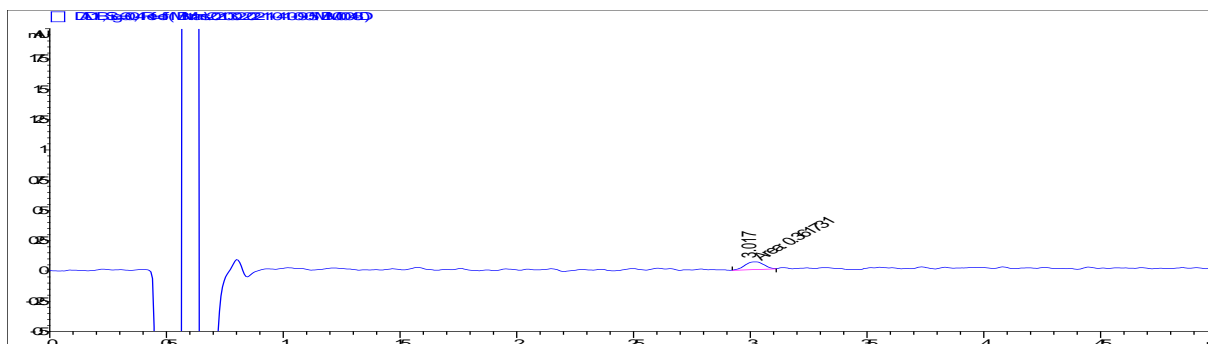
Slika 9. Kromatogram uzorka 17



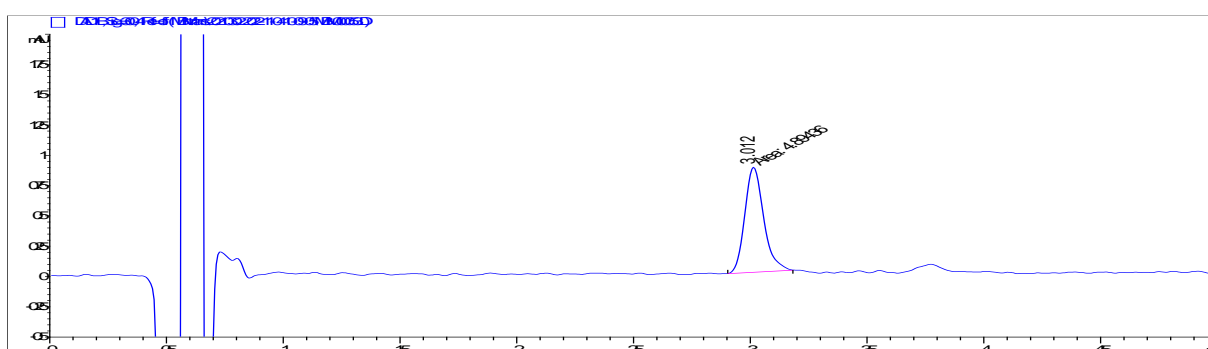
Slika 10. Kromatogram uzorka 23



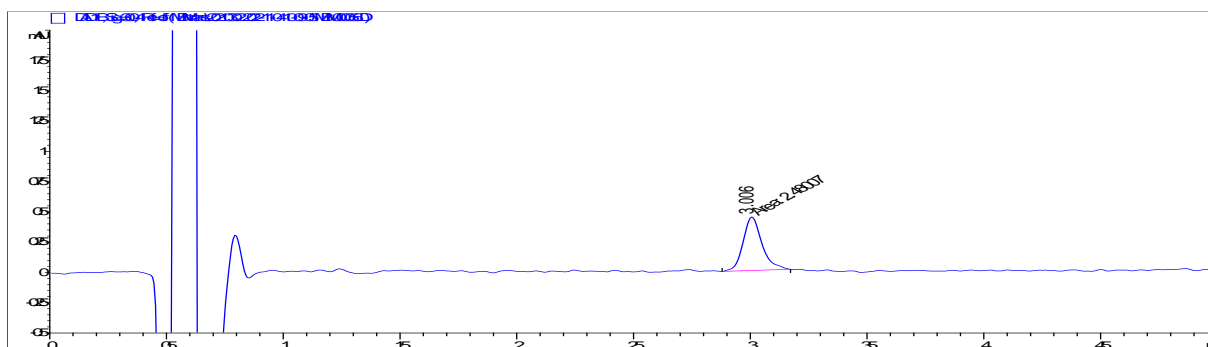
Slika 11. Kromatogram uzorka 24



**Slika 12.** Kromatogram uzorka 25



**Slika 13.** Kromatogram uzorka 27



**Slika 14.** Kromatogram uzorka 33

Utvrđeno je da četiri od ukupno sedam uzoraka u kojima je detektirana prisutnost analiziranog onečišćenja sadrži onečišćenje u koncentraciji manjoj od vrijednosti granice dokazivanja koja iznosi 2,00 ng/mL. Dakle, za uzorke 16, 23, 24 i 25 ne može se s dovoljnom sigurnošću tvrditi da uopće sadrže ispitivano onečišćenje. Nadalje, uzorci 17 i 33 sadrže onečišćenje u koncentraciji u rasponu između granice dokazivanja i granice određivanja koja iznosi 3,99 ng/mL. Za uzorke 17 i 33 može se tvrditi da sadrže ispitivano onečišćenje, ali nije ga moguće kvantificirati s dovoljnom sigurnošću jer korištena metoda nije validirana za to



koncentracijsko područje. Jedini uzorak čija je prosječna eksperimentalno određena koncentracija veća od granice određivanja je uzorak 27, što znači da je samo za njega moguće pouzdano reći kolika je koncentracija onečišćenja u uzorku. S obzirom da ne postoje podaci o zahtjevima i limitima za analizirano onečišćenje, nije moguće odrediti je li uzorak 27 zadovoljavajući.

## **5. ZAKLJUČAK**

Cilj ovog diplomskog rada bio je validirati i provesti metodu čiji je cilj kvantifikacija onečišćenja koje prelazi iz gumenih čepova u infuzijske otopine pri standardnim uvjetima skladištenja te predstavlja potencijalnu ugrozu za zdravlje krajnjih korisnika farmaceutskih pripravaka.

Ukupno 37 uzoraka infuzijskih otopina analizirano je HPLC-DAD metodom, odnosno tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz detektor s nizom dioda za identifikaciju analita. Validacija analitičke metode provedena je na slijedećim parametrima: granica dokazivanja i određivanja, linearnost, točnost, preciznost i izdržljivost. Svi parametri su zadovoljeni te se smatra da metoda u koncentracijskom rasponu analita 3,99 - 19,97 ng/mL pokazuje zadovoljavajuća svojstva linearnosti, točnosti i preciznosti. Metoda je validirana prema smjernicama ICH Q2(R2) - *Validation of analytical procedures*.

Od 37 uzoraka, 7 je uzoraka pokazivalo prisustvo analita čije se vrijeme zadržavanja poklapalo s vremenom zadržavanja ispitivanog onečišćenja. Od tih 7 uzoraka, 3 uzorka sadrže analizirano onečišćenje u koncentraciji iznad granice određivanja, odnosno iznad 2,00 ng/mL, a 1 uzorak od navedena 3 sadrži onečišćenje u koncentraciji iznad granice određivanja koja iznosi 3,99 ng/mL. To bi značilo da se samo za 8,1 % analiziranih uzoraka može sa sigurnošću reći da sadrže analizirano onečišćenje, a koncentracija onečišćenja može se pouzdano odrediti za 2,7 % uzoraka.

S obzirom da ne postoje podaci o maksimalnim dozvoljenim koncentracijama ili maksimalnom dnevnom unosu za analizirano onečišćenje, na temelju dobivenih rezultata analize nije moguće ustanoviti jesu li analizirane infuzijske otopine sigurne za upotrebu.

## **6. LITERATURA**

Boltres B, Tratzky S, Kass C, Eichholz R., Naß P. There Is Still Room for Improvement: Presentation of a Neutral Borosilicate Glass with Improved Chemical Stability for Parenteral Packaging. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2016, 70, 346-352.

Broschard, TH, Glowienke S, Bruen US, Nagao LM, Teasdale A, Stults CLM, Li KL, Iciek LA, Erexson G, Martin EA, Ball DJ. Assessing safety of extractables from materials and leachables in pharmaceuticals and biologics - Current challenges and approaches. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2016, 81, 201-211.

Christiaens P, Beusen JM, Verlinde P, Baeten J, Jenke D. Identifying and Mitigating Errors in Screening for Organic Extractables and Leachables: Part 1-Introduction to Errors in Chromatographic Screening for Organic Extractables and Leachables and Discussion of the Errors of Omission. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2020, 74, 90-107.

Cosnett JE. The origins of intravenous fluid therapy. *Lancet*, 1989, 333(8641), 768-771.

Dong MW. HPLC and UHPLC for Practicing Scientists. Hoboken, Wiley, 2019, str. 93.

Dong MW. Modern HPLC for Practicing Scientists. Hoboken, Wiley, 2006, str. 91-93.

Ermer J, Nethercote P. Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice, Weinheim, Wiley-VCH, 2015, str. 1-9.

EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use, Annex 15, 2015., European Commission. <https://health.ec.europa.eu>, pristupljeno 7.5.2023.

EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use, Volume 4, 2022., European Commission. <https://health.ec.europa.eu>, pristupljeno 7.5.2023.

European Directorate for the Quality of Medicine & HealthCare, European Pharmacopoeia, 11<sup>th</sup> Edition, 2023., <https://pheur.edqm.eu/home>, pristupljeno 7.5.2023.

Extractables & Leachables Safety Information Exchange, 2020., <https://www.elsiedata.org>, pristupljeno 7.5.2023.

Final Concept Paper ICH Q3E: Guideline for Extractables and Leachables (E&L), 2020., <https://database.ich.org>, pristupljeno 7.5.2023.

Finfer S, Myburgh J, Bellomo R. Intravenous fluid therapy in critically ill adults. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14, 541-557.

Graham T. Liquid Diffusion Applied to Analysis. *Philos Trans R Soc London*, 1861, 151, 183-224.

ICH guideline M7 on assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk – addendum Step 2b, 2021., <https://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 7.5.2023.

ICH guideline Q3C (R8) on impurities: guideline for residual solvents, 2022., <https://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 7.5.2023.

ICH guideline Q3D (R2) on elemental impurities, 2022., <https://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 7.5.2023.

ICH guideline Q14 on analytical procedure development, 2022., <https://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 7.5.2023.

ICH Topic Q3A (R2) Impurities in new Drug Substances, 2006., <https://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 7.5.2023.

ICH Topic Q3B (R2) Impurities in New Drug Products, 2006., <https://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 7.5.2023.

ICH Topic Q6A Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances, 2000., <https://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 7.5.2023.

ICH Topic Q2(R1) Validation of analytical procedures: Text and methodology, 1994., <https://database.ich.org>, pristupljeno 7.5.2023.

ICH Topic Q2(R2) Validation of analytical procedures, Draft version. 2022., <https://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 7.5.2023.

ISO 10993-18:2020, Biological evaluation of medical devices — Part 18: Chemical characterization of medical device materials within a risk management process, 2020., <https://www.iso.org>, pristupljeno 7.5.2023.

Jenke D. Identification and Quantitation Classifications for Extractables and Leachables. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2020, 74, 275-285.

Jenke D, Castner J, Egert T, Feinberg T, Hendricker A, Houston C, Hunt DG, Lynch M, Shaw A, Nicholas K, Norwood DL, Paskiet D, Ruberto M, Smith EJ, Holcomb F. Extractables characterization for five materials of construction representative of packaging systems used for parenteral and ophthalmic drug products. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2013, 67, 448-511.

Ohno Y. ICH guidelines--implementation of the 3Rs (refinement, reduction, and replacement): incorporating best scientific practices into the regulatory process. *ILAR J*, 2002, 43, 595-598.

Paskiet D, Jenke D, Ball, D, Houston C, Norwood DL, Markovic I. The Product Quality Research Institute (PQRI) Leachables and Extractables Working Group Initiatives for Parenteral and Ophthalmic Drug Product (PODP). *PDA J Pharm Sci Technol*, 2013, 67, 430-447.

Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. Introduction to Modern Liquid Chromatography. Hoboken, Wiley, 2010, str. 87-131, 165-166, 531-542.

Sacha GA, Saffell-Clemmer W, Abram K, Akers MJ. Practical fundamentals of glass, rubber, and plastic sterile packaging systems. *Pharm Dev Technol*, 2010, 15, 6-34.

Safety thresholds and best practices for extractables and leachables in orally inhaled and nasal drug products, 2006., <https://pqri.org>, pristupljeno 7.5.2023.

Schaut RA, Weeks WP. Historical Review of Glasses Used for Parenteral Packaging. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2017, 71, 279-296.

Ultraviolet Detectors: Perspectives, Principles, and Practices, 2019., <https://www.chromatographyonline.com>, pristupljeno 8.5.2023.

United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 43-NF 38); United States Pharmacopeial Convention: Rockville, MD, USA, 2021.

Watson DG. Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1999, str. 237-277.

Wesley JR. Intravenous containers and solution packaging. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 2000, 16, 597-598.

## **7. SAŽETAK / SUMMARY**



Infuzijske otopine spadaju u jedne od najprimjenjivanih farmaceutskih oblika kod liječenja akutno oboljelih pacijenata. Uzevši u obzir činjenice da se primjenjuju parenteralno te da spadaju u farmaceutske oblike koji imaju visok rizik stupanja u interakcije s ambalažom, potencijalno prisutna onečišćenja mogu predstavljati ugrozu za zdravlje krajnjih korisnika. Jedan od načina na koji onečišćenja iz ambalaže mogu dospjeti u infuzijske otopine je prelaskom iz gumenih čepova u formulaciju pri uvjetima skladištenja. Kako bi se mogla odrediti konačna sigurnost primjene farmaceutskog pripravka, takva onečišćenja trebala bi se identificirati i kvantificirati. U svrhu ovog rada validirana je i provedena HPLC-DAD metoda za kvantifikaciju jednog onečišćenja koje potječe iz gumene ambalaže. Metoda je validirana sukladno smjernicama Međunarodnog vijeća za harmonizaciju (ICH Q2(R2)) te je potom analizirano 37 uzoraka infuzijskih otopina. Od 37 uzoraka, 3 su sadržavala ispitivano onečišćenje u koncentraciji većoj od granice dokazivanja (LOD), a 1 je uzorak sadržavao onečišćenje u koncentraciji većoj od granice određivanja (LOQ).

Infusion solutions are one of the most widely used pharmaceutical forms in the treatment of acutely ill patients. Taking into consideration the fact that infusion solutions are administered parenterally and that they belong to a group of pharmaceutical forms that pose a high risk of interacting with the packaging, the potentially present impurities can pose a threat to the health of end users. One of the ways in which impurities from packaging can get into infusion solutions is by leaching from rubber stoppers to the formulation under storage conditions. In order to be able to determine the final safety of use of the pharmaceutical, such impurities should be identified and quantified. For this thesis, a HPLC-DAD method validated and conducted for the quantification of one impurity that is originating from rubber packaging. The method was validated in accordance with the guidelines published by the International Council for Harmonization (ICH Q2(R2)) and then 37 samples of infusion solutions were analyzed. Out of 37 samples, 3 contained the tested impurity in a concentration higher than the limit of detection (LOD), and 1 sample contained the impurity in a concentration higher than the limit of quantification (LOQ).

## **8. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA**

$\sigma$  - standardna devijacija

$\alpha$  - nagib pravca

AUC - površina ispod krivulje

DAD - detektor diodnog niza (engl. *Diode array detector*)

ECD - elektrokemijski detektor

ELSIE - engl. *The Extractables and Leachables Safety Information Exchange Consortium*

EMA - Europska agencija za lijekove (engl. *European medicines agency*)

FDA - Američke Agencije za hranu i lijekove (engl. *U.S. Food and Drug Administration*)

GMP - Dobra proizvođačka praksa (engl. *Good manufacturing practice*)

HPLC - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*)

ICH - Međunarodno vijeće za harmonizaciju (engl. *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*)

ISO - Međunarodna organizacija za standardizaciju (engl. *International Organisation for Standardisation*)

LOD - granica dokazivanja (engl. *limit of detection*)

LOQ - granica određivanja (engl. *limit of quantification*)

PQRI - Institut za istraživanje kvalitete proizvoda (engl. *Product Quality Research Institute*)

R - analitički prinos (engl. *recovery*)

$R^2$  - koeficijent determinacije

r - koeficijent korelacije

RSD - relativna standardna devijacija

USP - Američka farmakopeja (engl. *United States Pharmacopeia*)

**9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC  
DOCUMENTATION CARD**

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### VALIDACIJA HPLC-DAD METODE ZA ANALIZU ONEČIŠĆENJA IZ GUMENIH ČEPOVA U INFUZIJSKIM OTOPINA

Lorena Dorić

#### SAŽETAK

Infuzijske otopine spadaju u jedne su od najprimjenjivijih farmaceutskih oblika kod liječenja akutno oboljelih pacijenata. Uzevši u obzir činjenice da se primjenjuju parenteralno te da spadaju u farmaceutske oblike koji imaju visok rizik stupanja u interakcije s ambalažom, potencijalno prisutna onečišćenja mogu predstavljati ugrozu za zdravlje krajnjih korisnika. Jedan od načina na koji onečišćenja iz ambalaže mogu dospjeti u infuzijske otopine je prelaskom iz gumenih čepova u formulaciju pri uvjetima skladištenja. Kako bi se mogla odrediti konačna sigurnost primjene farmaceutskog pripravka, takva onečišćenja trebala bi se identificirati i kvantificirati. U svrhu ovog rada validirana je i provedena HPLC-DAD metoda za kvantifikaciju jednog onečišćenja koje potječe iz gumene ambalaže. Metoda je validirana sukladno sa smjernicama Međunarodnog vijeća za harmonizaciju (ICH Q2(R2)) te je potom analizirano 37 uzoraka infuzijskih otopina. Od 37 uzoraka, 3 su sadržavala ispitivano onečišćenje u koncentraciji većoj od granice dokazivanja (LOD), a 1 je uzorak sadržavao onečišćenje u koncentraciji većoj od granice određivanja (LOQ).

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

Rad sadrži: 47 stranica, 14 grafičkih prikaza, 11 tablica i 36 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: HPLC, infuzijske otopine, onečišćenje

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Monika Barbarić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Ana Karković Marković**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2023.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutical Analysis  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### VALIDATION OF HPLC-DAD METHOD FOR ANALYSIS OF LEACHABLES ORIGINATING FROM RUBBER STOPPERS IN INFUSION SOLUTIONS

**Lorena Dorić**

#### SUMMARY

Infusion solutions are one of the most widely used pharmaceutical forms in the treatment of acutely ill patients. Taking into consideration the fact that infusion solutions are administered parenterally and that they belong to a group of pharmaceutical forms that pose a high risk of interacting with the packaging, the potentially present impurities can pose a threat to the health of end users. One of the ways in which impurities from packaging can get into infusion solutions is by leaching from rubber stoppers to the formulation under storage conditions. In order to be able to determine the final safety of use of the pharmaceutical, such impurities should be identified and quantified. For this thesis, a HPLC-DAD method was validated and conducted for the quantification of one impurity that is originating from rubber packaging. The method was validated in accordance with the guidelines published by the International Council for Harmonization (ICH Q2(R2)) and then 37 samples of infusion solutions were analyzed. Out of 37 samples, 3 contained the tested impurity in a concentration higher than the limit of detection (LOD), and 1 sample contained the impurity in a concentration higher than the limit of quantification (LOQ).

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

Thesis includes: 47 pages, 14 figures, 11 tables and 36 references. Original is in Croatian language.

Keywords: HPLC, infusion solutions, impurity

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

Reviewers: **Ana Mornar Turk, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Monika Barbarić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ana Karković Marković, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2023.