

Razvoj i validacija LC metode za vrednovanje procesa čišćenja opreme nakon proizvodnje Betazon kreme i Betazon masti

Sušanj, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:147326>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

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



Ivan Sušanĳ

**Razvoj i validacija LC metode za
vrednovanje procesa ĉišćenja opreme
nakon proizvodnje Betazon® kreme i
Betazon® masti**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod mentorstvom prof. dr. sc. Biljane Nigović, a izrađen je u Jadran galenskom laboratoriju d.d., odjelu Razvojna analitika, pod stručnim vodstvom dr.sc. Danijele Štanfel i suvoditeljstvom Vlaste Bujan, mag. pharm.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Biljani Nigović na stručnom vodstvu, strpljenju i pruženoj pomoći prilikom izrade diplomskog rada.

Također se zahvaljujem dr. sc. Danijeli Štanfel na trudu, usmjeravanju i vođenju prilikom pripreme i odrade eksperimentalnog dijela rada.

Hvala Vlasti na beskrajnom strpljenju, idejama i pomoći tijekom izvođenja eksperimenta. Zahvaljujem se i djelatnicama odjela Razvojna analitika JGL d.d. na savjetima i ugodnom druženju.

Hvala mami, tati, Emi, Sari, nonotu Zvonkotu i nonami Jadranki, Bobi i Miji na podršci u životu i tijekom studiranja.

Hvala mojoj kumpaniji i prijateljima iz V7 na ugodno provedenim trenucima.

Posebnu zahvalu upućujem mojoj Matei na ljubavi, druženju i svim lijepim trenucima tijekom našeg studiranja. Hvala za svaku toplu riječ, za svako ohrabrenje i za svaki osmijeh.

Zrnca pijeska čine planine, trenuci čine godine, a sitnice cijeli život.

Sadržaj

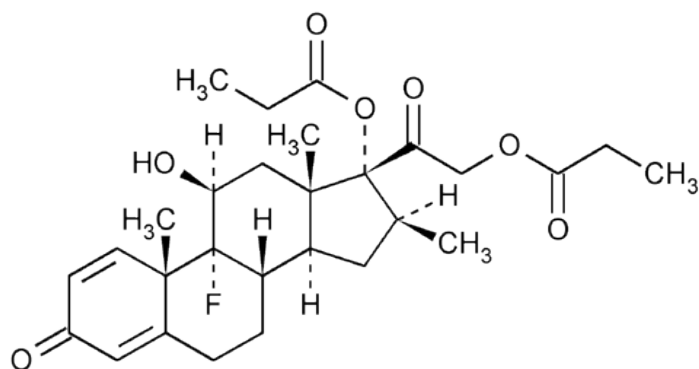
1. Uvod	1
1.1. Betametazondipropionat.....	2
1.2. Mehanizam djelovanja glukokortikoida	2
1.3. Topikalni pripravci s glukokortikoidima	3
1.4. Kromatografija.....	5
1.4.1. Kromatografski pojmovi i parametri	5
1.4.2. Tekućinska kromatografija (LC)	8
1.4.2.1. Tekućinska kromatografija visoke (HPLC) i ultra visoke djelotvornosti (UPLC).....	8
1.4.2.2. Dijelovi uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti.....	9
1.4.2.3. Vrste razdjelne kromatografije.....	10
1.4.3. Stacionarna faza u kromatografiji.....	10
1.4.3.1. Kromatografske kolone u tekućinskoj kromatografiji visoke i ultra visoke djelotvornosti.....	11
1.4.4. Razlike između UPLC i HPLC.....	11
1.4.5. Mobilna faza u kromatografiji.....	12
1.4.6. Detektori.....	13
1.4.7. Kvantitativna analiza u kromatografiji	14
1.5. Vrednovanje procesa čišćenja.....	15
1.6. Validacija analitičke metode.....	17
1.6.1. Terminologija i metodologija validacije analitičke metode.....	18
2. Obrazloženje teme	21
3. Materijali i metode.....	23
3.1. Standardi.....	24
3.2. Reagensi.....	24
3.3. Aparatura i materijali.....	24
3.4. Placebo uzorci.....	25
3.5. Priprema otopina – razvoj metode	25
3.5.1. Priprema otopina – razvoj 1	25
3.5.2. Priprema otopina – razvoj 2	31
3.5.3. Priprema otopina – razvoj 3	35
3.6. Parametri validacije i definirane granice prihvatljivosti	38

3.7. LC uvjeti rada i test prikladnosti sustava u validaciji metode	39
3.8. Priprema otopina u validaciji metode.....	40
3.9. Provedba postupka validacije	43
3.10. Obrada podataka.....	45
4. Rezultati i rasprava	46
4.1. Pregled literature i odabir početne metode za razvoj	47
4.2. Optimiranje početnih HPLC uvjeta i priprema poredbene otopine	50
4.3. Prelazak na UPLC kromatografske uvjete.....	51
4.4. Optimiranje protoka	53
4.5. Ispitivanje utjecaja filtera	55
4.6. Selektivnost.....	56
4.7. Brisevi na silikonu Advanta Pure.....	57
4.8. Bris i ispirak na inoksu	61
4.9. Rezultati validacije UPLC metode.....	62
4.9.1. Selektivnost	63
4.9.2. Preciznost ili pouzdanost.....	66
4.9.2.1. Preciznost instrumenta.....	66
4.9.2.2. Preciznost metode (ponovljivost).....	67
4.9.2.3. Transfer metode (obnovljivost).....	69
4.9.3. Točnost.....	69
4.9.4. Linearnost.....	71
4.9.5. Radno područje.....	72
4.9.6. Otpornost ili izdržljivost	72
4.9.7. Limit detekcije (LOD)	75
4.9.8. Limit kvantifikacije (LOQ)	76
4.9.9. Faktor iskoristivosti	77
5. Zaključci	79
6. Literatura.....	81
7. Sažetak/ Summary	85
8. Temeljna dokumentacijska kartica/ Basic documentation card	

1. Uvod

1.1. Betametazondipropionat

Betametazondipropionat je 17,21 – dipropionatni ester betametazona, sintetskog glukokortikoida koji ima metaboličko, protuupalno i imunosupresivno djelovanje. Molekulska formula betametazondipropionata je $C_{28}H_{37}FO_7$, a molekulska masa mu iznosi 505,595 g/mol (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov). Izgledom je bijeli ili gotovo bijeli kristalinični prah. Praktički je netopljiv u vodi, topljiv u acetonu i metilen kloridu, a djelomično topljiv u etanolu (Council of Europe, 2013). Betametazondipropionat se u tijelu hidrolizira do betametazon –17–propionata i betametazona, a oni se dalje mogu metabolizirati do 6β -OH derivata. Primarni metabolit je betametazon –17– monopropionat (enstilar.com).



Slika 1. Struktura betametazondipropionata (<http://www.pharmacopeia.cn>)

1.2. Mehanizam djelovanja glukokortikoida

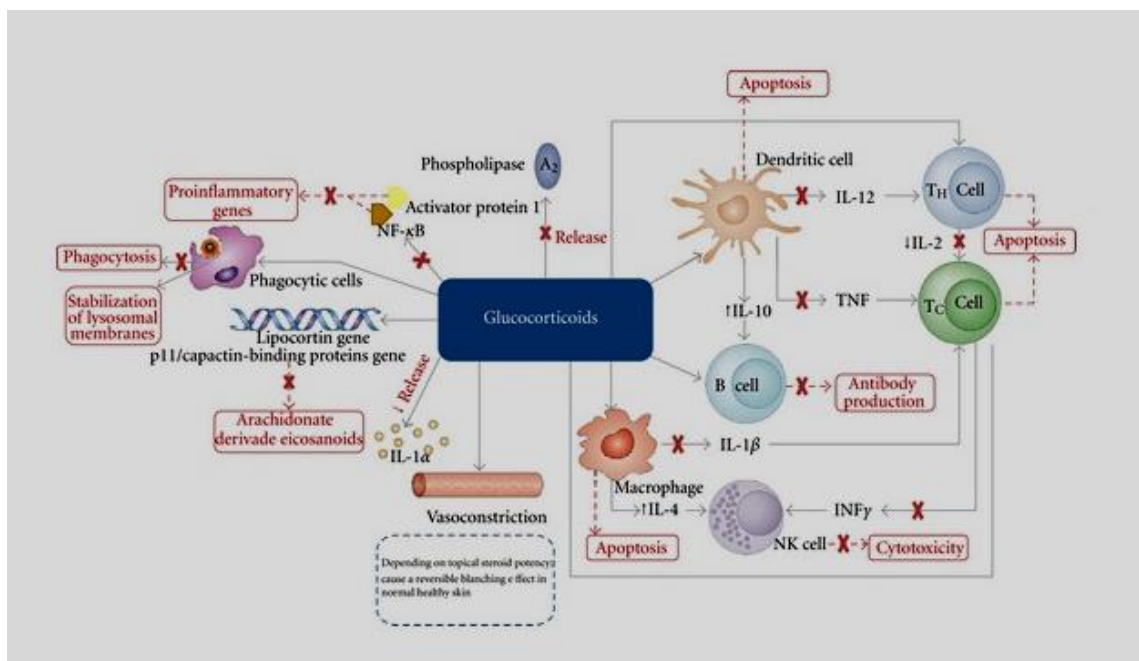
Mehanizam djelovanja glukokortikoida temelji se na agonističkom djelovanju na glukokortikoidne receptore. Kompleks glukokortikoid – glukokortikoidni receptor povezuje se s još jednim takvim kompleksom, ulazi u jezgru te se veže na GRE (od eng. glucocorticoide responsive elements; palindromska promotorska regija koja odgovara na dimer glukokortikoid – glukokortikoidni receptor) i posreduje direktne genomske učinke: potiče se transkripcija gena koji posreduju protuupalno djelovanje kao što su geni za tirozin aminotransferazu (TAT), fosfoenolpiruvat karboksikinazu (PEPCK), Il-1 antagonist i Il-10. Transrepsresijom se smanjuje transkripcija različitih proupalnih gena, npr. gena za određene citokine i faktore rasta (Uva i sur, 2012). Uslijed interakcija s drugim transkripcijskim

faktorima (pr. Nfkb), kompleks posreduje indirektne genomske učinke, a može ostvariti i negenomske učinke djelovanjem na aktivnost nekih enzima (pr. NO sintaza) (Bach – Rojecky, 2016). Smatra se da protuupalno djelovanje glukokortikoida uključuje i lipokortine, inhibitore fosfolipaze A2, koji inhibicijom metabolizma arahidonske kiseline kontroliraju stvaranje prostaglandina i leukotriena. Imunosupresivno djelovanje posljedica je smanjene funkcije limfnog sustava, redukcije koncentracija imunoglobulina i komponenti komplementa, smanjenja broja bijelih krvnih stanica i njihove funkcije te interferencije s vezanjem antigena i protutijela (www.drugbank.ca).

1.3. Topikalni pripravci s glukokortikoidima

Topikalna terapija glukokortikoidima u primjeni je od 1952. godine. Uveli su je Sulzberger i Wittenin i od tada se koristi za liječenje nekolicine dermatoloških bolesti uključujući psorijazu, atopički i seboreični dermatitis te ekcem (Stojadinović i sur, 2007).

Zahvaljujući svom protuupalnom djelovanju, glukokortikoidi predstavljaju zlatni standard u liječenju psorijaze. Na slici 2 prikazan je protuupalni, imunosupresivni i vazokonstriktivni učinak topikalno primjenjenih glukokortikoida.



Slika 2. Protuupalni, imunosupresivni i vazokonstriktivni učinak topikalno primjenjenih glukokortikoida (Uva i sur, 2012)

Epidermalni keratinociti također imaju važne imunološke funkcije, od kojih su brojne pogođene djelovanjem glukokortikoida. Djelovanje glukokortikoida na keratinocite u epidermisu inicijalno uključuje mali broj gena i fokusirano je na 3 procesa: transkripciju/signalizaciju, staničnu sudbinu i metabolizam. Kasniji učinak uključuje više različitih skupina gena i procesa: upalu, apoptozu, staničnu migraciju, metabolizam i diferencijaciju. Migracija i rana diferencijacija keratinocita su inhibirane, a kasna diferencijacija je inducirana. Inducirana je i transkripcija anti-apoptotičkih gena. Glukokortikoidi djeluju i kao potentni inhibitori djelovanja interferona γ kroz smanjenu ekspresiju IFN γ i njegovog receptora te smanjenu ekspresiju i aktivaciju STAT-1 proteina. Dugotrajna primjena u monoterapiji može dovesti do atrofije kože pri čemu se smanjuje debljina kože te se povećava transepidermalni gubitak vode, što uzrokuje slabljenje barijerne funkcije. U takvom stanju olakšano je prodiranje glukokortikoida kroz kožu i ulazak u sistemsku cirkulaciju čime je povećan rizik od sistemskih nuspojava. Neke od glukokortikoidima uzrokovanih nuspojava su osteoporoza, Cushingov sindrom, glaukom, katarakt i oportunističke infekcije (prvenstveno s *Candida* spp.). Kožne nuspojave najčešće uključuju stanjivanje kože, ireverzibilne strije i otežano zacjeljivanje rana. Mogu se pojaviti i steroidne akne, hipertrichoza, eritem, perioralni dermatitis i teleangiektazija, a rijetko se pojavljuje i hiperpigmentacija (Stojadinović i sur, 2007; Uva i sur, 2012; Segaert i sur, 2017).

Apsorpcija glukokortikoida pokazuje razlike ovisno o mjestu primjene. Najveća je u genitalnom području i kapcima (oko 30%), a najmanja na tabanima (0,05%). Vehikl u kojem se nalazi glukokortikoid također utječe na njegovo djelovanje. Niskolipidne formulacije (kreme) imaju jače djelovanje od viskolipidnih formulacija (masti i lipidima obogaćene kreme). Ostali farmaceutski oblici za topikalnu primjenu uključuju losione, pjene i sprejeve (Uva i sur, 2012).

Osim u monoterapiji, glukokortikoidi se primjenjuju i kao sastavni dijelovi politerapije. Za liječenje psorijaze kombiniraju se s analogima vitamina D, salicilnom kiselinom i retinoidima (Uva i sur, 2012).

1.4. Kromatografija

Kromatografija je tehnika odjeljivanja sastojaka u smjesi pri čemu mobilna faza (tekućina ili plin) nosi sastojke uzorka kroz stacionarnu fazu, a odjeljivanje sastojaka temelji se na različitim brzinama kretanja kroz stacionarnu fazu. Koristi se za odjeljivanje, identifikaciju i kvantifikaciju analita. Razlikuju se dvije vrste kromatografskih tehnika. U kromatografiji na stupcu, stacionarna faza ispunjava usku cijev kroz koju se mobilna faza kreće pod utjecajem tlaka ili gravitacije; u plošnoj kromatografiji, stacionarna faza nanosena je na papir ili ravnu plohu, a mobilna faza se kreće kroz nju pod utjecajem kapilarne sile ili gravitacije (Skoog i sur, 1999).

Kromatografija je izumljena početkom 20. stoljeća kada je ruski botaničar Mikail Semenovič Cvet primjenio tu tehniku za odjeljivanje otopine biljnih pigmenata klorofila i ksantofila prolaskom kroz staklenu kolonu ispunjenu sitnim zrnima kalcijevog karbonata. Odijeljeni sastojci vide se na koloni kao obojene vrpce po čemu je i tehnika dobila svoje ime (grč. chromos=boja, graphein=pisati) (Skoog i sur, 1999).

1.4.1. Kromatografski pojmovi i parametri

Kromatogram je ispis bilo koje funkcije koncentracije analizirane tvari u ovisnosti o vremenu ili volumenu elucije (Skoog i sur, 1999).

Elucija je proces u kojemu mobilna faza ispire analizirane sastojke sa stacionarne faze. Potpuno odjeljivanje sastojaka omogućeno je protjecanjem dovoljne količine mobilne faze kroz kolonu (kod kromatografije na stupcu) (Skoog i sur, 1999).

Vrijeme potrebno analitu da nakon unošenja uzorka stigne u detektor, naziva se vremenom zadržavanja i označava se s t_r . Mrtvo vrijeme t_m predstavlja vrijeme koje je potrebno da sastojak koji se ne zadržava na koloni prođe kroz kolonu (Skoog i sur, 1999).

Kapacitetni faktor, k' , parametar je kojim se opisuje gibanje analita u koloni (Skoog i sur, 1999). Definiran je jednadžbom:

$$k' = K_c * \frac{V_s}{V_m}$$

K_c - omjer raspodjele za analit

V_s – volumen stacionarne faze

V_m – volumen mobilne faze

Kapacitetni faktor može se izračunati i iz kromatograma pri čemu je:

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

U tekućinskoj kromatografiji faktor kapaciteta mijenja se promjenom sastava mobilne faze (Skoog i sur, 1999).

Razlučivanje kolone je kvantitativna mjera koja izražava sposobnost odjeljivanja dvaju sastojaka. Računa se prema formuli:

$$R_s = 1,18 * \frac{t_{rb} - t_{ra}}{w_{b0,5} + w_{a0,5}}$$

t_{ra} , t_{rb} – vrijeme zadržavanja analita a odnosno analita b

$w_{a0,5}$, $w_{b0,5}$ – širina pika na polovici njegove visine za pik analita a odnosno pik analita b

Razlučivanje $> 1,5$ odgovara odjeljivanju sastojaka na osnovnoj liniji (Nigović, 2016b).

Koeficijent selektivnosti neke kromatografske kolone (α) izračunat za dva različita analita pokazuje koliko će dobro ta kromatografska kolona odijeliti te sastojke (Nigović, 2016b).

Računa se po formuli:

$$\alpha = \frac{K_b}{K_a}$$

K_b - omjer raspodjele za snažnije zadržani analit

K_a – omjer raspodjele za slabije zadržani analit

Koeficijent selektivnosti može se izračunati i po formuli:

$$\alpha = \frac{k'_b}{k'_a}$$

k'_b – kapacitetni faktor za snažnije zadržani analit

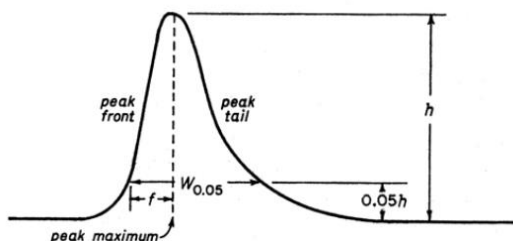
k'_a – kapacitetni faktor za slabije zadržani analit

Simetrijski faktor, A_s , (tailing factor, T, prema USP) mjera je simetrije pika. Računa se po formuli:

$$A_s = \frac{W_{0,05}}{2d}$$

$W_{0,05}$ – širina pika na 1/20 visine pika

d – udaljenost od maksimuma pika do dijela pika na 1/20 visine (slika 3; napomena: f na slici je d u jednadžbi)



Slika 3. Parametri za izračun simetrije pika (www.pharmacopeia.cn)

Kada je $A_s < 1$ govorimo o pojavi *frontinga* pika, a kada je $A_s > 1$, o *tailingu* pika, dok vrijednost od 1 predstavlja savršeno simetrični, Gaussijanski pik. Idealna simetrija pika je u rasponu od 0,95 – 1,15, dok se u primjeni dopuštaju širi rasponi (u JGL od 0,8 – 2,0).

Asimetrija pika može uzrokovati nepreciznost sustava i smanjiti razlučivanje kolone (Nigović, 2016b; www.pharmacopeia.cn).

Djelotvornost kromatografske kolone može se kvantitativno izraziti dvjema srodnim veličinama. To su visina tavana (H) i broj teoretskih tavana (N). Djelotvornost kolone izravno je proporcionalna broju tavana po jedinici duljine kolone. Termin teoretski tavan proizlazi iz rada engleskih znanstvenika A.J.P. Martina i R.L.M. Syngea koji su 1952. nagrađeni Nobelovom nagradom za doprinos razvoju suvremene kromatografije. Prema njihovom modelu, kromatografska kolona sastoji se od niza manjih dijelova, nazvanih teoretski tavan, unutar kojih se uspostavljaju ravnotežni uvjeti raspodjele (Skoog i sur, 1999).

1.4.2. Tekućinska kromatografija (LC)

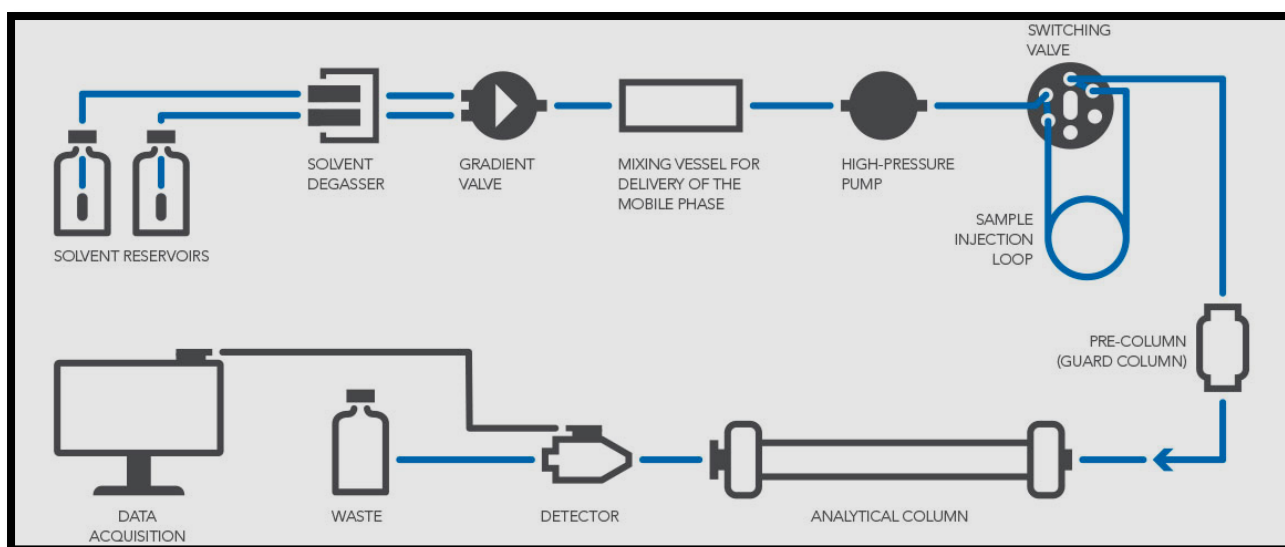
Pojam tekućinska kromatografija odnosi se na sve kromatografske tehnike kod kojih je mobilna faza tekućina - tradicionalnu kromatografiju na stupcu, papirnu i tankoslojnu kromatografiju te modernu tekućinsku kromatografiju (tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC) odnosno ultra visoke djelotvornosti (UPLC) (www.chromatography.co). Kromatografiju na stupcu s tekućom mobilnom fazom prema mehanizmu odjeljivanja možemo podijeliti na 5 vrsta: razdjelna kromatografija (kromatografija u sustavu tekućina-tekućina i kromatografija u sustavu vezane faze), adsorpcijska kromatografija (kromatografija u sustavu tekućina – čvrsta tvar), kromatografija ionske izmjene, kromatografija na gelu (kromatografija isključenjem) i kromatografija stereokemijskih interakcija (Skoog i sur, 1999; Nigović, 2016c).

1.4.2.1. Tekućinska kromatografija visoke (HPLC) i ultra visoke djelotvornosti (UPLC)

Akronim HPLC, koji je upotrijebio prof. Csaba Horvath 1970. godine prvotno se odnosio na pojam visokotlačne tekućinske kromatografije obzirom na činjenicu da je bio potreban visok tlak za osiguravanje protjecanja mobilne faze kroz pakirane čelične kolone. Pumpe koje su korištene u instrumentima mogle su generirati tlak od 35 bara. Napretkom tehnologije, pumpe su mogle osigurati i veće tlakove (do 400 bara), a razvijani su i ostali dijelovi kromatografskog sustava. Kontinuiranim promjenama i napretkom izvedbe, akronim HPLC počeo se od kraja 70-ih godina odnositi na pojam tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i u tom obliku zadržao se do danas. 2004. godine došlo je do daljnjeg napretka u kromatografskim instrumentima i tehnologiji izrade kolona u kojima su se nalazile manje čestice (1,7 μm) od dotadašnjih kolona. Razvijene su i pumpe koje su mogle osigurati tlakove

od 1000 bara. Novi sustav morao je biti i holistički kreiran pa je dobio naziv tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UPLC). Do današnjeg dana uspješno su konstruirane i kolone s česticama manjim od 1 μm te pumpe koje mogu osigurati tlak od 6800 bara što predstavlja perspektivu za daljnju optimizaciju i poboljšanje izvedbe sustava (www.waters.com).

1.4.2.2. Dijelovi uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti



Slika 4. Osnovni dijelovi uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (www.idex-hs.com)

Protok otapala u HPLC sistemu započinje u spremniku mobilne faze. Mobilna faza se prije ulaska u sustav filtrira kako bi se uklonile čestice koje potencijalno mogu oštetiti instrument. Nakon otplinjavanja u degazeru (sustavu za otplinjavanje) i prolaska kroz pumpu, mobilna faza dolazi do sustava za unošenje uzorka koji reproducibilno unosi zadanu količinu uzorka. Budući da uzorak često sadrži sitne čestice koje potencijalno mogu oštetiti instrument, prije punjenja u vialu se filtrira kroz filtere određenih veličina pora i/ili se u analizi koristi pretkolona (zaštitna kolona). Osim zaustavljanja čestica, uloga pretkolone može biti i zadržavanje spojeva koji bi mogli omesti separaciju na koloni. Nakon prolaska kroz kolonu i odjeljivanja analita, mobilna faza i uzorak prolaze kroz detektor i završavaju u otpadu. Signal s detektora bilježi se i obrađuje u sklopu softvera za obradu podataka (www.idex-hs.com).

1.4.2.3. Vrste razdjelne kromatografije

Obzirom na polarnost stacionarne faze i polarnost mobilne faze razlikujemo dvije vrste razdjelne kromatografije. Mikail Semenovič Cvet je u svojim separacijama koristio polarnu stacionarnu fazu (kalcijev karbonat u staklenoj koloni) i relativno nepolarnu mobilnu fazu. Takva je razdjelna kromatografija iz povijesnih razloga nazvana normalno faznom. Tipično je za tu vrstu kromatografije da se kao mobilna faza koriste isključivo organska otapala (nepolarna). Suprotno normalno faznoj kromatografiji, u kromatografiji obrnutih faza stacionarna faza je nepolarna, a mobilna faza relativno polarna. Tipična otapala korištena u mobilnim fazama u HPLC metodama obrnutih faza su voda, metanol i acetonitril. Procjenjuje se da je 75% današnjih HPLC metoda obrnutih faza (www.waters.com).

1.4.3. Stacionarna faza u kromatografiji

Stacionarna faza predstavlja kromatografsku fazu koja je odgovorna za retenciju, odnosno zadržavanje analita koji je nošen kromatografskim sustavom drugom kromatografskom fazom, mobilnom. Može biti u čvrstom, tekućem i gel obliku. Tekućina kao stacionarna faza nalazi se distribuirana unutar ili vezana na čvrstom nosaču. U tekućinskoj kromatografiji često se poistovjećuju termini pakirni materijal i stacionarna faza. Dok prvi predstavlja čestice koje su namijenjene punjenju u kolone, stacionarna faza je finalni produkt koji je u doticaju s mobilnom fazom u kromatografskoj analizi. Čvrsti nosač u stacionarnoj fazi predstavlja materijal koji podupire stacionarnu fazu, ali, u idealnoj situaciji, ne sudjeluje u separaciji. Stacionarna faza može biti imobilizirana na česticama čvrstog nosača ili na unutarnjoj strani stijenke kolone fizičkim i kovalentnim vezama odnosno formirana in-situ polimerizacijom nakon prekrivanja čvrstog nosača. Najviše pakirnih materijala s vezanom fazom pripravlja se reakcijom organoklorsilana sa $-OH$ skupinama na površini silikagela. Ovisno o upotrebljenom reagensu, razlikuje se i polarnost dobivenih stacionarnih faza. Nakon vezanja, stacionarna se faza može dodatno modificirati na krajevima (end-capped stationary phase) (Smith i Marton, 1997).

1.4.3.1. Kromatografske kolone u tekućinskoj kromatografiji visoke i ultra visoke djelotvornosti

Kolone u tekućinskoj kromatografiji napravljene su od čelika ili polimera, a rjeđe su prisutne kao staklene kolone koje sadrže umreženi silika-gel ili polimerne čestice. Dostupne su u različitim dimenzijama kako bi pokrile širok spektar potreba analitičara koji ih koriste: od kratkih i uskih kolona koje se koriste za high-throughput LC/MS analize do preparativnih kolona širine 600 mm za pilotne analize, scale-up i proizvodnju. Dimenzije kolone utječu na osjetljivost i efikasnost analize i ograničavaju količinu uzorka koji može biti injektiran u sustav. Moderne čelične analitičke kolone unutarnjeg su promjera od 1-4,6 mm i dužine od 20-250 mm. Pakirni materijal nalazi se unutar prostora omeđenog fritama od nehrđajućeg čelika (eng. stainless steel frits) i krajevima kolone. Za normalno faznu tekućinsku kromatografiju pakirni materijal je najčešće silika gel dok je kod kromatografije obrnutih faza silika gel nosač za kemijski vezanu stacionarnu fazu. Razlika između HPLC kolona i UPLC kolona je u njihovim dimenzijama i promjeru čestica koje se nalaze unutar kolone. Konvencionalne HPLC kolone sadrže čestice promjera 3-10 μm , dok su čestice korištene u UPLC kolonama manje od 2 μm (Taleuzzaman i sur, 2015; Nigović, 2016c; www.agilent.com).

1.4.4. Razlike između UPLC i HPLC

UPLC zbog smanjene veličine čestica u koloni osigurava bržu analizu (ušteta vremena i potrošnje otapala), veću osjetljivost i veće razlučivanje od HPLC-a. Teorijsku podlogu za razmatranje takvih rezultata predstavlja Van-Deemterova jednađba (jednađba ispod odlomka, slika 5). Istodobno sa smanjenjem veličine čestica, dolazi i do povećanja tlaka u koloni. Dok konvencionalne HPLC kolone rade na tlakovima do 400 bara, UPLC kolone podnose tlakove i do 1300 bara. Efekt povećanja tlaka može se umanjiti radom na većim temperaturama čime se reducira viskoznost mobilne faze i upotrebom monolitnih kolona koje smanjuju otpor protoku mobilne faze (Taleuzzaman i sur, 2015; Nigović, 2016c).

Van Deemterova jednadžba za tekućinsku kromatografiju:

$$H = \frac{A}{1 + C_m/v^2} + \frac{B}{v} + C_s v + C_m v^2$$

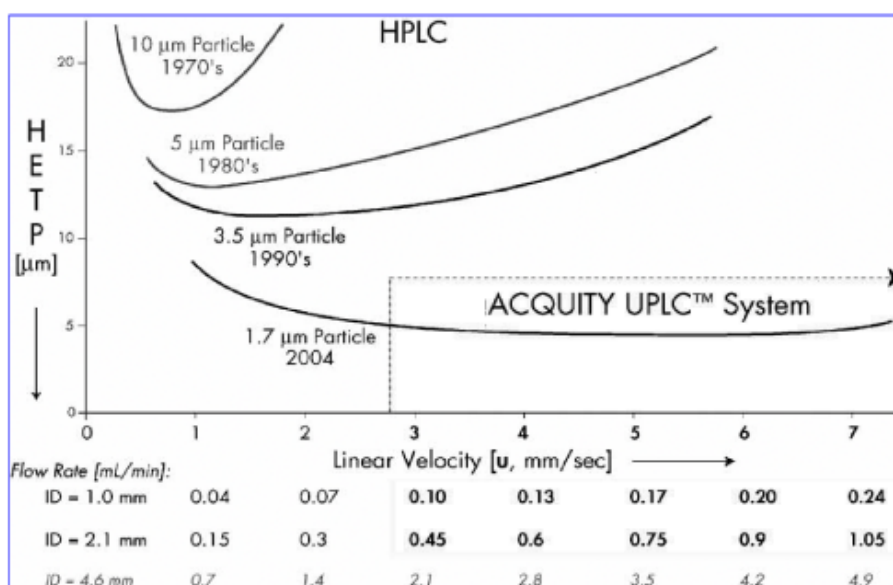
v – linearna brzina mobilne faze

A – „vrtložna“ difuzija

B – brzina difuzije u mobilnoj fazi

C_s - otpor prijenosu mase molekule u stacionarnoj fazi

C_m – otpor prijenosu mase ovisan o veličini i obliku čestice stacionarne faze i brzini difuzije molekule u mobilnoj fazi



Slika 5. Grafički prikaz ovisnosti HETP (visina ekvivalentna teorijskom tavanu) o lineranoj brzini protoka mobilne faze i veličini čestica stacionarne faze na temelju Van-Deemterove jednadžbe: manje čestice osiguravaju manju visinu teoretskog tavana, a time i efikasniju separaciju (Taleuzzaman i sur, 2015)

1.4.5. Mobilna faza u kromatografiji

Mobilna faza u kromatografiji predstavlja fluid koji prolazi kroz stacionarnu fazu u definiranom smjeru. Može biti tekućina (tekućinska kromatografija), plin (plinska kromatografija) ili superkritični fluid (SF kromatografija) (goldbook.iupac.org.).

U tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti, izbor otapala u mobilnoj fazi određen je svojstvima tog otapala i kompatibilnosti s ispitivanim uzorkom te vrstom kromatografije (normalno fazna ili obrnuto fazna). Faktori koji se razmatraju su indeks polarnosti, mješljivost s ostalim otapalima, topljivost uzorka u otapalu, kemijska inertnost, apsorbancija u UV spektru i toksičnost. Indeks polarnosti otapala indicira sposobnost otapala da eluira analit s kolone (stacionarne faze). Tijekom analize, sastav mobilne faze može biti konstantan (izokratna elucija) ili promjenjiv (gradijentna elucija). Sastav mobilne faze u gradijentnoj eluciji može se mijenjati kontinuirano ili skokovito. Sva upotrijebljena otapala koja se koriste u analizama moraju biti analitičkog stupnja čistoće HPLC razreda kako bi se izbjegle interferencije u analizi zbog prisutnih nečistoća (Ho i Stuart, 2003).

Mobilna faza može sadržavati i aditive. To su supstancije koje su dodane kako bi poboljšale separaciju i olakšale detekcijske karakteristike analita (primjerice kompetirajuća baza koje smanjuje efekte otkrivenih silanolnih grupa, kelirajući agens koji veže metalne ione ili UV-apsorbirajuća tvar koja omogućuje indirektnu fotometrijsku detekciju). U aditive ubrajamo i kiseline i baze kao i puferske sustave. pH mobilne faze može značajno utjecati na jakost interakcija između ionizabilnog analita i stacionarne faze i tako skratiti ili produljiti njegovo vrijeme zadržavanja (Majors i Car, 2001; www.chromacademy.com).

1.4.6. Detektori

Detektori u tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti dizajnirani su tako da koriste fizikalna i kemijska svojstva analita i/ili mobilne faze na jedan od 4 načina: mjerenje bulk svojstava ili diferencijalno mjerenje, mjerenje specifičnog odgovora analita, modifikacija mobilne faze i korištenje spregnute tehnike. Detektori bulk svojstava najuniverzalniji su HPLC detektori koji mjere razlike u odgovorima mobilne faze sa i bez uzorka. Oni reagiraju na sve analite u uzorku dajući važnost odjeljivanju sastojaka na koloni, ali su zbog toga limitirani osjetljivošću. Primjer za ovu vrstu je detektor indeksa refrakcije. Detektori koji mjere specifičan odgovor analita odgovaraju na neko jedinstveno svojstvo analita. Primjer za ovu vrstu je UV detektor koji mjeri apsorbanciju na određenoj valnoj duljini. Smatra se specifičnim za molekule s kromoforima, ali pri valnim duljinama manjim od 210 nm apsorbiraju i skoro sve organske supstancije tako da je zapravo univerzalan. Drugi analit specifični detektori su fluorescencijski, elektrokemijski i detektor koji mjeri vodljivost. Detektori koji se baziraju na promjene mobilne faze (post-kolonski) induciraju promjene u

svojstvima analita, primjerice stvarajući suspendirane čestice u plinovitoj fazi. Primjer za ovu vrstu je detektor raspršenja svjetla u uparenom uzorku ELSD (od eng. evaporative light-scattering detector). Posebnu vrstu detekcije predstavljaju spregnute tehnike, gdje se zasebna analitička tehnika povezuje s HPLC sustavom. Najčešći takav spregnuti sustav predstavlja LC-MS (masena spektrometrija). Ostale spregnute tehnike su LC-IR (infracrvena spektrometrija) i LC-NMR (nuklearna magnetska rezonancija). Pri odabiru detektora potrebno je razmotriti svojstva analita, odnosno uzorka i mobilne faze. Tražene kvalitete koja treba zadovoljiti potencijalni detektor su visoka osjetljivost i reproducibilnost, specifičan odgovor na analit, tj. odgovor na sve prisutne analite u uzorku, široko radno područje i linearan odgovor, neosjetljivost na male promjene u temperaturi i sastavu mobilne faze, neovisan odgovor o sastavu mobilne faze. Osim toga, ne smije uzrokovati post-kolonsko širenje pika, mora biti nedestruktivan u slučaju primjene HPLC-a u preparativne svrhe te osiguravati brz odgovor i pouzdanu kvalitativnu (vrijeme izlaska) i kvantitativnu informaciju detektiranog pika (Swartz, 2010).

1.4.7. Kvantitativna analiza u kromatografiji

Kvantitativna analiza u kromatografiji provodi se na temelju pretpostavke da je odgovor detektora proporcionalan količini analita.

U metodi s vanjskim standardom (sin. „Single–point“ kalibracija) koncentracija analita određuje se iz površine ili visine pripadajućeg pika¹ usporedbom s površinom ili visinom pika poredbene otopine (Nigović, 2016b).

Metoda s unutarnjim standardom uključuje dodatak poznate količine unutarnjeg standarda otopini uzorka s nepoznatom količinom analita koji se određuje te dodatak iste količine unutarnjeg standarda otopini poredbene tvari. Koncentracija ispitivane tvari određuje se usporedbom omjera površine ili visine pika ispitivane tvari i unutarnjeg standarda s omjerom površine ili visine pika poredbene tvari i unutarnjeg standarda (Nigović, 2016b).

U metodi kalibracije pripravlja se niz poredbenih otopina različitih koncentracija. Iz odnosa izmjerene površine ili visine pika i pripadajuće koncentracije izračuna se kalibracijska

¹ Površina pika ne ovisi o utjecajima širenja zone kao visina pika stoga je pouzdaniji parametar za kvantitativnu analizu

funkcija. Koncentracija analita izračunava se iz inverzne funkcije na temelju izmjerenog signala (Nigović, 2016b).

Metoda ukupne površine (sin. postupak normalizacije) izračunava postotak sadržaja iz omjera površine pika određivane tvari i ukupne površine svih pikova. Računa se po formuli:

$$c_x = \frac{\frac{A_x}{f_x}}{\sum \left(\frac{A_i}{f_i} \right)}$$

$A_{x/i}$ – površina pika analita/ površina svih pikova

$f_{x/i}$ – faktor odgovora za analit/ faktor odgovora za sve pikove

Faktor odgovora je relativna veličina koja predstavlja odnos površine pika analita prema površini pika poredbene tvari uz propisane uvjete. Izražava osjetljivost detektora za ispitivanu tvar u odnosu na poredbenu tvar (Nigović, 2016b).

Za primjenu metode ukupne površine sve sastavnice moraju eluirati, odgovor detektora mora biti linearan s koncentracijom i mora se propisati granica za površinu pikova koji nisu uključeni u računanje ukupnog zbroja površine svih pikova (Nigović, 2016b).

Metoda standardnog dodatka koristi se kada je znatan utjecaj matrice na određivanje analita. Analizira se ispitivana otopina bez dodatka standarda i serija otopina s porastom količine analita (dodatkom standarda). Sadržaj analita odredi se ekstrapolacijom na temelju odnosa površine pika analita prema poznatim koncentracijama otopina standarda (Nigović, 2016a).

1.5. Vrednovanje procesa čišćenja

Vrednovanje procesa čišćenja (sin. validacija čišćenja) predstavlja dokumentiranu evidenciju visokog stupnja pouzdanosti da odabrana metoda čišćenja udovoljava regulatornim zahtjevima za čistoću opreme na način da mjereni parametri ne prelaze dozvoljene limite. Primarno se validiraju metode čišćenja opreme u proizvodnji u farmaceutskoj industriji. Osim regulatornih zahtjeva, validacija čišćenja provodi se i kako bi se spriječila kontaminacija sljedećeg proizvoda zbog ostataka iz proizvodnje prethodnog. Ti ostaci mogu predstavljati aktivnu supstanciju ili ekscipijense iz prethodnog proizvoda, mikrobiološka onečišćenja, različite materijale korištene u proizvodnji ili onečišćenja zbog sredstava korištenih za

čišćenje (najčešće detergents). Validacija čišćenja provodi se kod inicijalne kvalifikacije procesa i opreme, u slučaju kritične promjene u proceduri čišćenja ili kod promjene sredstva za čišćenje te promjena u formulaciji proizvoda nakon kojeg se vrši validacija čišćenja (ako su te promjene značajne). Često se kod vrednovanja procesa čišćenja proizvodi grupiraju prema sličnostima u formulacijama, načinu proizvodnje i procesu čišćenja. Predstavnik grupe okarakteriziran kao „najlošiji slučaj“ odabire se za razvoj i validaciju metode koja će demonstrirati čistoću opreme. Na temelju rezultata za odabrani proizvod, validacija se smatra reprezentativnom i za ostale predstavnike grupe. Mjesta na opremi koja se odabiru za uzorkovanje trebaju uključivati najnedostupnije prostore na opremi koji se najteže čiste. Na opremi se definiraju kritična mjesta i vruće točke (tzv. hotspotovi). Hotspotovi predstavljaju lokacije koje se prljaju tijekom procesa proizvodnje i teško ih je očistiti dok su kritične točke lokacije koje će u slučaju neučinkovitog čišćenja sigurno kontaminirati sljedeći proizvod. Najčešće metode uzorkovanja u validaciji čišćenja su bris i ispirak. Uzorkovanje brisom uključuje mehaničko skidanje analita s površine pomoću adsorptivnih materijala. Prednosti ove metode su učinkovito skidanje analita s površine, kompatibilnost s većinom materijala, ekonomičnost i široka dostupnost, mogućnost uzorkovanja na točno definiranim mjestima i primjenjivost i na mikrobiološke nečistoće te ostatke sredstava za čišćenje. Nedostaci brisa su invazivnost i mogućnost otpuštanja vlakana, moguća ovisnost rezultata o primjenjenoj tehnici analize, utjecaj vrste vlakana na povrat analita i specifičnost metode te otežan pristup velikim, kompleksnim i teško dostupnim prostorima. 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 procesa. Nedostatci ove metode uzorkovanja su limitirana informacija o stvarnoj čistoći opreme, niža osjetljivost, mogućnost nehomogene distribucije ostataka unutar opreme što daje nereprezentativan rezultat u analizi, nemogućnost detekcije lokacija ostataka, kritičnost volumena ispirka za točnost rezultata i poteškoće u definiranju strategije kontrole određenih mjesta na opremi.

Za potrebe određivanja limita u analitičkoj metodi provjere čišćenja, treba se definirati maksimalni dozvoljeni prijenos tvari (MAC, od eng. maximum allowable carryover) prethodno proizvedenog lijeka u sljedeću proizvodnju nekog drugog lijeka. MAC može biti definiran u odnosu na terapijsku dozu lijeka za koje se vrši provjera čišćenja ili na temelju 10 ppm kriterija (maksimalno 10 ppm ostatka prethodno proizvedenog lijeka u sljedećem lijeku).

Analitičke metode koje se koriste u validaciji čišćenja moraju zadovoljiti određene kriterije: trebaju detektirati i odrediti analit u koncentracijama koje odgovaraju kriteriju prihvatljivosti, moraju detektirati i odrediti analit u prisutnosti drugih sastojaka (materijala) koji se mogu naći u uzorku i trebaju uključivati mogućnost pretvorbe rezultata na 100% vrijednost ako je povrat analita izvan dopuštenog područja. Metode koje se primjenjuju za provjeru čišćenja mogu biti specifične i nespecifične. Nespecifične metode detektiraju bilo koju sastavnicu u uzorku koja daje određen odgovor (pr. pH, vodljivost, TOC²) dok specifične reagiraju na točno određenu supstanciju. Najčešće primjenjivana analitička tehnika kod specifičnih metoda je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) (Narayana Murthy i Chitra, 2013).

1.6. Validacija analitičke metode

Validacijom analitičkog postupka utvrđuje se i dokumentira prikladnost analitičkog postupka za određenu primjenu. Validacija analitičkog postupka jamči da će se u propisanim uvjetima njegove primjene dobiti valjani rezultati. Definicija, terminologija i metodologija postupka validacije analitičke metode opisane su u tripartitnom vodiču Međunarodne konferencije o harmonizaciji tehničkih zahtjeva za registraciju farmaceutika primjenjenih na ljudima (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use) Q2 (R1) iz 2005. godine. Inicijalni tekst odnosi se na validaciju 4 tipa analitičkih postupaka: identifikacijske testove, kvantitativne testove onečišćenja, limit testove za onečišćenja i postupke za određivanje sadržaja aktivne tvari ili ekscipijensa u ljekovitim tvarima ili ljekovitim proizvodima. Prema regulatornim zahtjevima Dobre proizvođačke prakse (Good manufacturing practice, GMP) i Dobre laboratorijske prakse (Good laboratory practice, GLP) postupci validacije postali su obveza. Osim prilikom razvijanja nove metode, validacija analitičkog postupka provodi se i nakon promjena u sintezi aktivne tvari, promjena u finalnom sastavu proizvoda ili promjena u analitičkoj metodi. Cilj analitičke metode mora biti jasno definiran kako bi se moglo objektivno evaluirati validacijske značajke. Tipični validacijski parametri koji se vrednuju su: točnost, preciznost ili pouzdanost (ponovljivost ili preciznost mjerenja, srednja preciznost i obnovljivost), specifičnost/ selektivnost, limit detekcije, limit kvantifikacije, linearnost i radno područje. Izdržljivost (sin. robustnost, otpornost) nije terminološki definirana kao dio validacije, no stoji napomena da taj parametar treba razmotriti unutar razvoja analitičke metode. Ovisno o vrsti

² Total organic carbon = ukupni organski ugljen

analitičkog postupka, ispituju se različiti validacijski parametri. U metodama za određivanje sadržaja ispituje se točnost, preciznost, specifičnost/selektivnost, linearnost te radno područje. Analitički postupak razvija se i validira sve dok validacijski parametri ne zadovolje zahtjeve predviđene određenim propisima. Na temelju usporedbe dobivenih rezultata s postavljenim kriterijima privatljivosti, donosi se odluka o prihvatanju analitičke metode ili nastavku razvoja (CPMP, 1995; Nigović i sur, 2014).

Validacija analitičke metode mora biti provedena sukladno definiranom validacijskom protokolu koji sadrži pisane procedure za ispitivanje te granice prihvatljivosti za pojedine parametre. Procedure moraju biti opisane u detalje kako bi ih obučeni analitičar mogao pouzdano izvesti. Trebaju sadržavati kromatografske uvjete (u slučaju kromatografskih ispitivanja) odnosno opis mjernih uređaja i instrumentalnih parametara analize, upotrebene reagentne i standarde, načine pripreme otopina te formule za izračun rezultata i prikladnosti sustava (Nigović i sur, 2014; WHO, 2016).

1.6.1. Terminologija i metodologija validacije analitičke metode

Preciznost ili pouzdanost analitičke metode pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja dobivenih višestrukim uzorkovanjem istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Preciznost se može promatrati na tri razine: ponovljivost (engl. *repeatability*), srednja preciznost (engl. *intermediate precision*) i obnovljivost (engl. *reproducibility*). Ponovljivost izražava podudaranje rezultata dobivenih istom metodom pod istim uvjetima u kratkom vremenskom intervalu. Može se odrediti na minimalno 3 koncentracijske razine u triplicatu mjerenja ili na 6 mjerenja pri 100% vrijednosti testne koncentracije. Srednja preciznost iskazuje odstupanje rezultata dobivenih pod različitim uvjetima u istom laboratoriju (različiti dani, analitičari, instrumenti), dok obnovljivost označava odstupanje rezultata dobivenih u različitim laboratorijima. Preciznost se izražava statističkim veličinama kao standardno odstupanje, relativno standardno odstupanje (RSD (%)) ili raspon pouzdanosti oko srednje vrijednosti (Nigović i sur, 2014; WHO, 2016).

Specifičnost analitičke metode njezina je sposobnost da nedvojbeno razlikuje analit u prisustvu ostalih komponenti u uzorku. U praksi je to vrlo rijetko, pa se češće govori o selektivnosti analitičke metode. Selektivnost je definirana kao mogućnost metode da točno odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenata uzorka, poput onečišćenja ili

razgradnih produkata, pomoćnih tvari ili, općenito, matrice uzorka. U kromatografskim metodama za određivanje sadržaja ili onečišćenja reprezentativni kromatogrami trebaju dokazati specifičnost/selektivnost, a pojedine komponente trebaju biti prikladno označene. Kritične separacije trebaju biti detaljno istražene, a specifičnost/selektivnost treba biti dokazana razlučivanjem između dvije komponente koje eluiraju najbliže jedna drugoj (CPMP, 1995; Nigović i sur, 2014).

Linearnost analitičke metode predstavlja njezinu sposobnost da unutar određenog intervala daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Linearnost metode utvrđuje se kroz tri do šest mjerenja primjenom najmanje pet različitih koncentracija analita. Grafičkim prikazom ovisnosti izmjenjenog analitičkog signala o koncentraciji analita dobiva se kalibracijska krivulja. Linearnost metode se izražava koeficijentom korelacije regresijskog pravca k , a za prikaz se koriste i jednačba regresijskog pravca sa odsječkom na y-osi i rezidualna suma kvadrata (koeficijent determinacije) (CPMP, 1995; Nigović i sur, 2014).

Radno područje mjerenja označava raspon između gornje i donje koncentracije analita u uzorku, uključujući i granične vrijednosti, unutar kojega primijenjena analitička metoda ima zadovoljavajuću točnost, preciznost i linearnost (Nigović i sur, 2014).

Točnost analitičke metode pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Za utvrđivanje točnosti provode se najmanje tri mjerenja uzorka za najmanje tri koncentracije u radnom području metode. Točnost analitičke metode izražava se kao analitički prinos/povrat (eng. recovery) ili razlikom između pronađene i stvarne vrijednosti zajedno s intervalom pouzdanosti. Analitički prinos definiran je jednačbom:

$$R = \frac{x_{sr}}{x_{st}} * 100$$

x_{sr} – srednja izmjerena vrijednost analita u uzorku

x_{st} – stvarna vrijednost analita u uzorku

Točnost se određuje u radnom području metode nakon ispitivanja selektivnosti, linearnosti i preciznosti (CPMP, 1995; Nigović i sur, 2014).

Granica dokazivanja (engl. *limit of detection*, LOD) je najniža koncentracija analita koja se može dokazati, ali ne i odrediti, prema zadanim uvjetima metode.

Granica određivanja (engl. *limit of quantitation*, LOQ) je najniža koncentracija analita u uzorku i moguće ju je odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri propisanim uvjetima metode.

LOD i LOQ se najčešće određuju određuju iz omjera signala i šuma (LOD = minimalno 3:1 ili 2:1; LOQ = minimalno 10:1) ili iz standardnog odstupanja signala i nagiba kalibracijskog pravca (Nigović i sur, 2014).

Izdržljivost (sin. robustnost, otpornost) analitičke metode (engl. *robustness*) mjera je njezine sposobnosti da ostane nepromijenjena pod utjecajem malih, ali namjernih, promjena parametara metode. Indikator je pouzdanosti analitičke metode tijekom njezine normalne primjene uz male promjene uvjeta u kojima se realno provode analize. Procjenjuje se variranjem jednog parametra, dok ostali ostaju nepromijenjeni, a njegov izbor ovisi o samoj metodi. U slučaju utvrđivanja neprikladnosti metode zbog određene promjene parametara, taj parametar treba biti strogo kontroliran i izjava o predostrožnosti treba biti uključena u proceduru (CPMP, 1995; Nigović i sur, 2014).

2. Obrazloženje teme

Betametazondipropionat aktivna je komponenta topičke formulacije čija proizvodnja je izabrana kao najsloženiji slučaj procesnih uvjeta prilikom izrade polučvrstih oblika. Potrebno je razviti i validirati metodu koja će moći pouzdano odrediti sadržaj betametazondipropionata zaostao nakon procesa čišćenja, prema interno traženim zahtjevima unutar odjela Razvojna analitika JGL d.d. Na temelju postavljenih zahtjeva, izračunati su limiti u ispirku i na brisu. Koncentracijski limit za bris iznosi 0,0038 µg/mL (uz ekstrakcijski volumen od 25 mL), a za ispirak homogenizatora 0,00567 µg/mL, što je i najniža koncentracijska granica za ispirke instrumenata i spremnika. Postavljene granice zahtijevaju vrlo osjetljivu metodu za vrednovanje procesa čišćenja, stoga je kod pretraživanja znanstvene literature te pregleda eksperimentalnih analitičkih metoda JGL-a naglasak stavljen na limit kvantifikacije kao kritični parametar u odabiru potencijalne metode za vrednovanje procesa čišćenja. Nakon razvoja, potrebno je metodu validirati prema definiranim uputama validacijskog protokola.

3. Materijali i metode

3.1. Standardi

- Betametazondipropionat, radni standard, sadržaj: 100,4 %, sadržaj vode: 0,4 %, KKRST-018/17

3.2. Reagensi

- Voda za kromatografiju R, Aqua solutions, Middleborough, Massachusetts, SAD
- Acetonitril za kromatografiju R, J.T. Baker, Avantor, Center Valley, SAD
- Aceton R, *pro analysis*, Carlo Erba Reagenti, Milano, Italija
- Etanol (96%) R, *pro analysis*, Carlo Erba Reagenti, Milano, Italija
- Voda R (destilirana, deionizirana), Nirosta, Osijek, Hrvatska
- Sredstvo za čišćenje Cosa CIP 95, k.br. 5095AP1101, Ecolab, Saint Paul, Minnessota, SAD
- Sredstvo za čišćenje Cosa CIP 72, k.br. 4085AP0501, Ecolab, Saint Paul, Minnessota, SAD

3.3. Aparatura i materijali

- Tekućinski kromatograf Agilent Infinity series 1290 s PDA detektorom, Agilent, Santa Clara, Kalifornija, SAD
- Analitička vaga MX 5, Mettler Toledo, Columbus, Ohio, SAD
- Analitička vaga XP 205, Mettler Toledo, Columbus, Ohio, SAD
- Sustav za pročišćavanje vode, Aqua solutions, Middleborough, Massachusetts, SAD
- Sustav za pročišćavanje vode NIRO-VV-10-LAB, Nirosta, Osijek, Hrvatska
- Tresilica GFL 3006, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Njemačka
- Termostatirana ultrazvučna kupelj Bandelin Sonorex RK 1028H, Bandelin Electronic, Berlin, Njemačka
- Centrifuga Cetronic BL-II, JP Selecta, Abrera, Barcelona, Španjolska
- Kolona Zorbax Extend-C18, 100 x 3,0 mm, 1,8µm, oznaka: RA-K-C18-58, Agilent Santa Clara, Kalifornija, SAD
- Kolona Zorbax Eclipse XDB C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm, oznaka: RA-K-C18-9(2), Agilent, Santa Clara, Kalifornija, SAD
- Automatska pipeta Proline Plus Mechanical Pipette 728070 (100-1000µL), Sartorius Weighing Technology, Goettingen, Njemačka
- Bris Large Alpha Sampling Swabs, TX715, k.br. 164411, ITW Texwipe, Kernersville, Sjeverna Karolina, SAD

- Inoks ploča
- Inoks čaša
- Silikon pločica Advanta Pure APSW-P, New Age Industries, Southampton, Pennsylvania, SAD
- Silikon pločica Plutone Bio hose, Industrie Plastiche Lombarde, Besozzo, Italija

3.4. Placebo uzorci

- Placebo *Betazon® krema* bez betametazondipropionata, k.br. BK-125-250717, Jadran galenski laboratorij, Rijeka; datum izrade 25.07.2017.
- Placebo *Betazon® mast* bez betametazondipropionata, k.br. BM-126-070717, Jadran galenski laboratorij, Rijeka; datum izrade 07.07.2017.

3.5. Priprema otopina – razvoj metode

Priprema otopina u fazi razvoja arbitrarno je podijeljena u 3 dijela zbog sličnosti/istovjetnosti u imenima pojedinih otopina te zbog lakšeg praćenja njihove pripreme.

3.5.1. Priprema otopina – razvoj 1

Mobilna faza B početne metode/ mobilna faza³ (ACN : H₂O = 60 : 40 (% V/V))

Za pripremu 1L mobilne faze u menzuri odmjeri 600 mL acetonitrila za kromatografiju R i 400 mL vode za kromatografiju R te ih izmiješaj u Erlenmeyerovoj tikvici.

Mobilne faza A početne metode (ACN : H₂O = 40 : 60 (% V/V))

Za pripremu 1L mobilne faze A u menzuri odmjeri 400 mL acetonitrila za kromatografiju R i 600 mL vode za kromatografiju R te ih izmiješaj u Erlenmeyerovoj tikvici.

Osnovna otopina betametazondipropionata (c = 0,375 µg/mL)

15 mg radnog standarda betametazondipropionata otopi u 200,0 mL mobilne faze i dobro promućkaj. 1,0 mL te otopine razrijedi vodom za kromatografiju R do 200,0 mL.

³ U pripremama otopina, za otapanje i razrjeđivanje, korištena je ova mobilna faza u sva 3 potpoglavlja

Poredbena otopina (c = 0,0075 µg/mL)

2,0 mL osnovne otopine betametazondipropionata razrijedi vodom za kromatografiju R do 100,0 mL. Profiltriraj tako dobivenu otopinu kroz PTFE filter 0,45 µm.

LOQ otopina (c = 0,00469 µg/mL)

2,5 mL osnovne otopine betametazondipropionata razrijedi vodom za kromatografiju R do 200,0 mL. Profiltriraj tako dobivenu otopinu kroz PTFE filter 0,45 µm.

LOQ otopina (c = 0,00469 µg/mL) bez filtriranja

2,5 mL osnovne otopine betametazondipropionata razrijedi vodom za kromatografiju R do 200,0 mL.

Poredbena otopina (c = 0,0075 µg/mL) bez filtriranja

2,0 mL osnovne otopine betametazondipropionata razrijedi vodom za kromatografiju R do 100,0 mL.

Poredbena otopina (c = 0,0075 µg/mL) – ispitivanje utjecaja filtera

2,0 mL osnovne otopine betametazondipropionata razrijedi vodom za kromatografiju R do 100,0 mL. Profiltriraj tako dobivenu otopinu kroz⁴ PTFE filter 0,45 µm/ PTFE SRP 0,2 µm/ PTFE 0,2 µm/ RC 0,2 µm/ GHP 0,2µm/ PES 0,22 µm/ PVDF 0,45 µm/ PA 0,45 µm/ GF 0,7 µm.

Otopina placebo Betazon® kreme

U odmjernu tikvicu od 50 mL izvaži 2,15 g placebo Betazon® kreme bez betametazondipropionata, dodaj 20 mL mobilne faze te zagrijavaj u ultrazvučnoj kupelji zagrijanoj na 60°C dok se masna faza ne rastali (oko 5 minuta) uz povremeno mućkanje. Potom izvadi iz kupelji i snažno promućkaj (oko 5 minuta). Zagrijavanje i mućkanje ponovi još 2 puta. Uzorak ohladi na sobnu temperaturu i dopuni mobilnom fazom do oznake. Dio tako pripremljene otopine centrifugiraj na 11000 okretaja 15 minuta i odpipetiraj 1,0 mL supernatanta u odmjernu tikvicu od 50,0 mL te nadopuni vodom R do oznake. 1,0 mL tako dobivene otopine razrijedi vodom R do 50,0 mL.

⁴ Otopina je filtrirana prije punjenja u viala kroz različite filtere

Otopina placebo Betazon® masti

U odmjernu tikvicu od 50 mL izvaži 2,15 g placebo Betazon® masti bez betametazondipropionata, dodaj 20 mL mobilne faze te zagrijavaj u ultrazvučnoj kupelji zagrijanoj na 70°C dok se masna faza ne rastali (oko 5 minuta) uz povremeno mućkanje. Potom izvadi iz kupelji i snažno promućkaj (oko 5 minuta). Zagrijavanje i mućkanje ponovi još 2 puta. Uzorak ohladi na sobnu temperaturu i dopuni mobilnom fazom do oznake. Uzorak drži 15 minuta na temperaturi od -20°C. Dio tako pripremljene otopine centrifugiraj na 11000 okretaja 15 minuta i odpipetiraj 1,0 mL supernatanta u odmjernu tikvicu od 50,0 mL te nadopuni vodom R do oznake. 1,0 mL tako dobivene otopine razrijedi vodom R do 50,0 mL.

Slijepa proba bris

Namoči bris vodom za kromatografiju R i stavi ga u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL, dodaj 15,0 mL vode za kromatografiju R i tikvicu stavi 20 minuta na tresilicu na 150 rpm.

Slijepa proba bris – inoks

Namoči bris vodom za kromatografiju R i prebriši prostor veličine 10 cm x 10 cm (100 cm²) na čistoj i suhoj inoks ploči. Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL, dodaj 15,0 mL vode za kromatografiju R i tikvicu stavi 20 minuta na tresilicu na 150 rpm.

Slijepa proba bris – silikon Advanta Pure

Namoči bris vodom za kromatografiju R i prebriši čistu i suhu silikonsku pločicu Advanta Pure površine 10 cm x 10 cm (100 cm²). Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL, dodaj 15,0 mL vode za kromatografiju R i tikvicu stavi 20 minuta na tresilicu na 150 rpm.

Slijepa proba bris – silikon Plutone Bio

Namoči bris vodom za kromatografiju R i prebriši čistu i suhu silikonsku pločicu Plutone Bio površine 28 cm x 3,5 cm (98 cm²). Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL, dodaj 15,0 mL vode za kromatografiju R i tikvicu stavi 20 minuta na tresilicu na 150 rpm.

Otopina Cosa CIP 72

1,0 mL detergenta Cosa CIP 72 razrijedi vodom R do 50,0 mL.

1,0 mL dobivene otopine razrijedi vodom R do 200,0 mL.

Osnovna otopina Cosa CIP 95

1,5 mL detergenta Cosa CIP 95 razrijedi vodom R do 50,0 mL.

1,0 mL dobivene otopine razrijedi vodom R do 200,0 mL.

Otopina za injektiranje Cosa CIP 95

2,0 mL osnovne otopine Cosa CIP 95 razrijedi vodom R do 100,0 mL.

Poredbena otopina (c = 0,0075 µg/mL) cijepljena s otopinom Cosa CIP 95

2,0 mL osnovne otopine betametazondipropionata i 2,0 mL osnovne otopine Cosa CIP 95 razrijedi vodom R do 100,0 mL.

Matična otopina betametazondipropionata (c = 75 µg/mL)

15 mg radnog standarda betametazondipropionata otopi u 200,0 mL mobilne faze i dobro promućkaj.

Otopina betametazondipropionata za faktor iskoristivosti brisa (c = 0,75 µg/mL)

1,0 mL matične otopine betametazondipropionata razrijedi vodom za kromatografiju R do 100,0 mL.

Cijepljeni bris – silikon Advanta Pure (c = 0.00096 µg/cm², tj. 0.0064 µg/mL); sredstvo za skidanje: voda za kromatografiju R; otapalo: voda za kromatografiju R

Pomoću pipete kapljično nanesi 128 µL otopine betametazondipropionata za faktor iskoristivosti brisa na silikonsku pločicu Advanta Pure površine 10 cm x 10 cm (100 cm²) i ostavi sušiti na sobnoj temperaturi. Namoči bris vodom za kromatografiju R i prebriši silikonsku pločicu. Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL, dodaj 15,0 mL vode za kromatografiju R i tikvicu stavi 20 minuta na tresilicu na 150 rpm.

Cijepljeni bris – silikon Advanta Pure (c = 0.00096 µg/cm², tj. 0.0064 µg/mL); sredstvo za skidanje: mobilna faza; otapalo: voda za kromatografiju R

Pomoću pipete kapljično nanesi 128 µL otopine betametazondipropionata za faktor iskoristivosti brisa na silikonsku pločicu Advanta Pure površine 10 cm x 10 cm (100 cm²) i ostavi sušiti na sobnoj temperaturi. Namoči bris mobilnom fazom i prebriši silikonsku pločicu. Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL, dodaj 15,0 mL vode za kromatografiju R i tikvicu stavi 20 minuta na tresilicu na 150 rpm.

Cijepljeni bris – (0.0064 µg/mL) (u vodi, tresilica)

Pomoću pipete kapljično nanesi 128 µL otopine betametazondipropionata za faktor iskoristivosti brisa na bris. Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL, dodaj 15,0 mL vode za kromatografiju R i tikvicu stavi 20 minuta na tresilicu na 150 rpm.

Cijepljeni bris – (0.0064 µg/mL) (u vodi, ultrazvuk)

Pomoću pipete kapljično nanesi 128 µL otopine betametazondipropionata za faktor iskoristivosti brisa na bris. Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL, dodaj 15,0 mL vode za kromatografiju R i tikvicu stavi 10 minuta u ultrazvučnu kupelj.

Cijepljeni bris – silikon Advanta Pure ($c = 0.00096 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, tj. 0.0064 µg/mL); sredstvo za skidanje: etanol (96%) R; otapalo: voda za kromatografiju R

Pomoću pipete kapljično nanesi 128 µL otopine betametazondipropionata za faktor iskoristivosti brisa na silikonsku pločicu Advanta Pure površine 10 cm x 10 cm (100 cm²) i ostavi sušiti na sobnoj temperaturi. Namoči bris etanolom (96%) R i prebriši silikonsku pločicu. Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL, dodaj 15,0 mL otapala i tikvicu stavi 20 minuta na tresilicu na 150 rpm.

Cijepljeni bris – silikon Advanta Pure ($c = 0.00096 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, tj. 0.0064 µg/mL); sredstvo za skidanje: acetonitril za kromatografiju R; otapalo: voda za kromatografiju R

Pomoću pipete kapljično nanesi 128 µL otopine betametazondipropionata za faktor iskoristivosti brisa na silikonsku pločicu Advanta Pure površine 10 cm x 10 cm (100 cm²) i ostavi sušiti na sobnoj temperaturi. Namoči bris acetonitriлом za kromatografiju R i prebriši silikonsku pločicu. Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL, dodaj 15,0 mL vode za kromatografiju R i tikvicu stavi 20 minuta na tresilicu na 150 rpm.

10%⁵ otopina EtOH u vodi

10,0 mL etanola (96%) R razrijedi vodom za kromatografiju R do 100,0 mL.

⁵ Postotak ne implicira konačni volumni udio etanola (96%) R u smjesi, već je tako napisan radi jednostavnosti imenovanja otopine; isto se odnosi i na pripreme istoimene otopine u iduća dva potpoglavlja (razvoj 2 i 3), kao i na pripremu 50% otopine EtOH u zadnjem potpoglavlju

Cijepljeni bris – (0.0064 µg/mL) (u 10% otopini EtOH u vodi)

Pomoću pipete kapljično nanesi 128 µL *otopine betametazondipropionata za faktor iskoristivosti brisa* na bris. Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL, dodaj 15,0 mL 10% otopine EtOH u vodi i tikvicu stavi 20 minuta na tresilicu na 150 rpm.

Cijepljeni bris – silikon Advanta Pure (c = 0.00096 µg/cm², tj. 0.0064 µg/mL); sredstvo za skidanje: etanol (96%) R; otapalo: 10% otopina EtOH u vodi

Pomoću pipete kapljično nanesi 128 µL *otopine betametazondipropionata za faktor iskoristivosti brisa* na silikonsku pločicu Advanta Pure površine 10 cm x 10 cm (100 cm²) i ostavi sušiti na sobnoj temperaturi. Namoči bris etanolom (96%) R i prebriši silikonsku pločicu. Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL, dodaj 15,0 mL 10% otopine EtOH u vodi i tikvicu stavi 20 minuta na tresilicu na 150 rpm.

Cijepljeni bris – (0.0064 µg/mL) (u mobilnoj fazi)

Pomoću pipete kapljično nanesi 128 µL *otopine betametazondipropionata za faktor iskoristivosti brisa* na bris. Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL, dodaj 15,0 mL mobilne faze i tikvicu stavi 30 minuta na tresilicu na 150 rpm.

Cijepljeni bris – silikon Advanta Pure (c = 0.096 µg/cm², tj. 0.64 µg/mL); sredstvo za skidanje: mobilna faza; otapalo: voda za kromatografiju R

Pomoću pipete kapljično nanesi 128 µL *matične otopine betametazondipropionata* na silikonsku pločicu Advanta Pure površine 10 cm x 10 cm (100 cm²) i ostavi sušiti na sobnoj temperaturi. Namoči bris mobilnom fazom i prebriši silikonsku pločicu. Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL, dodaj 15,0 mL vode za kromatografiju R i tikvicu stavi 30 minuta na tresilicu na 150 rpm.

Cijepljeni bris – silikon Advanta Pure (c = 0.096 µg/cm², tj. 0.64 µg/mL); sredstvo za skidanje: mobilna faza; otapalo: mobilna faza

Pomoću pipete kapljično nanesi 128 µL *matične otopine betametazondipropionata* na silikonsku pločicu Advanta Pure površine 10 cm x 10 cm (100 cm²) i ostavi sušiti na sobnoj temperaturi. Namoči bris mobilnom fazom i prebriši silikonsku pločicu. Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL, dodaj 15,0 mL mobilne faze i tikvicu stavi 30 minuta na tresilicu na 150 rpm.

Cijepljeni bris – inoks ($c = 0.096 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, tj. $0.64 \mu\text{g}/\text{mL}$); sredstvo za skidanje: mobilna faza; otapalo: voda za kromatografiju R

Pomoću pipete kapljično nanesi $128 \mu\text{L}$ *matične otopine betametazondipropionata* na plohu inoks ploče površine $10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$ (100 cm^2) i ostavi sušiti na sobnoj temperaturi. Namoči bris mobilnom fazom i prebriši inoks. Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL , dodaj $15,0 \text{ mL}$ vode za kromatografiju R i tikvicu stavi 30 minuta na tresilicu na 150 rpm .

Cijepljeni bris – inoks ($c = 0.096 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, tj. $0.64 \mu\text{g}/\text{mL}$); sredstvo za skidanje: mobilna faza; otapalo: mobilna faza

Pomoću pipete kapljično nanesi $128 \mu\text{L}$ *matične otopine betametazondipropionata* na plohu inoks ploče površine $10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$ (100 cm^2) i ostavi sušiti na sobnoj temperaturi. Namoči bris mobilnom fazom i prebriši inoks. Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL , dodaj $15,0 \text{ mL}$ mobilne faze i tikvicu stavi 30 minuta na tresilicu na 150 rpm .

3.5.2. Priprema otopina – razvoj 2

Matična otopina betametazondipropionata ($c = 1,35 \text{ mg}/\text{mL}$)

27 mg radnog standarda betametazondipropionata otopi u mobilnoj fazi i razrijedi do $20,0 \text{ mL}$ mobilnom fazom.

Otopina betametazondipropionata za faktor iskoristivosti brisa ($c = 0,0135 \text{ mg}/\text{mL} = 13,5 \mu\text{g}/\text{mL}$)

$1,0 \text{ mL}$ *matične otopine betametazondipropionata* razrijedi vodom za kromatografiju R do $100,0 \text{ mL}$.

Poredbena otopina ($c=0,27 \mu\text{g}/\text{mL}$)

$1,0 \text{ mL}$ *matične otopine betametazondipropionata* razrijedi vodom za kromatografiju R do $100,0 \text{ mL}$. Potom $1,0 \text{ mL}$ te otopine razrijedi mobilnom fazom do $50,0 \text{ mL}$.

Cijepljeni bris – ($0,2565 \mu\text{g}/\text{mL}$) (u mobilnoj fazi, tresilica)

Pomoću pipete kapljično nanesi $285 \mu\text{L}$ *otopine betametazondipropionata za faktor iskoristivosti brisa* na bris. Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL , dodaj $15,0 \text{ mL}$ mobilne faze i tikvicu stavi 30 minuta na tresilicu na 150 rpm .

Cijepljeni bris – (0,2565 µg/mL) (u mobilnoj fazi, ultrazvuk)

Pomoću pipete kapljično nanesi 285 µL otopine betametazondipropionata za faktor iskoristivosti brisa na bris. Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL, dodaj 15,0 mL MF i tikvicu stavi 15 minuta u ultrazvučnu kupelj s uključenim ultrazvukom.

1% aceton

1,0 mL acetona R razrijedi do 100,0 mL vodom za kromatografiju R.

Poredbena otopina u 1% acetonu (c = 0,27 µg/mL)

1,0 mL matične otopine betametazondipropionata razrijedi vodom za kromatografiju R do 100,0 mL. Potom 1,0 mL te otopine razrijedi 1% acetonom do 50,0 mL.

Cijepljeni bris – (0,2565 µg/mL) (u 1% acetonu)

Pomoću pipete kapljično nanesi 285 µL otopine betametazondipropionata za faktor iskoristivosti brisa na bris. Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL, dodaj 15,0 mL 1% acetona i tikvicu stavi 30 minuta na tresilicu na 150 rpm.

Cijepljeni bris – silikon Advanta Pure (c = 0.0385 µg/cm², tj. 0.2566 µg/mL); sredstvo za skidanje: etanol (96%) R; otapalo: 1% aceton

Pomoću pipete kapljično nanesi 285 µL otopine betametazondipropionata za faktor iskoristivosti brisa na silikonsku pločicu Advanta Pure površine 10 cm x 10 cm (100 cm²) i ostavi sušiti na sobnoj temperaturi. Namoči bris etanolom (96%) R i prebriši silikonsku pločicu. Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL, dodaj 15,0 mL 1% acetona i tikvicu stavi 30 minuta na tresilicu na 150 rpm.

Cijepljeni bris – silikon Advanta Pure (c = 0.0385 µg/cm², tj. 0.2566 µg/mL); sredstvo za skidanje: aceton R; otapalo: 1% aceton

Pomoću pipete kapljično nanesi 285 µL otopine betametazondipropionata za faktor iskoristivosti brisa na silikonsku pločicu Advanta Pure površine 10 cm x 10 cm (100 cm²) i ostavi sušiti na sobnoj temperaturi. Namoči bris acetonom R i prebriši silikonsku pločicu. Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL, dodaj 15,0 mL 1% acetona i tikvicu stavi 30 minuta na tresilicu na 150 rpm.

Cijepljeni bris – silikon Advanta Pure ($c = 0.0385 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, tj. $0.2566 \mu\text{g}/\text{mL}$); sredstvo za skidanje i nakapavanje: etanol (96%) R; otapalo: 1% aceton

Pomoću pipete kapljično nanesi $285 \mu\text{L}$ otopine betametazondipropionata za faktor iskoristivosti brisa na silikonsku pločicu Advanta Pure površine $10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$ (100 cm^2) i ostavi sušiti na sobnoj temperaturi. Nakon sušenja nakapaj na površinu 10 kapi etanola (96%) R, namoči bris etanolom (96%) R i prebriši silikonsku pločicu. Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL, dodaj 15,0 mL 1% acetona i tikvicu stavi 30 minuta na tresilicu na 150 rpm.

Cijepljeni bris – silikon Advanta Pure ($c = 0.0385 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, tj. $0.2566 \mu\text{g}/\text{mL}$); sredstvo za skidanje i nakapavanje: aceton R; otapalo: 1% aceton

Pomoću pipete kapljično nanesi $285 \mu\text{L}$ otopine betametazondipropionata za faktor iskoristivosti brisa na silikonsku pločicu Advanta Pure površine $10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$ (100 cm^2) i ostavi sušiti na sobnoj temperaturi. Nakon sušenja nakapaj na površinu 10 kapi acetona R, namoči bris acetonom R i prebriši silikonsku pločicu. Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL, dodaj 15,0 mL 1% acetona i tikvicu stavi 30 minuta na tresilicu na 150 rpm.

10% otopina EtOH u vodi

10 mL etanola (96%) R dodaj u 90 mL vode za kromatografiju R.

Poredbena otopina u 10% otopini etanola u vodi ($c = 0,27 \mu\text{g}/\text{mL}$)

1,0 mL matične otopine betametazondipropionata razrijedi vodom za kromatografiju R do 100,0 mL. Potom 1,0 mL te otopine razrijedi 10% otopinom EtOH u vodi do 50,0 mL.

Cijepljeni bris – ($0,2565 \mu\text{g}/\text{mL}$) (u 10% otopini EtOH u vodi)

Pomoću pipete kapljično nanesi $285 \mu\text{L}$ otopine betametazondipropionata za faktor iskoristivosti brisa na bris. Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL, dodaj 15,0 mL 10% otopine EtOH u vodi i tikvicu stavi 30 minuta na tresilicu na 150 rpm.

Cijepljeni bris – silikon Advanta Pure ($c = 0.0385 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, tj. $0.2566 \mu\text{g}/\text{mL}$); sredstvo za skidanje: etanol (96%) R; otapalo: 10% otopina EtOH u vodi

Pomoću pipete kapljično nanesi $285 \mu\text{L}$ otopine betametazondipropionata za faktor iskoristivosti brisa na silikonsku pločicu Advanta Pure površine $10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$ (100 cm^2) i ostavi sušiti na sobnoj temperaturi. Namoči bris etanolom (96%) R i prebriši silikonsku

pločicu. Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL, dodaj 15,0 mL 10% otopine EtOH u vodi i tikvicu stavi 30 minuta na tresilicu na 150 rpm.

***Cijepljeni bris – silikon Advanta Pure* ($c = 0.0385 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, tj. $0.2566 \mu\text{g}/\text{mL}$); sredstvo za skidanje: etanol (96%) R; otapalo: 10% otopina EtOH u vodi; metoda s trljanjem**

Pomoću pipete kapljično nanesi 285 μL otopine betametazondipropionata za faktor iskoristivosti brisa na silikonsku pločicu Advanta Pure površine 10 cm x 10 cm (100 cm^2) i ostavi sušiti na sobnoj temperaturi. Dobro namoči bris etanolom (96%) R i prije brisanja protrljaj površinu silikonske pločice, pričekaj 10 s te ju potom prebriši. Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL, dodaj 15,0 mL 10% otopine EtOH u vodi i tikvicu stavi 30 minuta na tresilicu na 150 rpm.

***Cijepljeni bris – silikon Advanta Pure* ($c = 0.0385 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, tj. $0.2566 \mu\text{g}/\text{mL}$); sredstvo za skidanje: etanol (96%) R; otapalo: 10% otopina EtOH u vodi; metoda s 2 brisa**

Pomoću pipete kapljično nanesi 285 μL otopine betametazondipropionata za faktor iskoristivosti brisa na silikonsku pločicu Advanta pure površine 10 cm x 10 cm (100 cm^2) i ostavi sušiti na sobnoj temperaturi. Namoči bris etanolom (96%) R i prebriši silikonsku pločicu. Postupak ponovi 2 puta (razmak između dva brisanja je 1 min). Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL, dodaj 15,0 mL 10% otopine EtOH u vodi i tikvicu stavi 30 minuta na tresilicu na 150 rpm.

***Cijepljeni bris – silikon Advanta Pure* ($c = 0.0385 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, tj. $0.2566 \mu\text{g}/\text{mL}$); sredstvo za skidanje i špricanje: etanol (96%) R; otapalo: 10% otopina EtOH u vodi; metoda sa špricanjem**

Pomoću pipete kapljično nanesi 285 μL otopine betametazondipropionata za faktor iskoristivosti brisa na silikonsku pločicu Advanta Pure površine 10 cm x 10 cm (100 cm^2) i ostavi sušiti na sobnoj temperaturi. Prije brisanja, površinu silikonske pločice našpricaj etanolom 3 puta, a zatim namoči bris etanolom (96%) R i prebriši silikonsku pločicu. Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL, dodaj 15,0 mL 10% otopine EtOH u vodi i tikvicu stavi 30 minuta na tresilicu na 150 rpm.

Cijepljeni bris – inoks ($c = 0.0385 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, tj. $0.2566 \mu\text{g}/\text{mL}$); sredstvo za skidanje: etanol (96%) R; otapalo: 10% otopina EtOH u vodi

Pomoću pipete kapljično nanesi $285 \mu\text{L}$ otopine betametazondipropionata za faktor iskoristivosti brisa na plohu inoks ploče površine $10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$ (100 cm^2) i ostavi sušiti na sobnoj temperaturi. Namoči bris etanolom (96%) R i prebriši inoks. Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL , dodaj $15,0 \text{ mL}$ 10% otopine EtOH u vodi i tikvicu stavi 30 minuta na tresilicu na 150 rpm .

Poredbena otopina ($c = 0,27 \mu\text{g}/\text{mL}$) (razređenja u vodi)

$1,0 \text{ mL}$ matične otopine betametazondipropionata razrijedi vodom za kromatografiju R do $100,0 \text{ mL}$. Potom $1,0 \text{ mL}$ te otopine razrijedi vodom za kromatografiju R do $50,0 \text{ mL}$.

Poredbena otopina ($c = 0,27 \mu\text{g}/\text{mL}$) (razređenja u 10% otopini EtOH u vodi)

$1,0 \text{ mL}$ matične otopine betametazondipropionata razrijedi 10% otopinom EtOH u vodi do $100,0 \text{ mL}$. Potom $1,0 \text{ mL}$ te otopine razrijedi 10% otopinom EtOH u vodi do $50,0 \text{ mL}$.

Otopina betametazondipropionata za faktor iskoristivosti ispirka ($c = 0,0135 \text{ mg}/\text{mL} = 13,5 \mu\text{g}/\text{mL}$)

$1,0 \text{ mL}$ matične otopine betametazondipropionata razrijedi vodom za kromatografiju R do $100,0 \text{ mL}$.

Cijepljeni ispirak – inoks ($c = 0.0382 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, tj. $0.2411 \mu\text{g}/\text{mL}$)

Pomoću pipete kapljično nanesi $125 \mu\text{L}$ otopine betametazondipropionata za faktor iskoristivosti ispirka na dno inoks čaše (površina dna je $44,2 \text{ cm}^2$) i ostavi sušiti na sobnoj temperaturi. Po stijenkama čaše pipetom nanesi $7,0 \text{ mL}$ vode za kromatografiju R i stavi čašu 30 minuta na tresilicu na 150 rpm .

3.5.3. Priprema otopina – razvoj 3

10% otopina EtOH u vodi

200 mL etanola (96%) R dodaj u 1800 mL vode za kromatografiju R.

Matična otopina betametazondipropionata (c = 0,3 mg/mL)

15 mg radnog standarda betametazondipropionata otopi u mobilnoj fazi i razrijedi do 50,0 mL mobilnom fazom.

Osnovna otopina betametazondipropionata u vodi (c = 0,009 mg/mL = 9 µg/mL)

1,5 mL *matične otopine betametazondipropionata* razrijedi vodom za kromatografiju do 50,0 mL.

Osnovna otopina betametazondipropionata u 10 % otopini EtOH u vodi (c = 0,009 mg/mL = 9 µg/mL)

1,5 mL *matične otopine betametazondipropionata* razrijedi 10% otopinom EtOH u vodi do 50,0 mL.

Poredbena otopina (c = 0,27 µg/mL) (razređenja u vodi)

1,5 mL *osnovne otopine betametazondipropionata u vodi* razrijedi vodom za kromatografiju R do 50,0 mL.

Poredbena otopina (c = 0,27 µg/mL) (razređenja u 10% otopini EtOH u vodi)

1,5 mL *osnovne otopine betametazondipropionata u 10% otopini EtOH u vodi* razrijedi 10% otopinom EtOH u vodi do 50,0 mL.

Poredbena otopina (c = 0,27 µg/mL) (razređenja: voda, 10% otopina EtOH u vodi)

1,5 mL *osnovne otopine betametazondipropionata u vodi* razrijedi 10% otopinom EtOH u vodi do 50,0 mL.

Poredbena otopina (c = 0,27 µg/mL) (razređenja u vodi) + filter PTFE 0,2 µm

1,5 mL *osnovne otopine betametazondipropionata u vodi* razrijedi vodom za kromatografiju R do 50,0 mL. Dobivenu otopinu profiltriraj kroz PTFE filter veličine pora 0,2 µm.

Poredbena otopina (c = 0,27 µg/mL) (razređenja u 10% otopini EtOH u vodi) + filter PTFE 0,2 µm

1,5 mL *osnovne otopine betametazondipropionata u 10% otopini EtOH u vodi* razrijedi 10% otopinom EtOH u vodi do 50,0 mL. Dobivenu otopinu profiltriraj kroz PTFE filter veličine pora 0,2 µm.

Poredbena otopina (c = 0,27 µg/mL) (razređenja u vodi) + filter RC 0,2 µm

1,5 mL osnovne otopine betametazondipropionata u vodi razrijedi vodom za kromatografiju R do 50,0 mL. Dobivenu otopinu profiltriraj kroz RC filter veličine pora 0,2 µm.

Poredbena otopina (c = 0,27 µg/mL) (razređenja u 10% otopini EtOH u vodi) + filter RC 0,2 µm

1,5 mL osnovne otopine betametazondipropionata u 10% otopini EtOH u vodi razrijedi 10% otopinom EtOH u vodi do 50,0 mL. Dobivenu otopinu profiltriraj kroz RC filter veličine pora 0,2 µm.

Cijepljeni ispirak – inoks (c = 0.0386 µg/cm², tj. 0.2132 µg/mL)

Pomoću pipete kapljično nanesi 190 µL osnovne otopine betametazondipropionata u vodi na dno inoks čaše (površina dna je 44,2 cm²) i ostavi sušiti na sobnoj temperaturi. Po stijenkama čaše pipetom nanesi 8,0 mL vode za kromatografiju R i stavi čašu 30 minuta na tresilicu na 150 rpm.

Cijepljeni bris – inoks (c = 0.0385 µg/cm², tj. 0.2566 µg/mL); sredstvo za skidanje: etanol (96%) R; otapalo: voda za kromatografiju R

Pomoću pipete kapljično nanesi 425 µL osnovne otopine betametazondipropionata u vodi na plohu inoks ploče površine 10 cm x 10 cm (100 cm²) i ostavi sušiti na sobnoj temperaturi. Namoči bris etanolom (96%) R i prebriši inoks. Bris stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL, dodaj 15,0 mL vode za kromatografiju R i tikvicu stavi 30 minuta na tresilicu na 150 rpm.

50% otopina EtOH u vodi

20 mL etanola (96%) R dodaj u 20 mL vode za kromatografiju R.

Cijepljeni ispirak – inoks (c = 0.0386 µg/cm², tj. 0.1706 µg/mL) sa stabilizacijom

Pomoću pipete kapljično nanesi 190 µL osnovne otopine betametazondipropionata u vodi na dno inoks čaše (površina dna je 44,2 cm²) i ostavi sušiti na sobnoj temperaturi. Po stijenkama čaše pipetom nanesi 8,0 mL vode i stavi čašu 30 minuta na tresilicu na 150 rpm. Odpipetiraj 4,0 mL tako dobivene otopine u Erlenmeyerovu tikvicu od 25 mL i dodaj 1,0 mL 50% otopine EtOH u vodi.

3.6. Parametri validacije i definirane granice prihvatljivosti

Tablica 1: Parametri validacije i definirane granice prihvatljivosti

Parametar	Granica prihvatljivosti
1. Selektivnost	Kromatogrami <i>otapala</i> , <i>slijepe probe brisa</i> , <i>otopina sredstava za čišćenje proizvodne opreme</i> i <i>otopine placeba</i> ne sadrže pikove koji bi mogli interferirati s pikom betametazondipropionata
2. Preciznost 2.1. Preciznost sistema 2.2. Ponovljivost metode 2.3. Transfer metode	2.1. RSD: $\leq 5.0 \%$ 2.2. RSD: $\leq 20.0 \%$ 2.3. RSD (6 rezultata, operater 2): $\leq 20.0 \%$ Razlika između rezultata operatera 1 i 2: $\pm 20 \%$
3. Točnost	Povrat: 60.0 – 130.0 %
4. Linearnost	$r: \geq 0.99$
5. Područje rada	15 % (LOQ) – 200 % od koncentracije <i>poredbene otopine</i>
6. Otpornost: 6.1. Stabilnost mjernih otopina, briseva i ispiraka	6.1. Relativno odstupanje površine betametazondipropionata u otopini ispitanoj u vremenu t u odnosu na površinu betametazondipropionata u otopini ispitanoj odmah nakon pripreme: $\leq 15.0 \%$
7. Granica dokazivanja (LOD)	Omjer signala i šuma za pik betametazondipropionata: $\geq 3:1$
8. Granica određivanja (LOQ)	Omjer signala i šuma za pik betametazondipropionata: $\geq 10:1$ Povrat: 80.0 – 120.0 %
9. Faktor iskoristivosti	Informacija RSD: $\leq 20.0 \%$

3.7. LC uvjeti rada i test prikladnosti sustava u validaciji metode

Tablica 2: LC uvjeti rada⁶ propisani validacijskim protokolom

<i>Pumpa</i>	Agilent/Waters ili druga odgovarajuća protok 0,75 mL/min
<i>Detektor</i> ⁷	Agilent: DAD (Sample: Bw=4; Reference= 400; Bw=80) Waters: PDA (Resolution: 4.8 nm) $\lambda=240$ nm
<i>Injektor</i>	automatski Agilent / Waters ili drugi odgovarajući volumen injektiranja: 40 μL temperatura autosamplera: 20 °C
<i>Kolona</i>	Zorbax Extend-C18, 100 x 3,0 mm, 1,8 μ m (ili druga odgovarajuća kolona punjena oktadecilsilan stacionarnom fazom, koja odgovara testu prikladnosti LC sustava) i odgovarajuća pretkolona (Zorbax Eclipse Plus C18 5 x 2,1 mm, 1,8 μ m je prikladna)
<i>Temperatura kolone</i>	25 °C
<i>Mobilna faza</i>	Voda za kromatografiju R : acetonitril za kromatografiju R = 40 : 60 (%V/V)
<i>Vrijeme kromatografiranja</i>	8 minuta

Test prikladnosti je valjan ukoliko je:

1. relativna standardna devijacija, određena na ponovljenim injiciranjima *poredbene otopine* (n=6): $\leq 5,0$ %
2. faktor simetrije pika betametazondipropionata u *poredbenoj otopini*: $\leq 2,0$
3. broj teoretskih tavana za kolonu izražen na piku betametazondipropionata u *poredbenoj otopini*: ≥ 2000

Razlika u odgovorima poredbene otopine i verifikacijske poredbene otopine za betametazondipropionat mora biti $\leq 5,0$ %.

⁶ Integracijske parametre podesi ovisno o instrumentu na kojem se provodi analiza i prema tipičnim kromatogramima.

⁷ Preporuka: podesi peak width (Agilent): >0.025 min odnosno sampling rate (Waters): 2 point/s

3.8. Priprema otopina u validaciji metode

Otapalo

U 450 mL vode za kromatografiju R dodaj 50 mL etanola (96%) R.

Matična otopina (0.3 mg/mL)

15 mg radnog standarda betametazondipropionata otopi u mobilnoj fazi i razrijedi do 50,0 mL istim otapalom.

Osnovna otopina (9 µg/mL)

1,5 mL matične otopine razrijedi do 50,0 mL otapalom i dobro promućkaj.

Osnovna otopina za bris (15 µg/mL)

1,0 mL matične otopine razrijedi do 20,0 mL otapalom i dobro promućkaj.

Poredbena otopina (0,27 µg/mL)

1,5 mL osnovne otopine razrijedi do 50,0 mL otapalom i dobro promućkaj. Tom otopinom isperi i napuni vialu.

Slijepa proba brisa

Namoči bris etanolom (96%) R i namočeni bris stavi u TOC⁸ kivetu. Dodaj 15,0 mL otapala i stavi na tresilicu 30 minuta na 150 rpm. Tom otopinom isperi i napuni vialu.

Otopina sredstva za čišćenje Cosa CIP 95

1,5 mL detergenta Cosa CIP 95 razrijedi vodom R do 50,0 mL i dobro promućkaj.

1,0 mL dobivene otopine razrijedi vodom R do 200,0 mL i dobro promućkaj.

1,0 mL dobivene otopine razrijedi vodom R do 50,0 mL i dobro promućkaj. Ovom otopinom isperi i napuni vialu.

⁸ Kiveta koja se koristi prilikom analize ukupnog organskog ugljika (od eng. total organic carbon)

Otopina sredstva za čišćenje Cosa CIP 72

1,5 mL detergenta Cosa CIP 72 razrijedi *vodom R* do 50,0 mL i dobro promućkaj.

1,0 mL dobivene otopine razrijedi *vodom R* do 200,0 mL i dobro promućkaj.

1,0 mL dobivene razrijedi *vodom R* do 50,0 mL i dobro promućkaj. Ovom otopinom isperi i napuni vialu.

Otopina placebo Betazon® kreme bez betametazondipropionata

U odmjernu tikvicu od 50 mL izvaži 1,8 g *placebo Betazon® kreme bez betametazondipropionata*, dodaj 20 mL *mobilne faze* te zagrijavaj u ultrazvučnoj kupelji zagrijanoj na 60°C dok se masna faza ne rastali (oko 5 minuta) uz povremeno mućkanje. Potom izvadi iz kupelji i snažno promućkaj (oko 5 minuta). Zagrijavanje i mućkanje ponovi još 2 puta. Uzorak ohladi na sobnu temperaturu i dopuni *obilnom fazom* do oznake. Dio tako pripremljene otopine centrifugiraj na 11000 okretaja 15 minuta i razrijedi 1,0 mL supernatanta do 50,0 mL *otapalom* i dobro promućkaj. Ovom otopinom isperi i napuni vialu.

Otopina placebo Betazon® masti bez betametazondipropionata

U odmjernu tikvicu od 50 mL izvaži 1,8 g *placebo Betazon® masti bez betametazondipropionata*, dodaj 20 mL *obilne faze* te zagrijavaj u ultrazvučnoj kupelji zagrijanoj na 70°C dok se masna faza ne rastali (oko 5 minuta) uz povremeno mućkanje. Potom izvadi iz kupelji i snažno promućkaj (oko 5 minuta). Zagrijavanje i mućkanje ponovi još 2 puta. Uzorak ohladi na sobnu temperaturu i dopuni *obilnom fazom* do oznake. Uzorak drži 15 minuta na temperaturi od -20°C. Dio tako pripremljene otopine centrifugiraj na 11000 okretaja 15 minuta i razrijedi 1,0 mL supernatanta do 50,0 mL *otapalom* i dobro promućkaj. Ovom otopinom isperi i napuni vialu.

Cijepljeni bris za točnost (50, 100 i 200%)⁹

Namoči bris *etanolom* (96%) *R* te pomoću automatske pipete nanesi **A μ L** osnovne otopine za bris na bris (tablica 3). Bris stavi u TOC kivetu, dodaj 15,0 mL *otapala* i stavi 30 minuta na tresilicu na 150 rpm. Tom otopinom isperi i napuni vialu.

Tablica 3: Količina osnovne otopine za cijepljenje brisa

<i>Koncentracija cijepljeni bris za točnost</i>	A <i>osnovne otopine za bris</i>
~200 % (0,54 μ g/mL)	540 μ L
~100 % (0,27 μ g/mL)	270 μ L
~50 % (0,135 μ g/mL)	135 μ L

Tablica 4: Cijepljeni ispirci i otopine za točnost, linearnost, LOD i LOQ

OZNAKA	PRIPREMA
~200 % (0,54 μ g/mL)/ cijepljeni ispirak 200 %	Razrijedi 3,0 mL <i>osnovne otopine</i> do 50,0 mL <i>otapalom</i>
~150% (0,405 μ g/mL)	Razrijedi 9,0 mL <i>osnovne otopine</i> do 200,0 mL <i>otapalom</i>
~100 % (0,27 μ g/mL) / cijepljeni ispirak 100 %	Razrijedi 1,5 mL <i>osnovne otopine</i> do 50,0 mL <i>otapalom</i>
~50 % (0,135 μ g/mL) cijepljeni ispirak 50 %	Razrijedi 1,5 mL <i>osnovne otopine</i> do 100,0 mL <i>otapalom</i>
LOQ (~ 0,04 μ g/mL)	Razrijedi 1,5 mL <i>cijepljenog ispirka 100%</i> do 10,0 mL <i>otapalom</i>
LOD (~ 0,02 μ g/mL)	Razrijedi 1,5 mL <i>cijepljenog ispirka 50%</i> do 10,0 mL <i>otapalom</i>

⁹ Koncentracije izražene u % u odnosu na koncentraciju betametazondipropionata u *poredbenoj otopini*.

Otopina uzorka za faktor iskoristivosti brisa – (0,0383 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, tj. 0,255 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

Pomoću pipete kapljično nanesi 425 μL osnovne otopine na inoks plohu površine 10 cm x 10 cm (100 cm^2) i ostavi sušiti na sobnoj temperaturi. Namoči bris *etanolom* (96%) R i prebriši inoks plohu. Bris stavi u TOC kivetu, dodaj 15.0 mL *otapala* i tikvicu stavi 30 minuta na tresilicu na 150 rpm. Ovom otopinom isperi i napuni vialu.

Otapalo za stabilizaciju

U 25 mL vode za kromatografiju R dodaj 25 mL *etanola* (96%) R.

Otopina uzorka za faktor iskoristivosti ispirka – (0,0387 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, tj. 0.214 $\mu\text{g}/\text{mL}$ = 0.171 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nakon stabilizacije)

Pomoću pipete kapljično nanesi 190 μL osnovne otopine na dno inoks čaše (površina dna je 44,2 cm^2) i ostavi sušiti na sobnoj temperaturi. Po stijenkama čaše pipetom nanesi 8,0 mL vode i stavi čašu 30 minuta na tresilicu na 150 rpm. Odpijetiraj 4,0 mL tako dobivene otopine u Erlenmeyerovu tikvicu od 25 mL, dodaj 1,0 mL *otapala za stabilizaciju* i dobro promućkaj. Ovom otopinom isperi i napuni vialu.

3.9. Provedba postupka validacije

Selektivnost

Pripremljene su i injektirane sljedeće otopine: *otapala*, *slijepog brisa*, *sredstava za čišćenje Cosa CIP 72* i *Cosa CIP 95*, *placeba Betazon® kreme*, *placeba Betazon® masti*, *poredbene otopine* (2 injektiranja), *cijepljenog brisa* i *cijepljenog ispirka*.

Preciznost ili pouzdanost

Preciznost instrumenta

Pripremljene su 2 *poredbene otopine*. Prva *poredbena otopina* injektirana je 6 puta, a druga 2 puta.

Ponovljivost

Pripremljene su 2 *poredbene otopine*, 6 *cijepljenih briseva 100%* i 6 *cijepljenih ispiraka 100%*. Prva *poredbena otopina* injektirana je 6 puta, a ostale otopine po 2 puta.

Transfer metode (obnovljivost)

Prema validacijskom protokolu, transfer metode ispitan je samo na brisevima. Pripremljene su 2 *poredbene otopine* i 6 *cijepljenih briseva 100%*. Prva *poredbena otopina* injektirana je 6 puta, a ostale otopine po 2 puta. Analizu su neovisno provela 2 analitičara iz 2 različita laboratorija (Istraživanje i razvoj te Kontrola kvalitete).

Točnost

Pripremljene su 2 *poredbene otopine* i sljedeće otopine u triplicatu: *cijepljeni bris 50%*, *cijepljeni bris 100%*, *cijepljeni bris 200%*, *cijepljeni ispirak LOQ (15%)*, *cijepljeni ispirak 50%*, *cijepljeni ispirak 100%*, *cijepljeni ispirak 150%* i *cijepljeni ispirak 200%*. Prva *poredbena otopina* injektirana je 6 puta, a ostale otopine po 2 puta.

Linearnost

Pripremljene su 2 *poredbene otopine* i sljedeće otopine u triplicatu: *cijepljeni ispirak LOQ (15%)*, *cijepljeni ispirak 50%*, *cijepljeni ispirak 100%*, *cijepljeni ispirak 150%* i *cijepljeni ispirak 200%*. Prva *poredbena otopina* injektirana je 6 puta, a ostale otopine po 2 puta.

Otpornost (stabilnost otopina)

Za analizu stabilnosti, *poredbena otopina* razdvojena je na pola te je jedan dio ostavljen na tamno mjesto i sobnu temperaturu, a drugi dio u hladnjak. Pripremljene su dvije *poredbene otopine*.

Pripremljene su dvije *slijepe probe brisa* te je jedna ostavljena na tamnom mjestu i sobnoj temperaturi, a druga je pohranjena u hladnjak.

Pripremljena su dva *cijepljena brisa 100%*, te je jedan ostavljen na tamnom mjestu i sobnoj temperaturi, a drugi je pohranjen u hladnjak.

Tim otopinama je ispitana stabilnost nakon x sati (x = 24h, 48h, 72h).

Također, pripremljeno je još 10 *cijepljenih briseva 100% („suhi“)*, ali tako da je u TOC kivetu ostavljen samo cijepljeni bris bez dodatka *otapala*. Nakon x sati (x = 24h, 48h, 72h) na sobnoj temperaturi/u hladnjaku, dodano je 15,0 mL *otapala* i tikvica stavljena na 30 minuta na tresilicu na 150 rpm te je takvoj otopini ispitana stabilnost.

Prva *poredbena otopina* injektirana je 6 puta, a ostale otopine po 2 puta.

Limit detekcije

Limit detekcije ispitan je na triplikatu otopine betametazondipropionata koncentracije 0,02 µg/mL (7% koncentracije *poredbene otopine*). Otopine su injektirane po 2 puta.

Limit kvantifikacije

Limit kvantifikacije ispitan je na triplikatu otopine betametazondipropionata koncentracije 0,04 µg/mL (15% koncentracije *poredbene otopine*) uz pripremu dvije *poredbene otopine*. Prva *poredbena otopina* injektirana je 6 puta, a ostale otopine po 2 puta.

Faktor iskoristivosti

Pripremljene su 2 *poredbene otopine* i 6 *otopina uzorka* za *faktor iskoristivosti brisa* te 6 *otopina uzorka* za *faktor iskoristivosti ispirka*. Prva *poredbena otopina* injektirana je 6 puta, a ostale otopine po 2 puta.

3.10. Obrada podataka

Obrada kromatografskih podataka vršena je pomoću softvera Empower® (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, SAD). Kvantitativna analiza kromatograma provedena je na temelju metode s vanjskim standardom koristeći površine pikova. Za statističku obradu podataka korišten je program Excell® (Microsoft, Redmond, Washington, SAD), a formule za izračun rezultata validacije upotrijebljene su iz validacijskog protokola.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Pregled literature i odabir početne metode za razvoj

Razvoj metode započet je pretraživanjem literature i pregledom metoda za određivanje betametazondipropionata (tablica 5). Metode 5,6 i 7 eliminirane su kao potencijalne metode za razvoj zbog prevelikog limita kvantifikacije koji ni približno ne odgovara traženom zahtjevu. Metoda 4 s LOQ od 0,06 µg/mL potencijalno je mogla biti uzeta u razmatranje, ali je ta metoda razvijena za određivanje sadržaja betametazondipropionata u proizvodu odnosno formulaciji te joj područje linearnosti s vrijednostima od 20-100 µg/mL značajno premašuje zahtjevane vrijednosti (od LOQ do 200% najvećeg limita, odnosno do 0,17 µg/mL). U užem izboru ostale su metode 1,2 i 3 te su njihove karakteristike i uvjeti rada opisani u tablicama 6 i 7.

Tablica 5: Pregled metoda za određivanje betametazondipropionata s pripadajućim limitima kvantifikacije (nap. metode 1 i 2 su eksperimentalne metode JGL-a pa za njih nije navedena literatura)

Metoda	LOQ	Literatura
1	0,01028 µg/mL	¹⁰
2	0,02 µg/mL	¹¹
3	0,07 µg/mL	Vairale i sur, 2012
4	0,06 µg/mL	Shams i sur, 2016
5 ¹²	1,171 µg/mL	Roy i sur, 2013
6	6,53 µg/mL	Simon i sur, 2012
7	0,66 µg/mL	Nam i sur, 2011

¹⁰ HPLC metoda za ispitivanje onečišćenja (srodne supstancije) Betazon® kreme (JGL)

¹¹ HPLC metoda za ispitivanje onečišćenja (srodne supstancije) Betazon® masti (JGL)

¹² Napomena: metoda je normalno fazna

Tablica 6: Aparatura i uvjeti rada (izvorni) za tri odabrane potencijalne metode za razvoj validaciju čišćenja betametazondipropionata

	Metoda 1	Metoda 2	Metoda 3
pumpa	Agilent/Waters series	Agilent	Waters Alliance
protok/ gradijent protoka	0-20.9 min: 1,0 mL/min 21-30 min: 1,5 mL/min 30.1-35 min: 1,0mL/min	0-20.9 min: 1,0 mL/min 21-30 min: 1,5 mL/min	1,0 mL/min
detektor	Agilent: varijabilni UV ili DAD, Waters: PDA $\lambda=230$ nm	DAD ili varijabilni UV, $\lambda=254$ nm	PDA, $\lambda=240$ nm
injektor	Agilent/Waters series, V=70 μ L,	Automatski Agilent ili drugi odgovarajući V=70 μ L	Waters, V=20 μ L
kolona	Zorbax Eclipse XDB-C18, 150 x 4,6 mm, 5 μ m	Zorbax RX C18, 250 x 4,6 mm, 5 μ m	Altima C18, 250 x 4,6 mm, 5 μ m
temperatura kolone (°C)	25	25	50
mobilna faza	A = H ₂ O za kromatografiju R : ACN za kromatografiju R = 60:40 % V/V B = H ₂ O za kromatografiju R : ACN za kromatografiju R = 40:60 % V/V 0-11 min: 100% A 11-30 min: 100% B 30.1-35 min: 100%A	A = H ₂ O za kromatografiju R : ACN za kromatografiju R = 60:40 % V/V B = H ₂ O za kromatografiju R : ACN za kromatografiju R = 40:60 % V/V 0-11 min: 100 % A 11-30 min: 100 % B	A = H ₂ O za kromatografiju R : THF za kromatografiju R : ACN za kromatografiju R = 90:4:6 %V/V B = ACN za kromatografiju R : THF za kromatografiju R : H ₂ O za kromatografijuR : MeOH za kromatografiju R = 74:2:4:20 *gradijent je izvan tablice
vrijeme analize	35 min	30 min	80 min

Tablica 7: Gradijent mobilne faze po minutama za metodu 3:

t/min	Mobilna faza A/ %	Mobilna faza B/ %
0,01	75	25
2	75	25
37	58	42
48	45	55
57	45	55
62	10	90
70	10	90
72	75	25
80	75	25

Kao početna metodu za razvoj uzeta je **metoda 1** koja od pregledanih ima najniži LOQ. Razvijena je za ispitivanje onečišćenja (srodne supstancije) Betazon® kreme (JGL). Potencijalni problem za validaciju čišćenja mogli su predstavljati interferenti iz samog procesa čišćenja što je trebalo biti utvrđeno tijekom razvoja metode. LOQ razmatrane metode iznosi 0,01028 µg/mL, što je ujedno i najniži od svih pregledanih metoda, ali opet veći od donje granice traženog područja linearnosti nove metode. Potencijalna rješenja navedenog problema bila su smanjenje SEA¹³ za bris s 25 mL na 10 mL čime bi limit za ispirak porastao s 0,0038 µg/mL na 0,0095 µg/mL pa bi najmanji limit za određivanje rezidua ostao onaj ispirka homogenizatora od 0,00567 µg/mL. Alternativne modifikacije koje su još mogle biti primijenjene uključivale su povećanje volumena injektiranja sa 70 µL na 100 µL te promjenu valne duljine detekcije. Kako je metoda razvijena za ispitivanje čistoće, valna duljina detekcije nije bila na maksimumu apsorpcije betametazondipropionata ($\lambda=240$ nm) već na nižoj valnoj duljini ($\lambda=230$ nm). Uz navedene modifikacije, metoda bi se približila koncentracijskom području koji je potrebno mjeriti. Problem selektivnosti koji se mogao pojaviti zbog interferenata iz procesa čišćenja bio bi razmatran naknadno, ali potencijalna rješenja uključivala su promjene sastava mobilne faze, temperature ili kolone. Otapalo korišteno u metodi je mobilna faza B što je predstavljalo novi potencijalni problem obzirom da se u procesu čišćenja uglavnom koristi voda kao jeftino i neškodljivo otapalo, a betametazondipropionat je praktički netopljiv u vodi. Rješenje je otapanje betametazondipropionata u matičnoj otopini u mobilnoj fazi ili acetonitrilu i daljnje razrjeđivanje s vodom te bi tako praktički otapalo bilo voda.

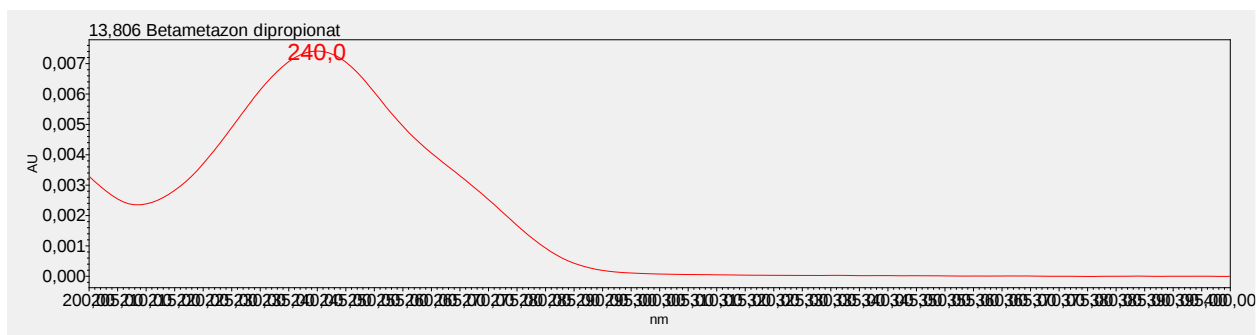
¹³ Solvent extraction amount = količina otapala za ekstrakciju

4.2. Optimiranje početnih HPLC uvjeta i priprema poredbene otopine

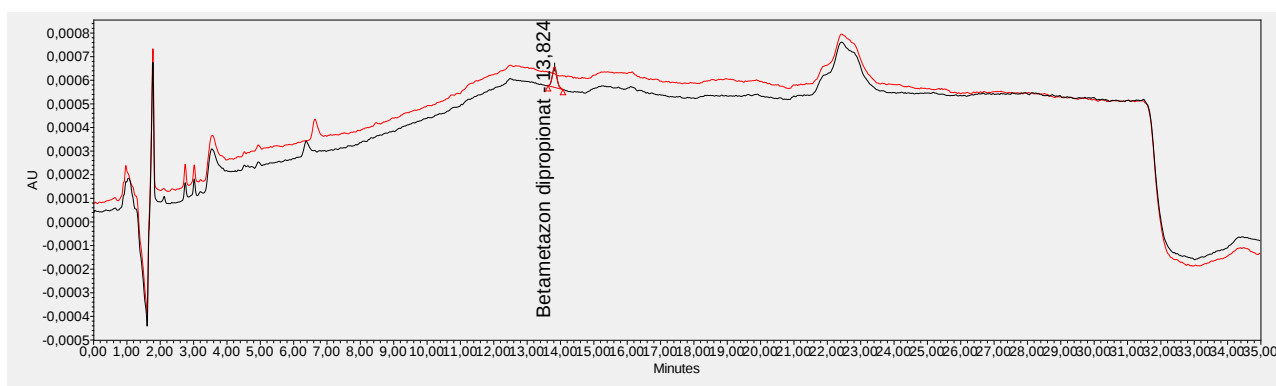
Tablica 8: Kromatografski uvjeti metode za određivanje sadržaja srodnih supstancija u Betazon® 0,5mg/g kremi i definirane izmjene u odnosu na navedenu metodu

Metoda za određivanje srodnih supstancija u Betazon® kremi									Izmjene u odnosu na početnu metodu
Pumpa	gradijent protoka								
	min	0	11	20,9	21	30	30,1	35	
	mL/min	1,0	1,0	1,0	1,5	1,5	1,0	1,0	
Detektor	DAD, λ=230 nm								DAD, λ=240 nm
Injektor	Volumen injektiranja = 70 μL, temperatura autosamplera = 20°C								Volumen injektiranja = 100 μL
Kolona	Zorbax Eclipse XDB C18, 150 x 4,6 mm, 5 μm								
t (kolone)	25 °C								
Mobilna faza	A = H ₂ O za kromatografiju R : ACN za kromatografiju R = 60 : 40 (%V/V)								
	B = H ₂ O za kromatografiju R : ACN za kromatografiju R = 40 : 60 (%V/V)								
	min	0	11	20,9	21	30	30,1	35	
	A (% V/V)	100	0	0	0	0	100	100	
	B % (V/V)	0	100	100	100	100	0	0	
Vrijeme analize	35 min								

Matična otopina za pripremu poredbene otopine pripremljena je u smjesi vode za kromatografiju R i acetonitrila za kromatografiju R u omjeru 60:40 V/V% dok su daljnja razrjeđenja pripremljena u vodi za kromatografiju R. U odnosu na početnu metodu, povećan je volumen injektiranja sa 70 μ L na 100 μ L te je izmijenjena valna duljina detekcije s 230 nm na 240 nm uzevši u obzir maksimum apsorpcije betametazondipropionata (slika 6) te niske koncentracije koje je potrebno kvantificirati. Prilikom filtriranja poredbene otopine s PTFE filterom, na očekivanom vremenu zadržavanja nije detektiran pik betametazondipropionata te je injektirana i nefiltrirana poredbena otopina gdje se pik pojavio (slika 7). Na temelju takvih rezultata, utvrđeno je zadržavanje betametazondipropionata na odabranom filtru pri ispitivanoj koncentraciji ($c = 0,0075 \mu\text{g/mL}$) zbog čega korištenje PTFE filtera nije prihvatljivo. U instrumentalnoj metodi odabran je *sampling rate* od 30 točaka po minuti.



Slika 6. Apsorpcijski spektar betametazondipropionata s maksimumom apsorpcije na 240 nm



Slika 7. Filtrirana poredbena otopina (crveno) i nefiltrirana poredbena otopina (crno, crveni pik)

4.3. Prelazak na UPLC kromatografske uvjete

Analizom kromatograma pri HPLC uvjetima uočeno je veliko odstupanje između poredbenih otopina sa s/n omjerom manjim od 40^{14} (tablice 9 i 10). Na temelju takvih rezultata, donesena je odluka za prelazak na UPLC kolonu. Za daljni razvoj odabrana je Zorbax Extend C18 kolona, istog tipa (L1, oktadecil silan kemijski vezan na porozne ili keramičke mikročestice silika gela) kao i prethodno korištena. Pomoću Acquity® UPLC column kalkulatora izračunati su parametri analize nove metode, optimirani prema veličini čestica (tablica 11). Obzirom da je vrijeme izlaska pika betametazondipropionata prije vremena kada se mijenja brzina protoka, ukinut je gradijent protoka. Prelaskom na tako definirane početne uvjete i analizom poredbenih otopina uočena je smanjena površina pika stoga je volumen injektiranja povećan s 28 na 100 μL . Zbog relativno male širine pika pri novim uvjetima, u

¹⁴ Iznimka je 2. injektiranje kod LOQ 2 otopine gdje je s/n omjer 70,27.

instrumentalnoj metodi je *sampling rate* promijenjen s 30 na 120 točaka po minuti (slika 8). U tablici 12 prikazani su konačno definirani uvjeti metode.

Tablica 9: Verifikacija poredbenih otopina ($c = 0,0075 \mu\text{g/mL}$)

Oznaka otopine	Prosječna površina (AU*s)	Odvaga (mg)	Verifikacija ZAHTJEV = <5%
P.O.1	1603	15,039	21,33
P.O.2	1326	15,092	

Tablica 10: Povrat na LOQ koncentraciji ($c = 0,00469 \mu\text{g/mL}$) i s/n omjer

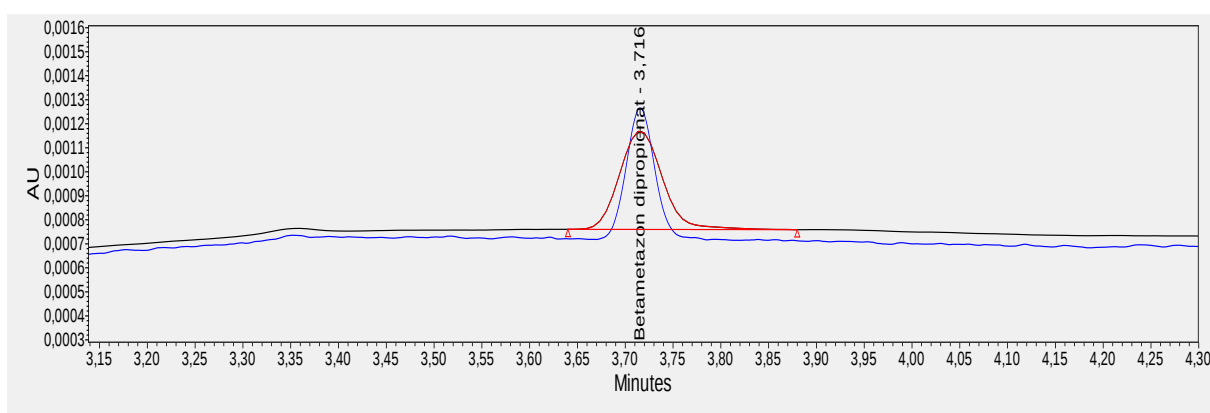
Oznaka otopine	Broj injektiranja	POVRAT (% dobivene koncentracije u odnosu na dobivenu) ZAHTJEV = 80 -120%	s/n omjer ZAHTJEV = ≥ 40
LOQ 1	1	92,02	23,18
	2	87,21	29,35
	3	87,32	32,92
	4	91,25	33,43
	5	97,27	37,37
	6	99,13	29,48
LOQ 2	1	112,74	30,32
	2	119,39	70,27
LOQ 3	1	93,40	36,01
	2	92,43	33,4

Tablica 11: Početni kromatografski uvjeti za UPLC prema Acquity® UPLC column kalkulatoru

Pumpa	Protok: 1,18 mL/min					
Detektor	DAD, $\lambda=240 \text{ nm}$					
Injektor	Volumen injektiranja = 28 μL , temperatura autosamplera = 20 °C					
Kolona	Zorbax Extend-C18, 100 x 3,0 mm, 1,8 μm					
t (kolone)	25 °C					
Mobilna faza	A = H ₂ O za kromatografiju R : ACN za kromatografiju R = 60 : 40 (%V/V)					
	B = H ₂ O za kromatografiju R : ACN za kromatografiju R = 40 : 60 (%V/V)					
	min	0	2,6	7,2	7,3	8,5
	A (% V/V)	100	0	0	100	100
	B % (V/V)	0	100	100	0	0
Vrijeme analize	8,5 min					

Tablica 12: Uvjeti kromatografiranja nakon optimizacije metode

Pumpa	Protok: 0,75 mL/min
Detektor	DAD, $\lambda=240$ nm
Injektor	Volumen injektiranja = 40 μ L, temperatura autosamplera = 20 °C
Kolona	Zorbax Extend-C18, 100 x 3,0 mm, 1,8 μ m
t (kolone)	25 °C
Mobilna faza	H ₂ O za kromatografiju R : ACN za kromatografiju R = 40 : 60 (%V/V)
Vrijeme analize	8 min



Slika 8. Pik betametazondipropionata pri sampling rate-u od 120 točaka po minuti (plava) i 30 točaka po minuti (crna, crveni pik)

4.4. Optimiranje protoka

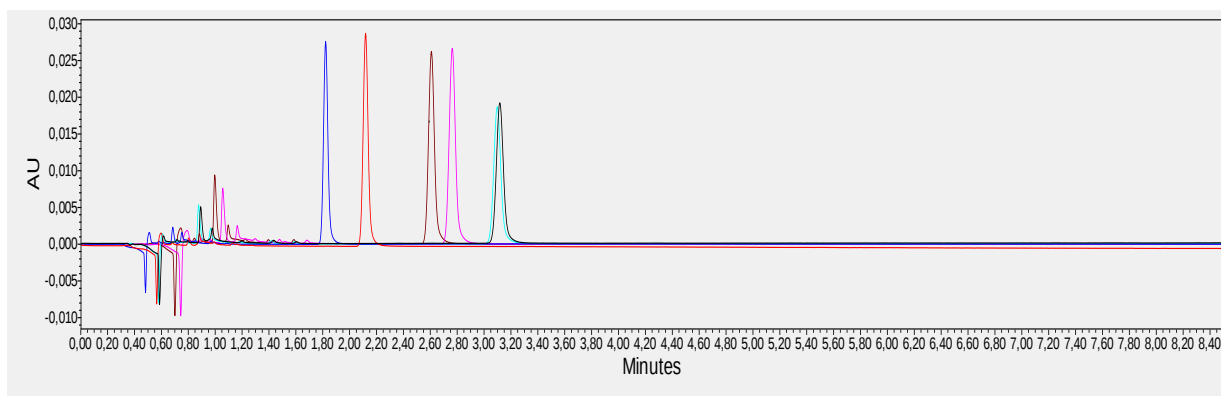
U cilju smanjenja vremena zadržavanja betametazondipropionata odnosno skraćanja trajanja analize, isprobane su promjene u gradijentu mobilne faze kao i promjene protoka (tablice 13 i 14, slika 9). Najpogodnijim se pokazala izokratna metoda s mobilnom fazom = voda za kromatografiju R : acetonitril za kromatografiju R u omjeru 40/60 (V/V%) i protokom 0,75 mL/min (tablica 13). Kod metode s tako definiranim parametrima, površina pika betametazondipropionata je najveća, uz zadovoljavajuće vrijeme zadržavanja (oko 2,7 minuta) te ostale parametre. S definiranom mobilnom fazom i protokom, vrijeme analize skraćeno je na 6 minuta.

Tablica 13: Optimiranje protoka (ispitano na osnovnoj otopini betametazondipropionata
(c = 0,375 µg/mL)

Metoda	Protok (mL/min)	Sastav mobilne faze	Površina (AU*s)	k'	A _s
početna UPLC metoda	1,18	gradijent*	68906	5,056	1,021
1	1	100% B	76671	2,496	1,132
2	1,18	100% B	64028	2,006	1,139
3	1,18	gradijent*	63581	4,102	1,072
4	1,18	gradijent*	62233	3,847	1,104
5	1	25% A, 75% B	72044	4,143	1,135
6	0,75	100% B	89946	3,56	1,155
7	0,8	100% B	83332	3,304	1,169

Tablica 14: Gradijent mobilne faze za početnu UPLC metodu, metodu 3 i metodu 4

početna UPLC metoda					
t/min	0	2,6	7,2	7,3	8,5
% A	100	0	0	100	100
% B	0	100	100	0	0
metoda 3					
t/min	0	1,5	7,2	7,3	8,5
% A	100	0	0	100	100
% B	0	100	100	0	0
metoda 4					
t/min	0	2,6	7,2	7,3	8,5
% A	50	0	0	100	100
% B	50	100	100	0	0



Slika 9. Pikovi betametazondipropionata pri različitim izokratnim uvjetima kromatografiranja: voda za kromatografiju R : acetonitril za kromatografiju R = 40/60 (V/V%), protok 1,18 mL/min (**ljubičasta**), voda za kromatografiju R : acetonitril za kromatografiju R = 40/60 (V/V%), protok 1,0 mL/min (**crvena**), voda za kromatografiju R : acetonitril za kromatografiju R = 40/60 (V/V%), protok 0,8 mL/min (**smeđa**), voda za kromatografiju R : acetonitril za kromatografiju R = 40/60 (V/V%), protok 0,75 mL/min (**roza**), voda za kromatografiju R : acetonitril za kromatografiju R = 45/55 (V/V%), protok 1,0 mL/min (**tirkizna**), voda za kromatografiju R : acetonitril za kromatografiju R = 50/50 (V/V%), protok 1,0 mL/min (**crna**).

4.5. Ispitivanje utjecaja filtera

Ispitan je i utjecaj različitih filtera. Upotrebljeni su PTFE SRP 0,45 μm , PTFE SRP 0,2 μm , PTFE 0,2 μm , RC 0,2 μm i GHP 0,2 μm , PES 0,22 μm , PVDF 0,45 μm , PA 0,45 μm , GF 0,7 μm . Od navedenih filtera, pik betametazondipropionata pojavio se samo prilikom filtracije s RC i PA filterom ali se površine filtrirane i nefiltrirane otopine razlikuju za 20% odnosno 50% te se odustalo od primjene filtera, a uvedena je pretkolona Eclipse Plus C18 5x2,1 mm, 1,8 μm , prema preporuci dobavljača, obzirom da za korištenu kolonu ne postoji definirana pretkolona (tablica 15).

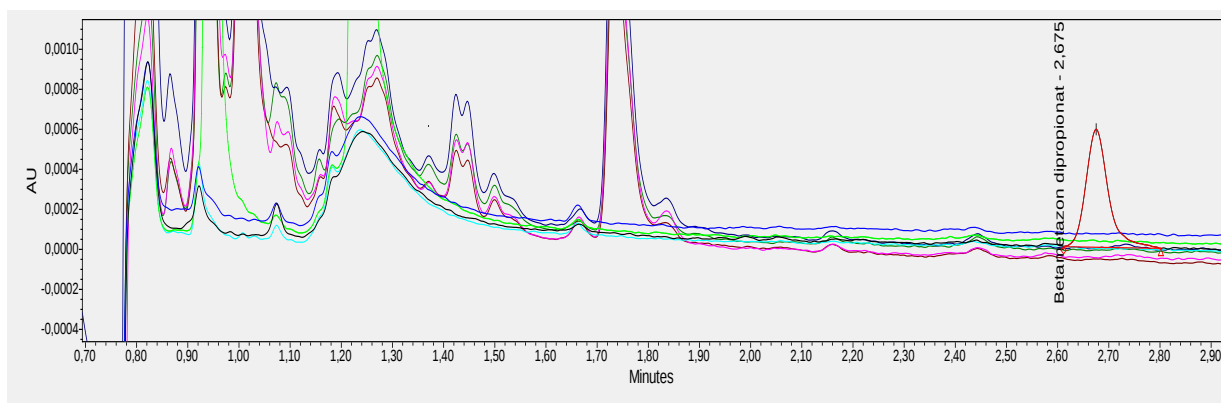
Tablica 15: Signali filtriranih i nefiltriranih otopina te razlika u odgovorima

Filter	POVRŠINA nefiltrirane poredbene otopine (AU*s)	POVRŠINA filtrirane poredbene otopine (AU*s)	Koncentracija poredbene otopine (µg/mL)	Razlika u odgovorima (% razlike)	Zahtjev/ zaključak
PTFE 0,2 µm	1827	nema pika	~0,0075	n.p.	Zahtjev: razlika u odgovorima filtrirane i nefiltrirane otopine <2.0%/ Zaključak: niti jedan filter ne udovoljava zahtjevu, otopine se ne smiju filtrirati
PTFE SRP 0,45 µm		nema pika		n.p.	
PTFE SRP 0,2 µm		nema pika		n.p.	
PTFE CHR 0,2 µm		nema pika		n.p.	
RC 0,2 µm		1404		23,2	
GHP 0,2 µm	1971	nema pika	~0,0075	n.p.	
PES 0,22 µm		nema pika		n.p.	
PVDF 0,45 µm		nema pika		n.p.	
PA 0,45 µm		1013		n.p.	
GF 0,7 µm		nema pika		n.p.	
PTFE 0,2 µm	22901	19933	~0,27	13	
RC 0,2 µm		22311		2,7	

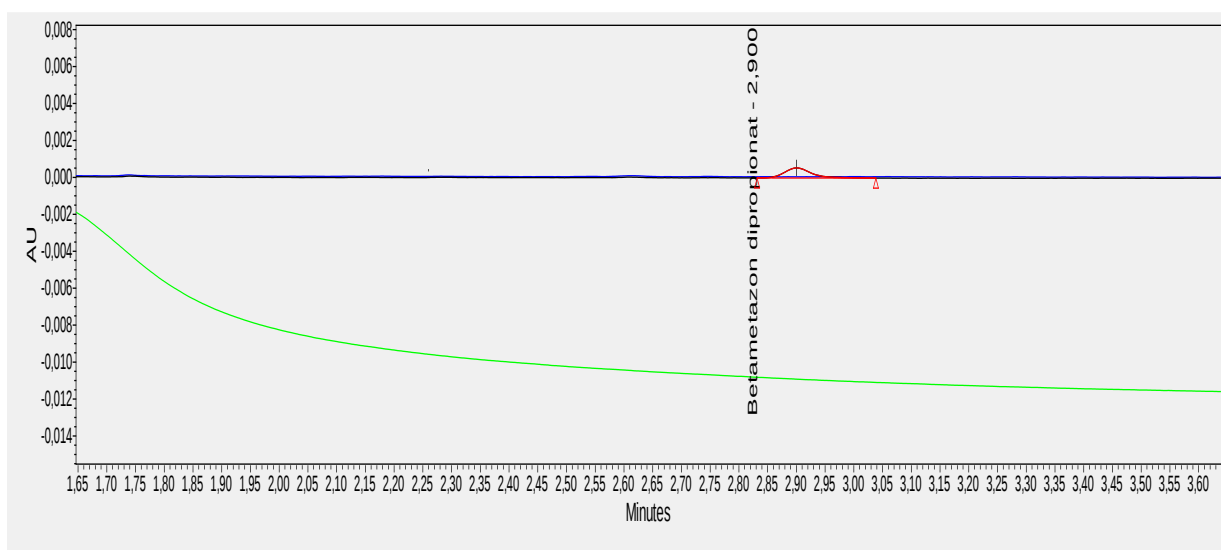
4.6. Selektivnost

Selektivnost metode ispitana je na placebo uzorku bez betametazondipropionata za Betazon® kremu i na placebo uzorku bez betametazondipropionata za Betazon® mast, sredstvima za čišćenje (razrijeđenim¹⁵) Cosa CIP 95, Cosa CIP 72, slijepoj probi brisa, slijepim probama brisa na inoksu, silikonu Advanta Pure i silikonu Plutone Bio. Niti jedan materijal i sredstvo, kao niti placebo uzorci kreme i masti nisu interferirali s pikom betametazondipropionata (slike 10 i 11). Za slijepi bris silikona i inoksa, kao sredstvo za skidanje i ekstrakcijsko sredstvo korištena je voda za kromatografiju R, stoga je u validaciji bilo potrebno potvrditi rezultate na otapalu 10%-tnoj otopini etanola u vodi i sredstvu za skidanje etanolu (96%) R (za bris). Slijepi ispirak na inoksu nije ispitan zbog manje kritičnosti parametra od slijepog brisa inoksa.

¹⁵ Koncentracije otopina deterjanata u ispitivanju bile su realno previsoke, ali kako ni tako koncentrirane nisu imale utjecaj na selektivnost, ispitivanje za niže koncentracije nije provedeno.



Slika 10. Selektivnost: otapalo (tamno plava), placebo kreme (svijetlo zelena), placebo masti (tirkizna), poredbena otopina (crna, crveni pik), „suhi“ slijepi bris (ljubičasta), slijepi bris silikon Advanta Pure (mornarska plava), slijepi bris silikon Plutone Bio (tamno zelena), slijepi bris inoks (smeđa)



Slika 11. Selektivnost - otopina Cosa CIP 72 (zelena), otopina Cosa CIP 95 (plava), poredbena otopina (crna, crveni pik)

4.7. Brisevi na silikonu Advanta Pure

Ispitan je povrat za cijepljeni bris te za briseve sa silikona Advanta Pure cijepljenog sa otopinom betametazondipropionata. U tablici 16 navedeni su povrati za cijepljene briseve u različitim otapalima. Isprobane su različite kombinacije sredstava za skidanje te ekstrakcijskih otapala, ali niti jednom kombinacijom nije dobiven povrat veći od 30 % (tablica 17). Obzirom na nizak povrat pri ispitivanim koncentracijama ($c = 0,0064 \mu\text{g/mL}$), ispitan je povrat na

većim koncentracijama ($c = 0,64 \mu\text{g/mL}$, $0,2565 \mu\text{g/mL}$ i $0,27 \mu\text{g/mL}$) kako bi utvrdili uzrok niskog povrata: zadržavanje betametazondipropionata na silikonu, niska prethodno mjerena koncentracija ili kombinacija tih uzroka. Prelaskom na više koncentracije, smanjen je volumen injektiranja sa $100 \mu\text{L}$ na $40 \mu\text{L}$ nakon prve analize s ciljem poboljšanja izgleda pika. Na temelju rezultata eksperimenta, a zbog utvrđenog niskog faktora iskoristivosti i ograničenja metode pri nižim koncentracijama/ limitima, odobren je prelazak na više vrijednosti koncentracija/ limita^{16,17} koje su izračunate na temelju maksimalnog dopuštenog prijenosa tvari (MAC). Kao sredstva za skidanje korišteni su aceton R, etanol (96%) R i acetonitril za kromatografiju R čiji rezultati se nisu značajno razlikovali pa je kao sredstvo za skidanje odabran etanol (96%) R kao najmanje toksično/ škodljivo otapalo. Odabirom 10% otopine EtOH u vodi kao otapala, na temelju rezultata cijepljenog brisa (tablica 18) definirani su i otapalo i sredstvo za skidanje te su ispitani povrati za različite modificirane postupke uzorkovanja brisom (tablica 19). Zbog pojave nepoznatog pika u 6-toj minuti vrijeme analize produženo je na 8 minuta. Na temelju odluke o primjeni jednonamjenskih (eng.dedicated) silikonskih cijevi, brisevi silikona Advanta Pure nisu ušli u fazu validacije.

Tablica 16: Povrat cijepljenih briseva, niži limiti (teoretska koncentracija iznosi oko $0,0064 \mu\text{g/mL}$)

Otapalo za ekstrakciju	POVRAT (% dobivene koncentracije u odnosu na dodanu)	Komentar
voda za kromatografiju R	49,55	Ekstrakcija betametazondipropionata provedena je na tresilici
voda za kromatografiju R	46,32	Ekstrakcija betametazondipropionata provedena je na ultrazvučnoj kupelji
10% otopina EtOH u vodi, 1. priprema	83,30	/
10% otopina EtOH u vodi, 2. priprema	82,14	
mobilna faza, 1.priprema	114,32	Za obje pripreme cijepljenog brisa u mobilnoj fazi izgled pika je loš, s/n omjer <40 te broj teoretskih tavana <2000
mobilna faza, 2. priprema	90,52	

¹⁶ Limiti za ispirke na višoj koncentraciji su u rasponu od $0,2269 \mu\text{g/mL}$ do $0,3479 \mu\text{g/mL}$ (materijal inoks) dok limit za bris na višoj koncentraciji iznosi $0,0385 \mu\text{g/cm}^2$ betametazondipropionata (materijali silikon i inoks).

¹⁷ Sukladno novim limitima prilagođene su koncentracije i priprema otopina.

Tablica 17: Povrat briseva s cijepljenog silikona Advanta Pure, niži limiti (teoretska koncentracija iznosi oko 0,0064 µg/mL)

Sredstvo za skidanje	Ekstrakcijsko otapalo	POVRAT (% dobivene koncentracije u odnosu na dodanu)	Zaključak
voda za kromatografiju R	voda za kromatografiju R	24,66	Niti jedna kombinacija nije uspjela dati povrat veći od 30%, a signal mjeren pri takvom povratu je niži od LOQ signala
		0,00	
MF	voda za kromatografiju R	28,80	
EtOH (96%) R	voda za kromatografiju R	27,72	
		0,00	
ACN za kromatografiju R	voda za kromatografiju R	23,21	
		0,00	
EtOH (96%) R	10% otopina EtOH u vodi	23,96	
		21,73	

Tablica 18: Povrat cijepljenih briseva na višim limitima (teoretska koncentracija iznosi oko 0,2565 µg/mL)

Otapalo	Teoretska koncentracija	POVRAT (% dobivene koncentracije u odnosu na dodanu)	Zaključak
MF	tresilica, c = 0,2565 µg/mL	86,43	Tresilica i ultrazvuk daju ekvivalentne rezultate toga je za fazu ekstrakcije odabrana tresilica kao jednostavnija metoda; mobilna faza daje najbolji povrat (recovery), ali je pik razvučen, a broj teoretskih tavana oko 6000; otapala 1% aceton i 10% otopina EtOH u vodi daju slične kromatograme pa je zbog većeg povrata i manje škodljivosti odabrana 10% otopina EtOH u vodi
		85,46	
MF	UZV, c = 0,2565 µg/mL	87,55	
		84,71	
1% aceton	tresilica, c = 0,2565 µg/mL	67,14	
		68,53	
10% otopina EtOH u vodi	tresilica, c = 0,2593 µg/mL	70,56	
		77,98	

Tablica 19: Povrat briseva s cijepljenog silikona Advanta Pure pomoću etanola (96%) R kao sredstva za skidanje i 10% otopine etanola u vodi kao sredstva za ekstrakciju

Postupak skidanja	POVRAT (% dobivene koncentracije u odnosu na dodanu)	Zaključak
Bris standardno	23,31	Najbolje rezultate uz prihvatljivo odstupanje daje bris špricanje te je uz povrat veći od 50% udovoljen zahtjev smjernice za validaciju čišćenja (PDA, 2012)
	25,24	
	23,22	
Srednja vrijednost	23,92	
RSD (%) ZAHTJEV: <20%	4,78	
Bris trljanje ¹⁸	24,11	
	29,25	
	25,82	
Srednja vrijednost	26,39	
RSD (%) ZAHTJEV: <20%	9,92	
Bris špricanje ¹⁹	48,55	
	58,50	
	60,08	
Srednja vrijednost	55,71	
RSD (%) ZAHTJEV: <20%	11,22	
Bris x2 ²⁰	46,05	
	45,54	
	43,68	
Srednja vrijednost	45,09	
RSD (%) ZAHTJEV: <20%	2,78	

¹⁸ Bris trljanje uključuje utrljavanje etanola na silikonsku pločicu prije prebrisavanja.

¹⁹ Bris špricanje uključuje špricanje površine silikonske pločice prije prebrisavanja.

²⁰ Bris 2x uključuje prebrisavanje površine s 2 brisa.

4.8. Bris i ispirak na inoksu

Definiranjem sredstava za skidanje i ekstrakciju za bris sa silikona Advanta Pure, ista kombinacija isprobana je i na brisu inoksa (tablica 20), s tim da se postupak skidanja nije modificirao. Nakon odluke o primjeni jednonamjenskih cijevi silikona za proizvodnju Betazon® kreme i Betazon® masti isprobana je i kombinacija skidanja betametazondipropionata s inoksa pomoću sredstva za skidanje vode za kromatografiju R u ekstrakcijskom sredstvu vodi za kromatografiju R. Utvrđena je nestabilnost betametazondipropionata u vodi na temelju velikog odstupanja u signalima poredbenih otopina u vodi i velikog odstupanja između 6 priprema ispirka s inoksa (RSD >20%). Definirana je priprema poredbenih otopina na način da se osnovna otopina ili matična otopina priprema u mobilnoj fazi, a daljnja razrjeđenja u 10% otopini etanola u vodi. Kao konačni-referentni rezultati za bris uzeti su oni s etanolom (96%) R kao sredstvom za skidanje i 10% otopinom etanola u vodi kao sredstvom za ekstrakciju. Zbog ranije navedene nestabilnosti, uzorci ispirka nakon provedenog postupka ispiranja s vodom morali su biti stabilizirani dodatkom etanola tako da je na kraju koncentracija etanola u uzorcima iznosila 10%²¹. Tim postupkom dobiveni su rezultati s prihvatljivim odstupanjem i zadovoljavajućim povratom prikazani u tablici 21. Na inoksu se pojavljuje i pik s vremenom zadržavanja oko 2,4 minute, ali je razlučivanje nepoznatog pika i pika betametazondipropionata >3 (zahtjev: ≥1.5) pa taj pik ne utječe na analizu (slika 12).

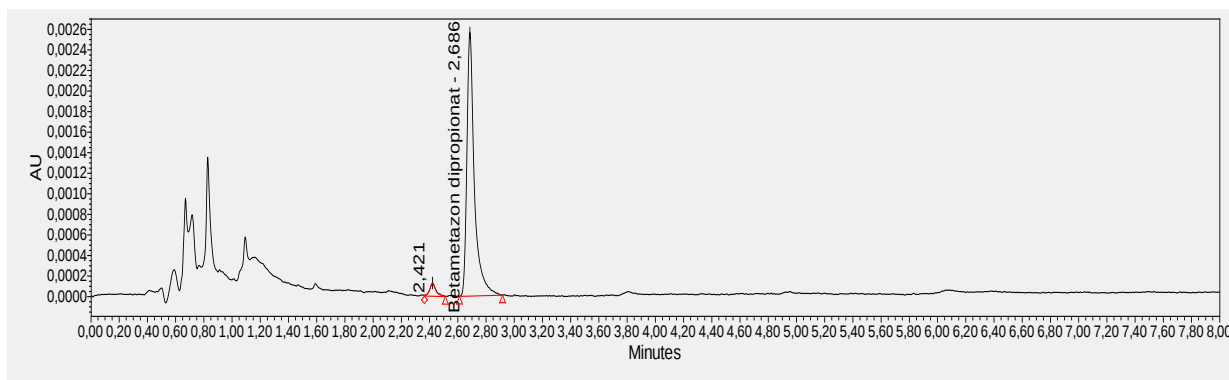
Tablica 20: Bris na cijepljenom inoksu s etanolom (96%) R kao sredstvom za skidanje i 10% otopinom etanola u vodi kao ekstrakcijskim sredstvom

Bris	POVRAT (% dobivene koncentracije u odnosu na dodanu)	Zaključak
	53,55	Zadovoljavajući povrat (>50%) uz prihvatljivo odstupanje (RSD <20%)
	55,13	
	59,58	
	65,08	
	55,94	
	48,22	
Srednja vrijednost	56,25	
RSD (%)	10,13	

²¹ Koncentracija od 10% ne odnosi se na volumni udio etanola, već je imenovana tako radi razlikovanja i jednostavnosti.

Tablica 21: Ispirak cijepljenog inoksa nakon provedene stabilizacije s 50% otopinom etanola u vodi

Ispirak	POVRAT (% dobivene koncentracije u odnosu na dodanu)	Zaključak
	80,32	Zadovoljavajući povrat (>50%) uz prihvatljivo odstupanje (RSD <20%)
	63,24	
	65,18	
	62,45	
	64,91	
	64,66	
Srednja vrijednost	66,79	
RSD (%)	10,04	



Slika 12. Kromatogram ispirka sa stabilizacijom; razlučivanje za nepoznati pik i pik betametazondipropionata iznosi 3,358

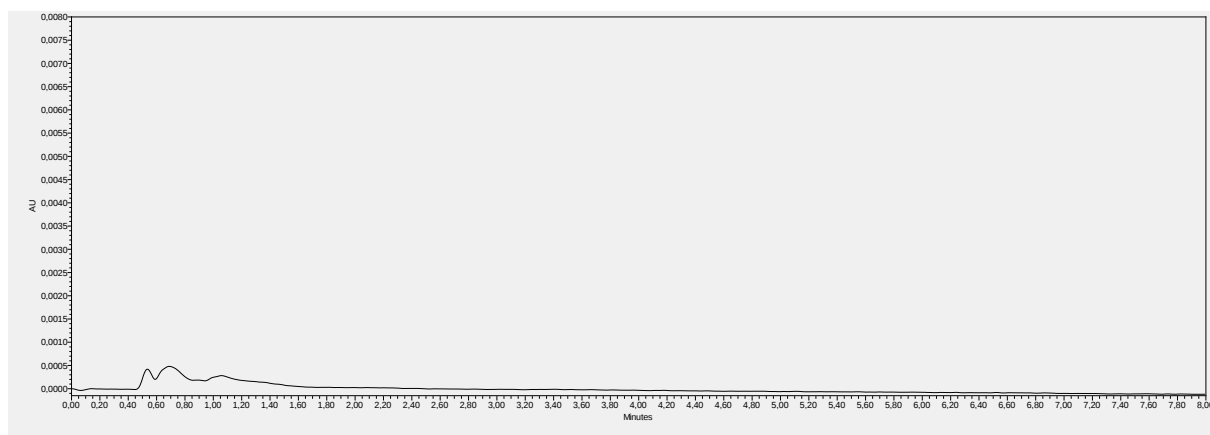
4.9. Rezultati validacije UPLC metode

Validacija analitičke metode za vrednovanje procesa čišćenja opreme nakon proizvodnje Betazon ® kreme i Betazon ® masti provedena je u laboratoriju odjela Istraživanje i razvoj (Razvojna analitika) JGL d.d. nakon razvoja metode, prema utvrđenom validacijskom protokolu. Specifikacijski leveli za ostatke betametazondipropionata su: ne više od 0,0385 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ za bris (0,257 $\mu\text{g}/\text{mL}$ s ekstrakcijskim volumenom otapala od 15 mL na površini od 100 cm^2) i 0,2269 – 0,3479²² $\mu\text{g}/\text{mL}$ za ispirke (0,27 $\mu\text{g}/\text{mL}$ korišteno je kao referentna vrijednost). Materijal na kojem je provedena validacijska studija je inoks.

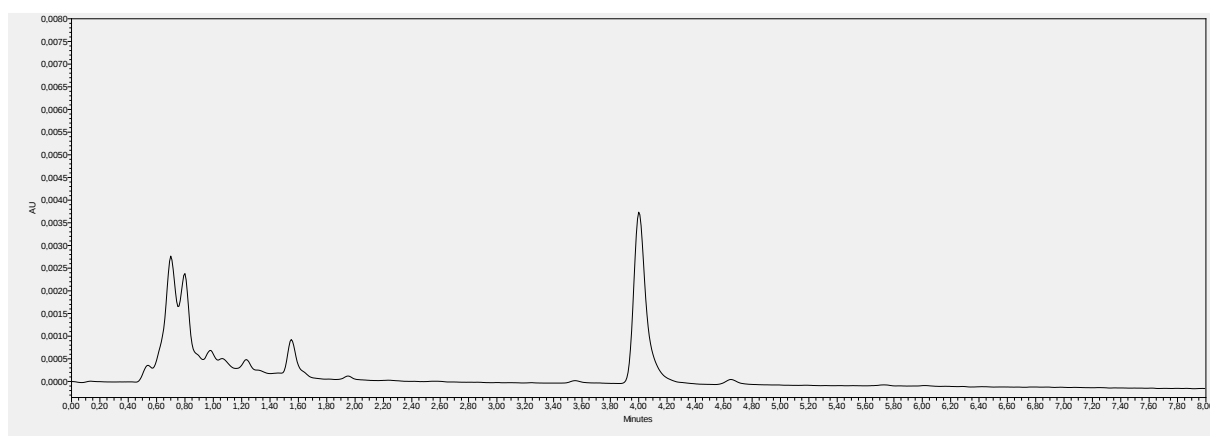
²² Ovisno o vrsti opreme.

4.9.1. Selektivnost

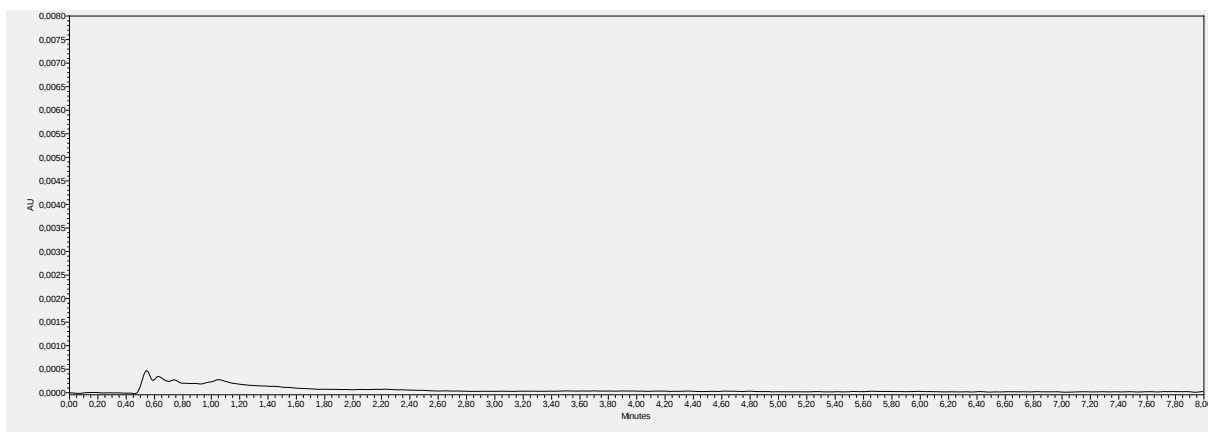
Selektivnost metode ispitana je injektiranjem sljedećih otopina: otapala, slijepog brisa, sredstava za čišćenje Cosa CIP 72 i Cosa CIP 95, placebo Betazon® kreme, placebo Betazon® masti, poredbene otopine, cijepljenog brisa i cijepljenog ispirka (slike 13-21).



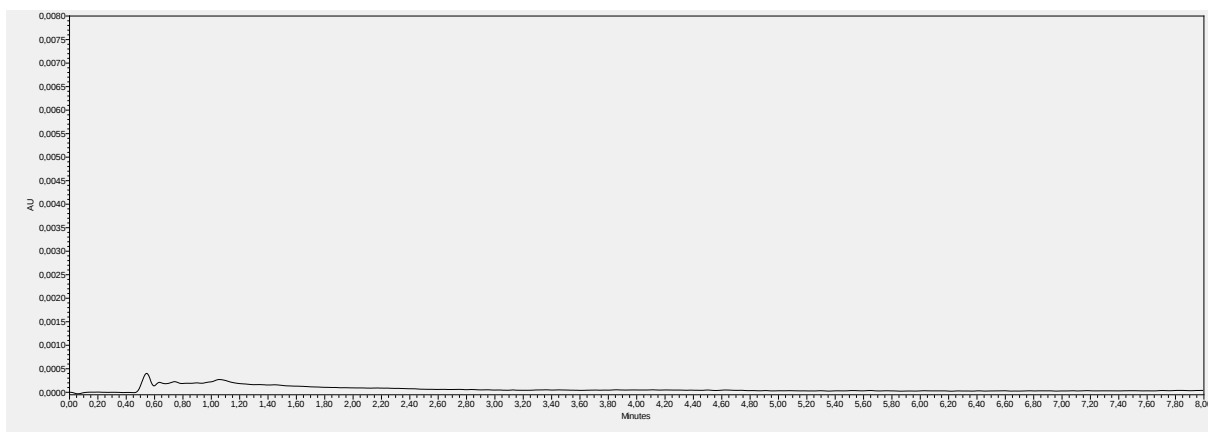
Slika 13. Kromatogram otapala



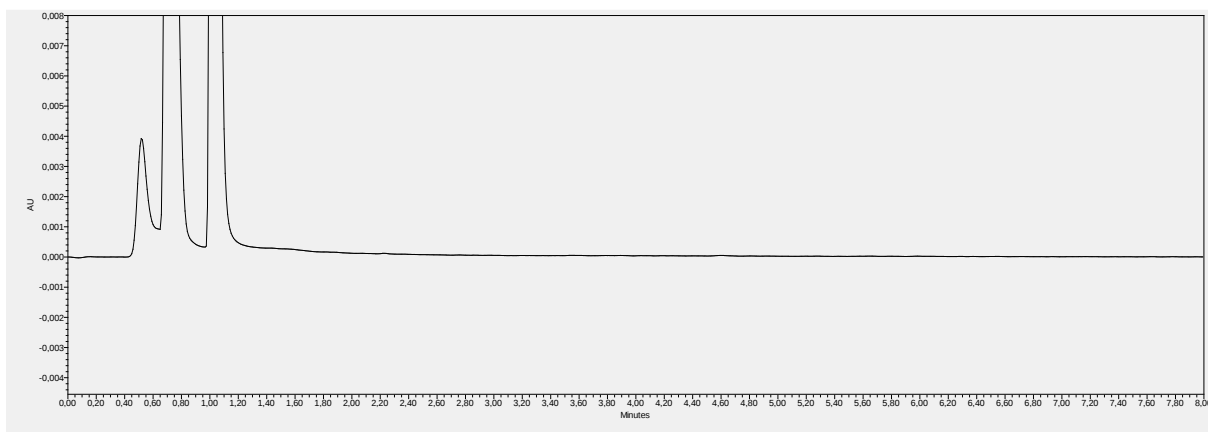
Slika 14. Kromatogram slijepog brisa



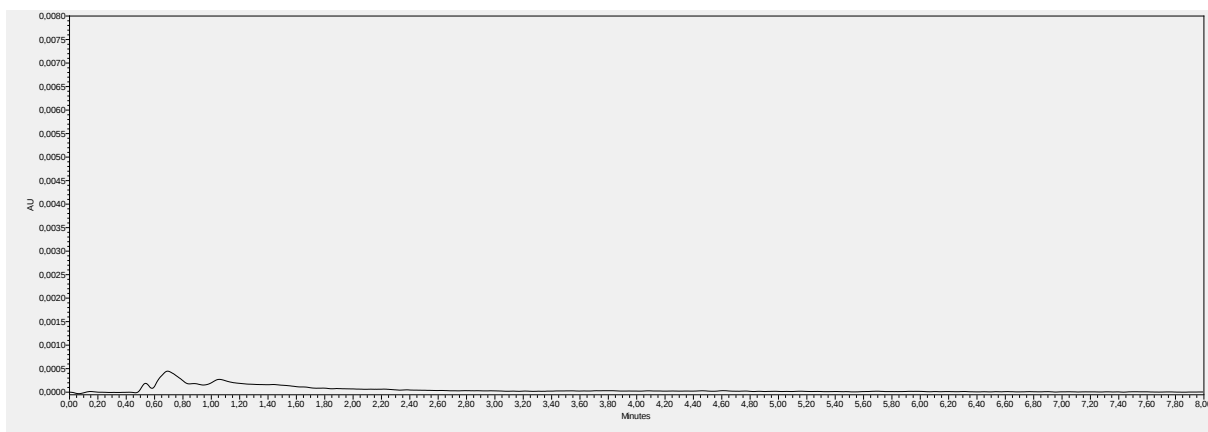
Slika 15. Kromatogram otopine sredstva za čišćenje Cosa CIP 72



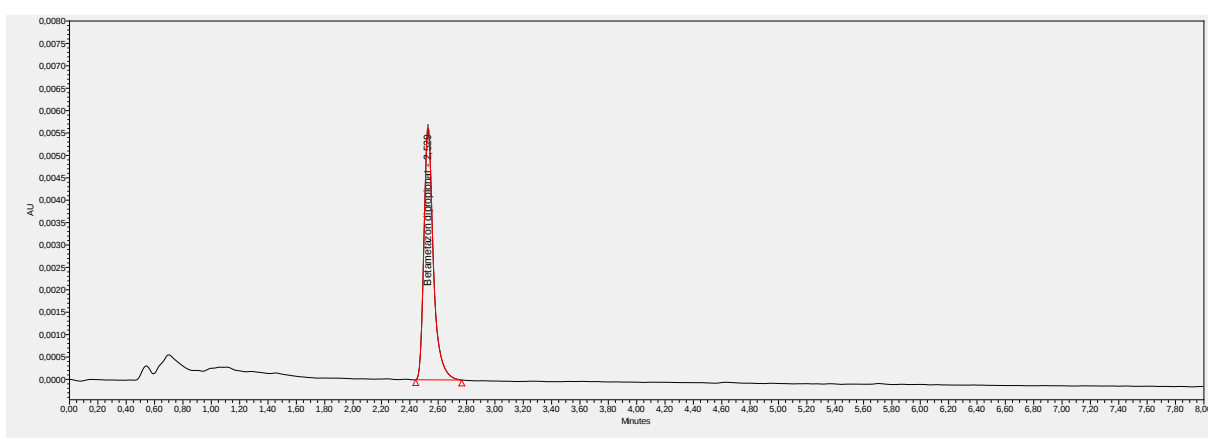
Slika 16. Kromatogram otopine sredstva za čišćenje Cosa CIP 95



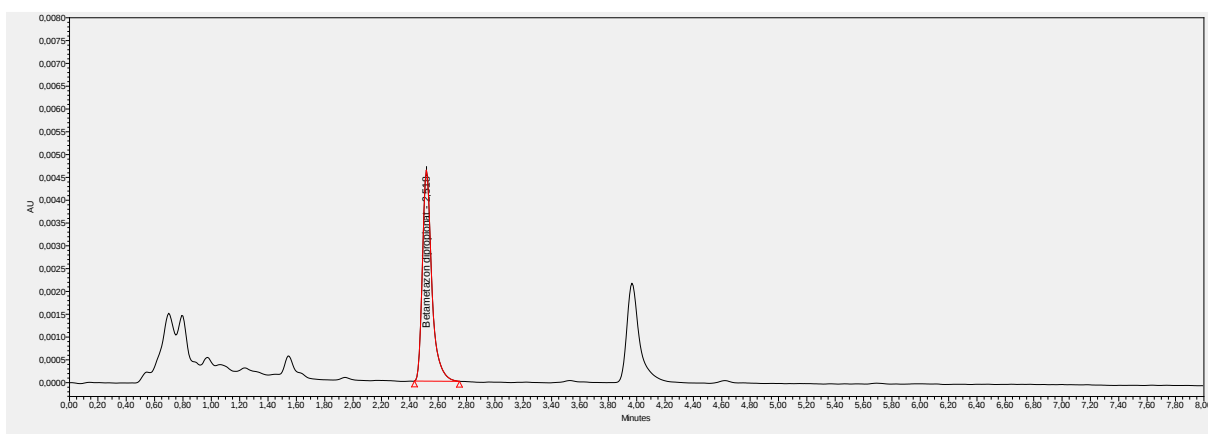
Slika 17. Kromatogram otopine placeba Betazon® kreme



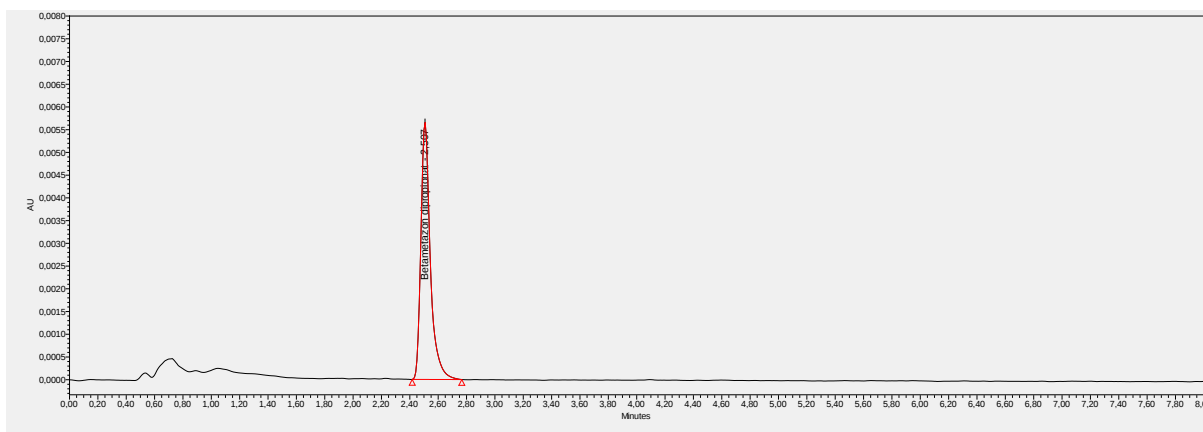
Slika 18. Kromatogram otopine placeba Betazon® masti



Slika 19. Kromatogram poredbene otopine betametazondipropionata



Slika 20. Kromatogram cijepljenog brisa



Slika 21. Kromatogram cijepljenog ispirka

Komentar: na kromatogramima otapala, slijepe probe brisa, otopina za čišćenje Cosa CIP 72 i Cosa CIP 95, otopina placeba Betazon® kreme i Betazon® masti nema pikova koji koeeluiraju/ interferiraju s pikom betametazondipropionata. Rezultati odgovaraju kriteriju selektivnosti metode.

4.9.2. Preciznost ili pouzdanost

4.9.2.1. Preciznost instrumenta

Preciznost instrumenta izračunata je na temelju površine pika betametazondipropionata u 6 ponovljenih injektiranja poredbene otopine u istom LC sustavu (tablica 22). Relativna standardna devijacija (RSD (%)) korištena je kao indikator preciznosti instrumenta.

Tablica 22: Preciznost instrumenta (poredbena otopina)

Uzorak	Redni broj injektiranja	Površina pika (AU*s)
<i>poredbena otopina</i>	1	23792
	2	23748
	3	23613
	4	23586
	5	23638
	6	23662
Srednja vrijednost		23673,2
Standardna devijacija		80,38
Relativna standardna devijacija (RSD)(%) (Zahtjev: $\leq 5,0\%$)		0,3
Preciznost instrumenta		ODGOVARA

Komentar: Rezultati analize odgovaraju kriteriju preciznosti instrumenta.

4.9.2.2. Preciznost metode (ponovljivost)

Preciznost metode (ponovljivost) ispitana je analizom 6 cijepljenih briseva i 6 cijepljenih ispiraka (tablice 23 i 24). Izračunat je povrat između teoretske koncentracije (dodane) i analizirane koncentracije (dobivene). Relativna standardna devijacija (RSD (%)) korištena je kao indikator ponovljivosti.

Tablica 23: Ponovljivost - brisevi

Uzorak/broj pripreme	Dodana koncentracija (µg/mL)	Dobivena koncentracija (µg/mL)	Povrat (%)
cijepljeni bris/ 1	0,272506	0,230203	84,5
cijepljeni bris/ 2		0,230444	84,6
cijepljeni bris/ 3		0,228921	84,0
cijepljeni bris/ 4		0,231512	85,0
cijepljeni bris/ 5		0,234543	86,1
cijepljeni bris/ 6		0,230758	84,7
Srednja vrijednost (%)			84,8
Standardna devijacija			0,7
RSD (%) (Zahtjev: ≤ 20.0%)			0,8
Interval pouzdanosti (P=95%)			84,8 ± 0,7
Preciznost metode			ODGOVARA

Tablica 24: Ponovljivost - ispirci

Uzorak/broj pripreme	Dodana koncentracija (µg/mL)	Dobivena koncentracija (µg/mL)	Povrat (%)
cijepljeni ispirak/ 1	0,277412	0,272048	98,1
cijepljeni ispirak/ 2		0,275420	99,3
cijepljeni ispirak/ 3		0,275017	99,1
cijepljeni ispirak/ 4		0,274860	99,1
cijepljeni ispirak/ 5		0,275545	99,3
cijepljeni ispirak/ 6		0,272462	98,2
Srednja vrijednost (%)			98,9
Standardna devijacija			0,6
RSD (%) (Zahtjev: ≤ 20.0%)			0,6
Interval pouzdanosti (P=95%)			98,9± 0,6
Preciznost metode			ODGOVARA

Komentar: Rezultati analize odgovaraju kriteriju preciznosti metode (ponovljivosti).

4.9.2.3. Transfer metode (obnovljivost)

Pripravljeno je 6 uzoraka cijepljenih briseva od strane 2 analitičara iz dva različita laboratorija (Istraživanje i razvoj te Kontrola kvalitete) i analizirano je na 2 različita instrumenta (tablica 25). Izračunat je povrat između teoretske koncentracije (dodane) i analizirane koncentracije (dobivene). Relativna standardna devijacija (RSD (%)) između povrata za svakog analitičara korištena je kao indikator obnovljivosti.

Sukladno validacijskom protokolu, transfer metode ispitan je samo na uzorcima cijepljenog brisa.

Tablica 25: Transfer metode

Uzorak/ broj pripreme	Povrat Analitičar 1 – Istraživanje i razvoj (%)	Povrat Analitičar 2 – Kontrola kvalitete (%)
cijepljeni bris/ 1	84,5	81,8
cijepljeni bris/ 2	84,6	83,1
cijepljeni bris/ 3	84,0	84,6
cijepljeni bris/ 4	85,0	84,4
cijepljeni bris/ 5	86,1	84,1
cijepljeni bris/ 6	84,7	82,2
Srednja vrijednost	84,8	83,4
Standardna devijacija	0,7	1,2
RSD (%) (Zahtjev: $\leq 20.0\%$)	0,8	1,4
Relativna razlika između analitičara 1 i analitičara 2 (%) (Zahtjev: $\pm 20\%$)	1,42	
Transfer metode	ODGOVARA	

Komentar: rezultati analize odgovaraju kriteriju obnovljivosti metode.

4.9.3. Točnost

Ispitivanje točnosti provedeno je u triplicatu za 3 koncentracije cijepljenog brisa: 50, 100 i 200% od koncentracije poredbene otopine, i u triplicatu za 5 koncentracija cijepljenog ispirka: 15 (LOQ), 50, 100, 150 i 200% od koncentracije poredbene otopine (tablice 26 i 27). Točnost metode izračunata je kao povrat između teoretske koncentracije (dodane) i analizirane koncentracije (dobivene). Prosječni povrat i RSD (%) izračunati su za svaku koncentraciju.

Rezultati:

Tablica 26: Točnost metode – brisevi

Uzorak/ koncentracija	Dodana koncentracija (µg/mL)	Dobivena koncentracija (µg/mL)	Povrat (%)	Prosječni povrat po koncentraciji (%) (Zahtjev: 60-130%)	RSD (%)
cijepljeni bris/ 50%	0,134472	0,110432	82,1	82,4	1,7
	0,133348	0,111949	84,0		
	0,132732	0,107676	81,1		
cijepljeni bris/ 100%	0,266565	0,219677	82,4	82,4	0,6
	0,264338	0,219180	82,9		
	0,263118	0,215370	81,9		
cijepljeni bris/ 200%	0,535544	0,461480	86,2	86,8	1,0
	0,531513	0,466940	87,9		
	0,525744	0,454579	86,5		
Prosječni povrat (n=9) (%) (Zahtjev: 60-130%)			83,9	ODGOVARA	

Tablica 27: Točnost metode - ispirci

Uzorak/ koncentracija	Dodana koncentracija (µg/mL)	Dobivena koncentracija (µg/mL)	Povrat (%)	Prosječni povrat po koncentraciji (%) (Zahtjev: 60-130%)	RSD (%)
Cijepljeni ispirak/ LOQ	0,041042	0,040609	98,9	98.8	0.3
	0,041463	0,040833	98,5		
	0,041112	0,040650	98,9		
Cijepljeni ispirak/ 50%	0,136807	0,135875	99,3	99.9	1.3
	0,138211	0,136796	99,0		
	0,137041	0,138870	101,3		
Cijepljeni ispirak/ 100%	0,273614	0,273405	99,9	99.7	1.2
	0,276422	0,272166	98,5		
	0,274082	0,276171	100,8		
Cijepljeni ispirak/150%	0,410420	0,406759	99,1	99.5	0.9
	0,414632	0,409603	98,8		
	0,411122	0,413192	100,5		
Cijepljeni ispirak/ 150%	0,547227	0,537966	98,3	99.5	1.6
	0,552843	0,547373	99,0		
	0,548163	0,555202	101,3		
Prosječni povrat (n=15) (%) (Zahtjev: 60-130%)			99,5	ODGOVARA	

Komentar: rezultati analize odgovaraju kriteriju točnosti metode.

4.9.4. Linearnost

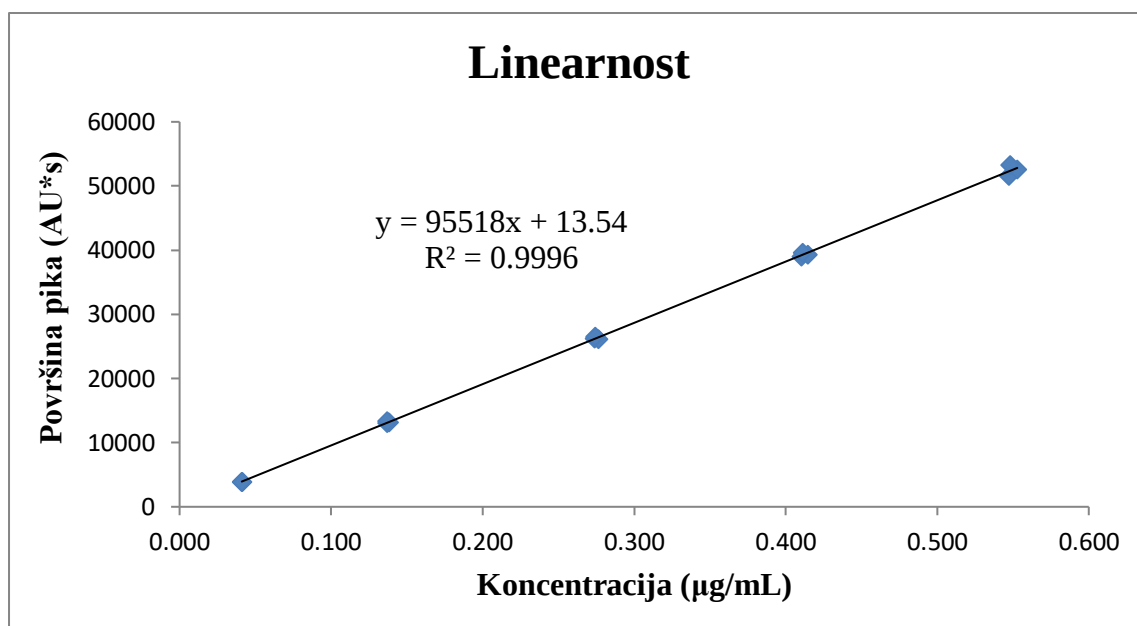
Ispitivanje linearnosti provedeno je u triplikatu za 5 koncentracija: 15 (LOQ), 50, 100, 150 i 200% od koncentracije poredbene otopine (tablica 28 i slika 12). Linearnost metode izražena je jednadžbom regresijskog pravca, odsječkom na osi y, koeficijentom determinacije i korelacijskim koeficijentom.

Linearnost regresije prikazana je matematičkim modelom jednadžbe pravca $y = ax + b$.

Rezultati su prezentirani tablično i grafičkim prikazom kalibracijskog pravca.

Tablica 28: Linearnost metode

Koncentracija	Koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	Površina pika (AU*s)
LOQ	0,041042	3898
	0,041463	3920
	0,041112	3902
50%	0,136807	13043
	0,138211	13131
	0,137041	13330
100%	0,273614	26244
	0,276422	26125
	0,274082	26510
150%	0,410420	39045
	0,414632	39318
	0,411122	39662
200%	0,547227	51639
	0,552843	52542
	0,548163	53294
Jednadžba regresijskog pravca		$y = 95518x + 13.54$
Nagib		95518
Odsječak na y-osi		13.54
Koeficijent determinacije (R^2)		0.9996
Korelacijski koeficijent (r) (Zahtjev: min 0,99)		0.9998
Linearnost metode		ODGOVARA



Slika 12. Linearnost metode – kalibracijski pravac

Komentar: Rezultat analize odgovara kriteriju linearnosti metode.

4.9.5. Radno područje

Podaci iz ispitivanja linearnosti i točnosti metode iskorišteni su za definiranje radnog područja metode.

Radno područje iznosi od 15% (LOQ) do 200% koncentracije poredbene otopine što odgovara koncentracijskom rasponu od 0,04 – 0,54 µg/mL betametazondipropionata.

Komentar: Rezultati analize odgovaraju kriteriju radnog područja metode.

4.9.6. Otpornost ili izdržljivost

Stabilnost otopina

Stabilnost otopina ispitana je na poredbenoj otopini, slijepoj probi brisa i cijepljenom brisu 100%²³, pohranjenima na sobnoj temperaturi i u hladnjaku (2-8°C). Slijepa proba brisa

²³ Jedan set priprava uključivao je dodatak otapala odmah nakon cijepljenja, dok je drugom setu otapalo dodano tek prije analize; detalji su opisani u poglavlju Materijali i metode.

promatrana je zbog moguće pojave dodatnog pika/dodatnih pikova koji bi mogli interferirati s pikom betametazondipropionata.

Rezultati su prikazani kao relativna devijacija između površine pika u vremenu $t=0$ i površine nakon određenog vremena koje je proteklo od pripreme otopina (tablice 29-34).

Za stabilnost cijepljenog ispirka 100% korišteni su rezultati za poredbenu otopinu obzirom da im je način pripreme identičan.

Tablica 29: Stabilnost poredbene otopine/cijepljenog ispirka 100% na sobnoj temperature (15 – 25°C)

Uzorak	Proteklo vrijeme (h)	Površina pika (AU*s)	Relativna devijacija od početne vrijednosti (Zahtjev: $\leq 15\%$)
poredbena otopina/ cijepljeni ispirak 100%	0	26370	0,00
	24	26014	1,35
	48	26085	1,08
	72	26086	1,08
Stabilnost poredbene otopine/ cijepljenog ispirka 100% na sobnoj temperaturi			ODGOVARA

Tablica 30: Stabilnost poredbene otopine/cijepljenog ispirka 100% u hladnjaku (2 – 8°C)

Uzorak	Proteklo vrijeme (h)	Površina pika (AU*s)	Relativna devijacija od početne vrijednosti (Zahtjev: $\leq 15\%$)
poredbena otopina/ cijepljeni ispirak 100%	0	26370	0.0
	24	26014	1,35
	48	26248	0,46
	72	26043	1,24
Stabilnost poredbene otopine/ cijepljenog ispirka 100% u hladnjaku			ODGOVARA

Tablica 31: Stabilnost cijepljenog brisa 100% na sobnoj temperaturi (15 – 25°C)

Uzorak	Proteklo vrijeme (h)	Površina pika (AU*s)	Relativna devijacija od početne vrijednosti (Zahtjev: ≤15%)
Cijepljeni bris 100%	0	22069	0,00
	23	21116	4,32
	47	21331	3,34
	72	21325	3,37
Stabilnost cijepljenog brisa 100% na sobnoj temperaturi			ODGOVARA

Tablica 32: Stabilnost cijepljenog brisa 100% u hladnjaku (2 – 8°C)

Uzorak	Proteklo vrijeme (h)	Površina pika (AU*s)	Relativna devijacija od početne vrijednosti (Zahtjev: ≤15%)
Cijepljeni bris 100%	0	22069	0,00
	24	20734	6,05
	48	20442	7,37
	72	21030	4,71
Stabilnost cijepljenog brisa 100% u hladnjaku			ODGOVARA

Tablica 33: Stabilnost „suhog“ cijepljenog brisa 100% na sobnoj temperaturi (15 – 25°C)

Uzorak	Proteklo vrijeme (h)	Površina pika (AU*s)	Relativna devijacija od početne vrijednosti (Zahtjev: ≤15%)
“Suhi” cijepljeni bris 100%	0	22069	0,00
	24	23464	6,32
	48	29636	34,29
	72	26052	18,05
Stabilnost “suhog” cijepljenog brisa 100% na sobnoj temperaturi			ODGOVARA kroz 24h

Tablica 34: Stabilnost „suhog“ cijepljenog brisa 100% u hladnjaku (2 – 8°C)

Uzorak	Proteklo vrijeme (h)	Površina pika (AU*s)	Relativna devijacija od početne vrijednosti (Zahtjev: ≤15%)
“Suhi” cijepljeni bris 100%	0	22069	0.00
	24	24450	10.79
	48	22692	2.82
	72	23651	7.17
Stabilnost “suhog” cijepljenog brisa 100% u hladnjaku			ODGOVARA

Komentar: Rezultati odgovaraju kriteriju stabilnosti otopina.

Rezultati pokazuju da su poredbena otopina, cijepljeni ispirci i cijepljeni brisevi stabilni tijekom najmanje 72 sata na sobnoj temperature (15 – 25°C) i u hladnjaku (2 – 8°C).

“Suhi” cijepljeni brisevi stabilni su tijekom 24 sata na sobnoj temperature (15 - 25°C) i najmanje tijekom 72 sata u hladnjaku (2 – 8°C).

Za vrijeme ispitivanja stabilnosti, na kromatogramu slijepe probe brisa nije uočen niti jedan pik koji bi mogao interferirati s pikom betametazondipropionata.

4.9.7. Limit detekcije (LOD)

Limit detekcije određen je na temelju omjera signala i šuma minimalne vrijednosti 3 za pik betametazondipropionata (tablica 35).

Tablica 35: Limit detekcije

Koncentracija (µg/mL)	Broj pripreme	Površina pika (AU*s)	s/n omjer
0,02 (7%)	1	1986	69
		1908	97
	2	1930	118
		2003	90
	3	2029	93
		2045	77
Srednja vrijednost		1984	91
Omjer signala i šuma (Zahtjev: ≥3)		ODGOVARA	
LIMIT DETEKCIJE		0.02 µg/mL (7 %)	

Komentar: Limit detekcije metode određen je na koncentraciji od 0,02 µg/mL što odgovara 7% vrijednosti koncentracije poredbene otopine. Omjer signala i šuma za pik betametazondipropionata pri ispitivanoj koncentraciji je 91.

4.9.8. Limit kvantifikacije (LOQ)

Limit kvantifikacije određen je na temelju omjera signala i šuma minimalne vrijednosti 10 za pik betametazondipropionata (tablica 36) te povrata na toj koncentraciji (tablica 37).

Tablica 36: Limit kvantifikacije – omjer signala i šuma

Koncentracija (µg/mL)	Broj pripreme	Površina pika (AU*s)	s/n omjer
0,04 (15%)	1	3918	293
		3878	223
	2	3909	146
		3930	267
	3	3938	164
		3866	141
Srednja vrijednost		3907	206
Omjer signala i šuma (Zahtjev: ≥10)		ODGOVARA	
LIMIT KVANTIFIKACIJE		0.04 µg/mL (15 %)	

Tablica 37: Limit kvantifikacije – povrat

Koncentracija (µg/mL)	Broj pripreme	Dodana koncentracija (µg/mL)	Dobivena koncentracija (µg/mL)	Povrat (%)
0,04 (15%)	1	0.041042	0.040609	98,9
	2	0.041463	0.040833	98,5
	3	0.041112	0.040650	98,9
Srednja vrijednost (%)				98,8
Povrat (Zahtjev: 80,0 – 120,0%)				ODGOVARA
LIMIT KVANTIFIKACIJE				0.04 µg/mL (15 %)

Komentar: Limit kvantifikacije metode određen je na koncentraciji od 0,04 µg/mL što odgovara 15% vrijednosti koncentracije poredbene otopine. Omjer signala i šuma za pik betametazondipropionata pri ispitivanoj koncentraciji je 206.

4.9.9. Faktor iskoristivosti

Faktor iskoristivosti određen je na specifikacijskom levelu za materijal inoks.

Otopina betametazondipropionata pripremljena je, i u obliku kapljica smještena na 6 ploha inoks ploče (površina 100 cm²) za određivanje faktora iskoristivosti brisa te na dno 6 inoks čaša (površina 44,2 cm²) za određivanje faktora iskoristivosti ispirka. Nakon sušenja, uzorkovanje je provedeno brisom na inoks ploči i ispiranjem u inoks čašama.

Izračunat je povrat između teoretske (dodane) i stvarne (dobivene) koncentracije betametazondipropionata te prosječni povrat i RSD (%) za svih 6 replikata oba tipa uzorka (tablice 38 i 39).

Tablica 38: Povrat za bris - inoks ploča

Uzorak/ broj pripreme	Dodana koncentracija (µg/mL)	Dobivena koncentracija (µg/mL)	Povrat (%)
Bris/ 1	0,258413	0,181791	70,3
Bris/ 2		0,163411	63,2
Bris/ 3		0,156676	60,6
Bris/ 4		0,160239	62,0
Bris/ 5		0,152536	59,0
Bris/ 6		0,163432	63,2
Srednja vrijednost (%)			63,1
Standardna devijacija			3,9
RSD (%) (Zahtjev: ≤20%)			6,2
Faktor iskoristivosti brisa			ODGOVARA

Tablica 39: Povrat za ispirak - inoks čaša

Uzorak/ broj pripreme	Dodana koncentracija (µg/mL)	Dobivena koncentracija (µg/mL)	Povrat (%)
Ispirak/ 1	0,173289	0,097921	56,5
Ispirak/ 2		0,100015	57,7
Ispirak/ 3		0,107000	61,7
Ispirak/ 4		0,100984	58,3
Ispirak/ 5		0,105588	60,9
Ispirak/ 6		0,103062	59,5
Srednja vrijednost (%)			59,1
Standardna devijacija			2,0
RSD (%) (Zahtjev: ≤20%)			3,4
Faktor iskoristivosti ispirka			ODGOVARA

Komentar: Rezultati odgovaraju kriteriju za određivanje faktora iskoristivosti.

Faktori iskoristivosti iznose:

- Za bris – inoks: 0,63 (63,1%)
- Za ispirak – inoks: 0,59 (59,1%)

5. Zaključci

1. Razvijena je i validirana UPLC metoda za vrednovanje procesa čišćenja opreme nakon proizvodnje Betazon® kreme i Betazon® masti
2. Metoda je razvijena na koncentracijama određenim maksimalnim dozvoljenim prijenosom tvari (MAC) u sljedeći proces proizvodnje
3. Kromatografski uvjeti konačno definirane metode su: protok od 0,75 mL/min, valna duljina detekcije od 240 nm, kolona: Zorbax Extend-C18 100 x 3,0 mm, 1,8μm temperirana na 25°C, mobilna faza acetonitril za kromatografiju R : voda za kromatografiju R = 60 : 40 (V/V%), volumen injektiranja od 40μL, temperatura injektora 20°C i vrijeme provođenja kromatografskog postupka od 8 minuta
4. Najveći povrat za bris na materijalu silikon - Advanta Pure definiran je i ostvaren metodom sa špricanjem pomoću etanola (96%) R kao sredstva za špricanje i skidanje te 10% otopine etanola u vodi kao otapala
5. Bris na materijalu inoks definiran je s etanolom (96%) R kao sredstvom za skidanje i 10% otopinom etanola u vodi kao otapalom za ekstrakciju
6. Odlukom o primjeni jednonamjenskih cijevi u proizvodnji Betazon® kreme i Betazon® masti, validacija metode nije provedena na materijalu silikon
7. Ispirak na materijalu inoks definiran je na način da se nakon uzorkovanja dodaje sredstvo za stabilizaciju (50% otopina etanola u vodi) zbog utvrđene nestabilnosti betametazondipropionata u vodi
8. Parametri validacije koje je metoda zadovoljila su selektivnost, linearnost, radno područje, točnost, limit detekcije i limit kvantifikacije
9. Stabilnost poredbene otopine, cijepljenih briseva i cijepljenih ispiraka potvrđena je tijekom najmanje 72 sata u hladnjaku i na sobnoj temperaturi dok je stabilnost „suhih“ cijepljenih briseva potvrđena tijekom 24 sata na sobnoj temperaturi i tijekom najmanje 72 sata u hladnjaku
10. Limit detekcije metode određen je na koncentraciji od 0,02 μg/mL, a limit kvantifikacije na 0,04 μg/mL betametazondipropionata
11. Radno područje metode je u rasponu od 0,04 do 0,54 μg/mL betametazondipropionata
12. Faktor iskoristivosti iznosi 0,63 za bris, a 0,59 za ispirak na materijalu inoks

6. Literatura

Bach-Rojecky L. Hormoni hipotalamusa i hipofize, tiroidni hormoni i kortikosteroidi, predavanje, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2016.

Betamethasone, DrugBank, www.drugbank.ca, pristupljeno 26.04.2018.

Betamethasone dipropionate, Pubchem, pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, pristupljeno 26.04.2018.

Committee for Proprietary Medicinal Products, CPMP. ICH Q2 (R1), Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, CPMP/ICH/381/95, 1995.

Council of Europe. European pharmacopeia (Ph. Eur.) 8th edition, 2013, str. 1661-1662.

Enstilar®: Full prescribing information, Leo Laboratories, Dublin, enstilar.com, pristupljeno 26.04.2018.

Ho WF. Stuart B. Practical Laboratory Skills Training Guides: High Performance Liquid Chromatography, Prichard E, urednica, Cambridge, UK, Royal Society of Chemistry, 2003, str. 5-7.

HPLC Center, Idex Health & Science, www.idex-hs.com, pristupljeno 09.05.2018.

HPLC Separation Modes, Waters, www.waters.com, pristupljeno 10.05.2018.

Liquid chromatography, Chromatography central, www.chromatography.co, pristupljeno 08.05.2018.

Majors RE, Carr PW. Glossary of Liquid-Phase Separation Terms, LCGC, 2001, 19(2), 124-162.

Mobile phase in chromatography, IUPAC Goldbook, goldbook.iupac.org, pristupljeno 14.05.2018.

Nam YS, Kwon IK, Lee KB. Monitoring of clobetasol propionate and betamethasone dipropionate as undeclared steroid in cosmetic products manufactured in Korea, *Forensic Sci Int*, 2011, 210(3), 144-8.

Narayana Murthy D, Chitra K. A Review Article On Cleaning Validation, *Int J Pharma Sci Res*, 2013, 4(9), 3317-3327.

Nigović B. Atomska emisijska spektroskopija, predavanje, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2016.

Nigović B. Kromatografske tehnike odjeljivanja, predavanje, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2016.

Nigović B. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), predavanje, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2016.

Nigović B, Jurešić Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova – praktikum, skripta, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2014, str. 135-137.

Parenteral Drug Association. Technical Report No. 29 (Revised): Points to Consider for Cleaning Validation, PDA, 2012.

Roy C, Chakrabarty J, Rao Ratti R. Development and validation of a stability-indicating NP-HPLC method for simultaneous determination of betamethasone dipropionate and calcipotriene in topical dosage form, *Arch Appl Sci Res*, 2013, 5(2), 15-24

Segaert S, Shear NH, Chiricozzi A, Thači D, Carrascosa JM, Young H, Descamps V. Optimizing Anti-Inflammatory Effect of Corticosteroid and Vitamin D Analogue Fixed-Dose Combination Therapy, *Dermatol Ther (Heidelb)*, 2017, 7(3), 265-279.

Shams A, Khan IU, Igbal H. Analysis of salicylic acid, arbutin and corticosteroids in skin whitening cream available in Pakistan using chromatographic techniques, *Int J Cosmet Sci*, 2016, 38(4), 421-8.

Simon A, Mendes Cabral L, Pereira de Sousa V. Development and validation of an analytical method by HPLC for simultaneous quantification of betamethasone dipropionate and betamethasone sodium phosphate in injectable suspension, *Quim Nova*, 2012, 35(3), 593-600.

Skoog DA, West DM, Holler FJ. Osnove analitičke kemije, Beršenić D, urednica, Zagreb, Školska knjiga, 1999, str. 645-673, 692-716.

Smith RM, Marton A. Classification and Characterization of Stationary phases for Liquid Chromatography Part I: Descriptive terminology (IUPAC Recommendations 1997), *Pure & Appl Chem*, 1997, 69(7), 1475-1480.

Stojadinović O, Lee B, Vouthounis C, Vukelić S, Pastar I, Blumenberg M, Brem H, Tomic-Canic M. Novel Genomic Effects of Glucocorticoids in Epidermal Keratinocytes: Inhibition of Apoptosis, Interferon- γ Pathway, and Wound Healing Along With Promotion of Terminal Differentiation, *J Biol Chem*, 2007, 282, 4021-4034.

Swartz M. HPLC Detectors: A Brief Review, *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2010, 33, 1130-1150.

System suitability, USP, www.pharmacopeia.cn, pristupljeno 02.06.2018.

Taleuzzaman M, Ali S, Gilani SJ, Imam SS, Hafez A. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) – A Review, *Austin J Anal Pharm Chem*, 2015, 2(6), 1056.

The LC Handbook, Agilent, www.agilent.com, pristupljeno 12.05.2018.

Uva L, Miguel D, Pinheiro C, Antunes J, Cruz D, Ferreira J, Filipe P. Mechanisms of Action of Topical Corticosteroids in Psoriasis, *Int J Endocrinol*, 2012, 561018.

Vairale AS, Sivaswaroop P, Bandana S. Development and Validation of Stability-indicating HPLC Method for Betamethasone Dipropionate and Related Substances in Topical Formulation, *Indian J Pharm Sci*, 2012, 74(2), 107-115.

What Is HPLC (High Performance Liquid Chromatography)?, Waters, www.waters.com, pristupljeno 09.05.2018.

Why is pH important for HPLC buffers, LCGC CHROMacademy, www.chromacademy.com, pristupljeno 14.05.2018.

7. Sažetak/ Summary

SAŽETAK

Razvoj i validacija LC metode za vrednovanje procesa čišćenja opreme nakon proizvodnje Betazon® kreme i Betazon® masti

Betametazondipropionat aktivna je komponenta topičke formulacije čija je proizvodnja izabrana kao najsloženiji slučaj procesnih uvjeta prilikom izrade polučvrstih oblika. Razvijena je i validirana UPLC metoda za određivanje ostataka betametazondipropionata nakon proizvodnje Betazon® kreme i Betazon® masti. Tijekom razvoja definirani su sljedeći kromatografski uvjeti: protok od 0,75 mL/min, valna duljina detekcije od 240 nm, kolona Zorbax Extend-C18 100 x 3,0 mm, 1,8µm temperirana na 25°C, mobilna faza acetonitril za kromatografiju R : voda za kromatografiju R = 60 : 40 (V/V%), volumen injektiranja od 40µL, temperatura injektora 20°C i vrijeme elucije 8 minuta.

Validacijska studija provedena je samo na materijalu inoks zbog odluke o nabavi jednonamjenskih silikonskih cijevi u proizvodnji Betazon® kreme i Betazon® masti. Metoda je uspješno validirana kroz parametre: selektivnost, linearnost, radno područje, točnost, limit detekcije i limit kvantifikacije. Ispitana je i stabilnost poredbene otopine, cijepljenog ispirka, cijepljenog brisa i „suhog“ cijepljenog brisa te je određen faktor iskoristivosti za bris i ispirak. Limit kvantifikacije metode iznosi 0,04 µg/mL, a radno područje je u rasponu od 0,04-0,54 µg/mL betametazondipropionata.

Ključne riječi: betametazondipropionat, UPLC, vrednovanje procesa čišćenja, validacija analitičke metode

SUMMARY

Development and validation of LC method for evaluation of the equipment cleaning process after production of Betazon® cream and Betazon® ointment

Betamethasone dipropionate is an active pharmaceutical ingredient in topical formulation which production has been chosen as the worst case scenario in production of semi-solid products. UPLC method has been developed and validated for determining the residues of betamethasone dipropionate after production of Betazon ® cream and Betazon® ointment. During development, next chromatographic conditions have been defined: flow 0,75 mL/min, detection wavelength 240 nm, column Zorbax Extend-C18 100 x 3,0 mm, 1,8 µm tempered at 25°C, mobile phase containing acetonitrile for chromatography R : water for chromatography R = 60 : 40 (V/V%), injecting volume 40µL, injector temperature 20°C and run time 8 minutes.

Validation study has been conducted for inox material only due to decision of using dedicated silicon plumbs in production of Betazon ® cream and Betazon® ointment. Method has been successfully validated through next parameters: selectivity, linearity, range, accuracy, limit of detection and limit of quantitation. Stability of reference solution, spiked eluate, spiked swab and „dry“ spiked swab has also been studied and recovery factors have been determined for both eluate and swab. Method's limit of quantitation is 0,04 µg/mL and range is in span from 0,04 to 0,54 µg/mL of betamethasone dipropionate.

Key words: betamethasone dipropionate, UPLC, cleaning validation, validation of analytical procedure

8. 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

Razvoj i validacija LC metode za vrednovanje procesa čišćenja opreme nakon proizvodnje Betazon® kreme i Betazon® masti

Ivan Sušanj

SAŽETAK

Betametazondipropionat aktivna je komponenta topičke formulacije čija je proizvodnja izabrana kao najsloženiji slučaj procesnih uvjeta prilikom izrade polučvrstih oblika. Razvijena je i validirana UPLC metoda za određivanje ostataka betametazondipropionata nakon proizvodnje Betazon® kreme i Betazon® masti. Tijekom razvoja definirani su sljedeći kromatografski uvjeti: protok od 0,75 mL/min, valna duljina detekcije od 240 nm, kolona Zorbax Extend-C18 100 x 3,0 mm, 1,8µm temperirana na 25°C, mobilna faza acetonitril za kromatografiju R : voda za kromatografiju R = 60 : 40 (V/V%), volumen injektiranja od 40µL, temperatura injektora 20°C i vrijeme elucije 8 minuta.

Validacijska studija provedena je samo na materijalu inoks zbog odluke o nabavi jednonamjenskih silikonskih cijevi u proizvodnji Betazon® kreme i Betazon® masti. Metoda je uspješno validirana kroz parametre: selektivnost, linearnost, radno područje, točnost, limit detekcije i limit kvantifikacije. Ispitana je i stabilnost poredbene otopine, cijepljenog ispirka, cijepljenog brisa i „suhog“ cijepljenog brisa te je određen faktor iskoristivosti za bris i ispirak. Limit kvantifikacije metode iznosi 0,04 µg/mL, a radno područje je u rasponu od 0,04-0,54 µg/mL betametazondipropionata.

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

Rad sadrži: 87 stranica, 12 grafičkih prikaza, 39 tablica i 34 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: betametazondipropionat, UPLC, vrednovanje procesa čišćenja, validacija analitičke metode

Mentor: **Dr. sc. Biljana Nigović**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Biljana Nigović**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Ana Mornar Turk, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Danijela Štanfel, Jadran galenski laboratorij d.d. Rijeka

Rad prihvaćen: srpanj 2018.

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

Development and validation of LC method for evaluation of the equipment cleaning process after production of Betazon® cream and Betazon® ointment

Ivan Sušanj

SUMMARY

Betamethasone dipropionate is an active pharmaceutical ingredient in topical formulation with production has been chosen as the worst case scenario in production of semi-solid products. UPLC method has been developed and validated for determining the residues of betamethasone dipropionate after production of Betazon ® cream and Betazon® ointment. During development, next chromatographic conditions have been defined: flow 0,75 mL/min, detection wavelength 240 nm, column Zorbax Extend-C18 100 x 3,0 mm, 1,8 µm tempered at 25°C, mobile phase containing acetonitrile for chromatography R : water for chromatography R = 60 : 40 (V/V%), injecting volume 40µL, injector temperature 20°C and run time 8 minutes.

Validation study has been conducted for inox material only due to decision of using dedicated silicon plumbs in production of Betazon ® cream and Betazon® ointment. Method has been successfully validated through next parameters: selectivity, linearity, range, accuracy, limit of detection and limit of quantitation. Stability of reference solution, spiked eluate, spiked swab and „dry“ spiked swab has also been studied and recovery factors have been determined for both eluate and swab. Method's limit of quantitation is 0,04 µg/mL and range is in span from 0,04 to 0,54 µg/mL of betamethasone dipropionate.

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

Thesis includes: 87 pages, 12 figures, 39 tables and 34 references. Original is in Croatian language.

Keywords: betamethasone dipropionate, UPLC, cleaning validation, validation of analytical procedure

Mentor: **Biljana Nigović, Ph.D. Full Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Biljana Nigović, Ph.D. Full Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ana Mornar Turk, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Danijela Štanfel, Ph.D. Jadran galenski laboratorij d.d. Rijeka

The thesis was accepted: July 2018.