

# Validacija metode HPLC za određivanje onečišćenja u aktivnoj supstanci verapamilu

---

Kaličanec, Mislav

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:627690>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijски odsjek

Mislav Kaličanec

**VALIDACIJA METODE HPLC ZA  
ODREĐIVANJE ONEČIŠĆENJA U  
AKTIVNOJ SUPSTANCI VERAPAMILU**

**Diplomski rad**

predložen Kemijском odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
radi stjecanja akademskog zvanja  
magistar kemije

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad izrađen je u laboratoriju za Kontrolu kvalitete Pliva Hrvatska d.o.o pod mentorstvom prof.dr.sc. Ive Juranović Cindrić i neposrednim voditeljstvom dipl. ing. preh. teh. Silvije Brletić.



## Zahvale

Ovim putem htio bih se zahvaliti neposrednoj mentorici dipl. ing. preh. teh. Silviji Brletić na vremenu i trudu koji je posvetila meni za izradu ovog diplomskog rada. Uz tvoje vodstvo, izrada diplomskog rada bila je puno lakša i zanimljivija. Puno hvala dipl. ing. preh. teh. Ines Dujmović i dipl. ing. chem. Ireni Jurišić što su mi pružile priliku izraditi diplomski rad u laboratoriju za kontrolu kvalitete Pliva Hrvatska.

Hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Ivi Juranović Cindrić, koja mi je svojim znanjem i stručnošću pružila akademsku podršku u osmišljavanju i izradi diplomskog rada.

Hvala prijateljima Danijelu, Hrvoju i Tomislavu na podršci i pomoći u bilo koje doba dana i noći. Bez vas ovo putovanje ne bi bilo isto. Hvala dečki.

Veliko hvala mojoj Stjepki na pomaganju, žvncima, razumijevanju i savjetima kojima si me tijekom cijelog studija bodrila. Hvala ti na svemu i presretan sam što si uz mene.

Hvala mami Hrvojki, tati Daliboru i sestri Barbari na neizmjerne podršci, pomoći i ljubavi koju ste mi pružili prilikom studiranja. Bez vas ovo ništa ne bi bilo moguće i na tome sam vam beskrajno zahvalan. Hvala.



## Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XI</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Kontrola kvalitete .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Onečišćenja lijekova .....</b>	<b>7</b>
<b>2.3. Kromatografija visoke djelotvornosti - HPLC .....</b>	<b>9</b>
<b>2.4. Verapamil hidroklorid .....</b>	<b>12</b>
<b>2.5. Validacija analitičke metode.....</b>	<b>14</b>
<b>2.6. Validacijski parametri.....</b>	<b>17</b>
2.6.1. Točnost.....	17
2.6.2. Preciznost.....	17
2.6.3. Specifičnost i selektivnost .....	18
2.6.4. Detekcijske granice.....	19
2.6.5. Kvantifikacijske granice .....	19
2.6.6. Linearnost .....	20
2.6.7. Radno područje.....	21
2.6.8. Robusnost.....	21
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1. Tehnička oprema i instrumenti .....</b>	<b>22</b>
<b>3.2. Reagensi .....</b>	<b>23</b>
<b>3.3. Referentne supstance .....</b>	<b>23</b>
<b>3.4. Kromatografski parametri.....</b>	<b>23</b>
<b>3.5. Priprema otopina .....</b>	<b>24</b>
3.5.1. Pokretna faza A.....	24
3.5.2. Pokretna faza B.....	24
3.5.3. Otapalo .....	24
3.5.4. Otopina za provjeru prikladnosti sustava.....	25
3.5.5. Ishodna otopina verapamil onečišćenja I i M .....	25
3.5.6. Ishodna otopina standarda .....	25
3.5.7. Razrjeđena otopina standarda.....	25
3.5.8. Otopina uzorka .....	26

---

3.5.9. Slijepi uzorak .....	26
<b>3.6. Obrada podataka .....</b>	<b>26</b>
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1. Priprema sustava HPLC .....</b>	<b>27</b>
<b>4.2. Validacija metode HPLC .....</b>	<b>29</b>
4.2.1. Selektivnost .....	30
4.2.2. Kvantifikacijska granica .....	41
4.2.3. Preciznost i točnost .....	43
Ponovljivost .....	43
4.2.4. Stabilnost .....	46
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>48</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA .....</b>	<b>49</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI .....</b>	<b>XV</b>
<b>§ 8. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>XVII</b>







Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

### Validacija metode HPLC za određivanje onečišćenja u aktivnoj supstanci verapamilu

Mislav Kaličanec

Verapamil hidroklorid, poznatiji pod nazivima verapamil i iproveratril, je lijek iz skupine lijekova koji blokiraju odnosno inhibiraju kanale kalcija i na taj način uspješno smanjuju prolazak kalcijevih iona u stanicu. Lijek verapamil se koristi za tretiranje raznih zdravstvenih tegoba kao što su aritmija, atrijska tahikardija i visoki krvni tlak.

Osnovna ideja ovog diplomskog rada je provesti postupak validacije analitičke metode za određivanje onečišćenja u aktivnoj supstanci verapamila prema propisanim regulatornim kriterijima Europske farmakopeje (Ph. Eur.) i Plivinim standardnim operativnim protokolima. Eksperimentalni dio validacije metode Ph. Eur. za određivanje onečišćenja u aktivnoj supstanci verapamilu proveden je u laboratoriju Kontrole kvalitete, Pliva Hrvatska pod uvjetima dobre proizvođačke prakse, kako bi se osiguralo da je predložena metoda na pravilan način integrirana u sustav Kontrole kvalitete Pliva Hrvatska. U svrhu validacije kromatografske metode visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda za određivanje onečišćenja određeni su validacijski parametri: selektivnost, osjetljivost, preciznost i stabilnost standarda i uzoraka.

(65 stranica, 21 slika, 11 tablica, 30 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: Verapamil, HPLC, validacija, onečišćenja

Mentor: prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Neposredni voditelj: dipl. ing. preh. teh. Silvia Brletić

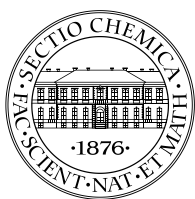
Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
2. izv. prof. dr. sc. Jana Pisk
3. izv. prof. dr. sc. Đani Škalamera

Zamjena: doc. dr. sc. Adriana Kendel

Datum diplomskog ispita: 13. prosinca 2023.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### Validation of HPLC method for determination impurities in the verapamil active substance

Mislav Kaličanec

Verapamil hydrochloride, better known as verapamil and ipoveratril, is a member of calcium channel blocking agents drug class that blocks calcium channels i.e. inhibits calcium channels and successfully reduces the entry of calcium ions in the cell. Verapamil is used to treat many health problems such as: arrhythmia, atrial tachycardia and high blood pressure.

The main idea of this thesis is to show how to validate a method for determination of impurities in the verapamil active substance by prescribed regulatory criteria of the European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) and Pliva Croatia standard operating procedure. Experimental part of this validation method for determination of impurities in verapamil active substance is performed in Quality Control laboratory, Pliva Croatia with good manufacturing practice conditions to ensure that the proposed analytical method is suitably implemented in Pliva QC. In order to inspect the following parameters: selectivity, sensitivity, precision and stability of standards and sample solutions, the HPLC technique with Diode Array Detector is used. (65 pages, 21 figures, 11 tables, 30 references, original in Croatian language)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: Verapamil, HPLC, validation, impurities

Mentor: Dr. sc. Iva Juranović Cindrić, Professor

Assistant mentor: dipl. ing. preh. teh. Silvia Brletić

Reviewers:

1. Professor Iva Juranović Cindrić
  2. Associate Professor Jana Pisk
  3. Associate Professor Đani Škalamera
- Substitute: Assistant Professor Adriana Kendel

Date of exam: 13.12. 2023.



## § 1. UVOD

Lijek dolazi od latinske riječi *medicus* što znači ljekovit, a općenito lijekovi služe za ublažavanje, sprječavanje i liječenje bolesti rada pojedinih organa kod ljudi i životinja. Lijekovi se vrlo rijetko primjenjuju kao čiste kemijske tvari, gotovo uvijek kao ljekoviti oblici, odnosno pripravci. Sastoje se od ljekovite, djelatne tvari koja ima terapijsko djelovanje i pomoćnih tvari koje daju određena fizikalna svojstva pripravku. Izborom pomoćnih tvari i primjenom različitih tehnoloških postupaka moguće je proizvesti različite ljekovite oblike, svaki jedinstven po svojim fizikalnim i farmaceutskim svojstvima.

Korištenje lijekova seže u davnu prošlost kada su ljudi počeli shvaćati i primjenjivati biljke u ljekovite svrhe. Kroz stoljeća napretka ljudskog znanja, znanosti, uključujući i kemiju, omogućeno je dobivanje mnogih sintetskih lijekova koji su se prije dobivali biljnim ili životinjskim putem što je temelj nastanka i razvoja farmaceutske industrije. Danas razvoj novog lijeka može potrajati i dulje od 15 godina jer sam proces stvaranja novog lijeka uključuje mnoge korake kao što su temeljna istraživanja, pretklinička i klinička istraživanja te na kraju odobrenje za korištenje. Važno je da svi ti koraci u razvoju lijekova budu kontrolirani i strogo nadzirani, pri čemu važnu ulogu ima laboratorij za kontrolu kvalitete. Svaki lijek je specifičan i zbog toga je potrebno razviti i provesti puno različitih istraživanja kako bi mu se osigurala potrebna kvaliteta. Dobra laboratorijska praksa je sustav upravljanja laboratorijima koji osigurava pouzdanost rezultata ispitivanja koja provode laboratoriji, a jedan od zahtjeva dobre laboratorijske prakse je validacija analitičke metode. Validacija je potvrda da se provelo detaljno istraživanje koje je rezultiralo objektivnim dokazima da analitička metoda, kada se ispravno koristi, daje rezultate koji su pouzdani i točni. Validacijskim postupkom se provjerava i osigurava da je predložena analitička metoda pogodna za rješavanje određenog problema, a dobiveni rezultati zadovoljavajući s obzirom na regulatorne zahtjeve. Upravo zato regulatorne agencije propisuju određene zahtjeve za postupak validacije analitičke metode kako bi se u konačnici dozvolilo korištenje samog lijeka, a sve sa svrhom zaštite ljudskog zdravlja. Dakle, kako bi laboratorij za kontrolu kvalitete mogao ispuniti određene zahtjeve propisane od strane regulatorne agencije, koriste se preporučene službene analitičke metode s unaprijed zadanim validacijskim parametrima. U kontroli kvalitete farmaceutskih uzoraka najčešće se koristi

metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC). Radi se o separacijskoj tehnici koja koristi tekuće pokretne faze, a prednost metode je što se analit može odvojiti i odrediti u vrlo niskim koncentracijama, često u prisutnosti neželjenih onečišćenja ili su sama onečišćenja ono što se određuje. Kako bi se osigurala pouzdanost i kvaliteta lijekova, analitička metoda za određivanje i analita i onečišćenja mora biti primijenjena u strogoj usklađenosti sa zahtjevima regulatornih agencija. Cilj ovog rada bio je provjeriti je li analitička metoda HPLC pogodna za određivanje onečišćenja u aktivnoj supstanci verapamilu kako bi se na pravilan način integrirala u sustav Kontrole kvalitete Pliva Hrvatska d.o.o.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Kontrola kvalitete

Pojam kontrola kvalitete u rječniku se definira kao usmjeravanje i provjera ili vrednovanje produkata i procesa izrade. Radi se o sustavu aktivnosti koji proizvođaču ili korisniku osigurava uslugu ili proizvod zadovoljavajuće, primjerene, ekonomične i pouzdane kvalitete uvjetovane definiranim normama. U kemijskoj analizi kontrola kvalitete obuhvaća sve procedure i postupke koji vode do statističke kontrole i zahtijevane točnosti i preciznosti mjernog postupka. U analitičkom postupku osigurava se, kontrolira i procjenjuje kvaliteta svakog njegova koraka, a posebice kvaliteta dobivenih rezultata analize. Podatci su kvalitetni kada su precizni i konzistentni, a njihova nesigurnost mala. Zbog sve većeg broja zahtjevnijih i osjetljivijih analitičkih metoda koje se koriste za analizu sve većeg broja novih lijekova, prvi stupanj osiguranja kvalitete analitičkih postupaka je upravljanje kvalitetom.<sup>1</sup> Dobra laboratorijska praksa (DLP, eng. *Good Laboratory Practice*, GLP) je sustav upravljanja u laboratorijima koji osigurava pouzdanost rezultata istraživanja. Načela dobre laboratorijske prakse definiraju skup pravila i kriterija koji se odnose na organizacijske procese i uvjete u kojima se neklinička ispitivanja planiraju, provode, nadgledaju te zapisuju, pohranjuju i dostavljaju konačna izvješća o njihovoj provedbi. Propisi o DLP postali su dio regulatornog okvira u drugoj polovici 1970-ih kao odgovor na zlouporabu u istraživanju i razvoju. Zlouporaba je najčešće obuhvaćala slučajeve prijave te puno pogrešnih i loših laboratorijskih praksi kao što su primjerice nekalibrirana i neispravna oprema kojom se netočno mjeri i dobivaju netočni podatci o uzorku i sl.<sup>2,4</sup> Analitički laboratorij osigurava kvalitetu svog rada uz pomoć kontrole i ocjene kvalitete. Jedan od elemenata kontrole kvalitete i zahtjeva dobre laboratorijske prakse je vrednovanje metode ili validacija metode. Validacija je postupak kojim se dokazuje da metoda služi svrsi kojoj je namijenjena, odnosno da je metoda prikladna ispuniti svoju zadaću prema standardima regulatornih tijela. Međunarodna organizacija za standardizaciju (eng. *International Organization for Standardization*, ISO) definira validaciju kao potvrdu ispitivanjem, pružanje objektivnih dokaza da su ispunjeni određeni zahtjevi za korištenje metoda, odnosno da se provelo detaljno ispitivanje koje dokazuje da ispravno korištena analitička metoda daje rezultate koji su pouzdani te također potvrđuje da je analitička



metoda učinkovita i točna. Kontrola kvalitete je izuzetno važna u farmaceutskoj industriji, a uključuje vrlo opširan i detaljan sustav kontrole u različitim fazama proizvodnje lijeka te provjeru distribucije lijekova kojeg je određena tvrtka proizvela, čime se potvrđuje identitet i kvaliteta nekog lijeka. U kontroli kvalitete proizvodnje lijekova uključene su različite provjere i testiranja u različitim fazama proizvodnje lijeka, a obuhvaćaju kvalitetu sirovina, završnih produkata, pakiranja te skladištenja i označavanja. U istraživanju i razvoju novih lijekova važno je integrirati farmakokinetiku, farmakodinamiku i toksikokinetiku. Lijekovi, kako bi se mogli koristiti, prvo trebaju biti klasificirani kao sigurni, a njihov učinak mora biti predvidljiv i ponajviše konstantan.<sup>1,2</sup> Upravo je zato farmaceutska industrija jedna od najstrože reguliranih industrija po pitanju kontrole kvalitete kojoj se daje velika pozornost i odvaja puno resursa.<sup>3</sup>

Danas postoji veliki broj organizacija koje daju smjernice za validaciju analitičkih metoda, a neke od njih su Europski odbor za normizaciju (eng. *European Committee for Normalization*, CEN), Međunarodna konferencija o harmonizaciji (eng. *International Conference on Harmonization*, ICH), Suradnja na međunarodnoj sljedivosti u analitičkoj kemiji (eng. *Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry*, CITAC), Europska organizacija za akreditaciju (eng. *European Cooperation for Accreditation*, EA), Organizacija za hranu i poljoprivredu (eng. *Food and Agricultural Organization*, FAO), Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (eng. *United States Food and Drug Administration*, FDA), Udruženje službenih analitičkih kemičara (eng. *Association of Official Analytical Chemists*, AOAC), Codexov odbor za metode analize i uzorkovanja (eng. *Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling*, CCMAS), Međunarodna organizacija za akreditaciju laboratorija (eng. *International Laboratory Accreditation Cooperation*, ILAC), Svjetska zdravstvena organizacija (eng. *The World Health Organization*, WHO), Međunarodna organizacija za normizaciju (eng. *International Organization for Standardization*, ISO), Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (eng. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC), Farmakopeja Sjedinjenih Država (eng. *United States Pharmacopeia*, USP) i Europska udruga kemijskih laboratorija *EURACHEM*.<sup>25</sup>

Međunarodna farmakopeja (Ph. Int.) je sveukupna pravno obvezujuća zbirka standarada i specifikacija za kvalitetu lijekova koji se koriste u nekoj regiji ili državi. Međunarodnu farmakopeju izdaje Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*, WHO) kao preporuku za međunarodne standarde koji isto tako uključuju dodatne, manje zahtjevne tehničke alternative gdje je to potrebno, kako bi se postigla globalna homogenost specifikacija za kvalitetu lijekova, pomoćnih tvari i doziranja samog lijeka.

Trenutno u svijetu postoji oko 60 farmakopeja među kojima su najveće američka, britanska, europska i međunarodna farmakopeja. U prošlosti, osnovna ideja farmakopeja bila je osigurati i zadržati visoku kvalitetu samog lijeka pomoću informacija o sastavu lijeka, metodama za izradu lijeka i njegovoj cijeni. Glavna zadaća farmakopeja, kvaliteta lijekova, je i danas ostala ista, međutim, danas farmakopeje imaju izuzetno visoke i opsežne standarde za provjeru kvalitete lijekova. Unutar same farmakopeje, specifikacija kvalitete je zapravo skup odgovarajućih informacija pomoću kojih se može potvrditi čistoća i kvaliteta kojima farmakopeje jamče kvalitetu proizvedenih lijekova, a sadrže odrednice kao što su: kvaliteta standarada za aktivne supstance, opći standardi za doziranje lijeka, opći standardi za proizvodnju lijekova, monografije te standardne terminologije.<sup>4,5</sup>

Gledano kroz povijest, svaka je država u Europi proizvodila lijekove pod vlastitom farmakopejom. Europska farmakopeja ima pravni status u Europskoj uniji te je priznato tijelo koje uspostavlja službene standarde kvalitete u zemljama članicama Europske unije. U Republici Hrvatskoj ulogu nacionalnog farmakopejskog tijela ima *Agencija za lijekove i medicinske proizvode* (HALMED) koja je odgovorna za sva pitanja u području lijekova i medicinskih proizvoda, što je utvrđeno Zakonom o lijekovima (Narodne novine, br. 7/13., 90/14., 100/18.).<sup>7</sup> Republika Hrvatska je od 1994. godine potpisnica *Konvencije i Protokola o izradi Europske farmakopeje* čime je preuzeta obveza njene primjene u praksi. Dakle, svi lijekovi koji su proizvedeni u Republici Hrvatskoj ili uvezeni na tržište iste moraju biti u skladu sa zahtjevima skupa Europskih monografija. Kroz rad delegata u Komisiji Europske farmakopeje i stručnjaka u radnim tijelima sudjeluje u izradi Europske farmakopeje.<sup>6</sup>

HALMED daje odobrenje za stavljanje lijeka u promet nacionalnim postupkom i zajedničkim europskim postupcima odobravanja lijekova, postupkom međusobnog priznavanja (MRP/*Mutual Recognition Procedure*) i decentraliziranim postupkom (DCP/*Decentralised Procedure*), dok Europska komisija daje odobrenja za lijekove centraliziranim postupkom. Odobrenje za stavljanje lijeka u promet može se dati samo za lijek za koji je, temeljem stručno-znanstvene ocjene dokumentacije o lijeku, utvrđeno da je lijek odgovarajuće farmaceutske kvalitete te da je korist njegove primjene veća od rizika. Stručno znanstvena ocjena provodi se prema unaprijed definiranim kriterijima te normama i standardima utvrđenim u hrvatskim i europskim propisima za lijekove, regulatornim i stručnim smjernicama za lijekove te najnovijim znanstvenim spoznajama.

U općim monografijama Europska farmakopeja sadrži sve informacije koje određuju propise i norme za sve proizvedene lijekove, uključujući metode analize supstanci i lijekova te opće zahtjeve i doze za odabrane skupine lijekova. Monografije su spisi koji sadrže sve

potrebne informacije o pojedinom lijeku: identitet, čistoća te preporučene i službene validirane metode koje će potvrditi sve zadane kriterije kvalitete. Ljekovite, aktivne i pomoćne supstance imaju zasebne monografije, u kojima su opisane smjernice za provjeru njihove kvalitete prema strogim propisanim zahtjevima kvalitete. Jedan od najvažnijih dijelova u monografijama o kvaliteti aktivne supstance lijekova je zapravo odjeljak o nečistoćama. Europska farmakopeja ima koncept o kvaliteti aktivne supstance pod nazivom *Certifikat o prikladnosti* (engl. *Certificate of Suitability*, CEP) za koji se proizvođač aktivne supstance može prijaviti. Prijava mora sadržavati detaljan opis na koji način se sintetizira aktivna supstanca lijeka te sadrži li i ukoliko da, navesti koje su to nečistoće. Ukoliko proizvođač može dokazati da je aktivna supstanca proizvedena prema normama i zahtjevima Europske farmakopeje bit će mu odobren certifikat čime Europska farmakopeja može garantirati punu kontrolu i kvalitetu aktivne supstance lijekova na području zemalja članica te u konačnici i sigurnost korištenja istih.<sup>5</sup>

Specifikacija se definira kao lista potrebnih analiza, karakteristike korištenih analitičkih postupaka te zadovoljavajući kriteriji prihvatljivosti za pojedinu analitičku metodu. Kriteriji prihvatljivosti se većinom odnose na numeričke granice i raspone rezultata za određene analitičke metode. Kako bi se izbjeglo prekomjerno trošenje sredstava na ukupnu karakterizaciju produkta, koriste se različite specifikacije za kontrolu kvalitete najvažnijih značajki proizvoda. Unaprijed su zadani i propisani kriteriji koji trebaju biti ispunjeni kako bi se lijek ili aktivna tvar nekog lijeka mogla smatrati prihvatljivom za upotrebu. Specifikacije su jako bitne stavke standarada kvalitete koje predlažu i na kraju zadovoljavaju proizvođači, potvrđuju regulatorne agencije kao uvjet za odobravanje lijeka, a zapravo su samo jedan mali dio ukupne strategije u kontroli kvalitete.<sup>7</sup>

Danas postoje i smjernice za proizvodnju novih lijekova i ostalih produkata koje pomažu u uspostavljanju jedinstvenog skupa specifikacija na globalnoj razini. Smjernice su zapravo postavke i kriteriji prihvatljivosti te odabir procedura za nove lijekove ili nove tvari sintetskog podrijetla koje još nisu registrirane u Europskoj uniji, Japanu i Sjedinjenim Američkim Državama.<sup>7</sup> Kako bi se uskladili tehnički zahtjevi za registraciju medicinskih produkata, 1990. godine osnovana je Međunarodna konferencija o harmonizaciji ICH, koje je okupila farmaceutsko-trgovačka i regulatorna udruženja iz Europe, Japana i Sjedinjenih Američkih Država. Kroz godine ICH je uskladila zahtjeve i izradila sukladni format koji je uvelike olakšao posao regulatornim agencijama i tvrtkama u vezi pregledavanja prijave za svaku posebnu regiju. Uključenjem sve više zemalja u ICH očekuje se širenje dobre proizvođačke prakse (engl. *Good manufacture practice*, GMP) te jednoznačan način komunikacije i daljnje interakcije po pitanju globalne regulacije lijekova. U fokusu

regulatornih zahtjeva, kontrole kvalitete te svih aktualnih i budućih inicijativa uvijek treba biti sigurnost pacijenta.<sup>7,8</sup>

## 2.2. Onečišćenja lijekova

Analitičke metode za određivanje aktivnih farmaceutskih sastojaka (engl. *Active Pharmaceutical Ingredient, API*) i njihovih nečistoća, vrlo je teško razviti i optimizirati te predstavlja veliki izazov u farmaceutskoj industriji. Razvoj analitičke metode najčešće se provodi ispitivanjem samo jedne komponente sustava (engl. *One Factor at Time, OFAT*) te se tim pristupom stvara veliki broj ponavljanja i ne dopušta istraživanje povezanosti analitičkih faktora. Najvažniji dio provjere kvalitete aktivnih supstanci, odnosno lijekova, je dio koji se odnosi na onečišćenja. Prema definiciji onečišćenja su kemijski entiteti koji nisu određeni kao komponenta lijeka te mogu utjecati na djelotvornost, kvalitetu i sigurnost korištenja lijekova. Niti jedna supstanca ne može biti u potpunosti čista. Radi se o neželjenim supstancama koje mogu biti rezultat kontaminacije u procesu proizvodnje samog lijeka, uvjeta čuvanja lijeka ili drugih mogućih utjecaja na proizvodnju i skladištenje lijeka. Kako bi se osigurala pouzdanost i kvaliteta lijekova, provjera onečišćenja mora biti primijenjena u strogoj usklađenosti sa zahtjevima regulatornih agencija. Onečišćenja mogu biti strukturom vrlo slična kao i aktivna supstanca samog lijeka te na taj način utjecati na djelotvornost lijeka. Kategorizacija onečišćenja prikazuje se u tri klase: organska onečišćenja, anorganska onečišćenja i onečišćenja iz zaostalih otapala. Organska onečišćenja mogu biti posljedica lošeg skladištenja novo proizvedene supstance ili se mogu pojaviti prilikom proizvodnog procesa, mogu biti klasificirana i neklasificirana te se može raditi o hlapljivim ili nehlapljivim onečišćenjima. Što se tiče anorganskih onečišćenja, ona također mogu biti rezultat proizvodnog procesa, ali su to obično poznata i identificirana onečišćenja koja uključuju: teške metale, anorganske soli, katalizatore i ostale materijale. Onečišćenja iz zaostalih otapala dijele se na organske i anorganske tekućine.<sup>9</sup>

Kako bi se osigurala proizvodnja kvalitetnih i sigurnih lijekova, provode se rutinska ispitivanja onečišćenja prema postavljenim zahtjevima kvalitete. Ispitivanjem čistoće aktivnih tvari utvrđuje se odgovara li ispitivani uzorak po količini onečišćenja farmakopejskim zahtjevima, a posebna pozornost se posvećuje onečišćenjima koja mogu imati toksična svojstva. ICH je izdala dokument kojim olakšava tvrtkama prijavu te registraciju novih onečišćenja u novo proizvedenim ljekovitim tvarima, odnosno lijekovima koji prije toga nisu bili registrirani. Onečišćenja u novim ljekovitim tvarima dijele se na dva segmenta: kemijski

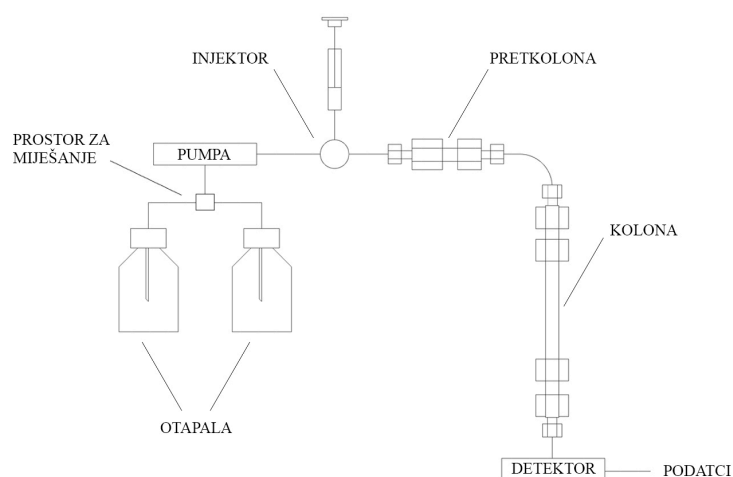
aspekt i sigurnosni aspekt. Kemijski aspekt u specifikacijama uključuje popis onečišćenja, kratku opservaciju na korištenu analitičku proceduru, identifikaciju i kategorizaciju onečišćenja, dok sigurnosni aspekt podrazumijeva jedinstvene smjernice za određivanje određenih onečišćenja koji nisu bili prisutni ili su bili prisutni, ali u jako niskim koncentracijskim rasponima u ishodnim supstancama. Onečišćenja mogu biti prisutna od početka proizvodnog procesa i kada je sam proizvođač testirao aktivnu supstancu u vidu djelotvornosti i sigurnosti te je nakon toksikološkog i kliničkog ispitivanja potvrđeno da je prisutnost onečišćenja, u toj određenoj količini, prihvatljiva. Nadalje, onečišćenja mogu biti farmakološki aktivne tvari koje mogu u potpunosti promijeniti način djelovanja lijeka ili u najgorem slučaju, mogu biti toksične.<sup>5,9</sup>

Za karakterizaciju i izolaciju onečišćenja koriste se brojne analitičke metode i tehnike. Odabir metode ovisi o strukturi, fizikalno-kemijskim svojstvima i količini prisutnog onečišćenja u uzorku iz kojeg treba biti izolirano. U farmakopejskim monografijama aktivnih tvari opisani su analitički postupci za ispitivanje onečišćenja koji najčešće obuhvaćaju provjeru izgleda otopine, provjeru kiselosti i lužnatosti, ispitivanje graničnih vrijednosti onečišćenja kationima i anionima, određivanje zaostalih otapala plinskom kromatografijom, primjenu tekućinske kromatografije ili spektroskopskih metoda, određivanje sadržaja vode i sl. Ekstrakcijske metode koje se koriste za izolaciju onečišćenja su ekstrakcija čvrsto-tekuće, ionsko-izmjenjivačka ekstrakcija i ekstrakcija fluidom pri superkritičnim uvjetima. Budući da su onečišćenja u aktivnim supstancama i lijekovima prisutna u vrlo niskim koncentracijama, u svrhu postizanja što preciznijih i boljih rezultata, nakon ekstrakcijskog odvajanja za analizu onečišćenja koriste se kromatografske tehnike. Kao službena i preporučena metoda najviše se koristi kromatografija visoke djelotvornosti koja se temelji na adsorpciji na površinu čvrstog adsorbensa. Uz navedenu HPLC metodu, još se koristi i plinska kromatografija (engl. *Gas chromatography*, GC), tankoslojna kromatografija (engl. *Thin-layer chromatography*, TLC) te se u posljednje vrijeme sve više implementira kapilarna elektroforeza (engl. *Capillary electrophoresis*, CE) kojom se uspješno uklanjaju pojedini nedostaci pri analizi prisutnih onečišćenja metodom HPLC.<sup>10</sup>

### 2.3. Kromatografija visoke djelotvornosti - HPLC

Tekućinska kromatografija koristi se za odjeljivanje i određivanje termički nestabilnih spojeva, spojeva koji su velike i male molekulske mase te onih spojeva koji se ne mogu prevesti u plinovito stanje zbog svoje nestabilnosti. Najviše korištena kromatografska metoda za određivanje onečišćenja u lijekovima je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. Koristi se za analizu i separaciju lijekova, određivanje čistoće i sadržaja tvari te za praćenje i garantiranje kvalitete. Metoda HPLC zamijenila je mnoge spektroskopske metode uključujući plinsku kromatografiju u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi.<sup>11,12</sup> Kod kromatografske metode koja kao mobilnu fazu koristi tekućine do razdvajanja komponenata smjese dolazi na temelju različite adsorpcije na površini čvrstog adsorbensa (tekućinsko-čvrsta kromatografija), različite topljivosti sastojaka u pokretnoj i nepokretnoj fazi (kromatografija obrnutih i normalnih faza), razlici u afinitetu sastojaka prema ionskoj izmjeni (ionsko-izmjenjivačka kromatografija), na temelju razlika u veličini, obliku i naboju molekula (gel-filtracijska i gel-propusna kromatografija) i na temelju specifičnih interakcija molekula analita i molekula vezanih za nepokretnu fazu (afinitetna kromatografija).<sup>13</sup>

Kako bi se postigao zadovoljavajući protok kroz kolonu sustava HPLC potreban je tlak od više stotina atmosfera. Budući da se radi o jako visokom tlaku potrebnom da bi metoda HPLC pravilno funkcionirala, oprema i dijelovi za HPLC su značajno skuplji nego za druge kromatografske tehnike. Slika 1 pokazuje pojednostavljeni shematski prikaz kromatografa HPLC.



Najvažniji dijelovi kromatografa su: pokretna faza i pumpa, sustav za unos uzoraka, kolona i detektor. Otpala koja se koriste kao pokretne faze u tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti ne smiju sadržavati nikakve otopljene plinove i čvrste čestice te moraju biti visoke čistoće. Otopljeni plinovi mogu dovesti do smanjenog protoka kolone, a mjehurići mogu reagirati s detektorom i tako utjecati na njegove karakteristike. Sustavom za prskanje, pomoću mjehurića inertnog plina koji nije topljiv u mobilnoj fazi, otopljeni se plinovi uklanjaju iz mobilne faze. U slučaju prisutnosti otopljenih plinova ili čestica, kako ne bi došlo do začepjenja ili oštećenja pumpe ili sustava za unošenje uzoraka, filter koji djeluje uz pomoć vakuuma spriječit će prolazak otopljenih čestica.<sup>12</sup>

Postoje dva načina odjeljivanja komponenata iz smjese metodom tekućinske kromatografije, izokratno i gradijentno eluiranje. Izokratno eluiranje znači da analit kroz kolonu prenosi samo jedno otapalo (sastav pokretne faze tijekom eluiranja je stalan) i to je najjednostavniji način eluiranja. U svrhu dobivanja što boljeg kromatograma, koristi se gradijentno eluiranje s više otapala, najčešće dva otapala koja se razlikuju po polarnosti. Tijekom gradijentnog eluiranja sastav pokretne faze mijenja se u zadanim koracima.<sup>12,13</sup>

Za protok mobilne faze u sustavu HPLC, potrebna je pumpa koja mora omogućiti visok tlak (do nekoliko milijuna Pa), stalni protok te reproducibilnost protoka do 99,5%. Uzorak se unosi u injektor, a volumen uzoraka može biti jako mali, od nekoliko desetina mikrolitara pa čak do 500  $\mu\text{L}$ . Danas se najčešće koristi prenosni injektor s petljom jer se na taj način uzorak unosi bez utjecaja na ukupni tlak u sustavu i ne prekida protok mobilne faze. Uzorak se unosi injektorskom iglom direktno u petlju, a za vrijeme unošenja uzorka u petlju mobilna faza ne ulazi u petlju. Kolone za tekućinsku kromatografiju izrađene su u obliku cijevi od glatkog nehrđajućeg čelika. Postoje i kolone koje su izrađene od polimera i kolone koje imaju debele stijenke od stakla, no one se mogu koristiti samo za niske tlakove. Kolone od glatkog nehrđajućeg čelika duljine su od 5 do 25 cm, punjene zrcima punila od 3 do 5  $\mu\text{m}$  u promjeru. Punilo koje se najčešće koristi za tekućinsku kromatografiju jest silikagel. Kolone su napravljene tako da imaju glatke unutrašnje stijenke kako bi se postigao što veći broj teorijskih tavana. Broj teorijskih tavana je izraz kojim se izražava djelotvornost kolone tj. radi se o broju uspostavljenih ravnoteža između pokretne i nepokretne faze tijekom razdvajanja sastojaka smjese. Ispred kolone može se postaviti i pretkolona koja služi kao zaštita same kolone ukoliko dođe do začepjenja te osigurava bolje razdjeljivanje sastojaka. Nakon razdvajanja analita, razdvojene komponente dolaze do detektora. Detektori u tekućinskoj kromatografiji često su uobičajeni analitički instrumenti koji su prilagođeni za mjerenje niskih koncentracija otopljenih tvari u pokretnoj fazi. Moguća je detekcija promjene svojstava pokretne faze kao što je

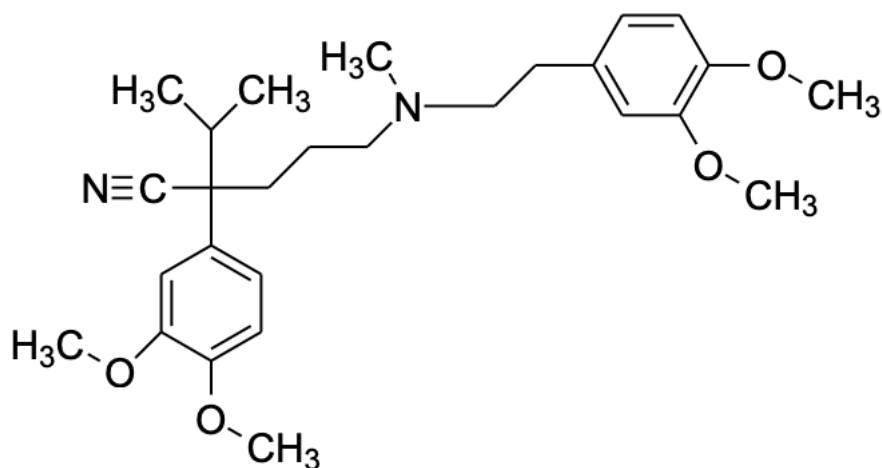
vodljivost, raspršenje i indeks loma što se zove indirektna detekcija te je moguća detekcija komponenti na osnovi vlastitih svojstava (fluorescencija, apsorpcija u UV području). Za detekciju komponenta vrlo često se koristi detektor s nizom dioda (engl. *Diode array detector*, *DAD*). *DAD* je detektor koji pripada u UV detektore koji detektiraju emitiranu svjetlost i prevode ju u električni signal. Prednosti detektora *DAD* su prije svega niska cijena, jednostavna upotreba te instrumentne značajke: niski šum, stabilnost bazne linije, visoka rezolucija i široko područje linearnosti.<sup>12,13</sup>

Razdvajanje u tekućinskoj kromatografiji temelji se na različitoj raspodijeli analiziranih tvari između nepokretne i pokretne faze. Nakon razdvajanja i detektiranja komponenta koje se analiziraju u uzorku dobije se kromatogram. Kromatogram je zapravo ovisnost odziva detektora ili koncentracije analita u eluatu o volumenu eluata ili vremenu koje je potrebno da se komponenta eluira s kolone. Pik (signal) je drugi naziv za kromatografski vršak što označava odziv detektora jednog sastojka. Visina samog pika daje kvantitativnu informaciju o sastojku, dok položaj kromatografskog vrška daje kvalitativne informacije na temelju usporedbe s pikom standarda.



## 2.4. Verapamil hidroklorid

Kasnih sedamdesetih godina prošlog stoljeća, blokatori kalcijevih kanala (engl. *Calcium channel blockers, CCB*) poznatiji pod nazivom antagonisti kalcijevih kanala koristili su se kao lijekovi pri liječenju mnogih oboljenja. Radi se o lijekovima za liječenje kardiovaskularnih bolesti koji se dijele u dvije kategorije: nedihidropiridine i dihidropiridine. Verapamil hidroklorid se svrstava pod nedihidropiridine, jednako kao još i flunarizin, diltiazem i benzotiazepin. Kardiovaskularni lijekovi najčešće se koriste za tretiranje koronarnog spazma, hipertenzije, angine pektoris, supraventrikularne aritmije i mnoga druga kardiovaskularna oboljenja. U Republici Hrvatskoj verapamil je dostupan u tabletama pod nazivom *Isoptin* i *Tarka*. Struktura verapamila prikazana je na slici 2.<sup>14,15</sup>

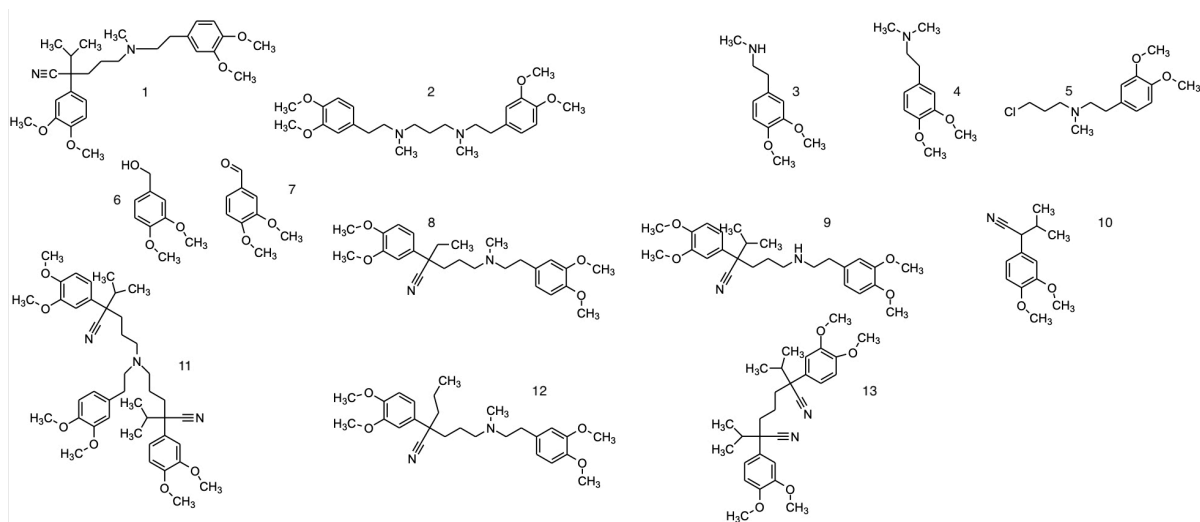


Slika 2. Struktura verapamila

Verapamil, po IUPAC-u 2-(3,4-dimetoksifenil)-5-[2-(3,4-dimetoksifenil)etil-metilamino]-2-propan-2-ilpentannitril ima molekulska masu 491,07 g mol<sup>-1</sup>. Što se tiče topljivosti, verapamil je dobro topljiv u vodi, slabo topljiv u alkoholu te izvrsno topljiv u kiselim otopinama. Po sastavu, verapamil je racemična smjesa što znači da se radi o smjesi s jednakim udjelom lijevog (S) i desnog (R) enantiomera. Radi se o selektivnom blokatoru kalcijevog kanala s direktnim djelovanjem na srčani mišić koji djeluje tako da sprječava transmembranski unos kalcijevih iona u srčane i krvožilne mišićne stanice vezanjem na L-tip

naponom kontroliranih kalcijevih kanala i na taj način postiže inhibitorski učinak. Inhibitorski učinak podrazumijeva snižavanje potrebe miokarda za kisikom te snižava tlačno opterećenje srčanog mišića. Efekt blokade unosa kalcijevih iona u glatko mišićno tkivo arterija koje opskrbljuju srce krvlju očituje se u većoj prokrvljenosti miokarda što dovodi do smanjenja naglog i nekontroliranog grčenja, spazma arterija koje opskrbljuju srce krvlju, odnosno koronarnih arterija.<sup>16,17</sup>

Verapamil trenutno ima 12 poznatih onečišćenja za čiju su analizu metodom HPLC propisane službene preporuke. Strukture su prikazane na slici 3.<sup>16</sup>



Slika 3. Strukture Verapamila i poznatih onečišćenja. (1) Verapamil, (2) onečišćenje A, (3) onečišćenje B, (4) onečišćenje C, (5) onečišćenje D, (6) onečišćenje E, (7) onečišćenje G, (8) onečišćenje H, (9) onečišćenje J, (10) onečišćenje K, (11) onečišćenje M, (12) onečišćenje O, (13) onečišćenje P.

## 2.5. Validacija analitičke metode

Razvoj nove analitičke metode najčešće podrazumijeva kombinaciju različitih, već poznatih, tehnika te njihove modifikacije koje u konačnici trebaju rezultirati željenom metodom. Najčešći izazov pri razvoju analitičke metode jest razviti metodu koja je robusna, da ima zadovoljavajuću točnost i preciznost, mali utjecaj matrice te izrazito niske detekcijske i kvantifikacijske granice. Validacija metode je proces koji se sastoji od najmanje pet različitih koraka: procjene prikladnosti (kvalifikacije) sustava, uzorkovanja, pripreme uzorka, analize i obrade podataka. Regulatorne agencije kao što su Američka agencija za hranu i lijekove i Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) za svaki lijek i ljekoviti proizvod predlažu smjernice i zahtijevaju strogi validacijski proces za osiguranje kvalitete farmaceutskog proizvoda. Propisana načela i praksa za validacijske postupke moraju biti provedeni u potpunosti za svaki korak proizvodnog procesa, djelotvornost, kvaliteta i sigurnost moraju biti dio samog proizvoda kako bi konačni proizvod zadovoljio propisanu specifikaciju kvalitete.<sup>18</sup>

Što se tiče zahtjeva za kvalifikaciju i validaciju, Europska agencija za lijekove ima jednake zahtjeve kao američka regulatorna agencija. FDA i EMA preko dobre laboratorijske prakse propisuju zahtjeve koje proizvođači moraju ispoštovati za kvalifikaciju i validaciju proizvoda kroz cijeli životni period ljekovitog proizvoda i procesa proizvodnje istog. Životni vijek ili period proizvoda podrazumijeva istraživanje, pretkliničko testiranje koja se izvodi na ljudskim ili životinjskim stanicama, fazu 1 ili kliničko istraživanje na malom broju ljudi s određenim zdravstvenim stanjem, fazu 2 kliničkog istraživanja na većem broju ljudskih subjekata, fazu 3 kliničkog istraživanja gdje se ispituje djelotvornost i sigurnost proizvoda te na kraju fazu 4 koja uključuje praćenje djelovanja proizvoda na velikom broju ljudi kroz određeno vrijeme.<sup>18,19</sup>

Opća procjena prikladnosti sustava služi za provjeru prikladnosti instrumenta za analizu koja se želi provesti te jesu li materijali (reagensi, certificirani referencijski materijali, unutarnji i vanjski standardi) prikladni za korištenje u analizi. Analitičari moraju biti educirani i kvalificirani te moraju provoditi određene analitičke postupke koji su prethodno odobreni s definiranim kriterijima prihvatljivosti. Uzorkovanjem se odabire reprezentativni dio uzorka koji se zatim analizira. Odabir prikladne metode uzorkovanja je vrlo važan korak jer se njime osigurava da je odabrani uzorak uistinu reprezentativan dio materijala koji se analizira. Nakon

uzorkovanja slijedi priprema uzorka koja je ključan korak za uspješnu validaciju metode. U većini analitičkih postupaka priprema uzorka je čak 60 - 80% ukupne aktivnosti i operativnih troškova u analitičkom laboratoriju. Analitičar treba odabrati metodu pripreme uzorka ovisno o vrsti analita, koncentraciji, matrici uzorka, veličini uzorka te instrumentalnoj metodi koja će se koristiti. Izbor određene instrumentne metode također ovisi o kemijskim svojstvima analita, koncentraciji analita u uzorku, matrica uzorka, ali i o brzini i cijeni analize. Validacija analitičke metode je prvi korak koji je potrebno napraviti nakon razvijanja određenog analitičkog postupka kako bi se odobrilo i potvrdilo je li predložena analitička metoda prikladna za predloženu namjenu i pri kojim uvjetima će ta metoda dati ispravne i točne rezultate. Cilj validacijskog postupka je pokazati da je nakon analize validiranom metodom proizvod siguran i primjeren za određenu namjenu. Najvažniji validacijski parametri koji su definirani od strane ICH i ostalih regulatornih agencija i industrijskih odbora za procjenu valjanosti analitičke metode su: točnost, preciznost (ponovljivost i srednja preciznost), specifičnost, detekcijske granice (engl. *Limit of Detection*, LOD), kvantifikacijske granice (engl. *Limit of Quantification*, LOQ), linearnost i radno područje. Robusnost kao validacijski parametar nije naveden među najvažnije parametre jer se on analizira samo u određenom trenutku razvoja analitičke metode, a ovisi o unutarnjim i vanjskim faktorima. Bilo kakve promjene u sintezi supstance, sastava krajnjeg proizvoda ili promjene u analitičkom postupku dovode do ponavljanja postupka validacije. Složenost postupka revalidacije ovisi o prirodi samih promjena u analitičkom postupku. Najvažniji validacijski parametri i specifičnosti za analitičku metodu pri određivanju onečišćenja u lijeku prikazani su u tablici 1.<sup>20</sup>

Tablica 1. Najvažniji validacijski parametri za analitičku metodu.<sup>19</sup>

Validacijski parametri	Identifikacija	Granica (limit) onečišćenja	Prisutnost nečistoća	Sadržaj
Točnost	-	-	+	+
Preciznost				
Ponovljivost	-	-	+	+(1)
Srednja preciznost	-	-	+(1)	+
Specifičnost (2)	+	+	+	+
Detekcijske granice, LOD	-	+	-(3)	-
Kvantifikacijske granice, LOQ	-	-	+	-
Radno područje	-	-	+	+
Linearnost	-	-	+	+

- označava da se taj parametar za tu analitičku metodu najčešće ne određuje

+ označava da se taj parametar za tu analitičku metodu najčešće određuje

(1) označava slučajeve gdje se odradio parametar reproducibilnosti, srednja preciznost nije potrebna

(2) označava manjak specifičnosti jedne analitičke metode (može ga nadoknaditi druga analitička metoda)

(3) označava parametar koji može biti koristan u nekim slučajevima

## 2.6. Validacijski parametri

### 2.6.1. Točnost

Točnost je jedan od ključnih parametara koji svaka analitička metoda mora zadovoljiti, a određivanje ovog parametra omogućava procjenu u kojem rasponu sustavne pogreške utječu na određenu analitičku metodu. Točnost metode pokazuje stupanj slaganja dobivenih rezultata i referentnih vrijednosti, kao što je nominalna koncentracija analita.

Za procjenu točnosti analitičke metode najčešće se koriste:

1. Mjerenje analita u određenom referentnom materijalu i uspoređivanje rezultata s certificiranom (poznatom) vrijednosti.
2. Mjerenje analita u slijepom uzorku uz dodatak poznate koncentracije analitičkog standarda u matricu uzorka (eng. *Recovery*), a rezultat se iskazuje kao postotak dobivenog rezultata u odnosu na dodanu poznatu količinu u uzorak.
3. Usporedba rezultata metode koja je u procesu validacije s rezultatima referentne metode.
4. Određivanje koncentracije analita u uzorku pomoću metode standardnog dodatka.<sup>21,22</sup>

### 2.6.2. Preciznost

Izraz preciznost je definiran od strane ISO Međunarodnog rječnika osnovnih i općih uvjeta u mjeriteljstvu (eng. *ISO International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology*, ISO-VIM) kao slaganje između dvije ili više brojevnih vrijednosti dobivenih mjerenjima pri istim uvjetima. Obično se izražava kao standardno odstupanje (engl. *Standard deviation*, SD), relativno standardno odstupanje (RSD), varijanca ili koeficijent varijacije skupine mjerenja odnosno izmjerenih koncentracija serije ponovljenih analiza uzoraka. Preciznost analitičke metode pokazuje stupanj slaganja između serije pojedinačnih mjerenja prikupljenih višestrukim uzorkovanjem istog homogenog uzroka prema propisanim uvjetima. Tri su razine preciznosti: reproducibilnost, srednja preciznost i ponovljivost.<sup>21,22,27</sup>

Prema smjernicama ICH točnost i preciznost unutar ciklusa treba procijeniti analizom najmanje pet ponavljanja na svakoj koncentraciji kalibracijskog standarda u svakom analitičkom ciklusu mjerenja. Točnost i preciznost između ciklusa treba procijeniti analizom svakog kalibracijskog standarda u najmanje tri analitička ciklusa tijekom najmanje dva dana. Na svakoj koncentraciji kalibracijskog standarda točnost bi trebala biti unutar  $\pm 15\%$  nominalne koncentracije, osim na donjoj kvantifikacijskoj granici (eng. *Lower limit of quantification*, LLOQ) gdje bi trebala biti unutar  $\pm 20\%$ . Preciznost (%CV) koncentracija utvrđenih na svakoj koncentraciji kalibracijskog standarda ne smije prelaziti 15%, osim kod LLOQ, gdje ne bi smjela prelaziti 20%.<sup>29</sup>

### 2.6.3. Specifičnost i selektivnost

Prema definiciji selektivnost se odnosi na raspon unutar kojeg se pomoću određene metode može odrediti analit koji se nalazi u nekoj kompleksnoj smjesi bez da dolazi do interferencija (smetnji) s drugim komponentama te smjese. Često se krivo koristi i izjednačava sa specifičnosti, koja znači da ne smije dolaziti do nikakvih interferencija. Selektivnost se povezuje s riječi *odabrati*, a specifičnost s riječi *točan*. Specifičnost metode je zapravo mogućnost jedinstvenog i preciznog određivanja jednog analita u matrici uzorka u prisutnosti mogućih smetnji koje se mogu očekivati pri analizi. Smetnje podrazumijevaju različite molekule koje jednim imenom zovemo onečišćenja, a utječu na mjerenje signala analita ili njegovo odvajanje od ostalih sastojaka u uzorku.

Za određivanje selektivnosti najčešće se uspoređuju kromatogrami dobivenih nakon injektiranja slijepog uzorka sa i bez analita ili uspoređuju kromatogrami dobivenih nakon injektiranja analitičkih otopina sa i bez svih mogućih interferencija te analizom certificiranih referentnih materijala. Kromatografske metode su obično selektivne jer mogu detektirati i kvantificirati nekoliko spojeva, a analiti od interesa se detektiraju u ovisnosti o njihovom vremenu zadržavanja u koloni. Selektivna metoda je ona metoda koja istovremeno može odrediti više analita u uzorku bez primjerice preklapanja signala ili drugih smetnji.<sup>21,22</sup>

#### 2.6.4. Detekcijske granice

Detekcijske granice (engl. *Limit of detection*, LOD) za određenu analitičku metodu definirane su kao najmanja količina analita u uzroku koji se može detektirati, ali ne nužno i kvantificirati. Prema smjernicama ICH može se odrediti na nekoliko načina: vizualno, računanjem omjera signala i šuma te na temelju standardnog odstupanja odziva i nagiba kalibracijske krivulje. Detekcijska granica se vizualno određuje tako da se pripreme uzorci poznate koncentracije analita od interesa te se vizualno iz grafa ili kromatograma procijeni pri kojoj koncentraciji se analit može pouzdano detektirati. Može se odrediti i iz omjera signala i šuma koji treba biti 1:3 što je prihvatljivo za procjenu detekcijske granice. Na temelju standardnog odstupanja odziva i nagiba kalibracijske krivulje računa se prema jednadžbi 1<sup>21,22</sup>

$$LOD = \frac{3.3\sigma}{S} \quad (1)$$

gdje je  $\sigma$  standardno odstupanje odziva, a  $S$  nagib kalibracijske krivulje analita.<sup>21,22,28</sup>

#### 2.6.5. Kvantifikacijske granice

Najmanja količina analita u uzroku koja se može kvantitativno odrediti sa zadanom i prihvatljivom točnošću i preciznošću je kvantifikacijska granica (engl. *Limit of quantification*, LOQ). Kao i detekcijska granica, može se odrediti vizualno, iz omjera odziva i šuma te preko standardnog odstupanja odziva i nagiba krivulje. Za vizualno određivanje kvantifikacijske granice pripreme se uzorci s poznatom koncentracijom i utvrđuje se minimalna koncentracija na kojoj se analit može kvantificirati s prihvatljivom točnošću i preciznošću. Odzivi uzorka poznate koncentracije se uspoređuju sa signalima slijepog uzorka do one analitičke koncentracije kod koje je signal jednak vrijednosti 10 puta standardnog odstupanja slijepog uzorka, odnosno omjer šuma i signala za LOQ obično je 1:10. Prema metodi standardnog odstupanja odziva i nagiba krivulje LOQ se računa prema jednadžbi (2):

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S} \quad (2)$$

gdje je  $\sigma$  standardno odstupanje odziva, a  $S$  nagib kalibracijske krivulje analita.

LOD i LOQ su vrijednosti koje se obično izražavaju u mjernoj jedinici  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $\text{mg mL}^{-1}$  ili kao postotak vrijednosti LOD i LOQ koja se dobije množenjem LOD (LOQ) sa 100 i dijeljenjem s najmanjom poznatom koncentracijom mjerene tvari.<sup>21,22</sup>



Teoretska koncentracija, s omjerom signala i šuma u iznosu 10, izračunata je prema sljedećoj jednadžbi (3):

$$\text{Teoretska koncentracija} = \frac{(S/N \text{ teoretski}) \times c \text{ (st)}}{(S/N \text{ dobiveni)}} \quad (3)$$

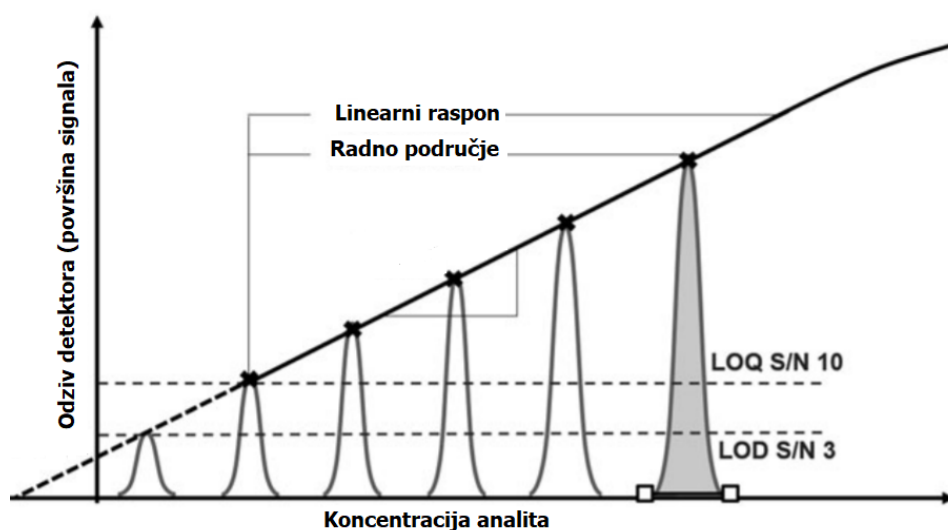
S/N teoretski: 10

$c$  (st): koncentracija otopine analita

S/N dobiveni: izmjereni omjer signala i šuma

#### 2.6.6. *Linearnost*

Linearnost analitičke metode je sposobnost mjerenja signala u određenom koncentracijskom rasponu u kojem je signal izravno proporcionalan određenoj koncentraciji analita u uzroku. Linearnost metode definirana je kao sposobnost metode koja daje rezultate ispitivanja izravno proporcionalne koncentraciji analita u uzorcima. U kromatografskim tehnikama određuje se injektiranjem niza otopina standarda poznate koncentracije ili razrijeđenih otopina standarda poznate koncentracije. Može se opisati pomoću matematičke funkcije  $y=f(x)$ , odnosno ako pravac ne prolazi kroz nulu:  $y=f(x)+b$ . Linearnost kalibracijske krivulje uobičajeno se određuje pomoću koeficijenta korelacije  $r$ . Korelacijski koeficijent koji je blizu vrijednosti 1 ( $r=1$ ) se smatra dovoljnim dokazom da bi se zaključilo da je eksperimentom postignuta savršena linearna kalibracija. Potrebno je injektirati najmanje 5 otopina različitih koncentracija u rasponu od 50-150% pretpostavljenog radnog područja, a Odbor za analitičke metode (eng. *Analytical Methods Committee*) za određivanje linearnosti predlaže pripremu najmanje šest koncentracija u duplikatu. Ovisnost odziva detektora o koncentraciji analita uz naznačeno područje linearnosti odnosno linearni raspon i radno područje prikazana je na slici 4.<sup>27</sup>



Slika 4. Područje linearnosti

Graf koji daje podatke o linearnosti se dobije unošenjem podataka najčešće u računalni program *Microsoft Excel* ili neki drugi program koji može izračunati jednadžbu pravca i prikazati područje linearnosti.<sup>21,22,27</sup>

#### 2.6.7. Radno područje

Radno područje ili raspon u analitičkoj metodi je interval koji uključuje gornju i donju koncentraciju analita, u kojem predložena metoda ima zadovoljavajuće zahtjeve što se tiče linearnosti, točnosti i preciznosti. Radi se o rasponu koncentracija u kojem će se odrediti linearnost (slika 4).<sup>21,22</sup>

#### 2.6.8. Robusnost

Robusnost analitičke metode je otpornost odnosno mjera njezine sposobnosti da ostane nepromijenjena pri malim, ali namjernim unaprijed definiranim varijacijama u parametrima metode te je pokazatelj njegove pouzdanosti tijekom normalne uporabe. U svrhu određivanja robusnosti metode mijenjaju se različiti parametri metode, kao što su pH, sastav mobilne faze, brzina protoka, temperatura itd. Robusnost se mjeri bilježenjem promjena u obliku oblika i položaja signala, vremena zadržavanja, razlučivosti i točnosti kvantifikacije. Ako su te promjene minimalne ili ih nema, za metodu možemo reći da je robusna. Robusnost je dobar indikator pouzdanosti i djelotvornosti metode prilikom korištenja iste.<sup>22</sup>

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Tehnička oprema i instrumenti

U eksperimentalnom radu korišten je uređaj HPLC Agilent Technologies 1100 Series s detektorom DAD prikazanom na slici 5, s kolonom (Waters Acquity) dimenzija 250 mm x 4,6 mm x 5 µm punjenom oktadecilsilil amorfnim organosilikatnim polimerom kao stacionarnom fazom.



Slika 5. Uređaj HPLC (Agilent Tehnologies Series 1100) <sup>23</sup>

Uz uređaj HPLC još su korišteni: uređaj za pročišćavanje vode, pH-metar, ultrazvučna kupelj te analitičke vage s preciznošću od 0,01 g, 0,01 mg te 0,0001 mg.

### 3.2. Reagensi

- Kalijev hidrogenfosfat, ( $K_2HPO_4$ ), p.a. (za analizu)
- Acetonitril, HPLC čistoće
- Fosfatna kiselina (85%), HPLC čistoće
- Voda, HPLC čistoće

### 3.3. Referentne supstance

- Verapamil hidroklorid
- Verapamil Ph. Eur. onečišćenje I
- Verapamil Ph. Eur. onečišćenje M

### 3.4. Kromatografski parametri

Tablica 2. Kromatografski parametri za analizu

Protok	1,5 mL min <sup>-1</sup>
Volumen injektiranja	10 µL
Detektor	278 nm BW 4nm
Temperatura kolone	25 °C
Ukupno vrijeme trajanja	51 min
Temperatura autosamplera	20 °C
Eluiranje	Gradijetno eluiranje prema tablici 3

Tablica 3. Uvjeti gradijentnog eluiranja

Vrijeme / min	Mobilna faza A / % v/v	Mobilna faza B / % v/v
0,0	63	37
22	63	37
27	35	65
45	35	65
46	Početni sastav	
51	Početni sastav	

### 3.5. Priprema otopina

#### 3.5.1. Pokretna faza A

Pokretna faza A pripravljena je otapanjem 6,97 g kalijevog hidrogenfosfata u 1 L vode, a vrijednost pH = 7,20 podešena je pomoću 85% fosforne kiseline. Pripremljeno je 6 L pokretne faze A.

#### 3.5.2. Pokretna faza B

Kao pokretna faza B korišteno je 6 L acetonitrila *ultra gradient grade* čistoće.

#### 3.5.3. Otapalo

Otapalo korišteno u pripravi modelnih otopina je smjesa pokretne faze A i pokretne faze B u mjeru 63:37, v/v. Pripremljeno je oko 8 L otapala.

#### 3.5.4. Otopina za provjeru prikladnosti sustava

Za razvoj analitičke metode poželjno je koristiti obogaćene modelne uzorke koji su kemijski i fizikalno što sličniji realnim uzorcima za koje se metoda razvija. Otopina za provjeru prikladnosti sustava (engl. *System Suitability Solution*, SST) sadrži 0,025 mg mL<sup>-1</sup> verapamil hidroklorida, 0,025 mg mL<sup>-1</sup> verapamil onečišćenja I te 0,025 mg mL<sup>-1</sup> verapamil onečišćenja M u otapalu. U volumetrijsku tikvicu od 20 mL odpipetira se 10 mL ishodne otopine verapamil onečišćenja I i M te se doda 5 mL ishodne otopine standarda i nadopuni otapalom do oznake.

#### 3.5.5. Ishodna otopina verapamil onečišćenja I i M

Za pripravu ishodnih otopina verapamil onečišćenja I i M odvagano je 1,25 mg verapamil onečišćenja I i 1,25 mg verapamil onečišćenja M u volumetrijsku tikvicu od 25 mL i nadopunjeno otapalom do oznake.

#### 3.5.6. Ishodna otopina standarda

Ishodna otopina standarda (engl. *Stock Standard Solution*) je otopina koja sadrži 0,1 mg mL<sup>-1</sup> verapamil hidroklorida u otapalu, a pripravljena je vaganjem 5,0 mg standarda verapamil hidroklorida u volumetrijsku tikvicu od 50 mL i nadopunjeno otapalom do oznake.

#### 3.5.7. Razrijeđena otopina standarda

Razrijeđena otopina standarda je otopina koja sadrži 0,00125 mg mL<sup>-1</sup> verapamil hidroklorida u otapalu. Odpipetira se 2,5 mL ishodne otopine standarda u volumetrijsku tikvicu od 200 mL i nadopuni se otapalom do oznake.

### 3.5.8. Otopina uzorka

Otopina uzorka sadrži oko 2,5 mg mL<sup>-1</sup> verapamil hidroklorida u otapalu. Precizno je izvagano 9 odvaga po 50 mg supstance u volumetrijsku tikvicu od 20 mL te nadopunjeno otapalom do oznake. U volumetrijsku tikvicu od 20 mL broj 1 i 2 doda se otapalo do polovice volumetrijske tikvice, stavi u ultrazvučnu kupelj 10 minuta i nakon otapanja uzorka nadopuni se otapalom do oznake. U volumetrijsku tikvicu od 20 mL broj 3, 4, 5, 6, 7 i 8 doda se otapalo do polovice volumetrijske tikvice te se također stavlja u ultrazvučnu kupelj 10 minuta. Nakon otapanja u ultrazvučnoj kupelji dodaje se 1 mL ishodne otopine verapamil onečišćenja I i M i napoduni otapalom do oznake. U volumetrijsku tikvicu od 20 mL broj 9 dodaje se otapalo do polovice volumetrijske tikvice, stavlja se u ultrazvučnu kupelj na 10 minuta, nakon ultrazvučne kupelji doda se 0,5 mL ishodne otopine verapamil onečišćenja I i M te nadopunjuje otapalom do oznake.

### 3.5.9. Slijepi uzorak

Kao slijepi uzorak korišteno je samo otapalo.

## 3.6. Obrada podataka

Glavna svrha obrade podataka je sažimanje i stjecanje uvida u određeni skup podataka pomoću matematičkih i statističkih pristupa. Obrada podataka omogućuje izdvajanje korisnih informacija i donošenje zaključaka o ulaznom i izlaznom signalu, te najvažnije, procjenu o samom procesu validacije, a u okviru ovog rada kromatogrami su procijenjeni vizualno te je korišten program Excel s podacima dobivenima iz programa Empower.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

Za određivanje onečišćenja verapamila u Pliva Hrvatska d.o.o. koristi se analitička metoda HPLC. Budući da postoje zahtjevi za rutinskom kontrolom i svakodnevnom analizom onečišćenja, potrebno je provjeravati aktivnu tvar koja se koristi u proizvodnim pogonima u Pliva Hrvatska.

### 4.1. Priprema sustava HPLC

Prije početka analize potrebno je kondicionirati kolonu propuštanjem mobilne faze (mobilna faza A 35% i mobilna faza B 65%) sve dok se ne postigne ravnoteža u koloni, stabilizira bazna linija i tlak u sustavu. Potom se injektiraju otopine za provjeru prikladnosti sustava (slijepi uzorak, otopina za prikladnosti sustava i otopina standarda) pri čemu moraju biti zadovoljeni uvjeti za provjeru prikladnosti sustava definirani metodom prikazani u tablici 4, a nakon što su zadovoljeni uvjeti prikladnosti sustava, može se započeti s postupkom validacije analitičke metode.

Tablica 4. Uvjeti za provjeru prikladnosti sustava

				Analiza dan 1.	Analiza dan 2.
Otopina	Signal	Validacijski kriterij		Rezultat	Rezultat
SST	Verapamil	Rezolucija	$\geq 4,5$	6,4	7,2
	Onečišćenje I				
Standard	Verapamil	RSD (%)	$\leq 10,0\%$ ( $n \geq 6$ )	3,1	0,8
Status				+	+



Pomoću otopine za provjeru prikladnosti sustava prvo se odredi rezolucija za slijepi uzorak, standardnu otopinu verapamila i verapamil-onečišćenje I i M te izračuna standardno odstupanje za mjerenja provedena unutar dva dana (Analiza dan 1. i dan 2.). Rezultati mjerenja rezolucije i izračunato srednje standardno odstupanje za analizu prvog i drugog dana zadovoljili su zadane kriterije, odnosno rezolucija je veća ili jednaka vrijednosti 4,5, a srednje standardno odstupanje za 6 ili više injektiranja je manje ili jednako 10,0% pa se na temelju toga može zaključiti da je metoda HPLC dovoljno precizna i može se koristiti u daljnjem određivanju onečišćenja u aktivnoj supstanci verapamilu.

Iz kromatograma su očitane i izračunate vrijednosti za relativno vrijeme zadržavanja (engl. *Relative retention time*, RRT) verapamil-onečišćenja I i M u odnosu na verapamil (od oko 15 minuta) i prema rezultatima iz tablice 5 može se zaključiti da je razlučivost zadovoljavajuća za daljnju analizu.

Tablica 5. Relativno vrijeme zadržavanja (engl. *Relative retention time*, RRT) verapamil-onečišćenja I i M

signal	RRT <sup>1</sup>
verapamil-onečišćenje I	~ 1,3
verapamil-onečišćenje M	~ 2,4

<sup>1</sup> Relativno vrijeme zadržavanja u odnosu na verapamil (vrijeme zadržavanja oko 15 minuta)

## 4.2. Validacija metode HPLC

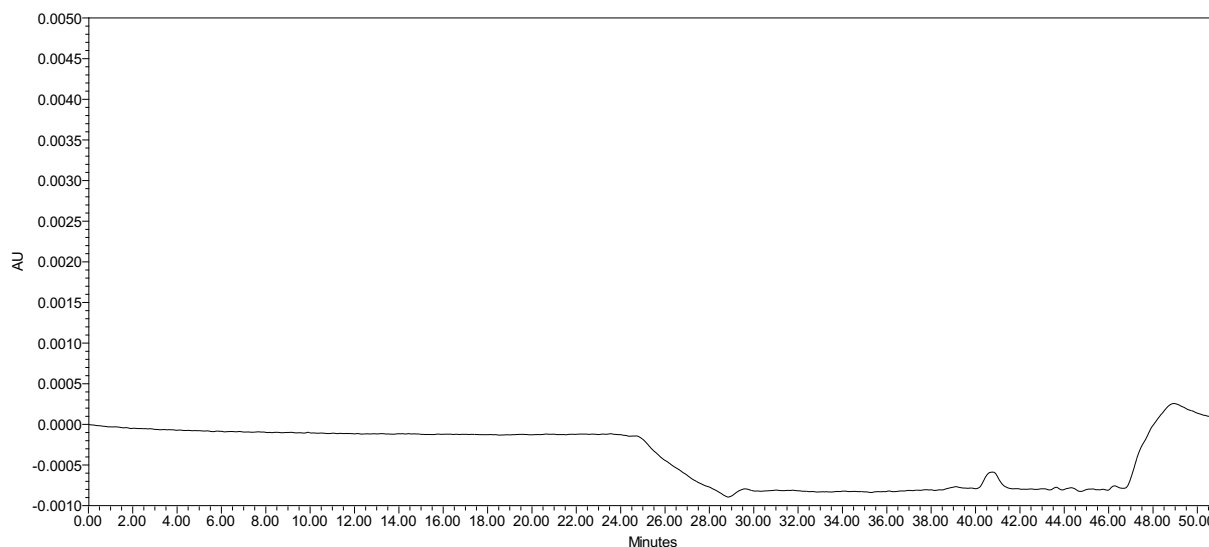
Validacija metode HPLC je proces koji se sastoji od različitih koraka: kvalifikacije sustava, uzorkovanja, pripreme uzorka, analize i obrade podataka. Opća procjena prikladnosti sustava uključivala je provjeru prikladnosti kromatografa za HPLC za predviđenu analizu te provjeru svih materijala (reagensi, certificirani referentni materijali, unutarnji i vanjski standardi) koji će se koristiti u analizi. Prije početka procesa validacije bitno je provjeriti je li sva instrumentacija ispravna. Za kromatografsku metodu prije analize bilo je potrebno provjeriti je li protok pumpe dobar, ponovljivost i linearnost injektora i je li intenzitet signala detektora prihvatljiv (omjer signala i šuma). Također, potrebno je provjeriti jesu li sve pipete i vage korištene u validaciji kalibrirane i umjerene. Pojednosti ovih provjera zabilježene su i pohranjene s podacima o validaciji i završnim izvješćem. Validacijski protokol pripremljen je za validaciju metode HPLC prema Europskoj farmakopeji za određivanje srodnih supstanci u verapamil hidrokloridu. Prema propisanom validacijskom protokolu potrebno je koristiti svu potrebnu zaštitnu opremu (maska, zaštitna odjeća, rukavice otporne na djelovanje kemikalija i zaštitne naočale).

Prije početka eksperimentalnog rada prihvaćena je analitička procedura za validaciju metode uz definirane kriterije prihvatljivosti. Kriteriji prihvatljivosti za selektivnost jesu da ukoliko postoje signali iz slijepog uzorka, oni ne smiju interferirati s kromatografskim vrškom standarada, uzorka i otopine za provjeru prikladnosti sustava. Signali standardnih otopina onečišćenja I i M moraju biti odvojeni jedan od drugog i isto tako odvojeni od signala verapamila. Kvantifikacijska granica prema specifikacijskom zahtjevu, provjerena je iz signala razrijeđene otopina standarda i otopine cijepljene onečišćenjem, ne smije imati omjer signala i šuma manji od vrijednosti 10, pri 0,05% radne koncentracije uzorka. Budući da je verapamil kao uzorak vrlo čist i onečišćenja nisu vidljiva u kromatogramu, mora se cijepiti poznatom koncentracijom onečišćenja od 0,1% što je propisana granica specifikacije koliko maksimalno onečišćenja smije biti u uzorku. Ukoliko se utvrdi da onečišćenja ili druge nepoznate tvari (Max X) prelaze granicu od 0,1% mora se prijaviti odstupanje te istražiti okolnosti pojave onečišćenja u uzorku aktivne supstance. Sve tvari prisutne u koncentracijama ispod kvantifikacijske granice se ne uzimaju u obzir. Što se tiče točnosti, relativno standardno odstupanje za cijepljene uzorke mora biti manje od 25% te analitički povrat onečišćenja cijepljenih uzoraka mora biti u rasponu od 75-125%. Stabilnost analita važno je utvrditi jer se na taj način garantira integritet i samog

uzorka. To omogućava provođenje validacije i analize na realnim uzorcima te prikupljanje valjanih rezultata. Stabilnost standardne otopine verapamila i otopina verapamila s dodanom poznatom koncentracijom onečišćenja određuje se iz promjene površine kromatografskog vrška za odabranu koncentraciju. Za standardnu otopinu verapamila, tijekom analiziranog razdoblja, prihvatljiva je promjena u površini kromatografskog vrška manja od 10%, dok za otopine cijepljene onečišćenjem apsolutna razlika u koncentraciji ne smije biti veća od 0,03%. Zbog vrlo niskih koncentracija onečišćenja i propisanih specifikacijskih uvjeta za maksimalnu dopuštenu količinu onečišćenja od 0,1% u odnosu na koncentraciju uzorka koja u ovom slučaju to iznosi  $2,5 \times 10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$ , linearnost i radno područje nije provjeravano te je provedena djelomična validacija.

#### 4.2.1. Selektivnost

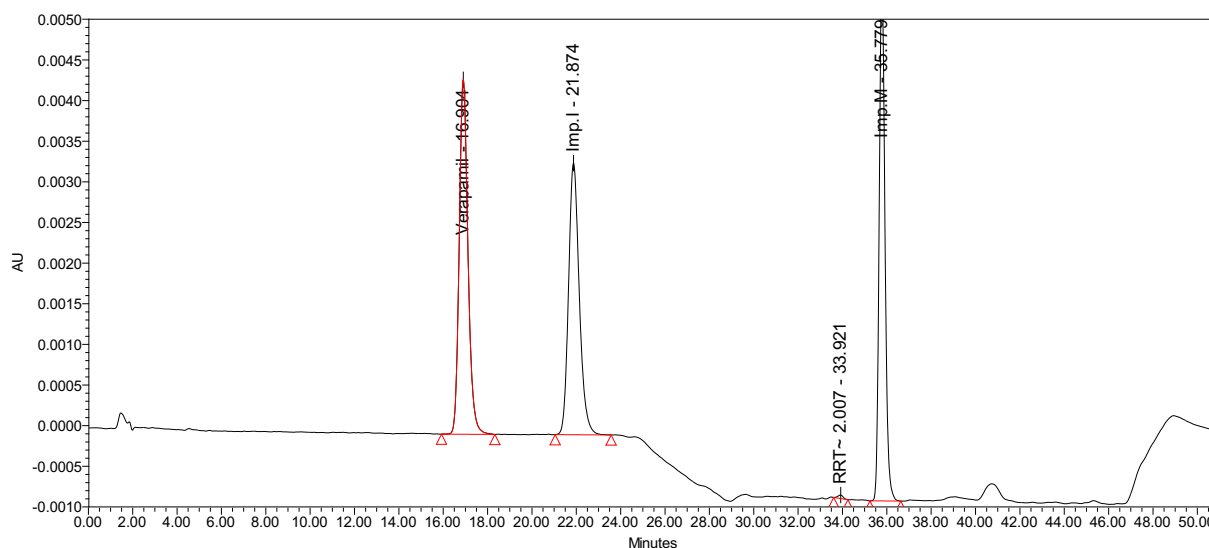
Selektivnost metode provjerena je usporedbom kromatograma slijepog uzorka, uzorka verapamila te standarda onečišćenja I i M. Uspoređeni su signali na kromatogramima dobiveni nakon injektiranja slijepog uzorka sa i bez analita (verapamil koncentracije  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) i signali na kromatogramima s dodanom poznatom koncentracijom onečišćenja I i M ( $0,0025 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Kromatogrami otapala, slijepog uzorka, otopine za provjeru prikladnosti sustava otopine, standardne otopine verapamila ( $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ), razrijeđene standardne otopine verapamila ( $0,00125 \text{ mg mL}^{-1}$ ), cijepljenih i necijepljenih uzoraka verapamila s onečišćenjima I i M prikazani su na slikama 6 – 21.



Slika 6. Kromatogram otapala (slijepog uzorka) pri gradijentnom eluiranju

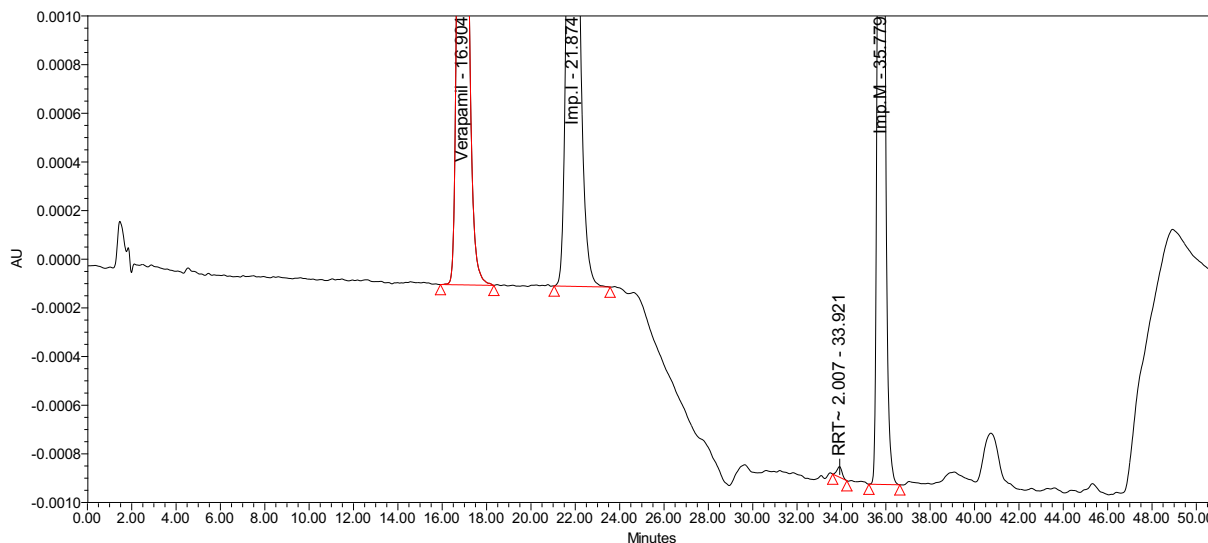
Slika 6 prikazuje kromatogram gradijentnog eluiranja otapala tj. slijepog uzorka koji trebaju biti isti ukoliko je sve postavljeno na ispravan način, te su pokretna faza A i pokretna faza B pripremljeni u skladu sa zahtjevom.

Na slici 7 prikazan je kromatogram otopine za provjeru prikladnosti sustava.



Slika 7. Kromatogram otopine za provjeru prikladnosti sustava

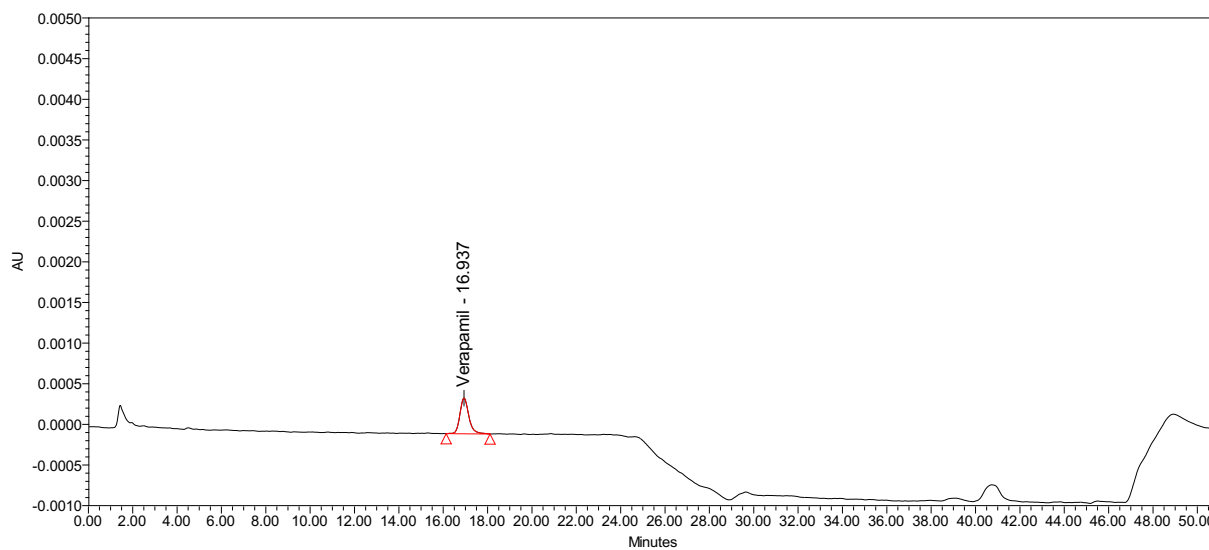
Radi bolje preglednosti signala otopine za provjeru prikladnosti sustava izdvojeni dio signala sa slike 7 prikazan je uvećan na slici 8.



Slika 8. Kromatogram otopine za provjeru prikladnosti sustava  
(uvećani prikaz)

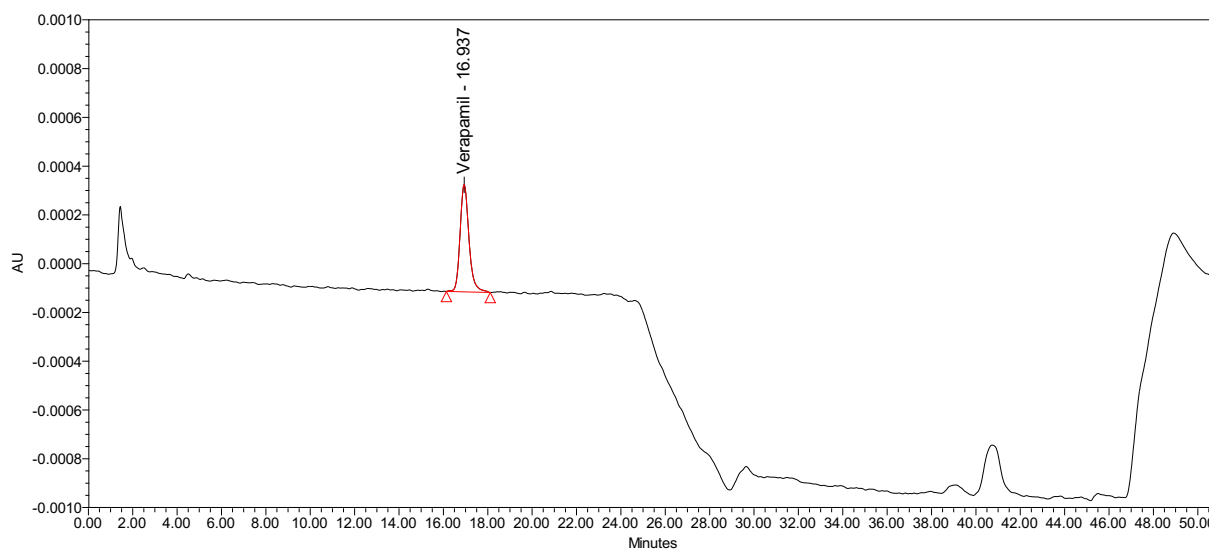
Na temelju usporedbe signala dobivenih kromatograma (slike 6 – 8) zaključeno je da ne postoje interferencije signala slijepog uzorka sa signalima analita od interesa. Slike 7 i 8 prikazuju signale standarda verapamila i standarde onečišćenja I i M pri koncentraciji  $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$  te njihovo vrijeme zadržavanja. Radi bolje preglednosti prikazani su uvećani prikazi (slika 8).

Slike 9 i 10 prikazuju signal standarda verapamila i njegovo vrijeme zadržavanja na koloni. Kromatogram standardne otopine verapamila pri koncentraciji od 4% u odnosu na koncentraciju uzorka od  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$  snimljen je u svrhu uobičajenog postupka prema zahtjevu specifikacije.



Slika 9. Kromatogram standardne otopine verapamila pri koncentraciji od 4% u odnosu na koncentraciju uzorka od  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$

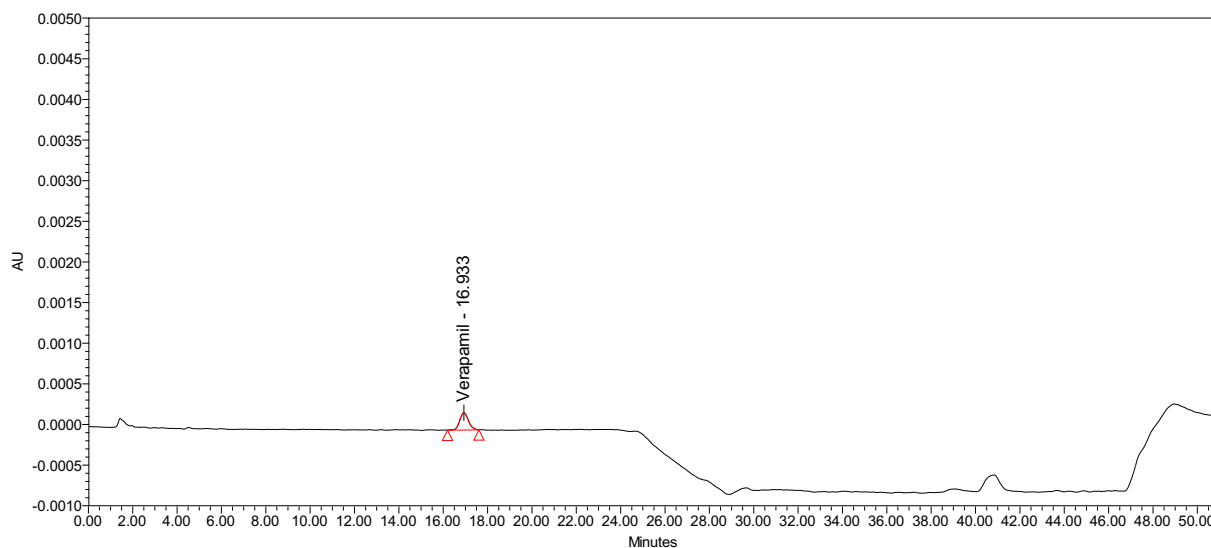
Na slici 10 prikazan je radi bolje preglednosti uvećani kromatogram signala otopine verapamila (sa slike 9) pri koncentraciji od 4% u odnosu na koncentraciju uzorka od  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ .



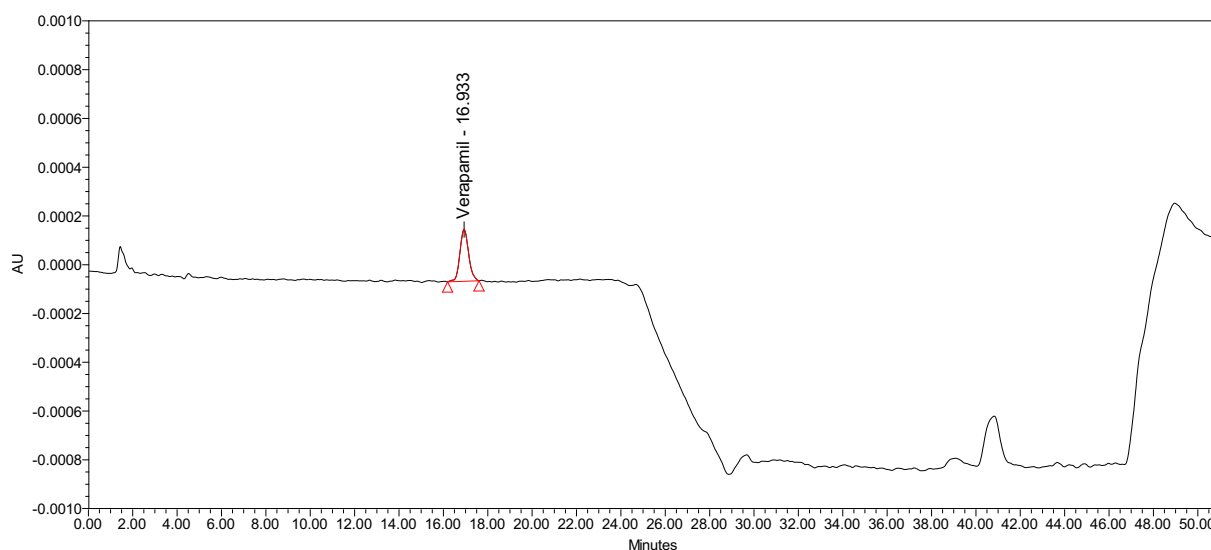
Slika 10. Kromatogram standardne otopine verapamila pri koncentraciji od 4% u odnosu na koncentraciju uzorka od  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$   
(uvećani prikaz)

Slike 11 i 12 prikazuju signal otopine razrijeđenog standarda verapamila, pri kvantifikacijskoj granici od 0,05% u odnosu na uzorak koncentracije od 2,5 mg mL<sup>-1</sup>. Svrha daljnje provjere osjetljivosti je dodatna provjera mogućnosti kvalitativnog vizualnog određivanja verapamila, te može li se dobiti dovoljno izraženi signal za kvantifikaciju.

Standardna otopina verapamila dodatno je razrijeđena i snimljen je kromatogram HPLC (slika 12), a radi bolje preglednosti navedeni signal prikazan je uvećano na slici 13.

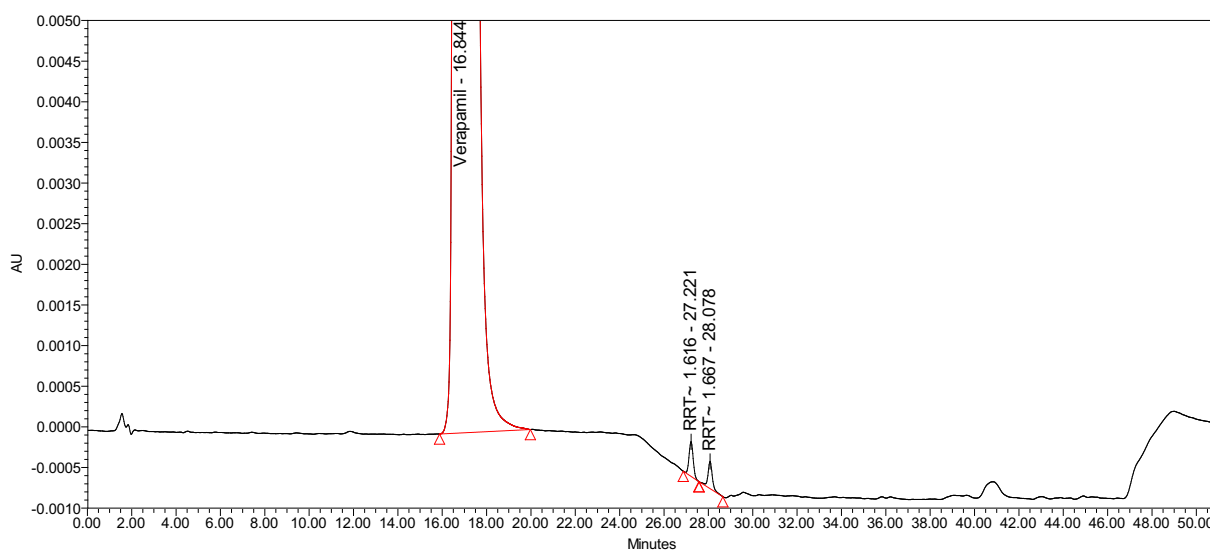


Slika 11. Kromatogram razrijeđene standardne otopine verapamila pri koncentraciji 0,05% u odnosu na uzorak verapamila koncentracije od 2,5 mg mL<sup>-1</sup>

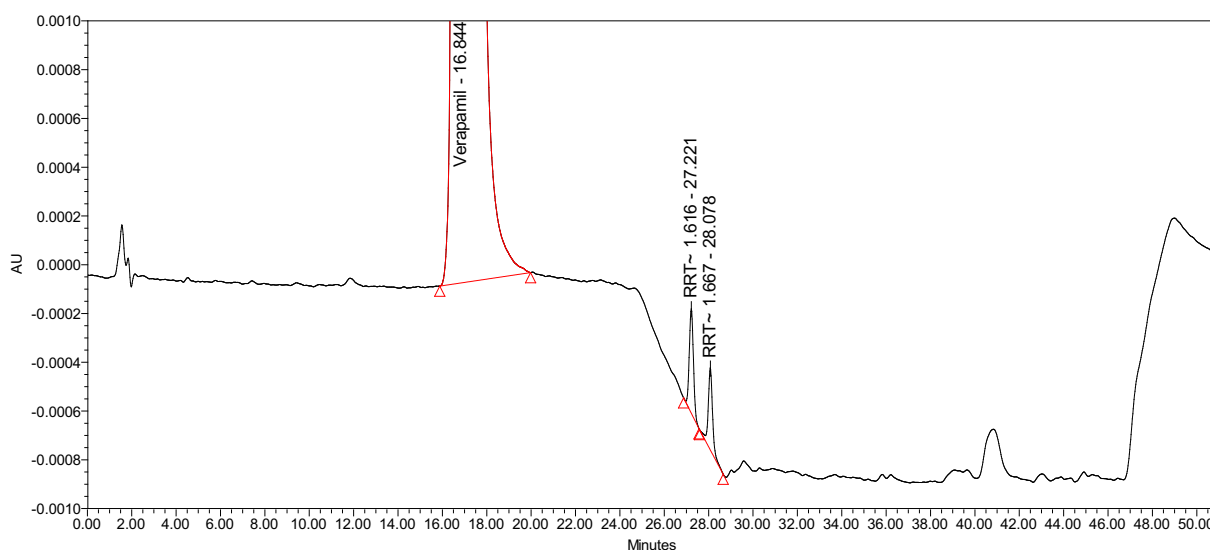


Slika 12. Kromatogram razrijeđene standardne otopine verapamila pri koncentraciji 0,05% u odnosu na uzorak verapamila koncentracije od 2,5 mg mL<sup>-1</sup>  
(uvećani prikaz)

Kromatogram otopine uzorka verapamila koncentracije  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$  prikazan je na slici 13, a svrhu dodatne provjere bazne linije i slabih nepoznatih signala (RRT pri vremenu zadržavanja od oko 27 -28 minuta koja predstavljaju MaxX, najveći nepoznati kromatografski vršak) prisutnih na kromatogramu dan je i uvećani prikaz na slici 14.



Slika 13. Kromatogram uzorka verapamila koncentracije  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$

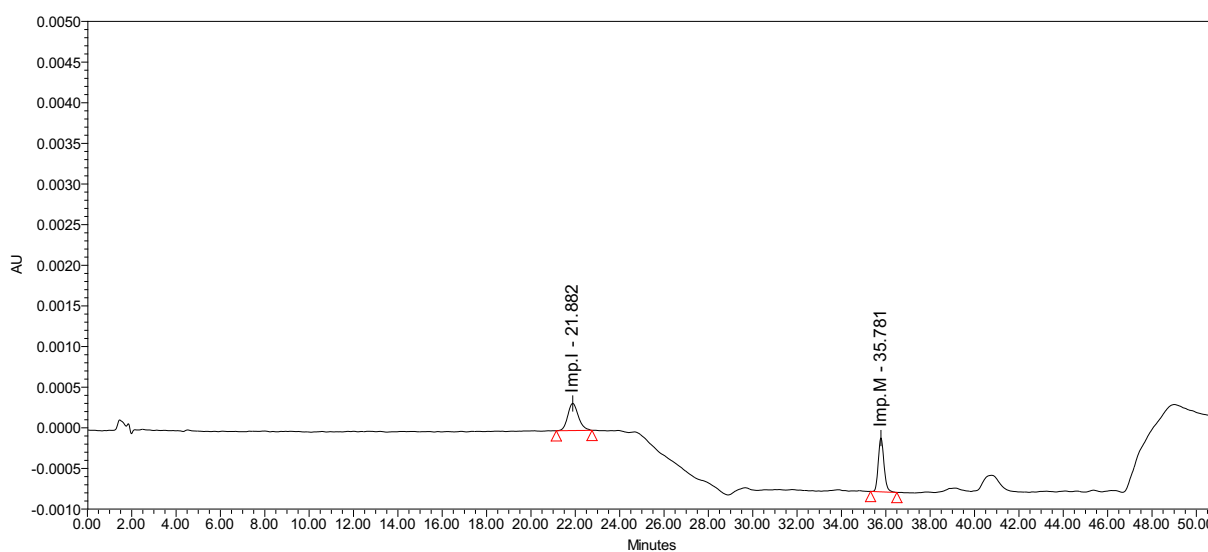


Slika 14. Kromatogram uzorka verapamila koncentracije  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$

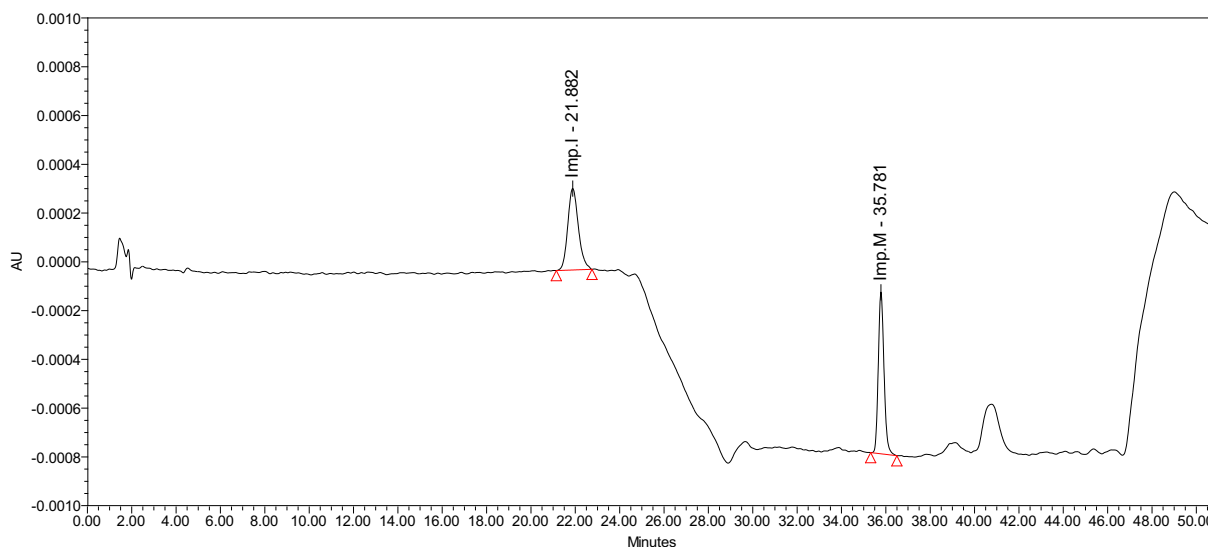
(uvećan prikaz)



Slike 13 i 14 prikazuju jaki signal uzorka verapamila koncentracije  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$  bez drugih izraženih signala u kromatogramu pa se već na temelju toga može zaključiti kako je uzorak verapamila izuzetno čist. Budući da se on koristi kao aktivna tvar za proizvodnju lijekova, iako je potvrđena visoka čistoća, u svrhu validacije metode i pojave vrlo slabih signala u kromatogramu provjeren je utjecaj onečišćenja na uzorak verapamila. U svrhu opažanja promjena u kromatogramu otopine uzorka verapamila dodane su poznate otopine onečišćenja I i M pri dva različita volumna udjela (0,1 i 0,05%) u odnosu na koncentraciju uzorka verapamila ( $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Kako bi se proveo postupak cijepljenja odnosno dodatka poznatih onečišćenja u standardnu otopinu verapamila prvo su pripremljene otopine onečišćenja I i M u koncentraciji 0,1% u odnosu na koncentraciju uzorka verapamila ( $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ), a njihovi kromatogrami prikazani su na slikama 15 i 16 (uvećani prikaz zbog bolje preglednosti signala).

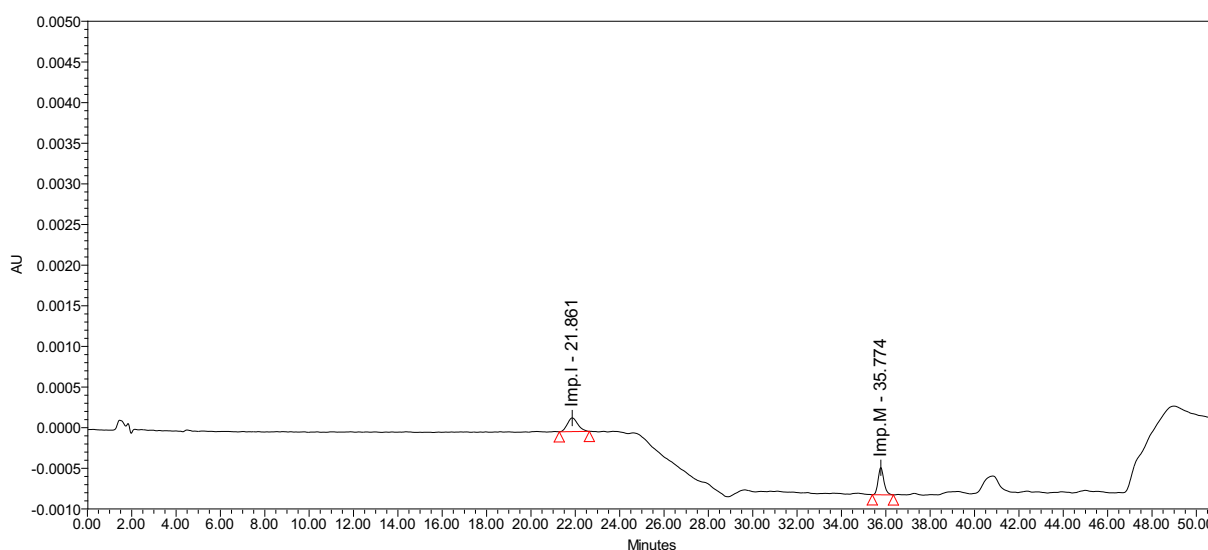


Slika 15. Kromatogram otopina onečišćenja I i M za cijepljenje u koncentraciji 0,1% u odnosu na koncentraciju uzorka verapamila ( $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ )



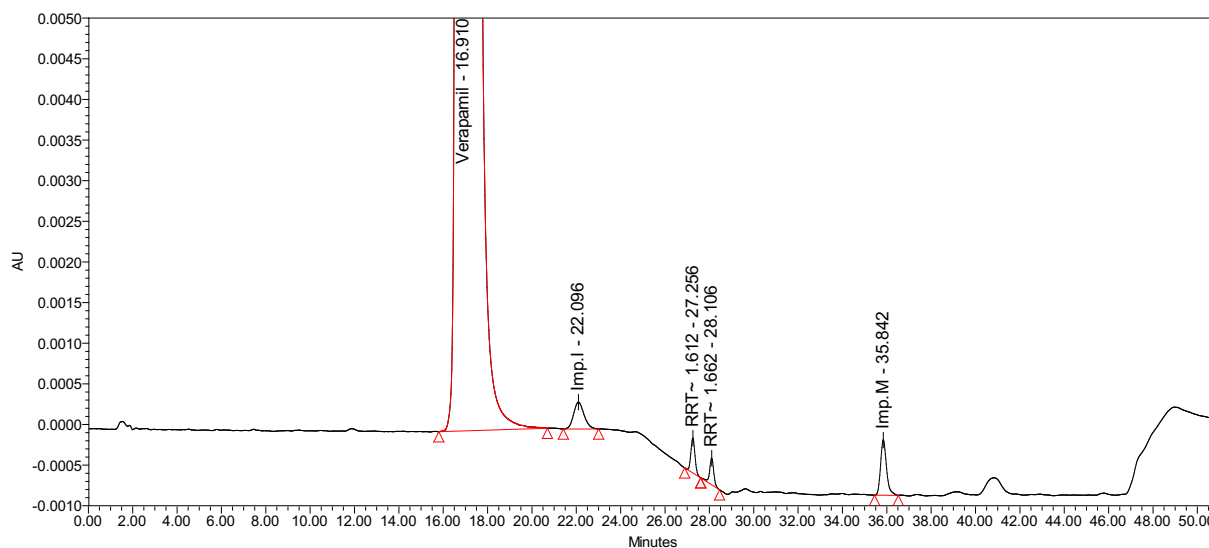
Slika 16. Kromatogram otopina onečišćenja I i M koncentracije 0,1% u odnosu na koncentraciju uzorka verapamila ( $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) (uvećani prikaz)

Kako bi se što točnije proveo postupak cijepljenja odnosno dodatka poznatih onečišćenja u standardnu otopinu verapamila pripremljene su i otopine onečišćenja I i M u još nižoj koncentraciji od 0,05% u odnosu na koncentraciju uzorka verapamila ( $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ), a kromatogram je prikazan na slici 17.

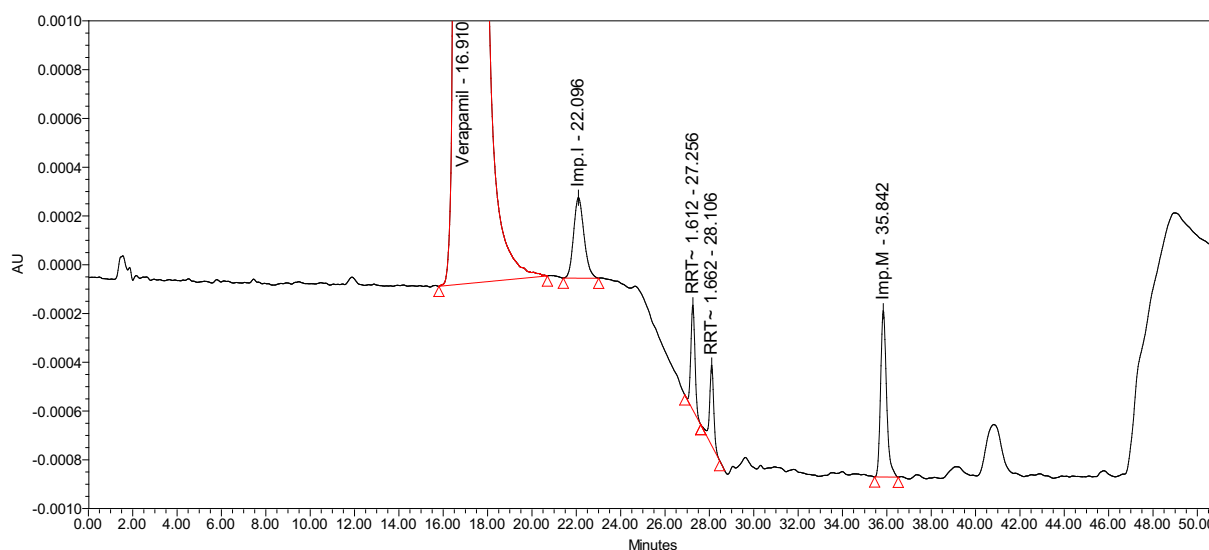


Slika 17. Kromatogram onečišćenja I i M pri koncentraciji 0,05% u odnosu na uzorak verapamila ( $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ )

Nakon što je u kromatogramu (slike 16 i 17) određen položaj signala otopina onečišćenja I i M u koncentraciji 0,1% u odnosu na koncentraciju uzorka verapamila ( $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) snimljen je kromatogram smjese otopine uzorka verapamila i dodane otopine onečišćenja I i M u koncentraciji 0,1% u odnosu na koncentraciju uzorka verapamila ( $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Kromatogram takve cijepjene otopine verapamila s onečišćenjima I i M prikazan je na slici 18, a radi bolje preglednosti i uvećani prikaz na slici 19.



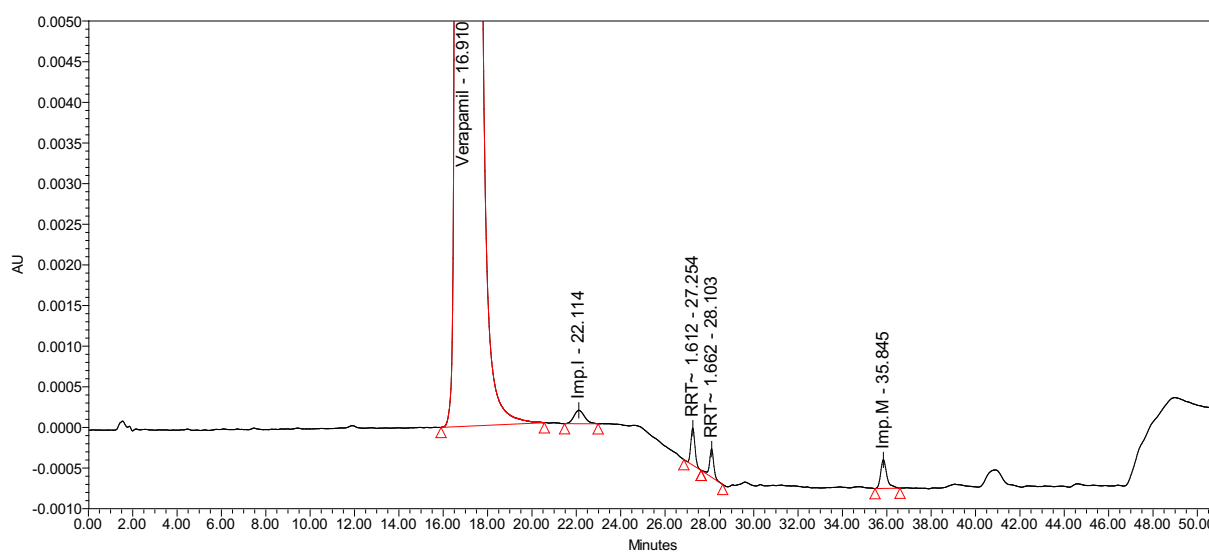
Slika 18. Kromatogram cijepjenog uzorka onečišćenjima I i M koncentracije 0,1% u odnosu na uzorak verapamila ( $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ )



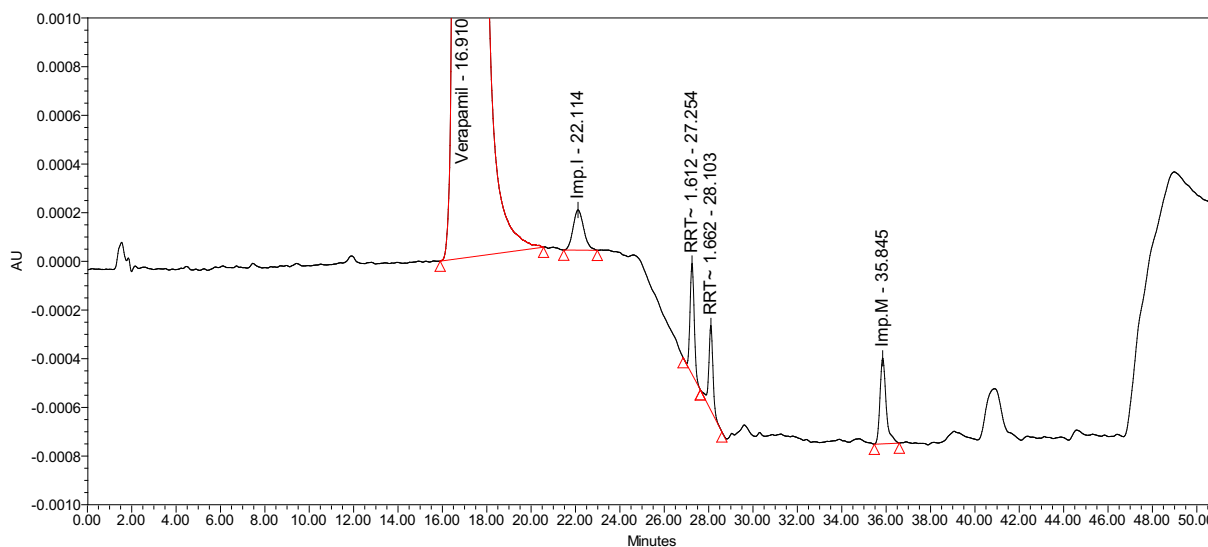
Slika 19. Kromatogram cijepjenog uzorka onečišćenjima I i M koncentracije 0,1% u odnosu na uzorak verapamila ( $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ )  
(uvećani prikaz)

Na temelju kromatograma smjese standardne otopine verapamila i dodanih onečišćenja I i M u koncentraciji 0,1% u odnosu na koncentraciju uzorka verapamila ( $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) može se zaključiti da je njihovo vrijeme zadržavanja različito te da nema preklapanja odnosno interferencija signala. U kromatogramima onečišćenja I i M bez uzorka verapamila nema slabih nepoznatih signala oznake RRT pri 27 i 28 minuta koji se pojavljuju u spektru čiste standardne otopine verapamila te u spektru sve tri tvari. Može se pretpostaviti da su nepoznati signali uzrokovani nepoznatom tvari u vrlo niskoj koncentraciji prisutnoj u uzorku verapamila ( $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) i ne interferiraju ni pri određivanju verapamila ni onečišćenja I i M u koncentraciji 0,1% u odnosu na uzorak verapamila ( $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

U svrhu dodatne provjere signala snimljeni su kromatogrami onečišćenja I i M pri vrlo niskoj koncentraciji od 0,05% u odnosu na uzorak verapamila ( $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Kromatogram cijepljenog uzorka onečišćenjima I i M koncentracije 0,05% u odnosu na uzorak verapamila prikazan je na slici 20, a radi bolje preglednosti i uvećani prikaz na slici 21.



Slika 20. Kromatogram cijepljenog uzorka onečišćenjima I i M koncentracije 0,05% u odnosu na uzorak verapamila



Slika 21. Kromatogram cijepljenog uzorka onečišćenjima I i M koncentracije 0,05% u odnosu na uzorak verapamila ( $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) (uvećani prikaz)

Na temelju provedenih istraživanja za kromatografsko odjeljivanje uzorka, standarda, slijepog uzorka, otopina za cijepljenje i otopina za provjeru prikladnosti sustava može se zaključiti da su svi signali na kromatogramima na obje kolone korištene u tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti vrlo dobro odvojeni i mogu se koristiti za određivanje onečišćenja u aktivnoj tvari verapamilu. Metoda je selektivna i može se koristiti u daljnjoj rutinskoj analizi onečišćenja verapamila.

#### 4.2.2. Kvantifikacijska granica

Kvantifikacijska granica je definirana kao najniža koncentracija analita u uzroku koja se može pouzdano kvantificirati tj. signal kojemu se može pridružiti brojčana vrijednost. Određivanje kvantifikacijske granice temelji se na kalibracijskom pravcu koji se utvrđuje mjereći uzorke koji sadržavaju analit u koncentraciji oko limita kvantifikacije te na mjerenju standardne devijacije odnosno računa se prema formuli (2). Vizualna procjena kvantifikacijskog limita se uglavnom koristi kod ne instrumentalnih metoda iako može biti korištena i kod instrumentalnih metoda i može se odrediti analizom uzoraka poznate koncentracije analita utvrđivanjem najnižeg nivoa na kojem se analit može kvantitativno odrediti sa zadovoljavajućom točnosti i preciznosti. Tipičan omjer signala i šuma pomoću kojega se određuju kvantifikacije granice je 10:1. U ovom radu kvantifikacijska granica je propisana specifikacijom i iznosi 0,05% odnosno prema masenoj koncentraciji verapamila, iznosi  $1,25 \times 10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$ .

Tablica 6. Prikaz rezultata dobivenih prilikom snimanja razrijeđene otopine standarda verapamila pri koncentraciji 0,05% u odnosu na uzorak verapamila.

		Analiza 1. dan	Analiza 2. dan
Otopina	Kriterij	Rezultat	Rezultat
Razrijeđena otopina standarda Verapamila	S/N NLT 10	48	59

Svaki korak u validaciji metode je bitan korak pa tako tablica 6 prikazuje da se standard verapamila može kvantificirati pri koncentraciji od 0,05% u odnosu na koncentraciju uzorka te omjer signala i šuma iznosi 48 odnosno 59 drugi dan analize. Budući da je kriterij omjera signala i šuma minimalno 10, zadovoljen je uvjet specifikacije.

Tablica 7. Granice kvantifikacije za onečišćenja – cijepljene otopine uzorka

Supstanca	Analiza (dan)	Masena koncentracija ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% radne koncentracije u odnosu na uzorak	S/N	Kriterij prihvatljivosti	Status	Stvarna masena koncentracija / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Koncentracija izračunata za S/N = 10	
								Masena koncentracija ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% radne koncentracije u odnosu na uzorak
Onečišćenje I	1	1,25	0,05	40	S/N omjer NLT 10 na 0,05%	+	1,1493	0,287	0,011
	2	1,25	0,05	27		+	1,280	0,474	0,019
Onečišćenje M	1	1,25	0,05	77		+	1,2972	0,168	0,007
	2	1,25	0,05	23		+	1,2540	0,022	0,022

Dakle, omjer S/N u iznosu 10 definira da je signal 10 puta veći nego šum, što je granica omjera signala i šuma kako bi se poslije analize mogao prepoznati signal tj. kvantificirati i dati nekakvu brojčanu vrijednost. Minimalni omjer signala i šuma za prepoznavanje radi li se uopće o signalu analita je 3. Nakon pripremljenih otopina i odrađene analize dobivene su prikazane vrijednosti signala i šuma za cijepljene otopine uzorka koje su prikazane u tablici 7. Kriterij prihvatljivosti koji je propisan specifikacijom S/N za volumni udio analita od 0,05% u odnosu koncentraciju uzorka je zadovoljen. Budući da je omjer S/N veći od kriterija prihvatljivosti izračuna se prema prikazanoj formuli, kolika bi zapravo bila koncentracija onečišćenja dovoljna da se zadovolji uvjet specifikacije te se izrazi u radnom postotku naspram ukupne koncentracije uzorka verapamila.

#### 4.2.3. Preciznost i točnost

Validacijski parametar točnosti ukazuje na podudarnosti rezultata ispitivanja i referentne vrijednosti, odnosno koliko je dobivena mjerna vrijednost, u ovom slučaju masena koncentracija, približna stvarnoj vrijednosti. Točnost metode određena je kao omjer prosječne koncentracije analita dobivene analizom duplikata koji su prošli identičan postupak obrade te nominalne vrijednosti koncentracije kojom je na početku bio obogaćen uzorak. U tablici 9 prikazane su dobivene prosječne koncentracije za koncentracijski nivo  $2,5 \times 10^{-3}$  mg mL<sup>-1</sup> te točnost određivanja. Vidljivo je kako je za sve analite analitički povrat oko 90% što ukazuje na točnost i pouzdanost metode.

Preciznost govori o podudarnosti više neovisnih rezultata dobivenih istim postupkom rada, a izražava se kao standardno odstupanja rezultata analize. Postoje tri razine preciznosti: ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost. Ponovljivost ili nepreciznost u seriji je najčešće ispitivana preciznost, a govori o nepreciznosti rada koja proizlazi u uvjetima kada na ispitivanju radi ista osoba, koristeći istu opremu u istom laboratoriju, primjenjujući istu metodu na poželjno identičnim ispitivanim uzorcima, poduzorcima homogenog uzorka, odnosno replikantima. Srednja preciznost pokazuje podudarnost rezultata analize s obzirom na promjenu određenog faktora. Ispituje se tako da se primjenjuje ista metoda s promjenom u određenom vanjskom faktoru, kao što je različito vrijeme, različiti instrumenti ili različiti analitičari. Obnovljivost predstavlja preciznost ispitivanja provedenih pod točno određenim uvjetima u određenim vremenskim razmacima. Kod analize metode obično se rade tri ponavljanja na nekoliko koncentracijskih razina koje se poklapaju s područjem linearnosti. Kriterij prihvatljivosti ovisit će o vrsti analize, matrici uzorka i koncentraciji uzorka koji se određuje, a u okviru ovog rada kriterij za uzorke cijepljene onečišćenjem u koncentraciji od 0,10% u odnosu na koncentraciju uzorka, srednji analitički povrat onečišćenja treba biti između 75% i 125% te preciznost rezultata izražena kao relativno standardno odstupanje (RSD) ne smije biti veći od 25%.

#### Ponovljivost

Budući da uzorak verapamila nije sadržavao onečišćenja iznad kvantifikacijske granice (0,05%), test ponovljivosti se proveo metodom HPLC na šest cijepljenih uzoraka i 2 necijepljena uzorka. Otopine uzorka su cijepljene onečišćenjima I i M u koncentraciji 0,1% u odnosu na koncentraciju uzorka verapamila. Dodatne dvije necijepljene otopine pripravljene su



u svrhu dodatne provjere i usporedbe rezultata mjerenja. Ponovljivost izražena kao relativno standardno odstupanje rezultata analize iznosila je 3,2% i 7,8% za onečišćenje I te 2,5% i 7,7% za onečišćenje M, a koristi se za procjenu potrebne preciznosti.

Tablica 8. Rezultati za određivanje preciznosti otopine uzorka verapamila

	Analiza 1. dan		
Onečišćenje	Onečišćenje I	Onečišćenje M	Max X
1	ND	ND	< LOQ
2	ND	ND	< LOQ
Prosjek	ND	ND	< LOQ
	Analiza 2. dan		
Onečišćenje	Onečišćenje I	Onečišćenje M	Max X
1	ND	ND	< LOD
2	ND	ND	< LOD
Prosjek	ND	ND	< LOD

Na temelju rezultata analize otopine uzorka verapamila prikazanim u tablici 9 može se zaključiti kako je uzorak aktivne supstance verapamila čist, bez onečišćenja. Budući da onečišćenja I i M uopće nisu detektirana u samom uzorku, potvrđeno je koliko je zapravo aktivna supstanca verapamila čista i primjenjiva za korištenja u proizvodnju lijeka. Ukoliko se utvrdi da onečišćenja ili druge nepoznate tvari (Max X) prelaze granicu od 0,1% mora se prijaviti odstupanje te istražiti okolnosti pojave onečišćenja u uzorku aktivne supstance No, kako bi se zadovoljili svi zahtjevi za određivanje preciznosti metode za analizu aktivne supstance koji su propisani specifikacijom validacijske metode HPLC za verapamil prema smjernicama *Ph. Eur.* potrebno je provesti dodatna istraživanja i uzorke cijepiti s onečišćenjima poznate koncentracije. Prema farmakopejskim smjernicama kriterij za analitički povrat je u rasponu od 75 - 125% uz preciznost izraženu kao relativno standardno odstupanje manje ili jednako od 25%. Cijepljenje uzorka verapamila (uzorci 3 – 8) poznatim koncentracijama onečišćenja I i M i njihovo kromatografsko odjeljivanje provedeno je na dvije kolone za HPLC (Analiza I i II), a rezultati za analitički povrat (%) prikazani su u tablici 9.

Tablica 9. Rezultati za analitički povrat (%) i preciznost metode (izražena kao RSD, %) za onečišćenja verapamila I i M.

Analiza	I	II	I	II
	Analitički povrat, %			
	Onečišćenje I		Onečišćenje M	
Uzorak 3	92	86	108	98
Uzorak 4	92	87	112	96
Uzorak 5	92	73	107	81
Uzorak 6	92	90	109	100
Uzorak 7	89	90	108	101
Uzorak 8	98	91	114	98
srednja vrijednost/%	93	86	110	96
Kriterij	75 - 125%			
RSD/%	3,2%	7,8%	2,5%	7,7%
Kriterij	≤ 25%			
Status	+		+	

Na temelju rezultata iz tablice 9 može se zaključiti da ne postoji značajna razlika u dvije nezavisne analize provedene na dvije različite kolone (73 -115%). Rezultati zadovoljavaju kriterije iz farmakopejskih smjernica za određivanje onečišćenja odnosno srodne supstance u verapamilu metodom HPLC. Dobiveni rezultati za verapamil su uspoređeni i u skladu su s

rezultatima koje je dao proizvođač čime je potvrđeno da je metoda HPLC primjenjiva za analizu onečišćenja u aktivnoj supstanci verapamilu.

#### 4.2.4. Stabilnost

Budući da je validacija metode HPLC standardna praksa u analitičkom laboratoriju kontrole kvalitete prilikom svakog izvođenja validacije (u ovom slučaju za verapamil) potrebno je prikazati podatke o stabilnosti otopina standarda i uzoraka. Stabilnost otopina standarda i uzoraka u uobičajenim laboratorijskim uvjetima mora biti određena kako bi osigurala da su i uzorci i standardi dovoljno stabilni u procijenjenom vremenskom periodu potrebnom za analizu. Nakon što se odredi stabilnost otopina, potrebno je zadati rokove valjanosti pojedinih uzorka i uvjete čuvanja uzorka za analitičku metodu. U slučaju da su uzorci i standardi stabilniji od uvjeta maksimalne razlike u površini koja ne smije biti veća ili jednaka vrijednosti 10, te koncentraciji koja se ne smije razlikovati za više od 0,03%, novo vremensko razdoblje se predlaže za stabilnost uzoraka i standarda. Stabilnost uzorka određena je usporedbom signala u kromatogramu za standardne otopine verapamila u vremenskom periodu između dvije analize u vremenskom rasponu od oko dva tjedna, nakon 5 (118 h) odnosno 15 dana (377 h), a rezultati su dani u tablici 10.

Tablica 10. Stabilnost standardne otopine verapamila

Otopina	Vrijeme / h	Površina	Razlika naspram točke 0 (Razlika u površini, %)	Zahtjev	Status
			Verapamil		
Standard	0	11978	/	≤ 10,0%	/
	118	12072	+ 1,8		+
	377	12976	+ 5,9		+

Prema rezultatima iz tablice 10 može se zaključiti kako je standardna otopina verapamila stabilna unutar 15 dana i zadovoljava propisane farmakopejske kriterije za promjene u površini signala u kromatogramu verapamila od  $\leq 10,0\%$ .

Ispitana je i stabilnost otopina onečišćenja I i M, a rezultati su prikazani u tablici 11.

Tablica 11. Stabilnost otopina s onečišćenjem I i M

Vrijeme / h	0	118	377	Maksimalna apsolutna razlika/ (NMT 0,03%)	Status
Onečišćenje I	0,09	0,05	0,04	0,05	-
Onečišćenje M	0,11	0,07	0,05	0,06	-

Na temelju rezultata iz tablice 10 i 11 može se zaključiti kako je standardna otopina verapamila stabilna i nakon 377 sati od pripremanja za prvu analizu za razliku od pripremljenih otopina onečišćenja I i M koja nisu ispunila uvjete stabilnosti u istom vremenskom periodu. Na temelju rezultata za određivanje stabilnosti standardnih otopina i uzorka preporuka je da ih je potrebno čuvati na temperaturi jednakoj ili manjoj od 20 °C te zaštićeno od direktnog utjecaja sunčevih zraka, a analizu provesti unutar deset dana.

## § 5. ZAKLJUČAK

Svrha dobre laboratorijske prakse je regulirati rad svih onih koji rade na istraživanju sigurnosti potencijalnih lijekova i drugih supstanci. Sigurnost lijekova je ključno pitanje koje ima direktan utjecaj na pacijente koji uzimaju lijekove i na ljude koji sudjeluju u kliničkim ispitivanjima. Iz tog razloga i zbog potrebe zadovoljavanja zahtjeva regulatornih tijela, sve analitičke metode trebaju biti ispravno validirane. Istraživanja u okviru ovog rada provedena su u svrhu validacije metode za određivanje onečišćenja u aktivnoj supstanci verapamil hidrokloridu, tvari koja je osnova raznih farmaceutskih pripravaka koji služe za liječenje kardiovaskularnih oboljenja. Validacija metode HPLC je provedena prema internim Plivnim standardima i propisima koji su napisani na temelju strogih zahtjeva farmakopeje i smjernica ICH. U svrhu validacije metode određeni su sljedeći parametri: selektivnost, kvantifikacijska granice, preciznost i stabilnost otopina uzoraka i standardnih otopina za analit i onečišćenja.

Pri kromatografskoj HPLC analizi analiti nisu međusobno interferirali te je potvrđeno da je metoda dovoljno selektivna. Izmjereni omjeri signala i šuma u svrhu provjere osjetljivosti otopina standardnog razrjeđenja i otopina cijepljenih onečišćenjem I i M bili su iznad zahtjeva metode te u tome zadovoljili kriterij. Točnost je određena iz analitičkog povrata za onečišćenja I i M i iznosi između 89% i 114%, a preciznost izražena RSD manjom od 25% također zadovoljava specifikaciju. Samo za standard verapamila dobivena je zadovoljavajuća stabilnost, pa će dobiveni podaci biti predloženi za dopunu specifikacijskih podataka dok stabilnost standarda onečišćenja I i M nije bila zadovoljavajuća u zadanim parametrima te su potrebna detaljnija istraživanja.

Budući da su svi ispitivani validacijski parametri za određivanje verapamila u zadanim okvirima regulatornih zahtjeva, metoda HPLC s detektorom DAD može se sigurno koristiti u budućem radu laboratorija Kontrole kvalitete Pliva Hrvatska d.o.o.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

Max X – najveći nepoznati kromatografski vršak u kromatogramu

ND – engl. not detected

NLT – engl. not lower than

NMT – engl. not more than

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. L. Levi, G. C. Walker, *Can. Med. Assoc. J.* **91** (1964) 781–785.
2. *Health products policy and standards*, 2023., *Quality Control guidelines*, <https://www.who.int/teams/health-product-and-policy-standards/standards-and-specifications/norms-and-standards-for-pharmaceuticals/guidelines/quality-control> (datum pristupa 15. studeni 2023.)
3. Quality Control During Drug Development, 04. prosinca 2022., Technology Networks, <https://www.technologynetworks.com/drug-discovery/articles/importance-of-quality-control-during-drug-development-368119> (datum pristupa 15. studeni 2023)
4. World Health Organisation, *WHO Drug Information* **27** (2013) 119-128.
5. European Pharmacopoeia: Quality standards for medicines, 2023., Eupati, <https://toolbox.eupati.eu/resources/european-pharmacopoeia-quality-standards-for-medicines/> (datum pristupa 14. studeni 2023.)
6. <https://www.halmed.hr/O-HALMED-u/Osnovni-podaci-i-dokumenti/Djelatnosti/> (datum pristupa 16. studeni 2023.)
7. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-6-test-procedures-acceptance-criteria-new-drug-substances-new-drug-products-chemical\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-6-test-procedures-acceptance-criteria-new-drug-substances-new-drug-products-chemical_en.pdf) (datum pristupa 16. studeni 2023.)
8. J. A. Molzon, A. Giaquinto, L. Lindstrom, T. Tominaga, M. Ward, P. Doerr, L. Hunt, L. Rago, *Clin. Pharmacol. Ther.* **89** (2011) 503-512.
9. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q3A%28R2%29%20Guideline.pdf> (datum pristupa 15. studeni 2023)
10. P. Prajapati, Y. K. Agrawal, *Rev. Anal. Chem.* **33** (2014) 123-133.
11. R. Sankar, G. Rajyalaksmi, D. Chapala, G. D. Rao, *JOCPS* **7** (2014) 259-274.
12. D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, Cengage Learning, Boston, 2018, str. 746-781.
13. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 1999, str. 692-716.
14. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482473/> (datum pristupa 17. studeni 2023)

15. <https://mediately.co/hr/drugs/Zb4Mfstw5sUX7DBbKZaoakknqtR/isoptin-120-mg-filmom-oblozene-tablete> (datum pristupa 17. studeni 2023.)
16. C. S. Moreira, F. R. Lourenço, *Microchem. J.* **154** (2020) 104610.
17. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2520#section=Pharmacology-and-Biochemistry> (datum pristupa 18. studeni 2023)
18. <https://www.biomerieux-industry.com/pharma-quality-control/resources/white-papers/method-qualification-and-validation-pharma-industry> (datum pristupa 20. studeni 2023)
19. [https://vial.com/blog/articles/drug-development-lifecycle/?https://vial.com/blog/articles/drug-development-lifecycle/?utm\\_source=organic](https://vial.com/blog/articles/drug-development-lifecycle/?https://vial.com/blog/articles/drug-development-lifecycle/?utm_source=organic) (datum pristupa 20. studeni 2023)
20. <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001826en.pdf> (datum pristupa 20. studeni 2023.)
21. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf> (datum pristupa 20. studeni 2023.)
22. <https://www.intechopen.com/chapters/57909> (datum pristupa 20. kolovoza 2023)
23. <https://myco-instrumentation.com/product/agilent-1100-series-hplc-with-uv-detector/> (datum pristupa 25. studeni 2023)
24. WHO TDR, 2008., *Handbook: Good laboratory practice*, <https://tdr.who.int/publications/m/item/2001-01-01-handbook-good-laboratory-practice> (datum pristupa 20. studeni 2023.)
25. P. Arajujo, *J. Chromatogr.* **877** (2009) 2224-2234
26. S. Braggio, R. J. Barnaby, P. Grossi, M. A. Cugola, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **14** (1996) 375-388.
27. A. M. Rodrigues, C. Antonio, *Methods Mol. Biol.* **1178** (2018) 19-31.
28. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q2b-validation-analytical-procedures-methodology> (datum pristupa 20. studeni 2023.)
29. European Medicine Agency, 2023., *ICH M10 on bioanalytical method validation*, <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline> (datum pristupa 20. studeni 2023.)
30. [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2012\\_07\\_73\\_1709.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2012_07_73_1709.html) (datum pristupa 20. studeni 2023.)



## § 8. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Mislav Kaličanec

Datum rođenja: 06.09.1996.

Mjesto rođenja: Zagreb, Republika Hrvatska

### Obrazovanje

2003–2011 Osnovna škola Antuna Mihanovića, Zagreb

2011–2015 VIII. Gimnazija Tituša Brezovačkog

2015–2021 Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno–matematički fakultet, Zagreb

2021–2023 Diplomsku sveučilišni studij, istraživački smjer, grane: biokemija i analitička kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2021. *Otvoreni dan kemije*, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb