

Validacija HPLC metode za određivanje onečišćenja u kalcij pantotenat aktivnoj supstanci

Ćužić, Anica

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:612515>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Anica Čužić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE ISPITE

Kandidatkinja **Anica Čužić**

Predala je izrađen diplomski rad dana: 24. rujna 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Danijela Ašperger, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Doc. dr. sc. Dragana Vuk, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije
Dr. sc. Kristina Tolić Čop, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije
Izv. prof. dr. sc. Davor Dolar, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 27. rujna 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Anica Čužić

**VALIDACIJA HPLC METODE ZA ODREĐIVANJE ONEČIŠĆENJA U
KALCIJ PANTOTENAT AKTIVNOJ SUPSTANCI**

DIPLOMSKI RAD

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. Red. prof. dr. sc. Danijela Ašperger
2. Doc. dr. sc. Dragana Vuk
3. Dr. sc. Kristina Tolić Čop, v. asis.

Zagreb, rujan 2024.

Ovaj rad izrađen je u *Kontroli kvalitete, Pliva Hrvatska* pod neposrednim mentorstvom dipl. ing. kem. teh. Vedrana Krištafora i dipl. ing. kem. teh. Domagoja Vukčevića.

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Danijeli Ašperger na izdvojenom vremenu i trudu.

Hvala mojim mentorima u Plivi, Domagoju Vukčeviću i Vedranu Krištaforu koji su mi uvelike olakšali proces izrade diplomskog rada, naučili me mnogočemu i bili tu za sva moja pitanja.

Hvala mojim predivnim kolegicama Viki, Kseniji, Martini i Blanki koje su me u zadnje dvije godine naučile svemu što znam o radu u Kontrolni kvalitete, a ponešto i o životu. Hvala svima u Kontrolni koji su mi na bilo koji način pomogli i uljepšali ovaj životni period.

Hvala svim mojim prijateljima i mom Mariju na svojoj ljubavi i podršci.

Na kraju, najveće hvala mojim roditeljima Daliborki i Tomislavu, sestri Mariji i bratu Zvoni koji su me bezuvjetno podržavali i bodrili tijekom cijelog mog studiranja.

Hvala vam što ste vjerovali u mene!

Sažetak

Svrha rada je detaljno opisati postupak validacije za određivanje onečišćenja u aktivnoj supstanci kalcijevog pantotenata. Kalcijev pantotenat je kalcijeva sol vitamina B₅ koja posjeduje antioksidacijska svojstva zbog čega je neophodna za razne metaboličke funkcije, uključujući metabolizam ugljikohidrata, proteina i masnih kiselina. Sudjeluje i u sintezi hemoglobina, kolesterola, lipida. Validacijski postupak proveden je u laboratorijima *Kontrole kvalitete, Pliva Hrvatska* prema internim propisima i pod GMP uvjetima. Sva provedena ispitivanja u skladu su s važećim regulatornim smjernicama, uključujući ICH smjernice i Europsku farmakopeju (*Ph. Eur.*). Kroz eksperimentalni dio rada validirana je *Ph. Eur.* metoda za određivanje onečišćenja u kalcijevom pantotenatu da bi se osiguralo da će predloženi postupak biti uspješno implementiran u laboratorijima *Kontrole kvalitete*. HPLC tehnikom s TUV detektorom ispitani su validacijski parametri selektivnost, osjetljivost, preciznost, točnost, linearnost, robusnost te stabilnost SST otopine i otopine standarda.

Ključne riječi: *validacija, kromatografija, kalcijev pantotenat*

Abstract

The aim of this paper is to describe the validation procedure for impurities determination in Calcium Pantothenate active substance. Calcium Pantothenate is the calcium salt of vitamin B₅ with antioxidant properties which makes it essential for various metabolic functions, including the metabolism of carbohydrates, proteins, and fatty acids. This vitamin is also involved in the synthesis of hemoglobin, cholesterol, lipids... The validation procedure was performed in the *Quality Control* laboratories, *Pliva Hrvatska* according to internal regulations and under GMP conditions. All tests performed are in accordance with current regulatory guidelines, including ICH guidelines and the European Pharmacopoeia (*Ph. Eur.*). Through the experimental part of the thesis, the *Ph. Eur.* procedure for impurities determination of Calcium Pantothenate active substance was validated to ensure that the proposed analytical method will be successfully implemented in *Quality Control* laboratories. The following validation parameters were tested using the HPLC technique with Tunable UV Detector, TUV: selectivity, sensitivity, precision, accuracy, linearity, robustness and stability of standard and SST solution.

Key words: *validation, chromatography, Calcium Pantothenate*

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski dio	2
2.1. Kontrola kvalitete u farmaceutskoj industriji.....	2
2.2. Validacija analitičke metode i validacijski parametri.....	4
2.2.1. Specifičnost i selektivnost metode.....	4
2.2.2. Linearnost metode.....	5
2.2.3. Područje metode	6
2.2.4. Preciznost metode.....	6
2.2.5. Robusnost metode.....	6
2.2.6. Točnost metode.....	7
2.2.7. Granica detekcije i granica kvantifikacije.....	7
2.3. Onečišćenja	8
2.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	10
2.5. Kalcijev pantotemat	13
3. Eksperimentalni dio.....	14
3.1. Instrumenti, kemikalije i referentni materijal.....	14
3.2. Kromatografski parametri.....	15
3.3. Priprema otopina za analizu	16
3.4. Priprema kromatografskog sustava	18
3.5. Priprema otopina za validaciju analitičke metode.....	19
3.5.1. Selektivnost	19
3.5.2. Osjetljivost (donja granica kvantifikacije – LOQ)	19
3.5.3. Preciznost (ponovljivost)	20

3.5.4.	Stabilnost otopina	20
3.5.5.	Točnost.....	20
3.5.5.1.	Priprema temeljne standardne otopine	20
3.5.5.2.	Priprema kontrolnih otopina	20
3.5.6.	Linearnost.....	21
3.5.6.1.	Priprema otopina za provjeru linearnosti metode za standard kalcijevog pantotenata 21	
3.5.6.2.	Priprema otopina za provjeru linearnosti metode za onečišćenje C	22
3.5.7.	Područje.....	23
3.5.8.	Robusnost	23
4.	Rezultati i rasprava	24
4.1.	Selektivnost	24
4.2.	Osjetljivost	29
4.3.	Linearnost.....	30
4.4.	Točnost.....	33
4.5.	Preciznost	35
4.6.	Robusnost ili otpornost	36
4.7.	Stabilnost.....	42
5.	Zaključak	44
	Popis slika.....	45
	Popis tablica.....	46
	Bibliografija.....	47

1. Uvod

U farmaceutskoj industriji kvaliteta proizvoda od izuzetne je važnosti, jer osiguravanje sigurnosti i učinkovitosti lijekova izravno utječe na zdravlje i dobrobit pacijenata. S obzirom na složenost proizvodnih procesa i stroge regulatorne zahtjeve, važno je implementirati validirane analitičke metode kako bi se zajamčila kvaliteta proizvoda. Validacija metoda ključni je proces u ovom kontekstu, jer potvrđuje da analitička metoda pruža točne, pouzdane i ponovljive rezultate u skladu s definiranim standardima.

Jedan od važnih aspekata kontrole kvalitete u farmaceutskoj industriji jest praćenje onečišćenja u aktivnim farmaceutskim tvarima. Onečišćenja mogu negativno utjecati na učinkovitost, stabilnost i sigurnost lijekova, zbog čega se posebna pažnja posvećuje razvoju i validaciji metoda za njihovo otkrivanje i kvantifikaciju. U ovom radu, fokus će biti stavljen na validaciju metode za određivanje onečišćenja u kalcijevom pantotenatu, kalcijevoj soli vitamina B₅, koja igra važnu ulogu u brojnim metaboličkim procesima u tijelu. Kalcijev pantotemat ima široku primjenu u farmaceutskoj industriji, a zbog svojih antioksidativnih svojstava i uloge u metabolizmu ugljikohidrata, proteina i masnih kiselina, njegova čistoća mora biti strogo kontrolirana.

Postupak validacije metode u ovom radu proveden je u laboratoriju za kontrolu kvalitete u Plivi prema važećim regulatornim smjernicama, uključujući ICH smjernice i Europsku farmakopeju. Cilj je bio osigurati da predložena metoda zadovoljava sve kriterije potrebne za pouzdano određivanje onečišćenja u kalcijevom pantotenatu te da se može uspješno implementirati u redovite analize. Validacija je provedena HPLC tehnikom s TUV detektorom, a ispitani su ključni validacijski parametri, kao što su selektivnost, osjetljivost, preciznost, točnost, linearnost, robusnost te stabilnost uzoraka i standardnih otopina. Osim što osigurava da će metoda pružiti točne rezultate, validacija je nužna kako bi se zadovoljili zahtjevi regulatornih tijela koja nadziru proizvodnju i kontrolu farmaceutskih proizvoda. Primjena rigoroznih postupaka validacije i praćenja kvalitete osigurava da farmaceutski proizvodi na tržištu zadovolje najviše standarde sigurnosti i učinkovitosti te pomaže u zaštiti pacijenata od potencijalnih rizika povezanih s prisutnošću onečišćenja.

2. Teorijski dio

2.1. Kontrola kvalitete u farmaceutskoj industriji

Kontrola kvalitete (**eng.** *Quality control*) odnosi se na proces ili skup aktivnosti koje se koriste kako bi se osiguralo da proizvodi ili usluge zadovoljavaju određene standarde kvalitete. Cilj kontrole kvalitete je identifikacija i uklanjanje pogrešaka ili odstupanja od standarda kako bi se osigurala dosljednost kvalitete proizvoda i zadovoljstvo kupaca. Kontrola kvalitete podrazumijeva korištenje različitih metoda, kao što su inspekcije, testiranja, statističke analize i upotreba raznih tehnika za poboljšanje procesa koji se koriste. Proces kontroliranja kvalitete može biti proaktivan, gdje se pokušavaju spriječiti pogreške prije nego što se pojave (preventivna kontrola kvalitete), ili reaktivan, gdje se pogreške identificiraju i ispravljaju nakon što se pojave (korektivna kontrola kvalitete). [1] [2]

Kvaliteta u farmaceutskoj industriji danas je izuzetno važna tema. Otkako su se predstavnici zemalja okupili radi usklađivanja zakona, praksi i smjernica, svijest o značaju kvalitete farmaceutskih proizvoda kontinuirano raste, što se ogleda kroz definiranje preciznih definicija koje jasno opisuju kakva bi kvaliteta lijekova trebala biti. Međunarodna konferencija o usklađivanju tehničkih zahtjeva za lijekove (**eng.** *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, ICH) predstavlja poseban projekt koji okuplja regulatorna tijela iz Europe, Japana i Sjedinjenih Američkih Država, kao i ostale stručnjake iz farmaceutske industrije čiji je cilj raspravljati o znanstvenim i tehničkim aspektima registracije proizvoda. FDA (**eng.** *U.S. Food and Drug Administration* – Američka agencija za hranu i lijekove) ovlaštena je agencija za provođenje inspekcijskih nadzora i ocjenjivanje validacijskih procesa koje provode proizvođači. FDA provodi propise pod nazivom cGMP (**eng.** *Current Good Manufacturing Practice* – Trenutna dobra proizvođačka praksa) za validaciju farmaceutske proizvodnje koji osiguravaju da svi proizvodi posjeduju predviđena im svojstva, već prema zahtjevima. [3]

Kasnih osamdesetih godina 20. stoljeća, FDA je donošenjem zakona o hrani, lijekovima i kozmetici 1938. godine (**eng.** *The Federal Food, Drug, and Cosmetic Act*) kao zakonske standarde za usklađenost službeno priznala specifikacije i smjernice za validaciju metoda koje su navedene

u trenutnom izdanju Farmakopeje Sjedinjenih Američkih Država (**eng.** *The United States Pharmacopeia*, USP). Kasnije su smjernice ažurirane kako bi se uskladile sa standardima ICH-a, čime se sve više premošćuju razlike u regulatornim zahtjevima diljem svijeta. Dvije primarne smjernice za bilo koji proces validacije metode su USP poglavlje 1225: *Validation of compendial procedures* i ICH smjernica: *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*. Osim navedenih organizacija i pripadajućih smjernica, važno je u ovom kontekstu spomenuti Međunarodnu organizaciju za standardizaciju (**eng.** *The International Organization for Standardization*, ISO) i normu ISO 9000 koja govori o temeljnim načelima, zahtjevima i uputama za upravljanje kvalitetom. [4]

Međusobno usklađivanje zakona, normi, propisa i smjernica svih ovih organizacija na svjetskoj razini ima za cilj učinkovitije korištenje ljudskih, životinjskih i materijalnih resursa, eliminiranje nepotrebnih kašnjenja u globalnom razvoju i dostupnosti novih lijekova, uz istovremeno osiguravanje standarda kvalitete, sigurnosti i učinkovitosti. [5]

2.2. Validacija analitičke metode i validacijski parametri

Validacija analitičke metode postupak je čijim je provođenjem cilj osigurati pouzdanost i točnost analitičkih podataka. Jednostavnije rečeno, validacijom se dokazuje da metoda koja se ispituje služi svrsi koju joj se dodjeljuje. Tijekom validacije definiraju se postupci i provode ispitivanja u svrhu prikupljanja dokaza o valjanosti metode. [4] Različite metode validiraju se na različite načine, ovisno o tome radi li se o kvalitativnoj ili kvantitativnoj metodi, te o tome je li cilj metode odrediti glavni analit u uzorku ili tragove analita u složenoj matrici. Stoga se svakoj metodi pristupa na drugačiji način. [6]

Nekoliko je osnovnih parametara, odnosno izvedbenih značajki validacije, a u eksperimentalnom dijelu ovoga rada validacija se provela sa sljedećim parametrima:

- Selektivnost,
- Osjetljivost,
- Linearnost,
- Radno područje,
- Preciznost,
- Točnost,
- Robusnost ili otpornost metode,
- Stabilnost ili postojanost. [6]

Validacijski protokol za HPLC metodu napravljen je prema *Eur. Ph. 11.5 (eng. European Pharmacopoeia)* za određivanje onečišćenja kalcijevog pantotenata.

2.2.1. Specifičnost i selektivnost metode

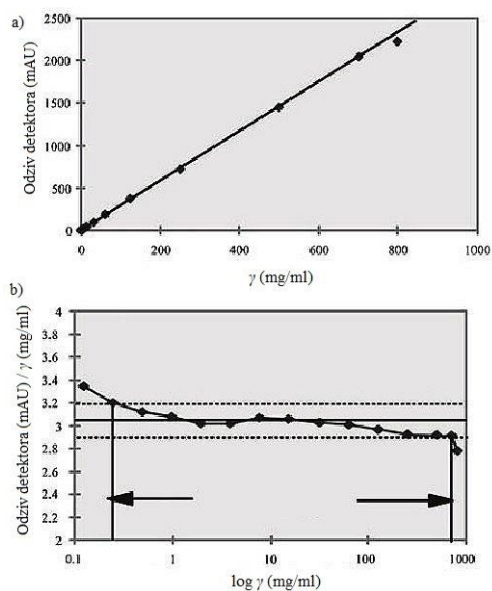
Specifičnost i selektivnost metode često se zajedno spominju kao ključni parametri u validaciji, a odnose se na sposobnost metode da točno i specifično identificira analit unutar uzorka u kojem su prisutne i druge komponente. Postoji razlika između ta dva pojma: specifičnost se odnosi na određivanje samo jednog, točno određenog analita, a selektivnost omogućuje istodobno određivanje više komponenti, uz uvjet da komponente međusobno ne utječu jedna na drugu tijekom analize. Prilikom ispitivanja specifičnosti i selektivnosti, uspoređuje se odziv metode na referentni materijal i uzorak, pri čemu su važni parametri simetrija i razdvojenost kromatografskih

vrhova, odnosno, krivulja (rezolucija ili razlučivost). [6] Referentni materijal odnosi se na uzorke određenih svojstava kojima je deklarirana vrijednost oslobođena sustavne pogreške. [7]

2.2.2. Linearnost metode

Linearnost se definira kao sposobnost metode da unutar određenog područja daje rezultate ispitivanja koji su proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. [4] Određuje se mjerenjem odziva metode na različite poznate koncentracije referentnog materijala, pri čemu se preporučuje koristiti otopine na barem pet različitih koncentracijskih razina uz tri ponavljanja. Linearnost se procjenjuje matematički i grafički. Matematičkim pristupom koristeći metodu linearne regresije odredi se jednadžba pravca općeg oblika $y = ax + b$. Nagib pravca a govori o osjetljivosti metode, a odsječak pravca b može ukazati na postojanje sustavne pogreške. Dva su načina grafičkog prikaza linearnosti metode:

- Ovisnost odziva detektora o koncentraciji ili logaritmu koncentracije analita – dobije se regresijski pravac oko kojeg su rezultati jednoliko raspoređeni s gornje i donje strane pravca (**Slika 1. a**)
- Ovisnost relativnog signala (omjer odziva detektora i koncentracije analita) o logaritmu koncentracije analita – u idealnim slučajevima, dobije se vodoravna linija u linearnom području (**Slika 1. b**) [6]



Slika 1. Grafički prikaz određivanja linearnosti metode [8]

2.2.3. Područje metode

Područje metode odnosi se na raspon između gornje i donje granice koncentracije analita u uzorku (uključujući te granice) koje se mogu kvantificirati uz zadovoljavajuću preciznost, istinitost i linearnost. Nije potrebno provoditi posebne eksperimente za određivanje ovog parametra, jer se zaključci izvode iz rezultata ispitivanja linearnosti. [6] Za određivanje onečišćenja ICH predlaže područje od granice kvantifikacije onečišćenja do 120 % razine specifikacije (koncentracije uzorka). [9]

2.2.4. Preciznost metode

Preciznost se definira kao stupanj podudarnosti između niza mjerenja provedenih na istom homogenom uzorku pod određenim uvjetima. [4] Ako se govori o preciznosti pod uvjetima ponovljivosti (**eng.** *repeatability*), mjerenja unutar kratkog vremenskog razdoblja obavlja isti analitičar u istom laboratoriju koristeći istu laboratorijsku opremu. S druge strane, ako se govori o međupreciznosti (**eng.** *intermediate precision*), mjerenja se provode tijekom duljeg razdoblja, pri čemu dolazi do promjene uvjeta provođenja analize (različiti instrumenti, analitičari, reagensi od različitih dobavljača i sl.). Preciznost pod uvjetima obnovljivosti (**eng.** *reproducibility*) podrazumijeva provođenje mjerenja u različitim laboratorijima i češće se koristi pri normiranju metode nego za validaciju. Mjerenja preciznosti metode se provode na nekoliko koncentracijskih razina koje odgovaraju području linearnosti, obično uz tri ponavljanja, a rezultati mogu pokazati prisutnost slučajne pogreške metode, što se najčešće izražava standardnom devijacijom. [6]

2.2.5. Robusnost metode

Robusnost ili otpornost metode se definira kao otpornost analitičkog postupka na male, namjerne promjene radnih uvjeta metode te utjecaj tih promjena na rezultate analize. Ovaj korak je ključan u razvoju metode jer pomaže u određivanju optimalnih uvjeta te upućuje na parametre koje treba nadzirati. Tijekom eksperimenata mijenjaju se radni uvjeti unutar stvarnih granica i prati se kvantitativna promjena rezultata. Kod tekućinske kromatografije, ispituju se utjecaji sastava i pH-vrijednost pokretne faze, protoka, temperature kolone i slično. Uvjeti čije promjene utječu na rezultat trebaju biti pod nadzorom i jasno navedeni u opisu metode. [6]

Provjera prikladnosti sustava (**eng.** *system suitability testing*, SST) sastavni je dio svakodnevnih kromatografskih ispitivanja. Testovima provjere prikladnosti sustava provjerava se

zadovoljavaju li parametri kromatografskog sustava, primjerice, razlučivost i ponovljivost, postavljene zahtjeve za analizu koja će se provesti. [4] [9] Upravo na temelju podataka o robusnosti, postavljaju se parametri za ispitivanje prikladnosti sustava. [6] Promjene radnih uvjeta trebaju biti simetrične oko nominalne vrijednosti ili vrijednosti određene metodom tako da se stvori interval koji će uključivati promjene do kojih će potencijalno doći prilikom implementacije ili prijenosa metode. Glavna prednost ispitivanja robusnosti metode je ta da se vrijednosti parametara mogu kasnije mijenjati unutar područja određenog ispitivanjem robusnosti kako bi zadovoljili uvjete prikladnosti sustava za analizu, bez potrebe za ponovnom validacijom metode. [4]

2.2.6. Točnost metode

Točnost je mjera blizine slaganja između prihvaćene referentne vrijednosti i vrijednosti dobivenih analizom uzorka. Kod lijekova, točnost se utvrđuje usporedbom rezultata analize uzoraka s rezultatima analize standardnog referentnog materijala ili usporedbom s drugom okarakteriziranom metodom. Što se tiče kvantifikacije onečišćenja, točnost se utvrđuje analizom uzoraka s poznatim količinama onečišćenja. [4] ICH predlaže da se točnost procijeni korištenjem najmanje devet određivanja na najmanje tri razine koje pokrivaju raspon metode (npr. tri koncentracije s tri ponavljanja pripreme uzorka). [9]

2.2.7. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Donja granica detekcije (**eng.** *limit of detection*, LOD) definira se kao najmanja koncentracija analita u uzorku koja se može detektirati, ali ne nužno i kvantificirati. Donja granica kvantifikacije (**eng.** *limit of quantification*, LOQ) definira se kao najmanja koncentracija analita u uzorku koja se može kvantificirati uz prihvatljivu preciznost i točnost pod točno određenim uvjetima propisanim metodom. [4] Obje granice određuju se razrjeđivanjem osnovne otopine, a procjenjuju vizualno, na temelju omjera signala i šuma (**eng.** *signal-to-noise*, S/N) te na temelju standardne devijacije odziva i nagiba kalibracijske krivulje. [9] Parametar granice kvantifikacije posebno je važan za metode određivanja analita u tragovima, koji čak i u niskim koncentracijama mogu biti štetni za ljudsko zdravlje i okoliš. [6]

2.3. Onečišćenja

Prema ICH-u, onečišćenje je svaki sastojak ljekovite tvari koji nema definiran kemijski entitet kao ljekovita tvar [10], odnosno, svaki sastojak farmaceutskog proizvoda koji nije ljekovita ili pomoćna tvar u proizvodu. [11] Onečišćenja u lijekovima su neželjene (i potencijalno za zdravlje opasne) tvari u aktivnoj farmaceutskoj tvari koje uglavnom zaostaju iz procesa proizvodnje, nastaju tijekom izrade lijeka te skladištenjem gotovog proizvoda ili same djelatne tvari. Zahtjevi kvalitete proizvoda definiraju prihvatljive granice za onečišćenja dopuštena unutar roka valjanosti lijeka. [12]

Onečišćenja se mogu grubo podijeliti na tri vrste: organska i anorganska onečišćenja te ostatna otapala. Organska onečišćenja mogu nastati tijekom procesa proizvodnje ili skladištenja lijekova, te mogu, ali ne moraju, biti specificirana i identificirana. Najčešće uključuju polazne materijale, nusprodukte, međuprodukte, produkte degradacije, reagense, katalizatore i sl. Anorganska onečišćenja također nastaju tijekom procesa proizvodnje, ali za razliku od organskih, anorganska su uvijek poznata, odnosno, identificirana te mogu uključivati reagense, ligande, katalizatore, anorganske soli, teške metale itd. [10] Ostatna otapala su zaostale, hlapljive organske kemijske tvari koje se koriste ili nastaju tijekom proizvodnje lijeka. ICH smjernice propisuju granice za otapala koja smiju zaostati u ljekovitim i pomoćnim tvarima nakon proizvodnje, a te granice ovise o toksičnosti otapala, načinu primjene i dozama lijeka. [13]

Svakom onečišćenju prisutnom u lijeku na razini većoj od identifikacijskog praga treba opisati strukturu, a svaki produkt razgradnje primijećen u ispitivanjima stabilnosti pri preporučenim uvjetima skladištenja iznad identifikacijskog praga treba identificirati. [10] Prema ICH smjericama u specifikacijama lijeka treba navesti sljedeća onečišćenja:

1. svako poznato i nepoznato organsko onečišćenje,
2. svako nepoznato organsko onečišćenje u količini iznad postavljenog praga identifikacije,
3. ukupna organska onečišćenja,
4. anorganska onečišćenja,
5. ostatna otapala.

Razlika između identificiranih i neidentificiranih onečišćenja sastoji se u tome da identificirana imaju karakteriziranu kemijsku strukturu, dok se neidentificirana prepoznaju samo po kvalitativnim svojstvima (npr. vrijeme zadržavanja). [12]

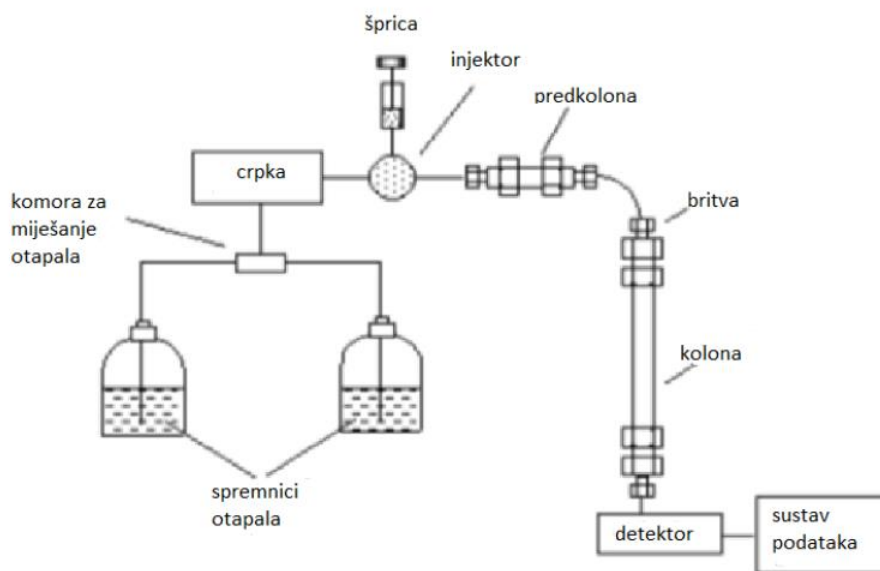
U smjesi ljevakovite tvari, onečišćenja se odvajaju separacijskim tehnikama kao što su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (**eng.** *high performance liquid chromatography* – HPLC), tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (**eng.** *ultra high performance liquid chromatography* – UHPLC), plinska kromatografija (**eng.** *gas chromatography* – GC), kapilarna elektroforeza (**eng.** *capillary electrophoresis* – CE) i dr., a za određivanje strukture onečišćenja s navedenim separacijskim kombiniraju se spektroskopske tehnike. Neke od najčešćih kombinacija su tekućinska kromatografija – spektrometrija masa (LC–MS), tekućinska kromatografija – nuklearna magnetska rezonantna spektrometrija (LC–NMR), plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC–MS) i sl. [12]

2.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Kromatografija je vrlo raširena tehnika koja služi separaciji, identifikaciji i određivanju pojedinačnih komponenti neke smjese. Svaki kromatografski sustav sadrži pokretnu (mobilnu) i nepokretnu (stacionarnu) fazu. Pokretna faza nosi komponente smjese kroz nepokretnu fazu, a separacija se temelji na razlikama u brzini kojom komponente prolaze kroz nepokretnu fazu, odnosno, na razlikama u zadržavanju pojedinih komponenti. Vrijeme zadržavanja prvotno ovisi o prirodi tvari koja se analizira, a zatim o nepokretnoj fazi i sastavu pokretne faze. Vrijeme u kojem tvar eluira naziva se retencijsko vrijeme ili vrijeme zadržavanja i karakteristično je za određenu tvar. S obzirom na agregatno stanje pokretne faze, razlikuju se tekućinska i plinska kromatografija. [14]

Nakon separacije, kao rezultat dobije se grafički prikaz koncentracijskog ili masenog profila ispitivanog sastojka koji se naziva kromatogramom. [15] Kromatogram služi za identifikaciju komponenti uzorka preko vremena zadržavanja maksimuma vrha krivulje (kvalitativna analiza) te za računanje količine komponente uzorka integriranjem površine ispod kromatografske krivulje (kvantitativna analiza). [16]

Tipični HPLC instrument sastoji se od spremnika za otapala pokretne faze, pumpe, injektora, detektora i kolone (**Slika 2.**).



Slika 2. Dijelovi tipičnog HPLC instrumenta [17]

Otapala koja se koriste kao pokretna faza moraju imati visok stupanj čistoće, te moraju biti bez suspendiranih čestica i otopljenih plinova. Dva su načina eluiranja: izokratno, kad sastav pokretne faze ostaje konstantan, te gradijentno, kad se sastav pokretne faze mijenja tijekom separacije, čime se omogućuje bolje odjeljivanje komponenti smjese i skraćuje vrijeme eluiranja. Degazer obavlja funkciju uklanjanja mjehurića plinova, a pumpa pod visokim tlakom tjera pokretnu fazu kroz sustav konstantnim protokom i miješa otapala u zadanom omjeru ukoliko se radi o gradijentnom načinu eluiranja. [14]

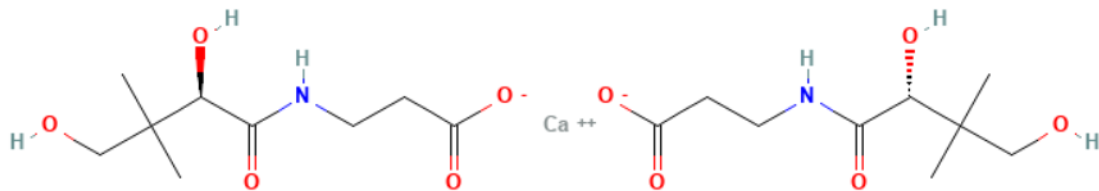
Kolone za HPLC obično su ravne i izrađene od nehrđajućeg čelika, rjeđe od stakla i polimera, poput poli(eter-eter-ketona) (PEEK). Kolone mogu imati duljinu od 5 do 25 cm i unutarnji promjer od 3 do 5 mm, a punjene su česticama (najčešće silika gela) promjera 3 ili 5 μm . Najčešće se koriste kolone duljine 10-15 cm unutarnjeg promjera 4,6 mm i napunjene česticama promjera 5 μm . U kontekstu korištenja kolone u HPLC sustavu, važan parametar je rezolucija (razlučivost), kvantitativna mjera sposobnosti kolone da razdvoji analit A od analita B. [14]

Najrašireniji detektori za tekućinsku kromatografiju temelje se na apsorpciji ultraljubičastog ili vidljivog zračenja i daju kromatograme u obliku ovisnosti apsorbancije o vremenu, a neki od njih su:

- a) UV detektor – najjednostavniji detektor koji mjeri samo jednu valnu duljinu,
- b) VWD (**eng.** *variable wavelength detector*) – u odnosu na jednostavni UV detektor, VWD dopušta mjerenje na više valnih duljina,
- c) DAD/PDA (**eng.** *diode array detector/photodiode detector*) – mjere cijeli spektar (apsorpciju svjetla na valnim duljinama od 200 do 400 nm) istovremeno, [18]
- d) TUV (**eng.** *tunable ultraviolet/visible detector*) – šum i pomak odziva su manji u odnosu na DAD/PDA detektor, pa je osjetljivost TUV-a bolja. [19]

2.5. Kalcijev pantotenat

Pantotenska kiselina (vitamin B₅) spada u kategoriju vitamina B i često se može pronaći kao dodatak za prehranu, te u životinjskim organizmima i biljkama s obzirom da je nužna za sintezu i degradaciju proteina, ugljikohidrata i masti. Pantotenska kiselina je spoj nastao kombinacijom pantoinske kiseline i aminokiseline β-alanina. [20] U dodacima za prehranu i životinjskoj hrani nalazi se u obliku kalcijevog pantotenata jer je kemijski stabilniji od drugih oblika, kao što je pantotenska kiselina i natrijev pantotenat. [21] Pantotenat je u vodi topljivi vitamin kojeg je otkrio Roger J. Williams 1919. godine, a može se pronaći u gotovo svakoj vrsti hrane. U većim količinama nalazi se u jajima, mesu, avokadu, jogurtu, a može se pronaći i u proizvodima za njegu kose i kože. [22]



Slika 3. Struktura kalcijevog pantotenata [23]

3. Eksperimentalni dio

3.1. Instrumenti, kemikalije i referentni materijal

U eksperimentalnom dijelu korišteni su sljedeći instrumenti i oprema:

- Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti koji sadrži pumpu, injektor, detektor, grijač kolone i vakuumski degazer,
- Kolona: oktadecilsilil silika-gel za kromatografiju (punilo), dimenzija 150 mm × 3,0 mm, 3,5 μm (Waters X Select HSS C18, 150 mm × 3,0 mm, 3,5 μm ili ekvivalent),
- Vaga, 0,01 g,
- Vaga, 0,01 mg,
- Vaga, 0,0001 mg,
- Uređaj za pročišćavanje vode,
- Ultrazvučna kupelj,
- pH-metar.

U eksperimentalnom dijelu korištene su sljedeće kemikalije i reagensi:

- Natrijev dihidrogenfosfat monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, *pro analysi*), proizvođač: Supelco,
- Acetonitril ($\geq 99,9\%$), proizvođač: J. T. Baker,
- Fosforna kiselina (85 %), proizvođač: Kemika i/ili Supelco,
- Visoko pročišćena voda (VPV).

U eksperimentalnom dijelu korišten je sljedeći referentni materijal (standardi):

- *Kalcijev pantotenat*, proizvođač: Pliva RS (radni standard), sadržaj: 95,5 %,
- *Pantotenat za identifikaciju* (sadrži onečišćenja B, E i H), proizvođač: EP, sadržaj: 99,9 %,
- *D-(-)-Pantolakton* (Onečišćenje C), proizvođač: trc Canada, sadržaj: 97,0 %,
- *(R)-Pantoic Acid Sodium Salt* (Onečišćenje B), proizvođač: trc Canada, sadržaj: 98,0 %,
- *Vitamin B5 Imp. 1* (Onečišćenje E), proizvođač: tlc, sadržaj: 99,9 %.

3.2. Kromatografski parametri

Tablica 1. daje podatke o kromatografskim parametrima procesa validacije metode određivanja onečišćenja kalcijevog pantotenata.

Tablica 1. Kromatografski parametri metode određivanja onečišćenja

Protok	1,0 mL/min
Volumen injektiranja	5 µL
Valna duljina detektora	200 nm
Temperatura kolone	35 °C
Temperatura komore za uzorke (eng. <i>autosampler</i>)	Sobna temperatura (oko 25 °C)
Eluiranje	gradijentno

Tablica 2. daje podatke o gradijentnom načinu eluiranja pokretnih faza.

Tablica 2. Tablica gradijentnog eluiranja pokretnih faza

Vrijeme, min	A, %	B, %
0	100	0
6	100	0
21	50	50
30	50	50
30,01	100	0
36	100	0

3.3. Priprema otopina za analizu

Za metodu određivanja onečišćenja kalcijevog pantotenata pripremljene su sljedeće otopine:

a) Otapalo:

Otapalo je visoko pročišćena voda (VPV).

b) Otopina pufera (NaH_2PO_4):

Pripremljena je otopina pufera koncentracije 1,56 g/L pH-vrijednosti 2,50, i to otapanjem 1,56 g NaH_2PO_4 u 1000,0 mL otapala te namještanjem pH-vrijednosti na 2,50 pomoću fosforne kiseline.

c) Pokretna faza A:

Pomiješani su acetonitril i otopina pufera pH-vrijednosti 2,50 u volumnom omjeru 1:99.

d) Pokretna faza B:

Pokretna faza B je acetonitril.

e) Slijepa proba:

Slijepa proba je otapalo (VPV).

f) Otopina za identifikaciju pantotenata (ID otopina):

Otopljeno je 3 mg pantotenata za identifikaciju u 0,5 mL otapala.

g) Otopina uzorka:

Pripremljena je otopina kalcijevog pantotenata koncentracije 6,0 mg/mL na sljedeći način: izvagano je 600,0 mg uzorka kalcijevog pantotenata u tikvicu od 100,0 mL, otopljeno u otapalu u ultrazvučnoj kupelji i tikvica je nadopunjena do oznake otapalom.

h) Otopina standarda kalcijevog pantotenata:

Pripremljena je otopina standarda kalcijevog pantotenata koncentracije 0,006 mg/mL u otapalu. Pripremljene su po dvije otopine standarda radi inicijalne provjere slaganja odziva standarda (**Tablica 3.**)

Primjer *a* (prikladno za analizu jednog uzorka): pipetirano je 2,0 mL otopine uzorka u tikvicu od 20,0 mL i nadopunjeno do oznake otapalom. Pipetirano je 2,0 mL te otopine u tikvicu od 200,0 mL i nadopunjeno do oznake otapalom.

Primjer *b* (prikladno za analizu jednog ili više uzoraka): izvagano je oko 1,200 mg standarda kalcijevog pantotenata u tikvicu od 200,0 mL, dodano oko 150,0 mL otapala i otopljeno u ultrazvučnoj kupelji, te nadopunjeno otapalom do oznake i dobro promućkano.

i) Otopina za provjeru prikladnosti sustava (SST otopina):

Pripremljena je otopina pantolaktone (Onečišćenje C) i standarda kalcijevog pantotenata sljedećih koncentracija: 0,006 mg/mL pantolaktone (Onečišćenje C) i 0,006 mg/mL standarda kalcijevog pantotenata u otapalu. Ta otopina pripremljena je na sljedeći način: otapanjem 3 mg pantolaktone (Onečišćenje C) u 5,0 mL otapala, pipetiranjem 1,0 mL te otopine u tikvicu od 100,0 mL i nadopunjavanjem do oznake otopinom standarda kalcijevog pantotenata.

3.4. Priprema kromatografskog sustava

Prije samog početka ispitivanja, potrebno je provesti provjeru prikladnosti sustava za analizu. Kroz kolonu se prvo pustio protok pokretnih faza u omjeru 50 % A : 50 % B, sve dok nije uspostavljena stabilna bazna linija, nakon čega se uspostavljala ravnoteža sustava propuštajući protok s početnim omjerom gradijenta pokretnih faza (100 % A : 0 % B) oko 6 minuta. Injektirale su se otopine koje služe provjeri prikladnosti sustava: slijepa proba, otopina standarda, te SST i ID otopina. Uvjeti koji se moraju zadovoljiti da bi se sustav proglasio prikladnim za analizu i da bi se ista obavila navedeni su u **Tablici 3**.

Tablica 3. Uvjeti za provjeru prikladnosti kromatografskog sustava za analizu

Otopina	Komponenta	Razlučivost	Faktor simetrije	Inicijalna provjera ¹	RSD ²
SST otopina	Kalcijev pantotenat	NLT ³ 3,0	/	/	/
	Onečišćenje C			90,0 %– 110,0 %	(N ⁴ ≥6) NMT 10,0 %
Standard	Kalcijev pantotenat	/	0,8-1,8	90,0 %– 110,0 %	(N ⁴ ≥6) NMT 10,0 %

¹ Po jedno injektiranje svake otopine standarda

² Relativno standardno odstupanje (**eng.** *relative standard deviation*) izračunato na temelju svih injektiranja (N) otopina standarda kroz analizu

³ Ne manje od (**eng.** *not less than*)

⁴ Broj injektiranja otopine

3.5. Priprema otopina za validaciju analitičke metode

Validacija metode proveda se u skladu s protokolom MVP006982/1, Plivnim trenutno važećim SOP dokumentima (**eng.** *Standard Operating Procedure*), te prema farmakopeji *Eur. Ph.* 11.5 (07/2023:0470). Kako bi se osiguralo da će metoda biti prikladno implementirana u laboratorijima Kontrole kvalitete u Plivi, provedena su ispitivanja za sljedeće validacijske parametre: selektivnost, osjetljivost, preciznost, stabilnost otopine standarda i SST otopine, točnost, linearnost, područje i robusnost. Postavljeni su sljedeći zahtjevi specifikacije za onečišćenja:

γ (uzorka) = 6,0 mg/mL (razina specifikacije)

Onečišćenje B: NMT⁵ 0,80 %,

Onečišćenje C: NMT 0,30 %,

Onečišćenje E: NMT 0,25 %,

Onečišćenje H: NMT 0,15 %,

Nespecificirana onečišćenja (računaju se preko standarda kalcijevog pantotenata): NMT 0,10 %,

Ukupna onečišćenja: NMT 1,20 %.

3.5.1. Selektivnost

Selektivnost se ispitivala proučavanjem kromatograma otopina slijepe probe, otopina standarda, ID i SST otopine te otopina uzorka. Dodatno se selektivnost ispitala cijepljenjem ili špikanjem (**eng.** *spiking*) otopine uzorka svim dostupnim onečišćenjima na razini specifikacije.

3.5.2. Osjetljivost (donja granica kvantifikacije – LOQ)

Donja granica kvantifikacije provjerila se injektiranjem LOQ otopine, što je razrijeđena otopina standarda, zatim injektiranjem otopina svih dostupnih onečišćenja u koncentracijama na pola razine specifikacije, te otopina uzoraka cijepljenih svim dostupnim onečišćenjima, također u koncentracijama na pola razine specifikacije.

⁵ Ne više od (**eng.** *not more than*)

3.5.3. Preciznost (ponovljivost)

Preciznost (ponovljivost) se odredila izvođenjem analize slijedeći propisanu analitičku metodu (Poglavlje 3.3.) na 6 priprema uzoraka za određivanje onečišćenja. Ista analiza ponovila se drugi dan pripremajući nove otopine uzoraka, standarda, SST otopine, pokretne faze i koristeći drugu kromatografsku kolonu (istog proizvođača, tipa i dimenzija, ali različitog serijskog broja). Time se ispitala međupreciznost jer je analiza provedena na različitim kolonama i na različite dane.

3.5.4. Stabilnost otopina

Provjera stabilnosti otopina provela se za otopinu standarda i SST otopinu nakon 7 dana, te za SST otopinu nakon 48 h usporedbom sa svježije pripremljenim otopinama.

3.5.5. Točnost

Kontrolna ispitivanja (**eng.** *recovery study*) izvedena su cijepljenjem uzorka kalcijevog pantotenata temeljnom standardnom otopinom onečišćenja C na tri (3) koncentracijska nivoa, s po tri (3) pripreme za svaki nivo.

3.5.5.1. Priprema temeljne standardne otopine

Za pripremu temeljne standardne otopine (**eng.** *stock solution*, TSO) izvagano je 6,0 mg onečišćenja C u tikvicu od 100 mL. Dodano je otapalo i otapanje se provelo stavljanjem tikvice u ultrazvučnu kupelj. Zatim je tikvica nadopunjena otapalom do oznake i dobro promućkana.

3.5.5.2. Priprema kontrolnih otopina

Izvagan je uzorak kalcijevog pantotenata tri puta za sva tri koncentracijska nivoa, a zatim je provedeno cijepljenje uzoraka zadanim volumenom TSO prema **Tablici 4**. Nakon cijepljenja, tikvice su nadopunjene otapalom do oznake.

Pripremljene su i dvije kalibracijske otopine na isti način kao i kontrolne otopine na R2 nivou, bez uzorka kalcijevog pantotenata. Kalibracijske otopine služe za usporedbu rezultata kontrolnih otopina.

Tablica 4. Priprema kontrolnih otopina za parametar točnosti

Kontrolna otopina	Masa kalcijevog pantotenata, mg	Volumen TSO, mL	Koncentracija onečišćenja C, mg/mL	Koncentracija kalcijevog pantotenata, mg/mL	Volumen tikvice, mL
R1	300,0	2,5	0,0030	6,0	50,0
R2	300,0	15,0	0,0180	6,0	50,0
R3	150,0	9,0	0,0216	6,0	25,0

3.5.6. Linearnost

Linearnost metode provjerava se za kalcijev pantotenat (nepoznata onečišćenja) i onečišćenje C na pet točaka, od granice kvantifikacije do 250 % granice specifikacije za nepoznata onečišćenja, odnosno, do 120 % granice specifikacije za onečišćenje C. Svaka otopina injektira se po dva puta.

3.5.6.1. Priprema otopina za provjeru linearnosti metode za standard kalcijevog pantotenata

Temeljna standardna otopina (TSO) za standard kalcijevog pantotenata pripremljena je na sljedeći način: Izvagano je oko 6,0 mg standarda kalcijevog pantotenata u tikvicu od 100,0 mL, dodano otapalo i otopljeno u ultrazvučnoj kupelji, a zatim nadopunjeno otapalom do oznake i dobro promućkano.

Prema **Tablici 5** pripremljene su otopine za linearnost pipetiranjem temeljne standardne otopine i nadopunjavanjem otapalom do oznake.

Tablica 5. Priprema otopina za provjeru linearnosti metode za standard kalcijevog pantotenata

Linearnost	~ % razine specifikacije	% u odnosu na koncentraciju uzorka	Koncentracija kalcijevog pantotenata, mg/mL	V (TSO), mL	V (tikvice), mL
L1	50 % (LOQ)	0,05	0,0030	5,0	100,0
L2	60 %	0,06	0,0036	6,0	100,0
L3	80 %	0,08	0,0048	8,0	100,0
L4	100 %	0,10	0,0060	10,0	100,0
L5	250 %	0,25	0,0150	25,0	100,0

3.5.6.2. Priprema otopina za provjeru linearnosti metode za onečišćenje C

Temeljna standardna otopina (TSO) za onečišćenje C pripremljena je na sljedeći način: Izvagano je oko 6,0 mg onečišćenja C u tikvicu od 100,0 mL, dodano otapalo i otopljeno u ultrazvučnoj kupelji, a zatim nadopunjeno otapalom do oznake i dobro promućkano.

Prema **Tablici 6** pripremljene su otopine za linearnost pipetiranjem temeljne standardne otopine i nadopunjavanjem otapalom do oznake.

Tablica 6. Priprema otopina za provjeru linearnosti metode za onečišćenje C

Linearnost	~ % razine specifikacije	% u odnosu na koncentraciju uzorka	Koncentracija onečišćenja C, mg/mL	V (TSO), mL	V (tikvice), mL
L1	16,67 % (1/6)	0,05	0,0030	2,5	50,0
L2	33,33 % (1/3)	0,10	0,0060	5,0	50,0
L3	66,67 % (2/3)	0,20	0,0120	10,0	50,0
L4	100 %	0,30	0,0180	15,0	50,0
L5	120 %	0,36	0,0216	9,0	25,0

Sve otopine za linearnost injektiraju se po dva puta. Kod ispitivanja parametra linearnosti postoji zahtjev za RSD: NMT 10,0 % za kalcijev pantotenat i NMT 10,0 % za onečišćenje C.

3.5.7. Područje

Područje metode definiralo se iz podataka dobivenih ispitivanjima točnosti i linearnosti.

3.5.8. Robusnost

Kod ispitivanja robusnosti metode, ocjenjivao se utjecaj promjene sljedećih kromatografskih parametara:

- Temperatura kolone: $35^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$
- Protok: $1,0 \text{ mL/min} \pm 0,3 \text{ mL/min}$

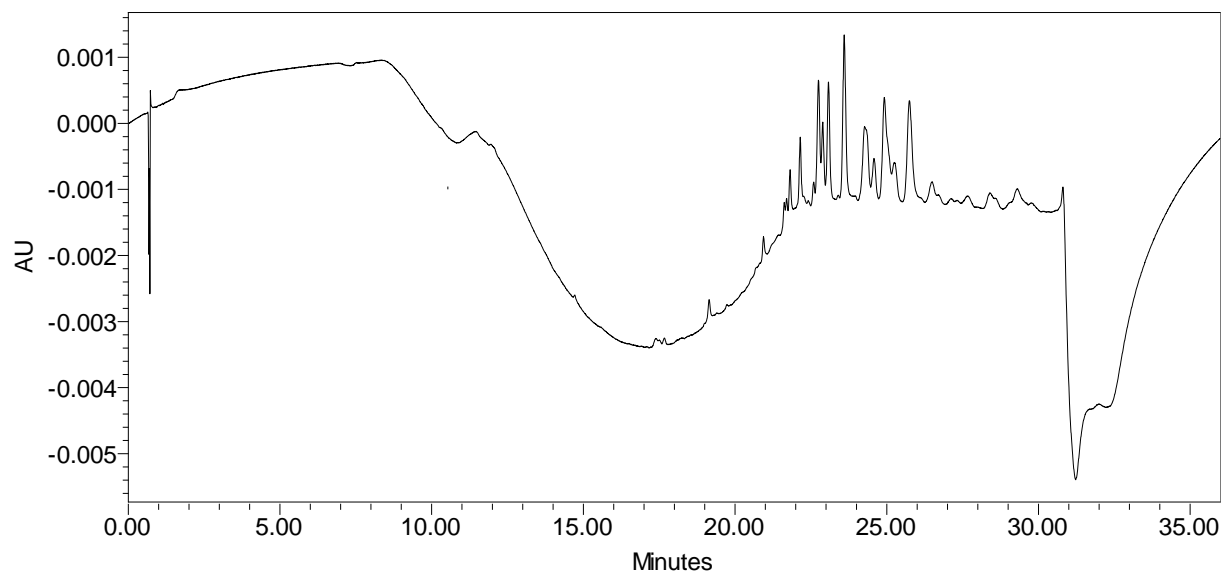
Dakle, provedena su četiri ispitivanja s kromatografskim parametrima iz **Tablice 1**, s promjenom samo jednog parametra. Tako je protok u prvom ispitivanju iznosio 0,7 mL/min, a u drugom 1,3 mL/min. U iduća dva ispitivanja promijenjena je temperatura kolone; u jednom ispitivanju iznosila je 30 °C, a u drugom 40 °C.

4. Rezultati i rasprava

Svi rezultati prikazani su u obliku kromatograma, grafičkog prikaza ovisnosti apsorbancije (AU – *absorbance unit*) o vremenu u minutama. Veći dio kromatograma nalazi se u uvećanom prikazu zbog jasnije slike i jednostavnijeg razmatranja dobivenih rezultata.

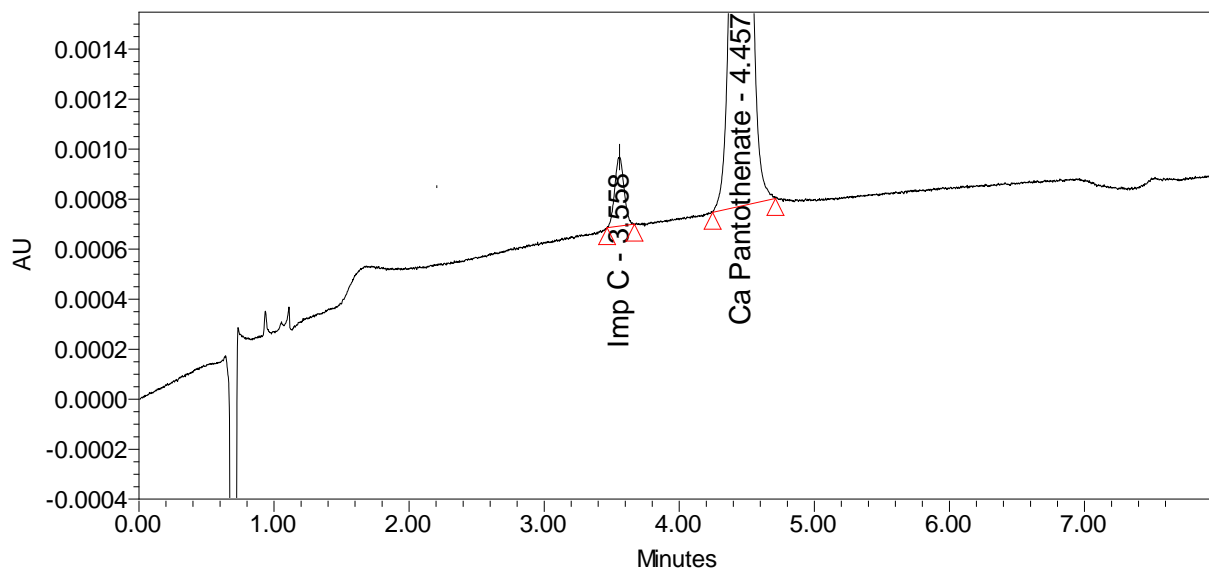
4.1. Selektivnost

Kriterij kojeg moraju zadovoljiti rezultati ispitivanja selektivnosti zahtjeva da su sve kromatografske krivulje kromatograma razdvojene, te da kromatografske krivulje slijepe probe značajno ne utječu na kromatografske krivulje iz otopine standarda i uzorka. Dobiveni kromatogrami prikazani su od **Slike 4** do **Slike 9**.



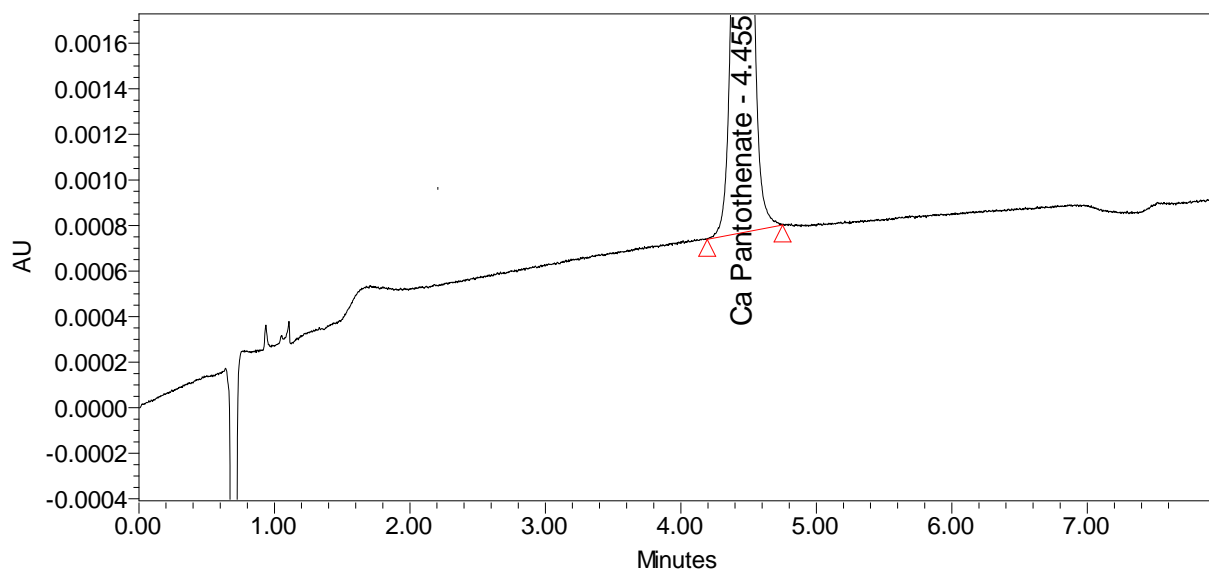
— SampleName: SP Channel Description: ACQUITY TUV ChA 200nm Result Id: 2281

Slika 4. Selektivnost - slijepa proba



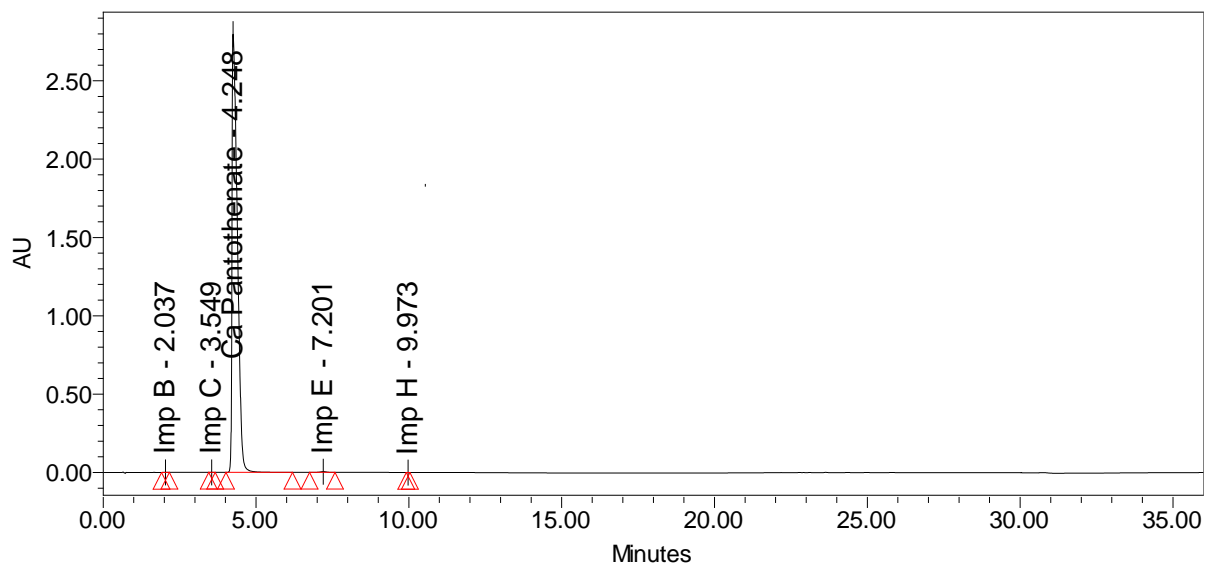
— SampleName: SST Channel Description: ACQUITY TUV ChA 200nm Result Id: 2284

Slika 5. Selektivnost - SST otopina, uvećani prikaz



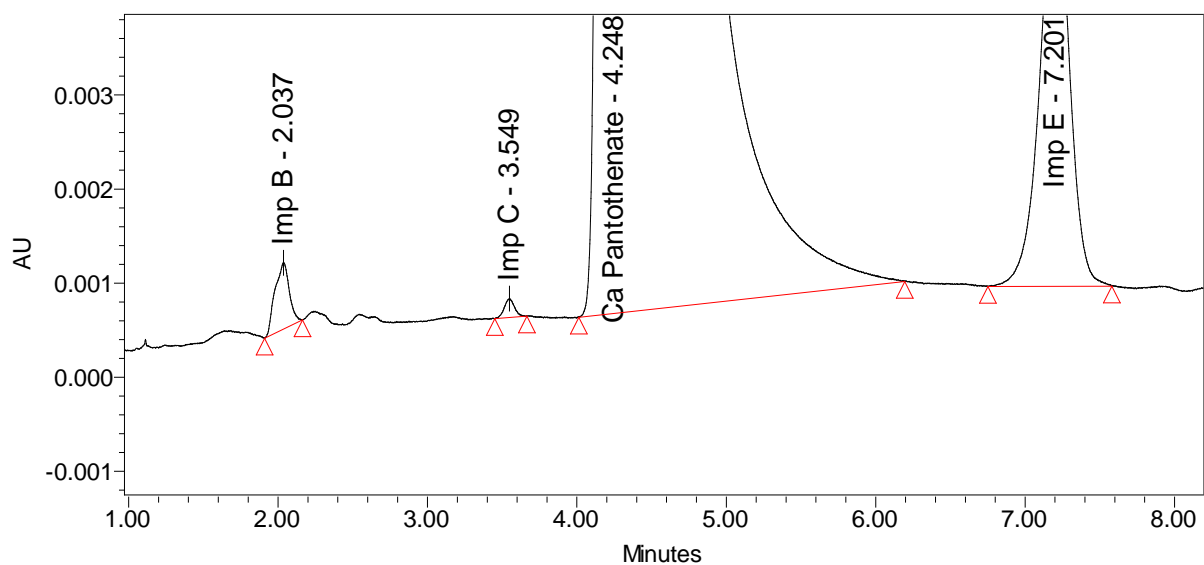
— SampleName: STD Channel Description: ACQUITY TUV ChA 200nm Result Id: 2293

Slika 6. Selektivnost - otopina standarda, uvećani prikaz



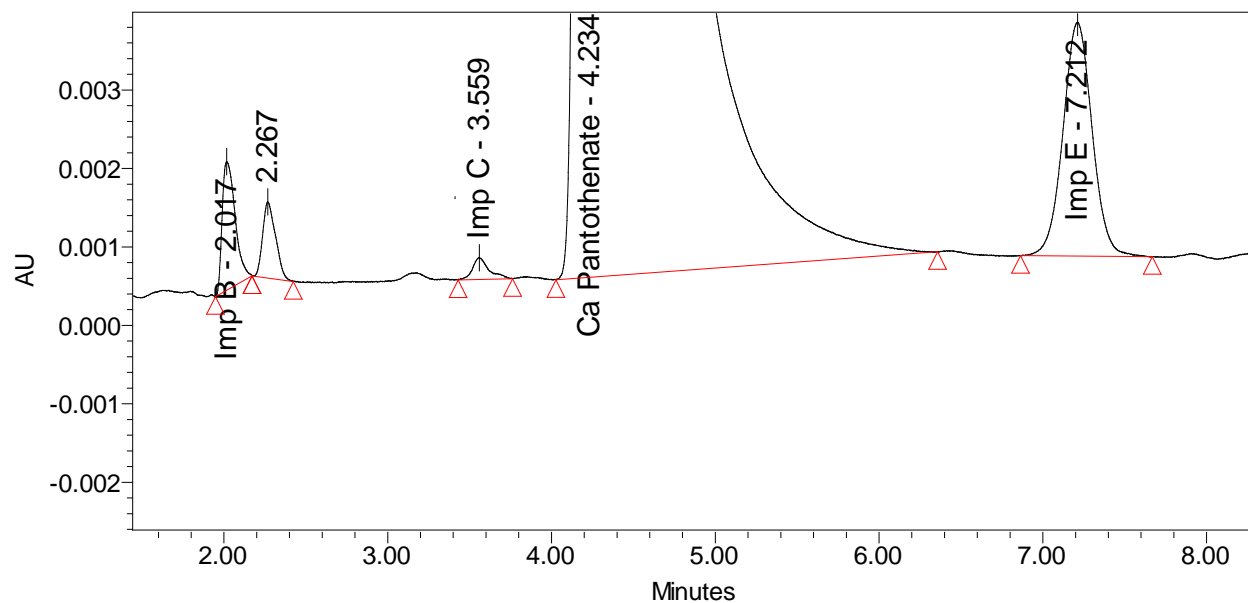
— SampleName: Uzorak Channel Description: ACQUITY TUV ChA 200nm Result Id: 2285

Slika 7. Selektivnost - otopina uzorka, cijeli prikaz



— SampleName: Uzorak Channel Description: ACQUITY TUV ChA 200nm Result Id: 2285

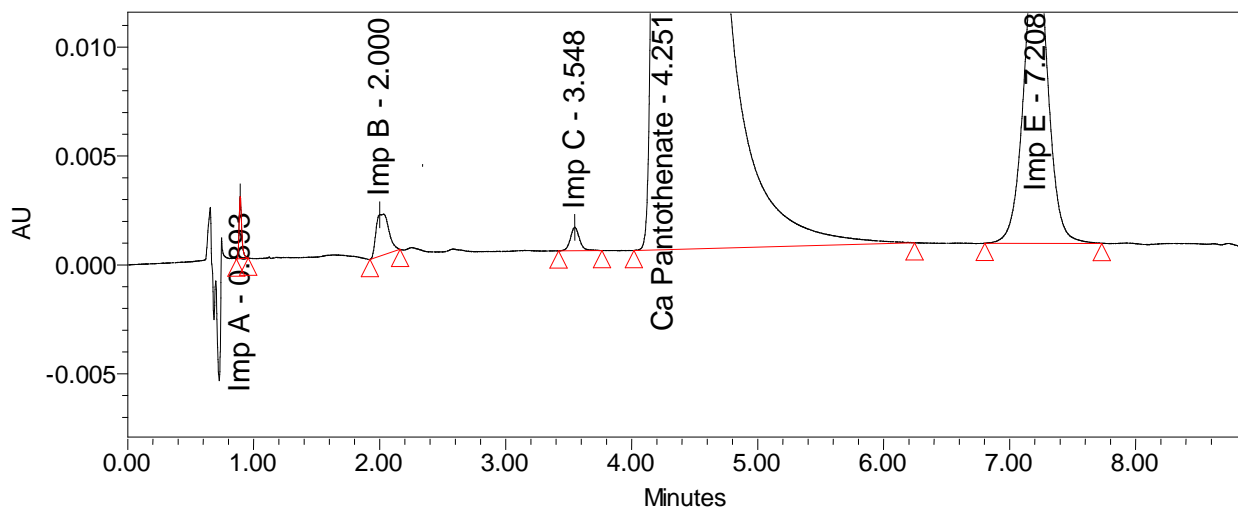
Slika 8. Selektivnost - otopina uzorka, uvećani prikaz



— SampleName: ID Channel Description: ACQUITY TUV ChA 200nm Result Id: 2271

Slika 9. Selektivnost - ID otopina, uvećani prikaz

Osim pomoću prikazanih otopina, selektivnost se dodatno ispitala cijepljenjem ili špikanjem (**eng. spiking**) otopine uzorka svim dostupnim onečišćenjima na razini specifikacije.



SampleName: Uzorak (cijepljen_B_C_E) Channel Description: ACQUITY TUV ChA 200nm
Result Id: 2960

Slika 10. Selektivnost - cijepljena otopina uzorka na razini specifikacije, uvećani prikaz

S obzirom da su zahtjevi za selektivnost ispunjeni, odnosno, sve kromatografske krivulje su dovoljno razdvojene i kromatografske krivulje iz slijepe probe ne utječu značajno na kromatografske krivulje iz otopine standarda i uzorka, može se zaključiti da je metoda selektivna.

4.2. Osjetljivost

Rezultati ispitivanja osjetljivosti moraju zadovoljiti barem jedan od dva uvjeta: da omjer signala i šuma (S/N) za kalcijev pantotemat i sva dostupna onečišćenja nije veći od 10 ili da RSD vrijednost injektiranja nije veća od 25 %. U **Tablici 7 i 8** prikazani su rezultati ispitivanja, na temelju kojih se može zaključiti da je metoda osjetljiva.

Tablica 7. Rezultati ispitivanja osjetljivosti metode

Komponenta	Koncentracija, mg/mL	% u odnosu na koncentraciju uzorka	S/N	Kriterij prihvatanja	Status
Kalcijev pantotemat	0,0030	0,050	137	S/N omjer NLT 10	Prolaz
Onečišćenje C	0,0090	0,150	16		Prolaz
Onečišćenje B	0,0240	0,400	41		Prolaz
Onečišćenje E	0,0075	0,125	198		Prolaz

Tablica 8. Rezultati ispitivanja osjetljivosti cijepljene otopine uzorka

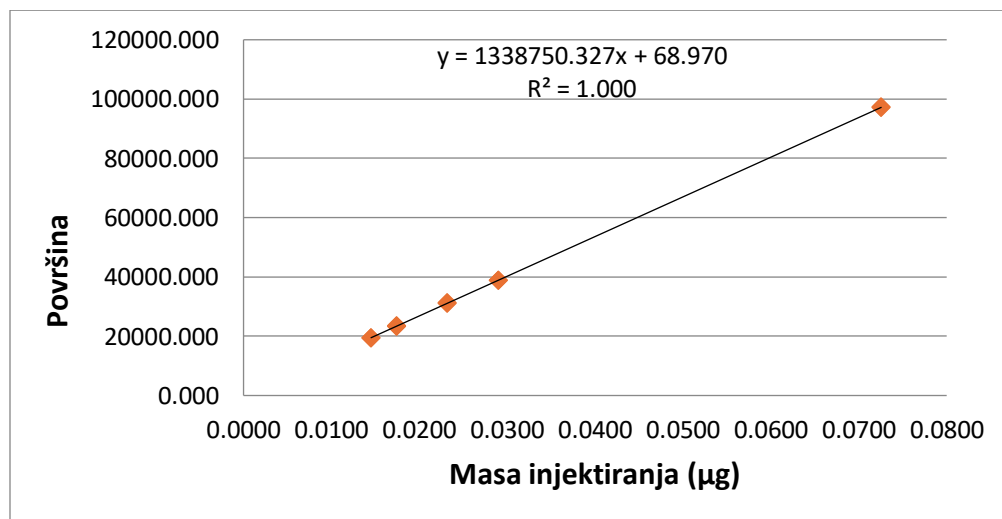
Komponenta	Koncentracija	Kriterij prihvatanja	S/N omjer	Status
Onečišćenje C	~ 0,230 % (~ 0,080 prisutno u uzorku + 0,150 % cijepljeno)	S/N omjer NLT 10	22	Prolaz
Onečišćenje B	~ 0,770 % (~ 0,370 prisutno u uzorku + 0,400 % cijepljeno)		43	Prolaz
Onečišćenje E	~ 0,280 % (~ 0,150 prisutno u uzorku + 0,125 % cijepljeno)		328	Prolaz

4.3. Linearnost

U **Tablici 9** i na **Slici 11** prikazani su rezultati ispitivanja linearnosti metode za kalcijev pantotenat (nepoznata onečišćenja) na pet koncentracijskih nivoa, od granice kvantifikacije (50 %) do 250 % granice specifikacije. U **Tablici 10** i na **Slici 12** prikazani su rezultati ispitivanja linearnosti metode za onečišćenje C, također na pet točaka, od granice kvantifikacije do 120 % granice specifikacije.

Tablica 9. Rezultati ispitivanja linearnosti za nepoznata onečišćenja

Otopina	% razine specifikacije	Koncentracija kalcijevog pantotenata, mg/mL	Površina – prvo injektiranje	Površina – drugo injektiranje	RRF ⁶
L1	50	0,0030	19514,775	19483,948	100,4
L2	60	0,0036	23494,375	23261,130	100,3
L3	80	0,0048	31240,320	31191,421	100,4
L4	100	0,0060	38822,067	38835,752	100,0
L5	250	0,0150	97076,392	97321,677	100,1



Slika 11. Grafički prikaz rezultata ispitivanja linearnosti za nepoznata onečišćenja

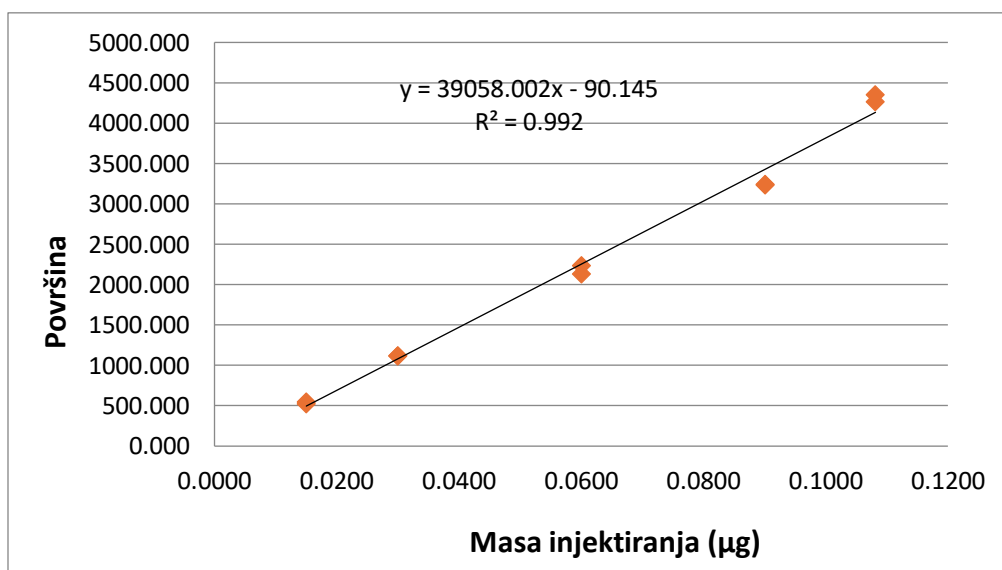
⁶ Eng. *relative response factor* – omjer odziva detektora za ciljani analit i referentnu tvar u istim analitičkim uvjetima. U ovom slučaju, odziv referentne tvari za računanje RRF vrijednosti je odziv otopine L4 (100 % razine specifikacije).

Zahtjevi koje moraju ispunjavati rezultati ispitivanja linearnosti za nepoznata onečišćenja su sljedeći:

- a) RRF u rasponu 80 – 120 % – zadovoljava (raspon rezultata je 100,0 – 100,4 %),
- b) RSD ne veći od 10,0 % – zadovoljava (RSD svih odziva je 0,32 %),
- c) $R^2 \geq 0,99$ – zadovoljava ($R^2 = 1,000$).

Tablica 10. Rezultati ispitivanja linearnosti za nepoznata onečišćenja

Otopina	% razine specifikacije	Koncentracija onečišćenja C, mg/mL	Površina – prvo injektiranje	Površina – drugo injektiranje	RRF
L1	16,67 (1/6)	0,0030	548,410	524,390	91,4
L2	33,33 (1/3)	0,0060	1120,424	1119,876	95,5
L3	66,67 (2/3)	0,0120	2243,268	2136,469	93,3
L4	100	0,0180	3238,702	3244,209	92,1
L5	120	0,0216	4358,673	4265,547	102,1



Slika 12. Grafički prikaz rezultata ispitivanja linearnosti za nepoznata onečišćenja

Zahtjevi koje moraju ispunjavati rezultati ispitivanja linearnosti za onečišćenje C su sljedeći:

- d) RRF u rasponu 80 – 120 % – zadovoljava (raspon rezultata je 91,4 – 102,1 %),
- e) RSD ne veći od 10,0 % – zadovoljava (RSD svih odziva je 4,58 %),
- f) $R^2 \geq 0,99$ – zadovoljava ($R^2 = 0,992$).

Može se zaključiti da je metoda linearna u području od granice kvantifikacije do 250 % razine specifikacije za nepoznata onečišćenja i u području od granice kvantifikacije do 120 % razine specifikacije za onečišćenje C.

4.4. Točnost

Ispitivanja točnosti izvedena su cijepljenjem uzorka kalcijevog pantotenata temeljnom standardnom otopinom onečišćenja C na tri (3) koncentracijska nivoa, s po tri (3) pripreme za svaki nivo. Prije ispitivanja, provedena je provjera prikladnosti sustava, a zahtjevi i rezultati su prikazani u **Tablici 11**.

Tablica 11. Provjera prikladnosti sustava za ispitivanje točnosti metode

Komponenta	Otopina standarda RSD, % NMT 10,0 %	Otopina standarda Faktor simetrije 0,8 – 1,8	SST otopina Razlučivost NLT 3,0
Kalcijev pantotemat	0,6	1,1	5,5
Onečišćenje C	8,2	/	/

U **Tablici 12** prikazani su rezultati ispitivanja točnosti metode.

Tablica 12. Rezultati ispitivanja točnosti metode

Otopina	% u odnosu na koncentraciju uzorka	Dodana koncentracija onečišćenja C, mg/mL	Izračunata koncentracija onečišćenja C, mg/mL	Recovery ⁷ , %	Srednja vrijednost Recovery vrijednosti, %	RSD, %
R1	0,05	0,0029	0,0031	107,9	109,9	3,1
		0,0029	0,0031	108,1		
		0,0029	0,0033	113,9		
R2	0,30	0,0174	0,0191	109,2	109,0	1,2
		0,0174	0,0188	107,6		
		0,0174	0,0192	110,1		
R3	0,36	0,0209	0,0227	108,3	108,1	1,0
		0,0209	0,0228	109,1		
		0,0209	0,0224	106,9		

Može se zaključiti da je metoda točna u području provedenih ispitivanja (0,05 do 0,36 % koncentracije uzorka).

⁷ Udio analita koji je uspješno detektiran u odnosu na poznatu ili očekivanu količinu dodanu ili prisutnu u uzorku. U ovom slučaju, to je omjer izračunate i dodane koncentracije onečišćenja C pomnožen sa 100.

4.5. Preciznost

Preciznost (ponovljivost) se odredila provođenjem analize slijedeći propisanu analitičku metodu (Poglavlje 3.3.) na šest (6) priprema uzorka za određivanje onečišćenja. Otopine uzoraka su cijepljene temeljnim standardnim otopinama dostupnih onečišćenja (onečišćenja B, C i E). Analiza se provodila dva dana na dvije kolone istog proizvođača i dimenzija, ali različitih serijskih brojeva, te se time ispitala međupreciznost (**Tablica 14.**). Prije ispitivanja, oba dana provedena je provjera prikladnosti sustava čiji su zahtjevi i rezultati prikazani u **Tablici 13.**

Tablica 13. Provjera prikladnosti sustava za ispitivanje preciznosti metode

Dan	Komponenta	Otopina standarda RSD, % NMT 10,0 %	Otopina standarda Faktor simetrije 0,8 – 1,8	SST otopina Razlučivost NLT 3,0
Dan 1	Kalcijev pantotenat	0,5	1,2	3,6
	Onečišćenje C	5,8	/	/
Dan 2	Kalcijev pantotenat	0,5	1,1	5,9
	Onečišćenje C	6,7	/	/

Tablica 14. Rezultati ispitivanja preciznosti metode

Onečišćenje	Dan 1 – Kolona 1	Dan 2 – Kolona 2
	21.08.2024.	23.08.2024.
	RSD, %	RSD, %
	NMT 10,0 % (za nepoznata onečišćenja NMT 15,0 %)	NMT 10,0 % (za nepoznata onečišćenja NMT 15,0 %)
Nepoznata onečišćenja	5,7	12,7
Onečišćenje B	1,1	0,4
Onečišćenje C	6,5	1,7
Onečišćenje E	0,2	0,2

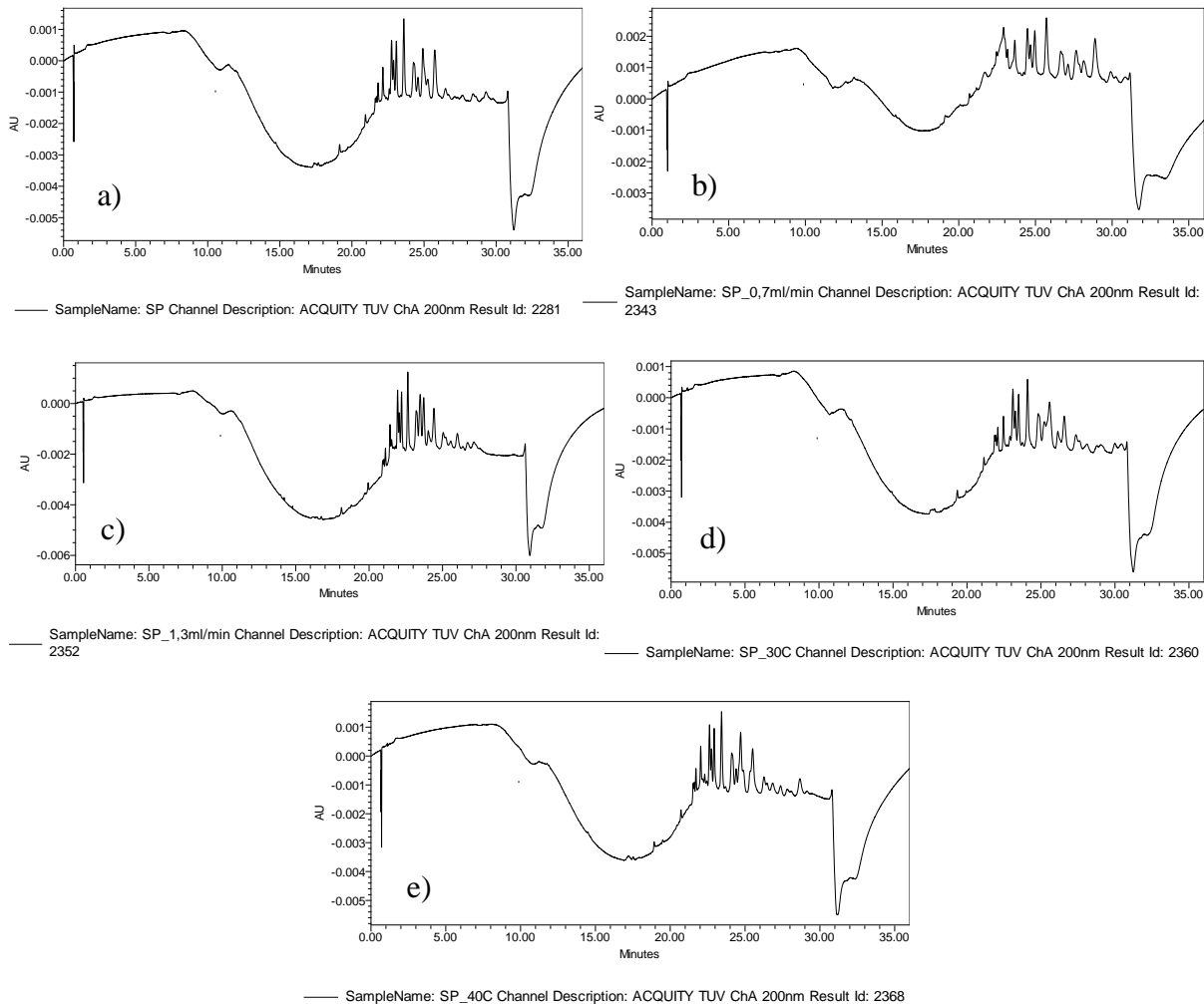
Može se zaključiti da je metoda precizna jer su zadovoljeni uvjeti za RSD vrijednost.

4.6. Robusnost ili otpornost

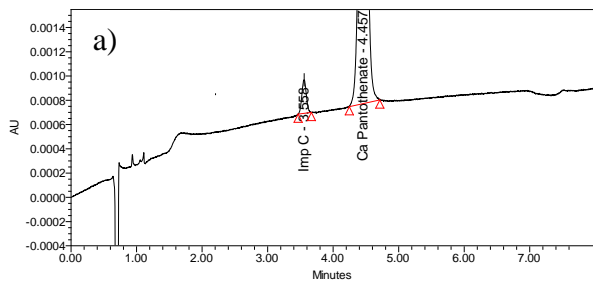
Kod ispitivanja robusnosti metode, ocjenjivao se utjecaj promjene sljedećih kromatografskih parametara:

- Temperatura kolone: $35^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$
- Protok: $1,0 \text{ mL/min} \pm 0,3 \text{ mL/min}$

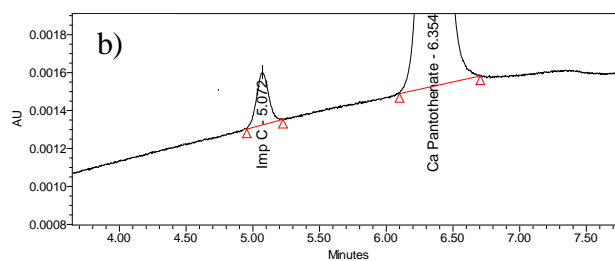
Kromatogrami su prikazani u nastavku (od **Slike 13.** do **Slike 17.**), a za usporedbu su prikazani kromatogrami otopina pri nominalnim uvjetima (**Tablica 1.**). Sve otopine osim slijepe probe prikazane su uvećano zbog jasnije slike i jednostavnijeg razmatranja dobivenih rezultata.



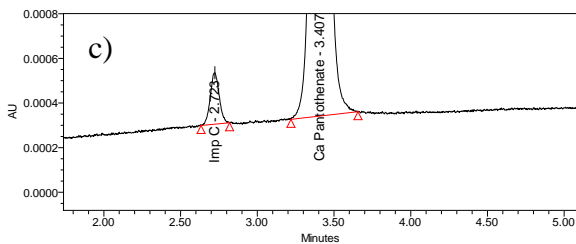
Slika 13. Slijepa proba pri a) nominalnim uvjetima b) protoku 0,7 mL/min c) protoku 1,3 mL/min d) temperaturi kolone 30°C i e) temperaturi kolone 40°C



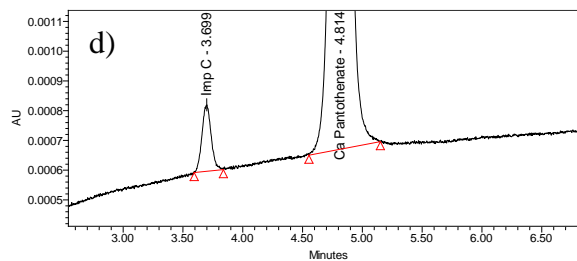
SampleName: SST Channel Description: ACQUITY TUV ChA 200nm Result Id: 2284



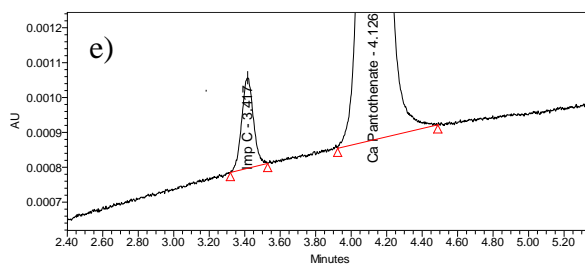
SampleName: SST_0,7ml/min Channel Description: ACQUITY TUV ChA 200nm Result Id: 2346



SampleName: SST_1,3ml/min Channel Description: ACQUITY TUV ChA 200nm Result Id: 2355

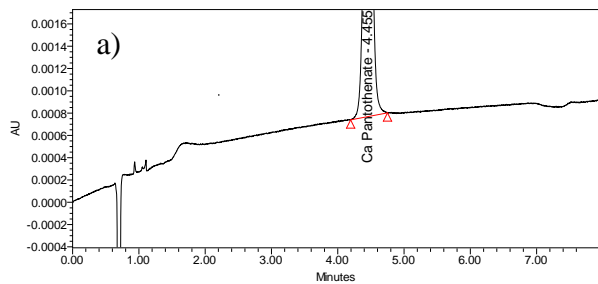


SampleName: SST_30C Channel Description: ACQUITY TUV ChA 200nm Result Id: 2363

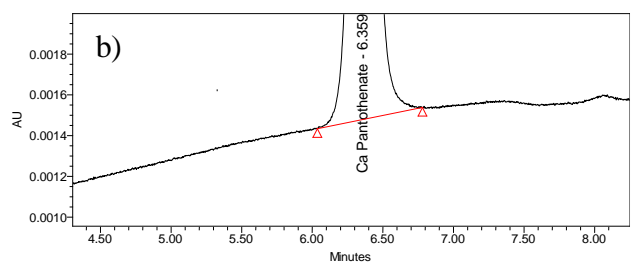


SampleName: SST_40C Channel Description: ACQUITY TUV ChA 200nm Result Id: 2371

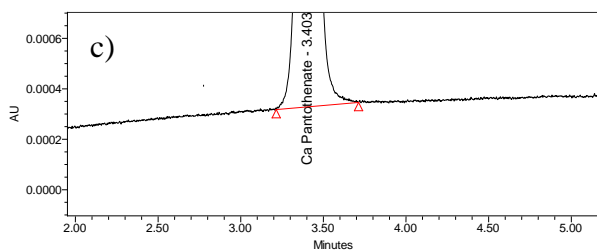
Slika 14. SST otopina pri a) nominalnim uvjetima b) protoku 0,7 mL/min c) protoku 1,3 mL/min d) temperaturi kolone 30 °C i e) temperaturi kolone 40 °C



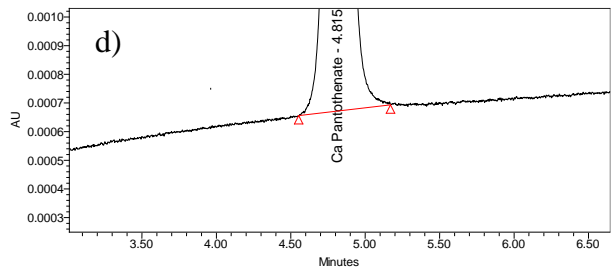
SampleName: STD Channel Description: ACQUITY TUV ChA 200nm Result Id: 2293



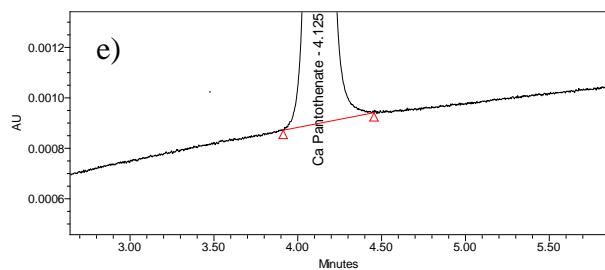
SampleName: STD_0,7ml/min Channel Description: ACQUITY TUV ChA 200nm Result Id: 2345



SampleName: STD_1,3ml/min Channel Description: ACQUITY TUV ChA 200nm Result Id: 2354

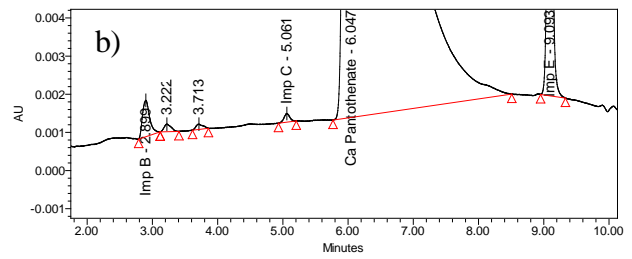
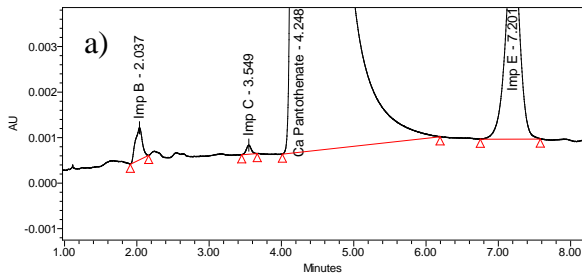


SampleName: STD_30C Channel Description: ACQUITY TUV ChA 200nm Result Id: 2362



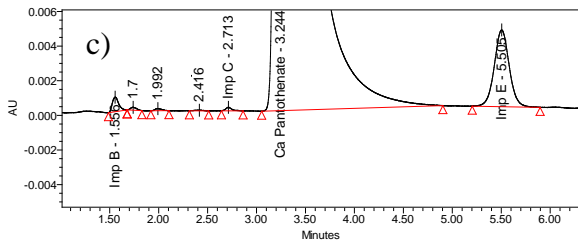
SampleName: STD_40C Channel Description: ACQUITY TUV ChA 200nm Result Id: 2370

Slika 15. Otopina standarda pri a) nominalnim uvjetima b) protoku 0,7 mL/min c) protoku 1,3 mL/min d) temperaturi kolone 30 °C i e) temperaturi kolone 40 °C

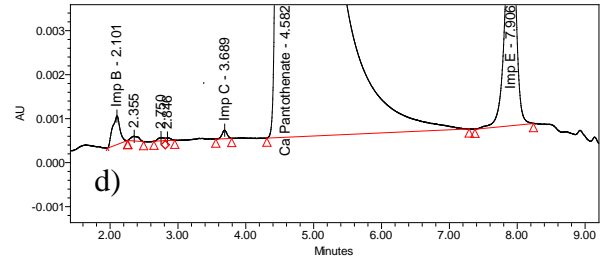


SampleName: Uzorak Channel Description: ACQUITY TUV ChA 200nm Result Id: 2285

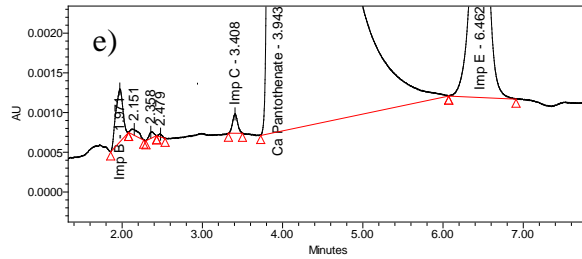
SampleName: Uzorak_0,7ml/min Channel Description: ACQUITY TUV ChA 200nm Result Id: 2347



SampleName: Uzorak_1,3ml/min Channel Description: ACQUITY TUV ChA 200nm Result Id: 2350

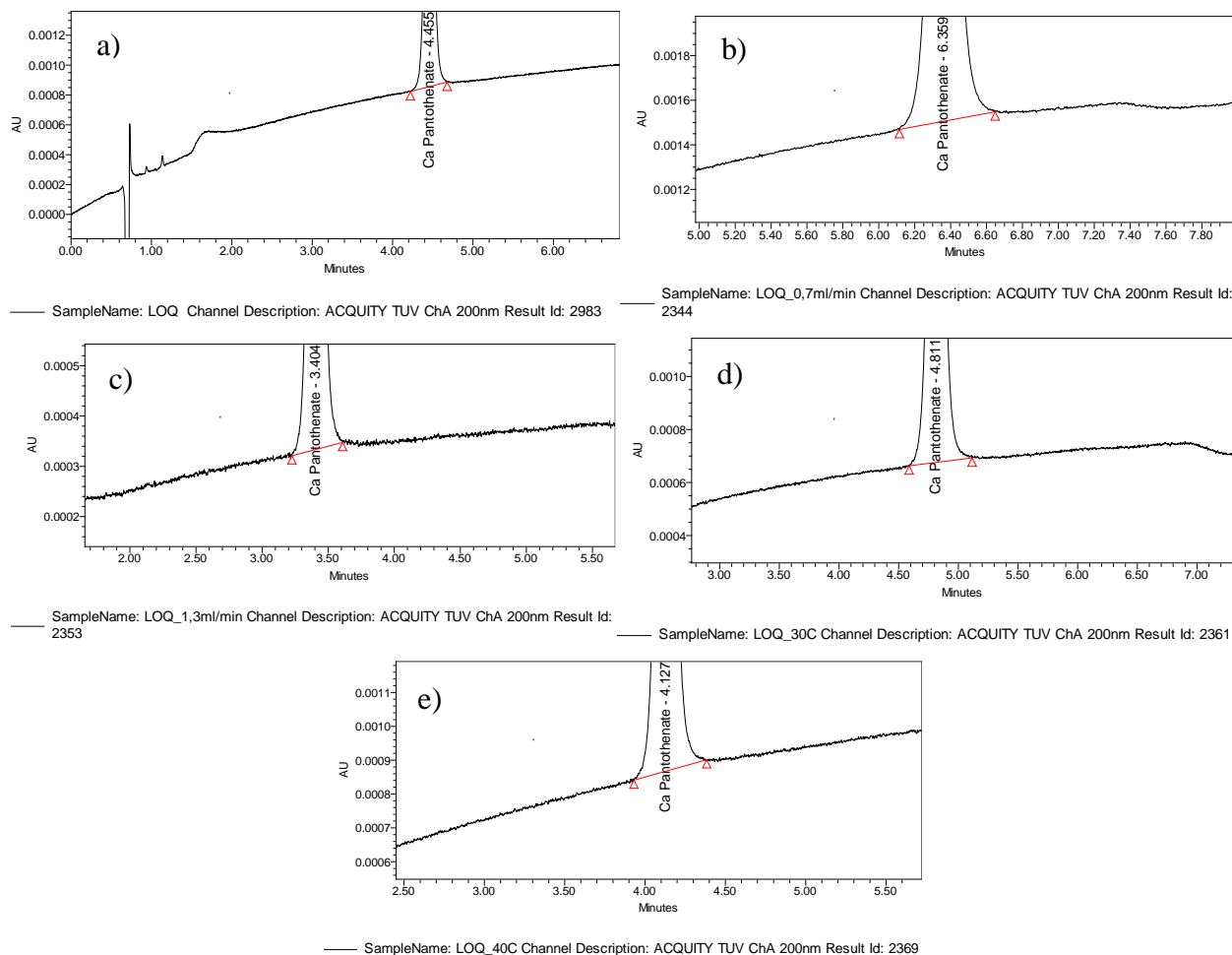


SampleName: Uzorak_30C Channel Description: ACQUITY TUV ChA 200nm Result Id: 2358



SampleName: Uzorak_40C Channel Description: ACQUITY TUV ChA 200nm Result Id: 2366

Slika 16. Otopina uzorka pri a) nominalnim uvjetima b) protoku 0,7 mL/min c) protoku 1,3 mL/min d) temperaturi kolone 30 °C i e) temperaturi kolone 40 °C



Slika 17. LOQ otopina pri a) nominalnim uvjetima b) protoku 0,7 mL/min c) protoku 1,3 mL/min d) temperaturi kolone 30 °C i e) temperaturi kolone 40 °C

Kod ispitivanja robusnosti metode važno je pratiti utjecaj promjene kromatografskih parametara na vrijednosti S/N omjera kromatografske krivulje kalcijevog pantotenata u LOQ otopini (**Tablica 14.**), te na razlučivost u SST otopini i faktor simetrije u otopini standarda (**Tablica 15.**).

Tablica 15. Ispitivanje robusnosti - utjecaj promjene parametara na *S/N* omjer

Kromatografski parametri	<i>S/N</i> omjer u LOQ otopini (kromatografska krivulja kalcijevog pantotenata)
Nominalni uvjeti (temperatura kolone 35°C i protok 1,0 mL/min)	137
Protok 0,7 mL/min	168
Protok 1,3 mL/min	77
Temperatura kolone 30 °C	130
Temperatura kolone 40 °C	168

Tablica 16. Ispitivanje robusnosti - utjecaj promjene parametara na razlučivost i faktor simetrije

Uvjeti	SST otopina Razlučivost	Otopina standarda Faktor simetrije
Nominalni uvjeti (temperatura kolone 35°C i protok 1,0 mL/min)	5,8	1,0
Protok 0,7 mL/min	6,5	1,0
Protok 1,3 mL/min	5,3	1,0
Temperatura kolone 30 °C	6,4	1,0
Temperatura kolone 40 °C	4,9	1,0

S obzirom da ne dolazi do značajnih promjena vrijednosti *S/N* omjera u LOQ otopini, te razlučivosti u SST otopini i faktora simetrije u otopini standarda, može se zaključiti da je metoda robusna.

4.7. Stabilnost

Provjera stabilnosti otopina proveda se za otopinu standarda i SST otopinu nakon sedam (7) dana, te za SST otopinu nakon 48 h usporedbom sa svježe pripremljenim otopinama. Rezultati su prikazani u **Tablici 16**.

Tablica 17. Stabilnost otopine standarda nakon ~7 dana

Otopina	Vrijeme, h	RF ⁸	Razlika u odnosu na točku 0, %	Kriterij prihvaćanja	Status
Otopina standarda	0	6648010	/	NMT 10,0 %	Prolaz
	173,983	6592164	0,84 %		

Tablica 18. Stabilnost SST otopine nakon 52 h i ~7 dana

Otopina	Vrijeme, h	RF	Razlika u odnosu na točku 0, %	Kriterij prihvaćanja	Status
SST otopina	0	220459	/	NMT 10,0 %	Pad
	173,367	143075	35,10		
	0	235842	/		Pad
	52,6	204045	13,48		

Otopina standarda stabilna je barem sedam (7) dana na sobnoj temperaturi. S obzirom da SST otopina nije zadovoljila kriterije prihvaćanja u vremenskim intervalima od 52 h i ~ 7 dana, mora se svježe pripremati prilikom svake analize. Stabilnost SST otopine prikladna je i zadovoljavajuća

⁸ Eng. *response factor* – omjer odziva detektora (površine) i koncentracije analita.

tijekom analize u jednom danu (24 sata od trenutka početka pripreme SST otopine), što se dokazalo u ispitivanjima preciznosti gdje je RSD vrijednost SST otopine prvi dan iznosila 5,8 %, a drugi dan 6,7 % (NMT 10,0 %).

5. Zaključak

U ovom radu validirana je metoda za određivanje onečišćenja u aktivnoj farmaceutskoj tvari kalcijevom pantotenatu. Validacija je provedena prema internim Plivinim propisima, koji su usklađeni s ICH smjernicama i zahtjevima Europske farmakopeje. U postupku validacije ispitane su ključne izvedbene karakteristike metode, uključujući selektivnost, osjetljivost, preciznost, točnost i linearnost. Također je ispitana stabilnost otopine standarda i SST otopine, kao i robusnost metode prilikom promjena temperature kolone i sastava pokretne faze. Postavljeni kriteriji prihvatljivosti su zadovoljeni za sve ispitane parametre. Rezultati analize pokazali su da je metoda linearna, robusna, precizna, točna, selektivna i osjetljiva. Otopina standarda pokazala je stabilnost do sedam (7) dana, dok SST otopina nije zadovoljila kriterij stabilnosti nakon 52 sata, stoga se mora svježe pripremati prilikom svake analize. Validacija HPLC metode s DAD detektorom prikazana u ovom radu uspješno je provedena te će se metoda uspješno implementirati i koristiti u budućim analizama laboratorija Kontrole kvalitete u Plivi za praćenje nečistoća u kalcijevom pantotenatu.

Popis slika

Slika 1. Grafički prikaz određivanja linearnosti metode [8].....	5
Slika 2. Dijelovi tipičnog HPLC instrumenta [17].....	11
Slika 3. Struktura kalcijevog pantotenata [23].....	13
Slika 4. Selektivnost - slijepa proba	24
Slika 5. Selektivnost - SST otopina, uvećani prikaz.....	25
Slika 6. Selektivnost - otopina standarda, uvećani prikaz	25
Slika 7. Selektivnost - otopina uzorka, cijeli prikaz	26
Slika 8. Selektivnost - otopina uzorka, uvećani prikaz.....	26
Slika 9. Selektivnost - ID otopina, uvećani prikaz	27
Slika 10. Selektivnost - cijepljena otopina uzorka na razini specifikacije, uvećani prikaz	28
Slika 11. Grafički prikaz rezultata ispitivanja linearnosti za nepoznata onečišćenja	30
Slika 12. Grafički prikaz rezultata ispitivanja linearnosti za nepoznata onečišćenja	31
Slika 13. Slijepa proba pri a) nominalnim uvjetima b) protoku 0,7 mL/min c) protoku 1,3 mL/min d) temperaturi kolone 30 °C i e) temperaturi kolone 40 °C	36
Slika 14. SST otopina pri a) nominalnim uvjetima b) protoku 0,7 mL/min c) protoku 1,3 mL/min d) temperaturi kolone 30 °C i e) temperaturi kolone 40 °C	37
Slika 15. Otopina standarda pri a) nominalnim uvjetima b) protoku 0,7 mL/min c) protoku 1,3 mL/min d) temperaturi kolone 30 °C i e) temperaturi kolone 40 °C	38
Slika 16. Otopina uzorka pri a) nominalnim uvjetima b) protoku 0,7 mL/min c) protoku 1,3 mL/min d) temperaturi kolone 30 °C i e) temperaturi kolone 40 °C	39
Slika 17. LOQ otopina pri a) nominalnim uvjetima b) protoku 0,7 mL/min c) protoku 1,3 mL/min d) temperaturi kolone 30 °C i e) temperaturi kolone 40 °C	40

Popis tablica

Tablica 1. Kromatografski parametri metode određivanja onečišćenja	15
Tablica 2. Tablica gradijentnog eluiranja pokretnih faza	15
Tablica 3. Uvjeti za provjeru prikladnosti kromatografskog sustava za analizu	18
Tablica 4. Priprema kontrolnih otopina za parametar točnosti	21
Tablica 5. Priprema otopina za provjeru linearnosti metode za standard kalcijevog pantotenata	22
Tablica 6. Priprema otopina za provjeru linearnosti metode za onečišćenje C	22
Tablica 7. Rezultati ispitivanja osjetljivosti metode	29
Tablica 8. Rezultati ispitivanja osjetljivosti cijepljene otopine uzorka	29
Tablica 9. Rezultati ispitivanja linearnosti za nepoznata onečišćenja	30
Tablica 10. Rezultati ispitivanja linearnosti za nepoznata onečišćenja	31
Tablica 11. Provjera prikladnosti sustava za ispitivanje točnosti metode	33
Tablica 12. Rezultati ispitivanja točnosti metode	34
Tablica 13. Provjera prikladnosti sustava za ispitivanje preciznosti metode	35
Tablica 14. Rezultati ispitivanja preciznosti metode	35
Tablica 15. Ispitivanje robusnosti - utjecaj promjene parametara na S/N omjer	41
Tablica 16. Ispitivanje robusnosti - utjecaj promjene parametara na razlučivost i faktor simetrije	41
Tablica 17. Stabilnost otopine standarda nakon ~7 dana	42
Tablica 18. Stabilnost SST otopine nakon 52 h i ~7 dana	42

Bibliografija

- [1] J. M. Juran, "Juran's Quality Handbook, fifth edition," McGraw-Hill, 1998., str. 4.2 - 4.12
- [2] D. C. Montgomery, "Introduction to Statistical Quality Control, sixth edition," John Wiley & Sons, Inc., 2009., str. 4-8
- [3] "Guidance for Industry: Process Validation: General Principles and Practices," priručnik, U.S. Department of Health and Human Services, 2011., str. 3-18, preuzeto s web stranice fda.gov
- [4] I. S. Krull i M. E. Swartz, "Handbook of Analytical Validation," CRC Press, 2012., str. 1-9
- [5] R. Haleem, "Quality in the Pharmaceutical Industry - A Literature Review," časopis *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2013., str. 3.
- [6] K. Lazarić, "Validacija analitičkih metoda - osnovna načela," časopis *Laboratoriji*, str. 61 - 64
- [7] D. Ašperger, "Sustav kvalitete", predavanja, Zavod za analitičku kemiju, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2023.
- [8] Ključne riječi: linearity plot in validation, web stranica: https://www.researchgate.net/figure/Linearity-plot-of-an-analyte-sample_fig1_221913303. (Preuzeto: 25.08.2024)
- [9] "Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)," priručnik, ICH, 1994., str. 1-13
- [10] "Impurities in New Drug Substances Q3A (R2)," priručnik, ICH, 2006., str. 1-7
- [11] "Impurities in New Drug Products," priručnik, ICH, 1999., str. 4-14

- [12] M. Sertić, B. Nigović, "Onečišćenja u lijekovima," časopis *Farmaceutski glasnik*, 2012., str. 77-85
- [13] "Guideline on Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C (R9)," priručnik, ICH, 1996, str. 2-9
- [14] D. A. Skoog, D.M. West, F. J. Holler i S. R. Crouch, "Fundamentals of Analytical Chemistry, 9th edition", Brooks/Cole, Cengage Learning, 2014., str. 912 - 924
- [15] D. Ašperger, "Separacija i izolacija analita", predavanja, Zavod za analitičku kemiju, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2023.
- [16] "Empower Software Data Acquisition and Processing: Theory Guide", priručnik, Waters Corporation, 2002., str. 21.
- [17] S. Luterotti, "Uvod u kemijsku analizu", udžbenik, Farmaceutsko - biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2002., str. 219.
- [18] Ključne riječi: HPLC detectors, web stranica: <https://elsci.io/peaksel/article/types-of-uv-detectors.html>. (Preuzeto: 28.08.2024.)
- [19] "Impact of Instrument and Detector Characteristics on Size Exclusion Chromatography Method Transfer Across Biocompatible UHPLC Systems," priručnik, Waters Corporation, 2018., str. 6.
- [20] Ključne riječi: Calcium Pantothenate properties, web stranica: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/PantothenicAcid-HealthProfessional/> (Preuzeto 28.08.2024.)
- [21] "Scientific Opinion on the safety and efficacy of pantothenic acid (calcium D-pantothenate and D-panthenol) as a feed additive for all animal species based on a dossier submitted by Lohmann Animal Health," EFSA Journal, 2011., str. 6.
- [22] Ključne riječi: Calcium Pantothenate properties, web stranica: <https://go.drugbank.com/salts/DBSALT000034>. (Preuzeto: 28.08.2024.)

[23] Ključne riječi: Calcium Pantothenate structure, web stranica:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Calcium-Pantothenate>. (Preuzeto:
28.08.2024.)