

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra farmaceutické technologie

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

2009

Veronika Koníková

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**Katedra farmaceutické technologie**

Studijní program: farmacie

*Validace čisticích procedur při výrobě tekutých  
lékových forem*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Autor práce:** Veronika Koníková

**Vedoucí práce:** Doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

**Konzultanti:** Ing. Antonín Božoň, PharmDr. Jarmila Stupková

**UNIVERSITY OF CHARLES IN PRAGUE**  
**FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ**

**Department of pharmaceutical technology**

Field of study: Pharmacy

*Cleaning Validation Procedures in  
Manufacturing of Liquid Dosage Forms*

MASTER THESIS

**Author:** Veronika Koníková

**Supervisor:** Doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

**Consultant:** Ing. Antonín Božoň, PharmDr. Jarmila Stupková

Prohlašuji, že práce je mým autorským dílem. Veškeré literární prameny a zdroje, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

V Hradci Králové dne.....

.....  
Podpis

## ANOTACE

Úvod práce představuje seznámení s validacemi analytických metod, jakožto důležitého procesu při farmaceutickém vývoji a kontrole kvality ve farmaceutické výrobě.

Validace metod má zásadní vliv na farmakoeconomiku a významně zkracuje dobu uvolnění léčiva na trh. Princip IMS významně krátí dobu analýzy a tím zajišťuje farmaceutické firmám inovační a ekonomický růst. Experimentální část této práce byla provedena na přístroji IONSCAN – LS Smiths-Detection, USA v pobočce firmy TEVA v Opavě, která zavádí využití IMS k validaci analytických postupů pro validaci čištění ve farmaceutické výrobě.

K měření byl použit standard Naphazolini nitras a metoda Teflon dry. Při vývoji samotné metody, na které jsem se podílela, byl nalezen rozsah použitelnosti metody v intervalu hmotnostních koncentrací od 0,06 – 0,80 mg / ml. Byl stanoven detekční limit na úrovni 0.02 ppm, kvantifikační limit na úrovni 0.08 ppm a byla ověřena linearita. V druhé části jsem validovala analytickou metodu pro validaci procesu čištění. Vzorkování bylo provedeno pomocí stěrů polyuretanovými tampóny Large Swab, a to z ocelové destičky o velikosti plochy 5 x 5 cm<sup>2</sup>. Z tohoto zařízení bude po výrobě produktu proveden stěr, který se podrobí Limitnímu testu IMS. Jeho výsledek určí, zda je výrobní zařízení připraveno k výrobě následujícího produktu, zda čištění bylo dostatečné. Během validace analytické metody se postupovalo dle izraelského Validačního protokolu a byla ověřena linearita, opakovatelnost a výtěžnost stěrů, která činila 93.59 – 135.81 %.

Klíčová slova: Validace, IMS, vývoj metody, validace analytické metody, stěry, výtěžnost

## ABSTRACT

The thesis preamble introduces validations of analytical methods, as an important process during pharmaceutical development and quality control in pharmaceutical manufacturing.

Method validation has essential influence on pharmacoeconomics and greatly shortens the time of placing the medicament to the market. The IMS principle greatly shortens analysis time, thus ensuring economic and innovation growth for pharmaceutical companies. Experimental part of this thesis was performed on the device IONSCAN – LS Smiths-Detection, USA in the branch of the Teva company in Opava, which introduces IMS to analytical procedures validation for cleaning validation in pharmaceutical manufacturing.

For measuring, the Naphazolini nitras standard was used and the Teflon dry method was applied. During the method development itself, in which I participated, the method usability range was found in the interval of mass concentrations from 0,06 – 0,80 mg / ml. The detection limit at the level of 0.02 ppm and the quantification limit at the level of 0.08 ppm were determined and linearity was verified. In the second part, I validated the analytical method for cleaning process validation. Sampling was performed by means of polyurethane swabs “Large Swab” from a metal plate of surface size 5 x 5 cm<sup>2</sup>. From this equipment, a swab will be made after product manufacturing. The swab will undergo the IMS Limit Test. Its result will determine whether the manufacturing equipment is ready for production of the following product, whether cleaning was sufficient. During the analytical method validation, an Israeli Validation Protocol was followed and the linearity, repeatability and swab recovery equaling to 93.59 – 135.81 % were verified.

Key words: validation, IMS, method development, analytical method validation, swabs, recovery

## **Poděkování**

Děkuji vedoucímu oddělení Validací firmy TEVA Ing. Pavlu Frankovi, PharmDr. Jarmile Stupkové, Ing. Antonínu Božoňovi za umožnění přístupu a provedení práce v laboratořích firmy TEVA, za odborné vedení a cenné připomínky. Dále děkuji týmu analytických laborantů, zejména Ireně Holušové, pracujících na validačních procesech, kteří mi pomáhali při řešení problémů spojených s měřením.

Děkuji Doc. RNDr. Pavlu Doležalovi za ochotu a pomoc při zpracování rukopisu.

## PŘEDMLUVA

Experimentální část práce jsem po dobu 3 měsíců realizovala v divizi QC Pharma, ve výstupní laboratoři instrumentálních metod farmaceutické firmy TEVA v Opavě. Proto zde o této firmě zmiňuji několik poznámek

Společnost IVAX Pharmaceuticals s.r.o., dříve známá jako Galena, je významným farmaceutickým výrobcem s velmi dlouhou historií. Její sídlo se nachází v Opavě-Komárově. Ve svém širokém portfoliu má generické léčivé přípravky – především antiastmatika, cytostatika, imunosupresiva, hypolipidemika, antihypertenziva aj. - v podobě tablet, tobolek a kapalných lékových forem, dále také volně prodejné léky (OTC), účinné farmaceutické látky (API) a rostlinné extrakty. Produkty splňují uznávané standardy kvality a jsou exportovány do řady zemí. Na úspěchu společnosti a plnění náročných cílů se podílí přibližně 800 zaměstnanců. V roce 2006 se společnost stala součástí nadnárodní skupiny Teva. <sup>[1]</sup>

Tato společnost je rozdělena na divizi vyrábějící léčivé přípravky (Pharma) a divizi pro výrobu účinných substancí (TAPI Galena).

Útvary divizí :

### **Kvalita**

Útvar kvality je zodpovědný za tyto dvě oblasti:

- kontrola jakosti (QC) – zahrnuje laboratorní testy vyráběných substancí prováděné pomocí nejmodernějších laboratorních technik a přístrojů renomovaných firem (kapalinová a plynová chromatografie, titrace, termická analýza a další typy spektrálních technik)
- jištění jakosti (QA) – je nastavováno a kontrolováno systémem Správné výrobní praxe (SVP) pro celou společnost



## **Registrace**

Registrace (RA) – shromažďuje dokumentaci k postupům výroby a kontrole substancí.

## **Výzkum a vývoj**

Zaměřuje se především na:

- metody separace účinných látek,
- metody syntézy účinných látek,
- analytické metody a jejich validace,
- nalezení nových polymorfů a jejich charakterizaci.

Zcela novou aktivitou je vývoj vysoce účinných aktivních farmaceutických látek (HAPI). Klíčové výsledky jsou patentovány a nové postupy výroby ověřovány v laboratorním a poloprovozním měřítku.

Pracovníci výzkumu a vývoje rovněž spolupracují s technologi ve výrobě při optimalizaci stávajících výrobních procesů a připravují podklady pro registraci substancí.

## **Prodej a marketing**

Útvar se zabývá nejen prodejem účinných farmaceutických látek a rostlinných extraktů, ale také prodejem práv na finální lékové formy vyvinuté na základě substancí divize TAPI Galena (tzv. Out-Licensing). Obchodní kontakty jsou rozvíjeny po celém světě, přičemž ve spolupráci s ostatními útvary je neustále zlepšována úroveň služeb zákazníkům. Prodej a marketing se rovněž podílí na rozšiřování a doplňování portfolia firmy a na plánovitém zvyšování kvality a konkurenceschopnosti stávajících produktů.

# OBSAH

1.	ÚVOD.....	12
2.	TEORETICKÁ ČÁST .....	15
2.1.	ČIŠTĚNÍ.....	15
2.1.1.	PROCEDURY ČIŠTĚNÍ .....	15
2.1.2.	TYPY ČISTICÍCH PROCEDUR .....	17
2.1.3.	FREKVENCE ČIŠTĚNÍ.....	19
2.1.4.	MONITOROVÁNÍ ČIŠTĚNÍ.....	19
2.2.	VALIDACE.....	20
2.2.1.	ORGANIZACE VALIDACÍ.....	20
2.2.2.	ŘÍZENÍ VALIDACÍ.....	21
2.3.	VALIDACE ČIŠTĚNÍ TEKUTÝCH LÉKOVÝCH FOREM .....	24
2.3.1.	VALIDACE ČIŠTĚNÍ PŘI VÝROBĚ TEKUTÝCH LÉKOVÝCH FOREM.....	24
2.3.1.1.	Účel a rozsah validace .....	25
2.3.1.2.	Validační tým .....	26
2.3.1.3.	Popis procesu .....	26
2.3.1.4.	Metody testování.....	27
2.4.	IMS- IONTOVÁ MOBILITNÍ SPEKTROMETRIE .....	29
2.4.1.	SROVNÁNÍ HPLC a IMS.....	30
2.4.2.	IMS VERSUS TOC .....	30
2.5.	PRINCIP IMS .....	31
2.5.1.	IONTOVÁ POHYBLIVOST.....	32
2.5.2.	IONIZACE.....	32
2.6.	PROVEDENÍ ANALÝZY .....	35
2.6.1.	ZAVÁDĚNÍ VZORKU.....	35
2.6.2.	TEPLOTNÍ DESORPCE.....	35
2.6.3.	HPI VSTŘIKOVAČ.....	36
2.6.4.	KONDENZAČNÍ TRUBICE .....	36
2.6.5.	KALIBRANT .....	36
2.6.6.	REAKTANT .....	37
2.6.7.	MODEL TOKU .....	37
2.6.8.	KONTROLA HPI .....	37
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	39
3.1.	VÝVOJ ANALYTICKÉ METODY .....	39
3.1.1.	PRODUKT VALIDACE.....	39
3.1.2.	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	40
3.1.2.1.	CHEMIKÁLIE.....	41
3.1.3.	POSTUP PŘI ANALÝZE.....	41
3.1.4.	ZÁSADY PROVEDENÍ SPRÁVNÉ VALIDACE METODY.....	43
3.1.5.	VÝVOJ METODY .....	44
3.1.5.1.	Zajištění patřičné výkonnosti přístroje pomocí blanku a IPC .....	44
3.1.5.2.	Příprava vzorku.....	44
3.1.5.3.	Určení pozitivního nebo negativního módu.....	46
3.1.5.4.	Nastavení alarmu k detekci píku.....	48
3.1.5.5.	Opakované měření koncentrace pro optimalizaci metody.....	51
3.1.5.6.	Sledování odezvy při změně koncentrace.....	51
3.1.5.7.	Určení následné kontaminace .....	53

3.1.5.8.	Kontrola desorpčního profilu.....	54
3.1.5.9.	Optimalizace post dispense delay .....	54
3.1.5.10.	Předpokládané hodnoty LOQ a LOD .....	54
3.1.5.11.	Linearita .....	55
3.2.	VALIDACE ANALYTICKÉ METODY PRO VALIDACI ČIŠTĚNÍ	
	59	
3.2.1.	CHEMIKÁLIE.....	59
3.2.2.	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	59
3.2.3.	VZORKOVÁNÍ.....	59
3.2.4.	PŘÍPRAVA STĚRŮ .....	60
3.2.5.	PROVEDENÍ STĚRU .....	60
3.2.6.	ODSTRANĚNÍ ZBYTKU REZIDUÍ ZE STĚROVÉ	
	TYČINKY .....	61
3.2.7.	VLASTNÍ VALIDACE METODY .....	61
3.2.7.1.	Základní informace .....	62
3.2.7.2.	Ověření blanku.....	62
3.2.7.3.	Určení limitu kvantifikace .....	64
3.2.7.4.	Ověření limitu kvantifikace .....	65
3.2.7.5.	Přesnost.....	66
3.2.7.6.	Provedení stěru a stanovení výtěžnosti.....	67
3.2.7.7.	Linearita .....	72
3.2.7.8.	Opakovatelnost .....	73
4.	KOMENTÁŘ K VÝSLEDKŮM A ZÁVĚR .....	74
5.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	76
6.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	78
7.	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	80
8.	SEZNAM TABULEK.....	82
9.	PŘÍLOHY .....	84
9.1.	PŘÍLOHA I.....	84
9.2.	PŘÍLOHA II.....	87

# 1. ÚVOD

Čištění výrobních zařízení se zaměřením na vnitřní povrchy je standardním krokem zahrnutým do procesu výroby farmaceutických produktů. Čištění je důležité pro odstranění reziduí a k zabránění křížové kontaminace. Procesy jsou založeny na solubilizaci, chemických reakcích a fyzikálních dějích. Pro jednotlivá výrobní zařízení byly vyvinuty konkrétní čistící procedury, které jsou řízeny předpisy. Pokud jsou testy na čistotu výrobního zařízení vyhovující, provede se validace standardní procedury čištění. Pokud testy neodpovídají normě, je třeba zvolit jiný postup čištění. Pro validaci je nutné stanovit kritické kroky a parametry tohoto procesu. Vyhodnocení čistících procesů nám potvrdí účinnost a bezpečnost konkrétního postupu a umožní nám provést úplnou validaci čistících procesů. <sup>[2]</sup>

Validace jsou systémem jištění jakosti, který souvisí se správnou výrobní praxí. Specifikou farmaceutického průmyslu je, že pravidla jištění jakosti ve výrobě léků jsou pevně zakotvena v právním řádu moderního státu. Farmaceutický průmysl je řazen ke státům regulovaným odvětvím a podléhá legislativě.

V České republice je legislativa v plném souladu s předpisy EU a USA. Oblast léčiv je regulována na základě zákona č.378/2007 Sb. O léčivech a o změnách a doplnění některých souvisejících zákonů. Požadavky na SVP jsou v ČR definovány vyhláškou MZ ČR a MZe ČR č.411/2004, kterou se stanoví správná výrobní praxe, správná distribuční praxe a podmínky povolování výroby a distribuce léčiv. Orgánem kompetentním udělovat povolení k výrobě, kontrolovat plnění právních předpisů a provádět registraci léčivých přípravků, je Státní ústav pro kontrolu léčiv, správní orgán podřízený Ministerstvu zdravotnictví.

První a základní předpis regulující oblast léčiv a léků byl přijat EHS (Evropské Hospodářské Společenství) v roce 1965. Směrnice Zásad a pravidel Správné výrobní praxe pro léky k humánnímu použití byla vydána v roce 1991. Detailní rozpracování požadavků SVP je obsaženo v dokumentu „Guide to Good Manufacturing Practice for medicinal products.“

Tyto předpisy se týkají prostor a zařízení pro výrobu, údržby zařízení, zabývají se kontaminací surovin. Tyto předpisy nejsou však detailní, vyžadují pouze přesný popis metod čištění a jejich validace.

K evropským požadavkům patří ještě některé doplňky:

-Anex 15,EU Guide-Qualification and Validation

-Anex 15 PIC/S Guide to GPM

Oba tyto doplňky se zabývají validací čištění a jsou prakticky shodné.

V USA je hlavní autoritou FDA (Food and drug administration), která vydává normy (regulations). Tyto normy jsou pak publikovány ve federální sbírce zákonů USA 21CFR (Code of Federation Regulation) 210 a 211

„Current GMP in manufacturing, processing, packing or holding of drugs“.

V části „§211.67 Equipment clearing and maintenance“ jsou definovány základní požadavky na čištění, které se týkají zařízení pro výrobu, procedur čištění, údržbou a záznamy jednotlivých procesů. Předpisy FDA jsou společně s japonskými považovány za nejobsáhlejší a nejpřísnější na světě.

Pokyny pro validaci čištění jsou uvedeny v těchto základních dokumentech:

- „Guide to inspection of validation of cleaning processes“- pokyny FDA pro inspekce validací čistících procesů, vyžaduje tyto informace:
  - SOP pro čistící postupy
  - Procedury validací
  - Validační protokoly
  - Výsledky validací
  - Limity pro znečištění
- „Validation Master Plan, IQ, OQ, Non-sterile process Validation,Cleaning Validation“, PIC/S,2000. (PIC-Pharmaceutical inspection convention). Tento předpis požaduje, aby byl každý postup dobře navržen a ověřen validací. Zabývá se též kontaminací aktivních substancí a finálních léčivých přípravků. Výsledkem validace čištění je dokument, který potvrzuje, že zvolená metoda čištění poskytuje jistotu pro dané zařízení a daný proces výroby finálního přípravku nebo aktivní substance.

- Technical report PDA, 1998, Points to Consider for Cleaning Validation - metodické pokyny pro čištění a validaci čištění  
Jde o praktický návod na aplikaci čisticích metod a jejich validaci..  
Týká se vývoje čištění, validace čištění, odstraňování reziduí, čištěním výrobních zařízení, vývojem čisticích cyklů, techniky odběru vzorků, analytickými metodami, limity, atd. Jedná se o velice dobře propracovaný dokument využitelný v celosvětovém měřítku. <sup>[2,3]</sup>

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. ČIŠTĚNÍ

#### 2.1.1. PROCEDURY ČIŠTĚNÍ

Procedury čištění vnitřních povrchů zařízení představují standardní činnost prováděnou po výrobě farmaceutických produktů z důvodu odstraňování reziduí a bránění křížové kontaminaci. [2]

**Vývoj čisticí procedury závisí na:**

- Produktu
- Výrobním zařízením
- Čisticích prostředcích
- Postupech a parametrech
- Dokumentaci
- Školení

**Složení produktu:** Čištění závisí na typu materiálu, který má být odstraněn z povrchu. Je třeba brát v úvahu chemické a fyzikální vlastnosti produktu. Mezi ně patří rozpustnost, koncentrace, fyzikální vlastnosti účinné látky a pomocných látek. Bereme na vědomí i možné interakce produktu s povrchem. U kapalných produktů může docházet k většímu průniku látky těsněním a tím je zabráněno efektivnímu čištění. Pevné produkty mohou vytvářet agregáty smáčení povrchu čisticími prostředky. Rozpustné látky se čištěním snadno odstraňují, zatímco nerozpustné látky musí být odstraněny fyzikálními prostředky nebo vyšší koncentrací čisticích prostředků. [2]

**Výrobní zařízení:** Pokud se zařízení používá k výrobě jednoho produktu, jsou vyloučeny úvahy o křížové kontaminaci. Víceúčelová zařízení jsou komplikovaným systémem z hlediska kontaminace, proto musí být

provedena určitá opatření. Kampaňovitá výroba je výhodná pro minimalizaci rizik kontaminace mezi šaržemi. Zde se čištění provádí po ukončení kampaň. V úvahu bereme i složitost zařízení.<sup>[2]</sup>

**Čistící prostředky:** Čistící prostředky musí být vybírány podle vhodnosti k odstraňování reziduí a podle jejich toxicity. Musí být stanoveny přípustné limity a uvedena jejich specifikace. Účinnost čištění závisí na jejich koncentraci, expoziční době, tlaku, teplotě a pH. K přípravě čisticích prostředků se využívá voda pro injekce nebo voda čištěná.<sup>[2]</sup>

**Čistící postupy a parametry:** Čistící postup se skládá z těchto kroků:

- Prewashing-hrubé čištění
- Washing-mytí
- Rinsing-oplach
- Drying-vysušení

Jednotlivý čistící postup nemusí zahrnovat všechny tyto kroky nebo může zahrnovat i kroky navíc. Kritickou roli zde hrají parametry jako čas, teplota, koncentrace čisticího prostředku a čistící děj. Každý čistící krok se vyhodnocuje podle toho k jaké redukci kontaminace v daném kroku došlo. Po vyhodnocení se buď nějaký krok přidá nebo ubere.<sup>[2]</sup>

**Dokumentace:** Na konci vývoje čistící procedury musí být vypracován standardní operační postup (SOP). Tento dokument musí obsahovat všechny kroky a parametry čisticích procedur. SOP pro čištění by měl zahrnovat tyto aspekty:

- Rozsah rozebrání zařízení
- Kritická místa a oblasti
- Podrobný popis metod,zařízení,materiálů použitých pro čištění
- Vizuální inspekce
- Odpovědnost za čištění zařízení
- Rozvrhy čištění
- Odstranění označení předchozí šarže



- Ochranu čistého zařízení před kontaminací před použitím
- Inspekci zařízení na čistotu bezprostředně před použitím
- Metody očištění nebo manipulace a skladování náradí pro čištění <sup>[2]</sup>

V průběhu vývoje procedury se připraví rovněž příslušné formuláře záznamů pro rutinní čištění. Tyto dokumenty slouží po jejich vyplnění jako záznam o čištění a prokazují, že čistota zařízení byla zkontrolována nezávislým supervizorem. <sup>[2]</sup>

Kromě těchto dokumentů je třeba připravit validační protokol pro zvalidování čisticích procedur.

## 2.1.2. TYPY ČISTICÍCH PROCEDUR

### 1. Ruční

### 2. Poloautomatické

### 3. Automatické

#### **Ruční čištění:**

Jedná se o přímé čištění výrobního zařízení operátorem s použitím čisticích prostředků a ručních zařízení. Ke kritickým krokům manuálního čištění patří:

- Objem čisticího prostředku
- Teplota mycích a oplachovacích roztoků
- Doba trvání mycích a oplachovacích cyklů
- Tlak roztoků
- Koncentrace detergentu

Jednotlivými kroky tohoto typu čištění jsou :

- ✓ Demontáž-rozložení zařízení
- ✓ Hrubé čištění-odstranění hrubých nečistot s použitím vody nebo rozpouštědla
- ✓ Mytí-kyselé nebo bazické s použitím detergentů

- ✓ Oplach-slouží k odstranění detergentů
- ✓ Vysušení-s využitím sušicího plynu
- ✓ Montáž-složení zařízení

Výhodou manuálního čištění je zkušenost operátora a nevýhodou je variabilita čištění zařízení. Pro validaci ručního čištění je kritickým faktorem schopnost dosáhnout reprodukovatelnosti. <sup>[2]</sup>

### **Semiautomatické čištění:**

Jedná se o kombinaci ručního a automatického čištění. Existuje několik typů tohoto procesu :

- Automatickému čištění předchází ruční čištění demontovaného zařízení
- Proces s využitím vysokotlakého sprejovacího zařízení

Výhodou poloautomatického čištění je nízká nákladovost a umožňuje čištění složitých soustav. Klady a zápory určuje rozsah manuálního a automatického čištění. <sup>[2]</sup>

### **Automatické čištění:**

Jde o čištění plně automatizované s využitím programovacích systémů, které umožní naprogramovat různé čisticí cykly. Je řízeno integrovaným řídicím systémem, který umožní regulaci cyklů. Jednotlivé kroky tohoto procesu jsou stejné jako u ručního čištění a to:

- Demontáž zařízení
- Hrubé čištění
- Mytí-s použitím detergentů
- Oplach-používá se voda
- Vysušení
- Montáž zařízení <sup>[2]</sup>

### **2.1.3. FREKVENCE ČIŠTĚNÍ**

Frekvence a rozsah čištění bývá většinou určován povahou výrobního procesu. Frekvence závisí na tom, zda se vyrábí rozdílné produkty nebo šarže téhož produktu. Proto se obvykle rozlišuje:

- Čištění mezi šaržemi různých produktů, tím se zabrání křížové kontaminaci produktem
- Čištění mezi šaržemi téhož produktu <sup>[2]</sup>

### **2.1.4. MONITOROVÁNÍ ČIŠTĚNÍ**

Během monitorování čištění musí být sledovány kritické parametry. Mezi kritické parametry patří teplota, průtok, tlak, hladina tekutiny, vodivost a pH. Během validace a vývoje procedury čištění musí být stanoveny rozmezí těchto parametrů. Kromě nich je třeba monitorovat také čistotu povrchu zařízení po každém ručním čištění i automatickém čištění.

Přístroje k monitorování jsou buď zapojeny přímo do čisticího zařízení, jsou tedy „in-line“ nebo mimo ně jako „off-line“. O čištění musí být uchovány záznamy, ve kterých je uváděno, kdo čištění provedl, kdo provedl inspekci, čísla zařízení a datum čištění. <sup>[2]</sup>

## **2.2. VALIDACE**

### **2.2.1. ORGANIZACE VALIDACÍ**

Pro validace neexistuje žádný návod ani postup. Program validací by měl zahrnovat tyto klíčové postupy:

#### 1. KONCEPCE VALIDACÍ

Koncepce validací by měla být prosazena řídicím týmem schopným vytvořit validační plán, posuzovat jednotlivé případy, schvalovat validační protokoly a zprávy. Validace by měly být prováděny dle standardního operačního postupu, tzv. SOP. Má význam pro plánování a vyhodnocování validací.

#### 2. ZDŮVODNĚNÍ VALIDACÍ

Zdůvodnění validací znamená nalezení důvodů k provedení validací. Mezi důvody patří např. zlepšení výroby, zvýšení jakosti výrobku, snížení nákladů, atd.

#### 3. PRIORITY

Je důležité si vymezit priority. Validovat všechny procesy je neúčelné, nákladné.

#### 4. VÝBĚR VALIDAČNÍHO TÝMU

Ve validačním týmu je nutná přítomnost osoby, která je schopna koordinace jednotlivých procesů.

Před každou validací by měl připravit pro validační tým zdůvodnění validace, validační protokoly a harmonogram provedení validace.

#### 5. PŘEDMĚT VALIDACE

Předmětem validace můžou být požadavky na výrobek, definice procesu a určení faktorů ovlivňujících jakost.

## 6. PROVEDENÍ VALIDACE

Provedení je závislé na způsobu validace. Prospektivní validace je prováděna u 3 výrobních šarží, retrospektivní u 20 šarží nutných k prokázání reprodukovatelnosti procesu s dostatečnou spolehlivostí.

## 7. VYHODNOCENÍ VÝSLEDKU

Vyhodnocování validací se provádí metodou SPC (Statistical Process Control) nebo metodou ANOVA (Analysis of Variety), aj. Musí být vyhodnoceno zda bylo dosaženo cíle studie, nebo zda byla splněna kriteria přijatelnosti.

## 8. VALIDAČNÍ ZPRÁVA

Všechny výsledky by měly být zpracovány ve formě závěrečné validační zprávy.

## 9. ZAVEDENÍ DO PRAXE

Jde o nejvýznamnější krok celé validace. <sup>[4]</sup>

### **2.2.2. ŘÍZENÍ VALIDACÍ**

Řízení validací se děje prostřednictvím Validation Master Plan. Tento základní řídicí dokument, který je vyžadován státními autoritami, byl vydán PIC (Pharmaceutical Inspection Convention) v roce 2001.

Každá validační dokumentace musí zahrnovat:

- VMP (Validation Master Plan)
- VP (Validační protokoly)
- VR (Validační zprávy)
- SVR (Souhrná validační zpráva) <sup>[4]</sup>

VMP je vypracován řídicím validačním týmem, který je tvořen odborníky různých oborů (projektanti, technici, technologové, zástupci QA (Quality assurance), QC, specialisti na validace, mikrobiologii, apod.) <sup>[4]</sup>

Obsahem VMP by podle doporučení PIC mělo být:

1. Úvod-firemní koncepce validací:

- koncepce jakosti výroby
- rozsah a cíl validací
- priority
- standardy

2. Organizace validačních aktivit:

- VMP
- VP
- provedení
- příprava
- schvalování protokolů a zpráv
- sledování a vyhodnocování
- trénink personálu

3. Popis procesu výroby:

- schéma výrob a procesů
- popis procesu

4. Specifické úvahy o procesech:

- kritické parametry produktů zařízení systémů
- kritická místa procesu

5. Rozsah validací:

- produkty (PQ)
- zařízení a systémy (IQ,OQ,PQ)

- procedury (OQ,PQ)

6. Klíčová kritéria přijatelnosti

7. Formát validační dokumentace:

- validační zprávy a protokoly

- souhrnná validační zpráva

8. Související dokumentace

9. Harmonogram validací:

- procedury, vybavení, personál, čas, ceny

10. Kontrola změn:

- materiálů, zařízení, procedur <sup>[4]</sup>

## 2.3. VALIDACE ČIŠTĚNÍ TEKUTÝCH LÉKOVÝCH FOREM

### 2.3.1. VALIDACE ČIŠTĚNÍ PŘI VÝROBĚ TEKUTÝCH LÉKOVÝCH FOREM

Čisticí procedury jsou součástí výrobních činností a z ohledu jakosti produktu jsou považovány za kritické. Z tohoto důvodu je dnes většinou autorit vyžadována jejich validace.

Validace čisticích procesů hrála dlouho kritickou roli ve farmaceutické výrobě.

Stopová analýza je vysoce kritická ve farmaceutické výrobě zejména při čištění vybavení během vývoje léčiva. V ranných fázích vývoje léčiva se analyzuje mnoho vzorků, zatímco se vyvíjí výrobní proces. Každý výrobní proces vyžaduje čisté zařízení. V pozdějších fázích výrobního procesu je čas velmi drahocenný. Jakmile se produkt přenesse do komerčního výrobního procesu, musí být dopad na výrobu co nejmenší. Proces je validován, pokud je robustnost preparátu a výrobního procesu známá, musí se také optimalizovat a identifikovat kritické faktory. Prodlužování validace výrobního procesu zpožďuje výrobu produktu a jeho spuštění prodeje. Pacienti přicházejí o životně důležitá léčiva a dochází ke ztrátám milionů dolarů.

Validování čisticích procesů se vykonává proto, aby se zjistilo zda API (aktivní farmaceutická ingredience) a ostatní látky, které přicházejí do styku s povrchy výrobních zařízení, nebyly kontaminovány. Validace čisticích procedur následuje po validaci výrobních postupů. Během všech fází vývoje musí být každá část výrobního zařízení ověřena, že je čistá, než se použije k výrobě. Během komerční výroby léčiva se už validace čištění nemusí provádět pokaždé a používá se jen jako namátková kontrola. FDA vyžaduje, aby firmy psaly postupy popisující čisticí postupy použité pro různé zařízení a popisy validace těchto postupů. Míra úspěšné a neúspěšné analýzy je určována dle směrnic FDA a specifické politiky farmaceutické společnosti. Tyto analýzy potřebují přístroj o vysoké senzitivitě, spolehlivosti, snadné použitelnosti a vysoké rychlosti.<sup>[4]</sup>



Validace je řízena předpisem Cleaning Validation, vydaným PIC v roce 2001, který obsahuje tato doporučení:

1. Princip validace-vysvětlení významu čištění
2. Obecné zásady
3. Dokumentace- validační zprávy, protokoly a SOP
4. Personál- kontroly čištění, trénink operátorů
5. Zařízení- kritické části čištění
6. Mikrobiologické aspekty
7. Vzorkování- plán, stěry, vzorky oplachované tekutiny
8. Detergenty- účinnost čištění, složení, limity
9. Analytické metody- validace, citlivost metod
10. Nastavení limitů- kritéria přijatelnosti, individuální .<sup>[4]</sup>

Průběh validace je zaznamenán do validačního protokolu. Tento dokument musí obsahovat:

- Účel a rozsah validace
- Validační tým
- Popis procesu(zařízení, procedury)
- Metody testování(vzorkování, vizuální kontrola, analytické hodnoty)
- Kritické kroky a parametry
- Metody hodnocení
- Kritéria přijatelnosti
- Harmonogram
- Formuláře protokolů<sup>[4]</sup>

#### 2.3.1.1. Účel a rozsah validace

Validace bude provedena pro všechna zařízení, která jsou určena k výrobě TLF.

Účelem prospektivní validace je průkaznost, že:

- Čištění je pro výrobu vhodné
- Čištění probíhá ve shodě s platnou dokumentací
- Je dosahováno specifických parametrů

- Dokumentace je správná a úplná
- Všechny odchylky jsou prověřeny a zdůvodněny<sup>[4]</sup>

Rozsahem prospektivní validace se rozumí:

- Ověření čistících procedur pro každé zařízení na nejméně 3 po sobě jdoucích operacích
- Proověření účinnosti
- Posouzení dosažených kritických parametrů
- Posouzení všech změn a odchylek<sup>[4]</sup>

#### 2.3.1.2. Validační tým

Pro validace musí být ustaven validační tým. Jeho úkolem je jednak příprava celé validace, ale také provedení validace. Na konci validace musí vypracovat validační zprávu a zhodnotit výsledky validace.<sup>[4]</sup>

#### 2.3.1.3. Popis procesu

Popis procesu se týká popisu zařízení a popisu čistících procedur. Jako zařízení pro výrobu se používá formulační kotel o objemu 1000l, sterilizační filtr, plnička s pístovou pumpou a kontejnery k dávkování pomocných látek nebo kádinky k dávkování léčivých látek. Procedury čištění jsou dvojího typu:

- Procedura SOP-R (ruční)
- Procedura SOP-A (automatické)

Procedura čištění SOP-R se používá pro pomůcky ve výrobě TLF. Automatické čištění se používá pro všechna zařízení potřebná pro výrobu. Čištění je prováděno vždy do jednoho dne od ukončení výroby. Znovu musí být zařízení použito opět do jednoho dne od čištění a sterilizace.<sup>[4]</sup>

#### 2.3.1.4. Metody testování

Do metod testování patří vizuální kontrola, vzorkování a analytické metody. Vizuální kontrolou hodnotíme viditelná znečištění vnitřních povrchů zařízení. Slouží také jako metoda k určení míst stěrů. Vzorkování je používáno k prokázání čistoty zařízení po automatickém čištění. Existuje několik způsobů odběrů vzorků :

- I. Odběr z oplachových tekutin
- II. Odběr z poslední oplachovací tekutiny
- III. Stěry produktu
- IV. Odběry kondenzátu-endotoxiny <sup>[4]</sup>

Ad I)

Vzorek je vždy odebírán z výpustného ventilu na začátku a na konci příslušného kroku čištění. Minimální množství odebraného vzorku pomocí vzorkovnic činí 500ml.

Ad II)

Vzorek je odebírán v poslední minutě oplachu po zastavení přívodu WFI.

Ad III)

Pro stěr každého produktu bude provedena studie k určení výtěžnosti, tzv. recovery. Proveďte se tak, že se na destičku ze stejného materiálu jako zařízení, nanese známé množství produktu, který bude stírán stejným způsobem jako zařízení. Výtěžnost individuálního stěru **R<sub>i</sub>** se vypočítá jako:

$$\mathbf{R_i} = 100 \times \text{nalezené množství/nanesené množství} \quad (\%)$$

Tato studie musí být opakována 6 x pro léčivou látku (API) i produkt. Výsledná hodnota bude průměrem dílčích hodnot. Jednotlivá místa stěru jsou jasně určena. Provádí se z plochy 25cm<sup>2</sup> pomocí polyuretanových tampónů, který se vyextrahuje ve zkumavce.

Ad IV)

Kondenzát bude odebírán pouze po automatickém čištění pomocí depyrogenizovaných vzorkovnic. Odebere se 100 ml kondenzátu po částečném odtoku.

Analytické metody se používají pro stanovení reziduí. Dělíme je na nespecifické metody, kam patří např. měření UV spektra, vodivosti a stanovení TOC (Total Organic Carbon) a specifické metody, jako jsou stanovení API pomocí HPLC, IMS nebo stanovení endotoxinů pomocí LAL testu.

### **Metody nespecifické:**

#### **1. měření UV spektra**

Porovnává roztok produktu proti oplachové tekutině v UV spektru.

#### **2. měření vodivosti**

Měří se vzorky oplachových tekutin před čištěním a po čištění.

#### **3. měření TOC**

Opět se měří vzorky oplachových tekutin jako u vodivosti. Vzorky stěrů se ředí.

### **Metody specifické:**

#### **1. HPLC**

Vzorek se připraví tak, že se k oplachové tekutině přidá koncentrovaný amoniak, tak aby měl vzorek pH 8,0-9,5.

#### **2. LAL test**

Vzorek se připraví tak, že se ke kondenzátu přidá 1 ml LAL činidla. Následuje inkubace a vyhodnocení. Pozitivní reakce poukazuje na přítomnost endotoxinů.

[4]

Mezi specifické metody patří i IMS ( Ion Mobility Spektrometry)

## 2.4. IMS- IONTOVÁ MOBILITNÍ SPEKTROMETRIE

IMS ( Ion mobility Spectrometry) je jednou ze specifických analytických metod, která se využívá pro validaci čištění výrobních zařízení ve farmaceutické výrobě.

Její použití je velice vzácné oproti tradičně používaných HPLC, TOC. Tato metoda byla vyvinuta na konci 70. let v USA. Pracuje za atmosférického tlaku, vyžaduje malé množství vzorku, má subnanogramovou citlivost a velice snadno se používá. IMS byla studována jako alternativa k HPLC pro validaci čistících postupů. Velkou výhodou měřením pomocí IMS je velká úspora času pro ověření čištění a vývoj čistící metody, peněz, materiálu a především vysoká citlivost metody. IMS je vhodná pro farmaceutické použití díky jejímu softwaru, který dovoluje snadný přístup k vývoji metody a autosampleru k maximalizaci rychlosti a stejnoměrnosti. Další výhodou je snadné ovládání injektoru kontrolovaného uživatelem a detekčními proměnnými.

Validace čistících postupů hrála dlouho kritickou roli ve farmaceutické výrobě v celosvětovém měřítku, jelikož prodlužovala dobu uvedení léčiva na trh a vedla k ekonomickým ztrátám. Většina farmaceutického průmyslu využívá k vyhodnocení stěrů z výrobního zařízení HPLC. Detekční limity pro tuto hodnotu jsou v hodnotách 10 ppm. IMS metoda umožňuje jak redukci času potřebného pro nastavení parametrů, tak pro vlastní měření. K vyhodnocení vzorku dochází při této metodě během 15 až 20 s, zatímco u HPLC je to 15 až 20 min. Výsledků celé sekvence vzorků u HPLC dosáhneme až druhý den, u IMS máme zanalyzované vzorky během jedné hodiny. <sup>[5,6]</sup>

### 2.4.1. SROVNÁNÍ HPLC a IMS

Tabulka 1: Srovnání HPLC a IMS <sup>[6]</sup>

	HPLC	IMS limit.test
Čas analýzy 1 vzorku (s)	Nad 600	5-20
Počet vzorků za hod.	6	Nad 30
Doby přípravy vzorku	Stejná	Stejná
Operační kvalifikace	Vysoká	Nízká
Cena vzorku	Vysoká	Nízká
Vývoj metody	Pomalý	Rychlý
Odpadní rozpouštědla	Ano-mobilní fáze	Nejsou
Možnosti analýzy	Ne	Ano
Poskytnuté informace	Koncentrace	Výsledky o čistotě nebo znečištění

### 2.4.2. IMS VERSUS TOC

TOC se využívá k měření organických sloučenin (tj. sloučeniny obsahující uhlík) ve vodních systémech. Organickými kontaminantami ve farmaceutické výrobě mohou být zbytky cukru, PVC, alkoholu. Jsou měřeny na základě vodivosti. Nevýhodou TOC je, že může poskytnout falešně pozitivní výsledky, jelikož vyhodnotí organický uhlík, ale nerozpozná zda jde o saponát nebo API.

TOC tak může prodlužovat dobu analýzy potřebným přečišťováním a reanalýzou. IMS na rozdíl od TOC vykazuje vysoce selektivní výsledky, zamezující vzniku falešných negativních a pozitivních výsledků. <sup>[7]</sup>

## 2.5. PRINCIP IMS

IMS je instrumentální analytická metoda, která je podobná metodě Time-of-flight MS. IMS využívá ionizované molekuly, které putují trubicí (drift tube) rozdílnou rychlostí a tato rychlost se vztahuje k jejich hmotnosti a geometrickému uspořádání. Lze zvolit pozitivní nebo negativní ionizaci, která napomůže zlepšit citlivost a identifikaci sloučenin. Chemická ionizace probíhá za atmosférického tlaku. Vzorek se zahřeje pomocí desorbční teploty na 290°C a následně odpaří a podléhá ionizaci pomocí  $\beta$  radiačního záření Ni<sup>63</sup>. Jedná se o tzv. chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI). Ionty nebo iontové shluky jsou pak separovány dle velikosti, hmotnosti a struktury. Po dopadu každý ion vytvoří specifický signál, který je funkcí iontové mobility. Iontová mobilita (K) je určena z proudové rychlosti ( $v_d$ - drift velocity), která je získána ionty v elektrickém poli (E) v drift tube.

$$V_d = K \cdot E \quad (\text{rovnice č.1})$$

Jednotlivé signály tvoří spektrum, které koresponduje s pásmem iontové mobility. Záznamy iontových spekter zůstávají uchovány v softwaru přístroje a jsou monitorovány. Během analýzy přístrojem IONSCAN se hledají ionty, jejichž píky mají maximum ve stejném časovém intervalu. Pokud ionty vyhovují těmto parametrům, dojde k zaznamenání substance jako „alarmu“. Pokud ionty nevyhovují těmto parametrům zaznamenána je, ale nespustí alarm.<sup>[9]</sup>

IMS využívá k analýze iontovou pohyblivost chemických látek v plynné fázi, určenou měřením záchytných rychlostí pod vlivem elektrického pole.

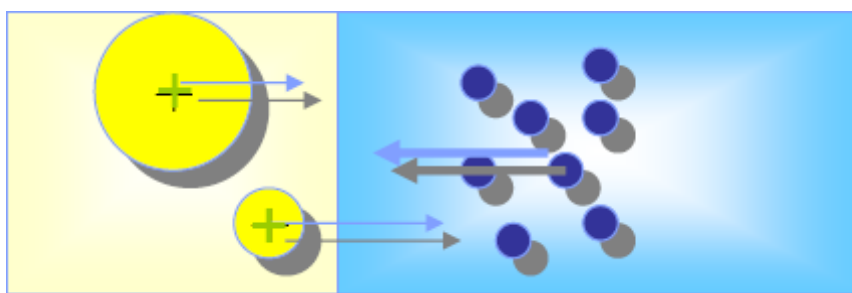
Výstupní napětí ze sběrné elektrody je monitorováno pomocí času (drift time), aby se detekovala přítomnost substancí. Výsledné signály jsou zobrazeny na plasmagramu.

Rychlost jakou se ion pohybuje je charakterizována otiskem palce (fingerprint).<sup>[8]</sup>

## 2.5.1. IONTOVÁ POHYBLIVOST

Iontová pohyblivost popisuje jak pohotově ionty, které se pohybují pod vlivem elektrického pole, mohou migrovat plynem. Pohyblivost iontů je charakteristická pro danou sloučeninu a závisí na velikosti, tvaru iontu a molekulách proudícího plynu. Iontová mobilita odpovídá přibližně reciproké hodnotě iontové hmotnosti. Kromě toho je závislá na tlaku, teplotě a převrácené hodnotě síly elektrického pole.<sup>[8]</sup>

**Obrázek 1: Pohyb iontů pod vlivem elektrického pole**<sup>[8]</sup>



Průměrná rychlost ( $v$ ) se vypočítá dle rovnice č.2

$$v = K \cdot E \quad (\text{rovnice č.2})$$

$v$  – průměrná rychlost (cm/s)

$K$  – iontová mobilita (cm<sup>2</sup>/Vs)

$E$  – síla elektrického pole (cm/s)

Teplota a tlak mohou být vyloučeny z rovnice použitím redukované iontové pohyblivosti tzv.  $K_0$ , která je vztažena na teplotu 273 °K a tlak 760 torrů.<sup>[8]</sup>

$$K_0 = K \left( \frac{273}{T} \right) \left( \frac{P}{760} \right) \quad (\text{rovnice č.4})$$

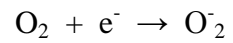
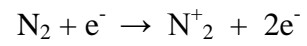
## 2.5.2. IONIZACE

IONSCAN-LS závisí na  $\beta$  zářiči (<sup>63</sup>Ni) a využívá chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI).

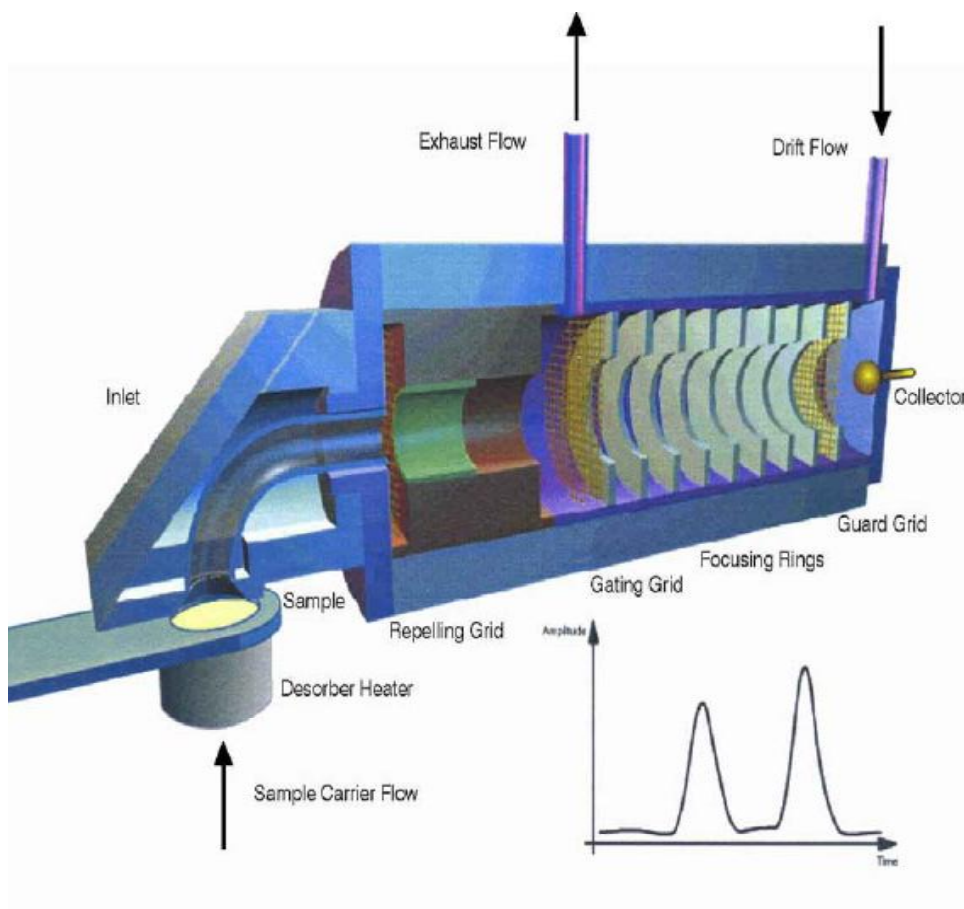
Molekuly soutěží o dostupný náboj podle jejich nábojové afinity v plynné fázi.



Chemická ionizace za atmosférického tlaku nejprve dává vzniknout primárním iontům pomocí elektrického nárazu v páře. Pozitivní ionty vznikají interakcí s dusíkem ( $N_2$ ). Negativní ionty využívají kyslík ( $O_2$ ).<sup>[8]</sup>



Obrázek 2: Princip IMS <sup>[10]</sup>



Vysvětlivky:

- Exhaust Flow – výfukový proud
- Drift Flow – nosný proud
- Collector – sběrací zařízení
- Guard Grid – ochranná část
- Focusing Rings – zaostřující část
- Gating Grid – vstupní mřížka
- Repelling Grid – odpuzující část
- Sample Carrier Flow – unášec vzorku
- Desorber Heater – desorpční ohřívač
- Inlet – vstup

## 2.6. PROVEDENÍ ANALÝZY

IMS zařízení se skládá ze systému, do kterého se zavádí vzorek, ionizačního zdroje, analyzátoru (používaného k separaci iontu dle jejich pohyblivosti), detektoru a počítače k získání dat. <sup>[10]</sup>

### 2.6.1. ZAVÁDĚNÍ VZORKU

Vzorek může být umístěn na teflonový substrát buď ručně nebo pomocí autosampleru. HPI vstřikovač přijme stejně dobře jak ruční tak i automatický vstřík. Vzorek je přemístěn směrem k vstupní ploše, kde je ohříváč, který uzavře prostor a automaticky spustí analýzu vzorku. Nakonec se vzorek teplem odpaří a nosný plyn nese páry do ionizační oblasti. <sup>[8]</sup>

### 2.6.2. TEPLOTNÍ DESORPCE

Teplotní desorpce je proces, kdy je vzorek na teflonovém substrátu zahřán a výpary jsou odvedeny pomocí hnacího plynu do ionizační komory. Vycházející vzduch proniká přes membránu a pohání desorbovanou páru k ionizační části. <sup>[8]</sup>

Typické teploty komponent jsou uvedeny v tabulce:

**Tabulka 2: Přehled teplot součástí IMS <sup>[8]</sup>**

	<b>Negativní ionty</b>	<b>Pozitivní ionty</b>
<b>Desorber</b>	233°C	285°C
<b>Vstupní otvor</b>	240°C	280°C
<b>Proudová trubice</b>	114°C	225°C
<b>HPI vstupní otvor</b>	300-400°C	300-400°C
<b>HPI přenosová trubice</b>	280°C	280°C

Teplota vstupního otvoru je nastavena výše než je teplota desorberu, aby zajistila kompletní odpaření vzorku a aby zbytky páry zůstaly před přepážkou.

Teplota proudové trubice je nastavena tak, aby zabránila fragmentaci díky vysokým teplotám a podporuje shlukování a adici při nižších teplotách u negativních iontů. <sup>[8]</sup>

### **2.6.3. HPI VSTŘIKOVAČ**

Vzorek je zaveden přes clonu a uživatel má na výběr zda použít horký nebo chladný vstřík při použití vstříkovače.

Při horkém vstříku je oblast HPI udržována na vysokých teplotách a vzorek je okamžitě po vstříku odpařen. U chladného vstříku je přístroj udržován na nižší teplotě a vzorek je odpařen následně zvyšující se teplotou.

HPI vstříkovač nabízí několik možností jak kontrolovat vstřík. Jedná se o monitorování a kontrolu teploty a fázování proudu. Vstřík o velkém objemu umožňuje vyvinout široký rozsah metod k optimalizaci analýzy. <sup>[8]</sup>

### **2.6.4. KONDENZAČNÍ TRUBICE**

Kondenzační trubice zachycuje odpadní produkty z IMS detektoru a zabraňuje jim tak v nahromadění. Je potřeba ji pravidelně vypouštět a kontrolovat. <sup>[8]</sup>

### **2.6.5. KALIBRANT**

Kalibrant je mezi analýzami neustále monitorován a je používán ke kompenzaci malých změn barometrického tlaku a teploty. Jeho známá iontová pohyblivost umožňuje plynulou kalibraci proudových časů. Systém monitoruje přesný proudový čas kalibrantu a používá jej k přesnému výpočtu proudového času vzorku.

IMS detektor má dva zásobníky kalibrantu, každý z nich má životnost přibližně pět let. <sup>[8]</sup>

**Tabulka 3: Přehled kalibrantů pro jednotlivé módy** <sup>[8]</sup>

<b>Kalibrant</b>	<b>Stav</b>	<b>K<sub>0</sub> rozsah</b>
Nikotinamid	Pozitivní	1.8550-1.8650
Isobutyramid	Pozitivní	1.5730-1.5830
4-Nitrobenzonitril	Negativní	1.6470-1.6570

### **2.6.6. REAKTANT**

Hexachlorethan je používán jako standard reaktantů v negativním stavu. V pozitivním stavu slouží jako reaktant nikotinamid. Kromě použití jako kalibrantu u pozitivního stavu se nikotinamid může použít jako reaktant. Některé sloučeniny v negativním stavu ionizují účinněji bez reaktantu. V těchto případech může být reaktant vynechán. <sup>[8]</sup>

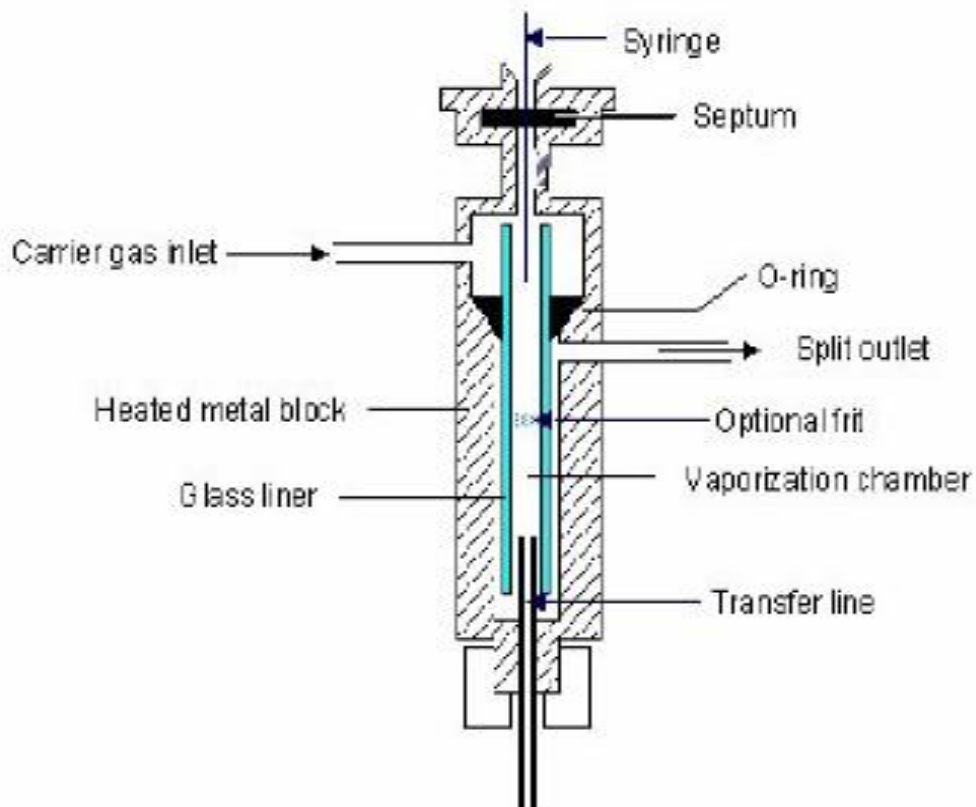
### **2.6.7. MODEL TOKU**

Model toku kontroluje tři cesty toku vzduchu. Proud proudí ze zadní části přístroje a nese kalibrant do systému. Proud taky umožňuje vyprazdňování trubice z důvodu nežádoucích iontů. <sup>[8]</sup>

### **2.6.8. KONTROLA HPI**

HPI obsahuje elektronické čidlo, které kontroluje nosný plyn a tlak při vstříku. <sup>[8]</sup>

Obrázek 3: Schéma HPI <sup>[10]</sup>



Vysvětlivky:

Syringe - jehla

Septum - přepážka

Split outlet - výpušť

Optional frit – frit

Vaporization chamber – odpařovací prostor

Transfer line – přenosná trubice

Glass liner – skleněný obal

Heated metal block – zahřátý kovový blok

Carrier gas inlet – vstup nosného plynu

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Měření jsem prováděla v laboratoři na oddělení kontroly kvality, v budově číslo 96 ve farmaceutické firmě Teva, Ostravská 29, 747 70 Opava-Komárov, Česká republika.

#### 3.1. VÝVOJ ANALYTICKÉ METODY

**Přístroj:** IONSCAN-LS, firmy Smiths Detection

**Software:** IM-station, verze č. 5389 <sup>[11]</sup>

**Princip:** Ion mobility Spectrometry

**Vzorek:** Naphazolini nitras, IvaxPharmaceuticals,s.r.o, výrobce Loba Feinchemie AG/Fischamed/Austria, šarže č. 0360120001

##### 3.1.1. PRODUKT VALIDACE

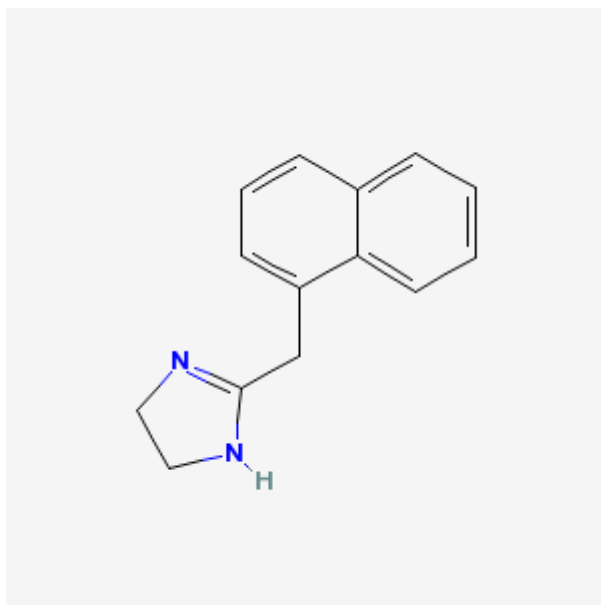
Farmaceutická substance Naphazolini nitras odpovídá sumárnímu vzorci  $C_{14}H_{15}N_3O_3$ . Vzhledově se jedná o bílý nebo téměř bílý krystalický prášek s relativní molekulovou hmotností 273,29. <sup>[12]</sup>

CAS 5144-52-5

Jedná se o 2 – (naftalen-1- ylmetyl)-4,5-dihydro-1H-imidazol-nitrát

Rozpustnost :mírně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v ethanolu 96%

**Obrázek 4: Strukturální vzorec Naphazolini nitras <sup>[12]</sup>**



Teplota tání: 167°C – 170° C

Skladování: chránit před světlem <sup>[12]</sup>

K vlastní validaci metody byl použit standard Naphazolini nitras š. 0360120001, Ivax-pharmaceutical Standard, vyrobený v Loba Feinchemie AG/ Fishamend/Austria

### **3.1.2. PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ**

**Ultrazvuková lázeň (PS1000A – SON 05)** - Ultrasonic compact cleaner 10L – č. 200507; s.č. 35209; výrobce: Notus – Powersonic s.r.o. Vráble, SR. Zařízení použité pro rozklad vzorku.

**Vodní lázeň (WBT 01)** s teploměrem TER 21 (A 100) - č. 35981; s.č. X03001; výrobce: LAURA DR.R. WOBSEER GMBH.

**Přístroj IONSCAN-LS (4 VOB -LS )**, serial number: 25326, HPI: H0504338, AUTOSAMPLER: 11840806, výrobce: Smiths Detection, 14 commerce Drive, Danbury.



**Analytické váhy** – BAL07; č. 66828 - AX205DR; výrobce: METTLER  
TOLEDO Určeno pro navažování chemikálií.

### 3.1.2.1. CHEMIKÁLIE

**Aceton:**  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ , šarže 4404301J,  $M_r$  58.08, výrobce: Fluka

**Ethanol:**  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , šarže S903546,  $M_r$  46.07, výrobce: Fluka

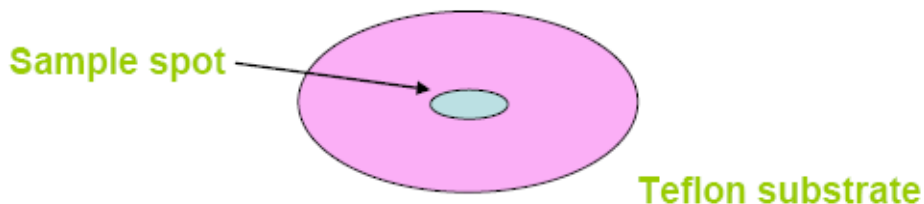
**Laboratorní vybavení:** Odměrné baňky, kádinky, zásobní nádoby na odpad a oplachy, pipety, navažovací náčiní

### 3.1.3. POSTUP PŘI ANALÝZE

1. Substrát obsahující zkoumaný vzorek se umístí na desorber udržovaný na teplotě  $290^\circ\text{C}$ . Do IONSCAN-LS IMS zařízení je vzorek zaváděn termální desorpcí z teflonového substrátu. Kromě této metody se dá použít vysokovýkonnostní injektor (HPI-High Performance Injector).

2. Vzorek se nanáší manuálně nebo pomocí autosampleru v množství 2-5  $\mu\text{l}$  na teflonový substrát. Do HPI je možné nanést větší množství vzorku.

**Obrázek 5: Způsob nanesení vzorku na teflonový substrát**



Vysvětlivky:

Sample spot – místo, kam se nanáší vzorek

Teflon substrate – teflonový substrát

3. Vzorek nanesený na substrát byl přenesen ke vstupnímu otvoru.
4. Jakmile se vzorek přesunul ke vstupnímu otvoru, byl díky vysoké teplotě odpařen a přeměněn na ionty o specifické iontové pohyblivosti.
5. Brána se otevřela a nechala ionty vstoupit z reakční do ionizační oblasti, ionty zde byly zaměřovány a urychlovány elektrickým polem podél hnací trubice, tak aby se dostaly ke sběrné elektrodě. Velikost proudu na elektrodě je proporční k počtu iontů, které k ní doputují. Detektor je vysoce selektivní, protože proudové časy jsou vysoce specifické pro danou sloučeninu.
6. Mikroprocesor v IONSCAN-LS monitoruje signál sběrné elektrody a detekuje přítomnost cílových iontů.
7. Výsledek analýzy je zachycen jako spektrum, které je nazýváno plasmagramem. Plasmagram může být ve 2D nebo 3D zobrazení. <sup>[8]</sup>

### 3.1.4. ZÁSADY PROVEDENÍ SPRÁVNÉ VALIDACE METODY

Krok 1. Zajištění patřičné výkonnosti přístroje použitím blanku a Instrument Performance Check.

Krok 2. Příprava vzorku o dané koncentraci

Krok 3. Určení pozitivního a negativního operačního módu.

Krok 4. Měření blanku a vzorku a sledování píku

- a) sběr dat ( křivka, alarmy, parametry pro sběr dat)
- b) nastavení kritérií pro detekci píku
- c) použití několika substancí

Krok 5. Opakované měření sloučeniny a určení koncentrace potřebné pro optimalizaci metody.

Krok 6. Analýza roztoků o vyšší a nižší koncentraci k určení toho, zda se odezva mění se zvyšující a snižující se koncentrací.

Krok 7. Analýza blanku po každém nástřiku k určení, zda nedochází k následné kontaminaci, tzv. carry over.

Krok 8. Kontrola desorpčního profilu. Optimalizace desorpční a vstupní teploty.

Krok 9. Optimalizace času potřebného k vypaření vzorku.

Krok 10. Odhad LOD a LOQ.

Krok 11. Připravit standardy LOD a LOQ a kontrola jejich odezev.

Krok 12. Další strategie vývoje metody.<sup>[10]</sup>



**Tabulka 4: Příprava vzorku o určité koncentraci:**

25 mg standardu rozpustíme ve 25 ml rozpouštědla	
1 ml tohoto roztoku smísíme s 9 ml rozpouštědla v 10 ml odměrné baňce	
Koncentrace naphazolinu v ppm ( $\mu\text{g/ml}$ )	Objem ( $\mu\text{l}$ )
0.01	2.5
0.02	5
0.03	7.5
0.04	10
0.05	12.5
0.06	15
0.07	17.5
0.08	20
0.09	22.5
0.1	25
0.2	50
0.3	75
0.4	100
0.5	125
0.6	150
0.7	175
0.8	200
0.9	225
1.0	250

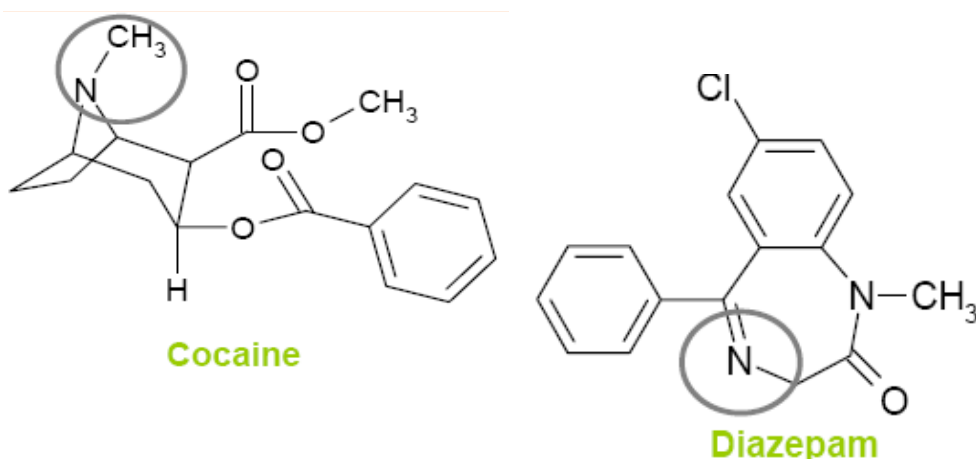
Navázila jsem 25 mg standardu naphazolinu, š. 0360120001 do odměrné baňky o objemu 25 ml a rozpustila v asi 10 ml acetonu. Na 10 minut jsem roztok vložila do ultrazvukové lázně a poté umístila do vodní lázně na 20 minut vytemperovat na teplotu. 20 °C. Po 20 minutách jsem baňku z lázně vytáhla a doplnila acetonem po rysku. 1 ml tohoto roztoku jsem odebrala do 10-ti ml odměrné baňky a přidala jsem asi 7 ml acetonu a dala vytemperovat na 20 minut do vodní lázně na 20°C a poté doplnila acetonem po rysku. Z takto připraveného roztoku jsem do 25 ml odměrných baněk odpipetovala předepsané množství dle tabulky a doplnila acetonem po rysku. Po protřepání jsem naplnila vialky roztoky o určité koncentraci v množství asi 1,5 ml a vialky uzavřela je.

### 3.1.5.3. Určení pozitivního nebo negativního módu

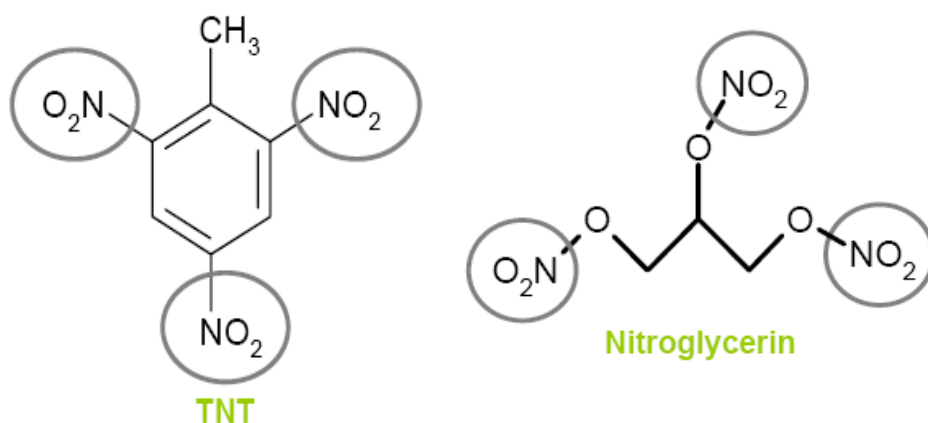
Připravila jsem určitou sekvenci vzorků o určitých koncentracích a sledovala jsem jejich odezvu na plasmagramu. Některé sloučeniny se více projeví v pozitivním a některé v negativním módu. Některé se mohou projevit v obou variantách, ale v těchto případech se pro měření použije mód pozitivní. Jednotlivé módy souvisí s chemickou strukturou sloučeniny.

**Obrázek 7: Příklady sloučenin projevující se v pozitivním a negativním módu** <sup>[10]</sup>

Sloučeniny projevující se v pozitivním módu:



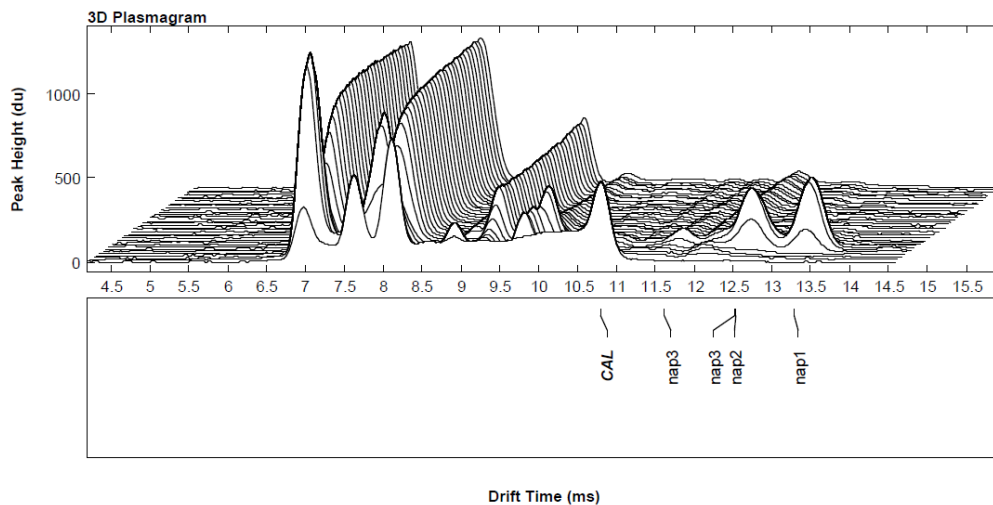
Sloučeniny projevující se v negativním módu:



## Obrázek 8: 3D Plasmagram negativního a pozitivního módu naphazolinu

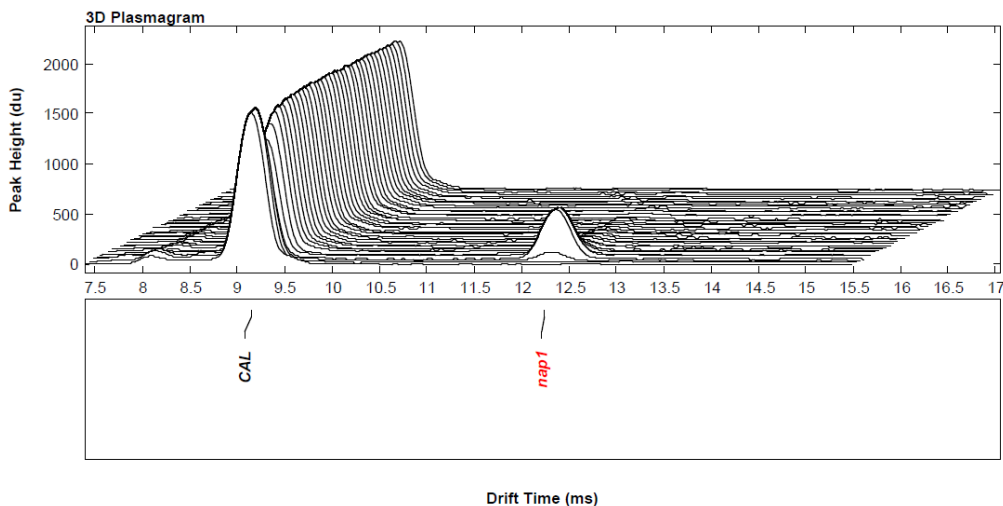
Context:

Mode: Negative Ion



Context: test naphazolinu

Mode: Positive Ion



Naphazolin standard, š. 0360120001 se projevil více v pozitivním módu jak je vidět na následujícím obrázku 8. V negativním módu byla zaznamenána nízká odezva a nejasné maximum.

### Vysvětlivky

**CAL** – pík kalibrantu

**Nap1** – pík naphazolinu

**osa y** - výška píku

**osa x** – drift time

**osa z** – desorpční čas

### 3.1.5.4. Nastavení alarmu k detekci píku

Alarm je nastaven a nadefinován pomocí funkce Gaussian fit. Je to soubor parametrů, podle kterých se detekují naměřené píky. Ze všech zalarmovaných píků v segmentu se udělá průměr.

#### Nastavení kritérií pro detekci píku:

**FWHM** (full width at half maximum) - šířka píku v polovině výšky, vyjádřená v  $\mu\text{s}$ , šířka detekovaného píku musí být maximálně 1,5 naprogramovaného FWHM.

**Variability** – časový interval v  $\mu\text{s}$ , ve kterém je ještě pík akceptován, její hodnota je 50, pík musí ležet v tomto rozmezí, aby byl detekován.

**Amplitude Thresold** –prahová hodnota amplitudy

**Block Thresold** – blokový práh

**Tabulka 5: Kritéria pro detekci píku**

	<b>K<sub>o</sub></b>	<b>Var.</b>	<b>B.Th</b>	<b>A.Th</b>	<b>FWHM</b>	<b>Hits</b>	<b>Bar</b>	<b>Min.s</b>	<b>Max.s</b>
Nap1	1.3917	50	1.0	20	360	1	1000	2	999
Nap2	1.3912	50	1.0	20	347	1	1000	2	999

#### Vysvětlivky:

**Nap1, Nap2** - názvy alarmů pro Naphazolini nitras

**K<sub>o</sub>** - iontová mobilita

**Var.** – variabilita

**B.Th.** – blokový práh

**A.Th.** – prahová hodnota amplitudy

**FWHM** – šířka píku

**Hits** – počet zalarmovaných píků

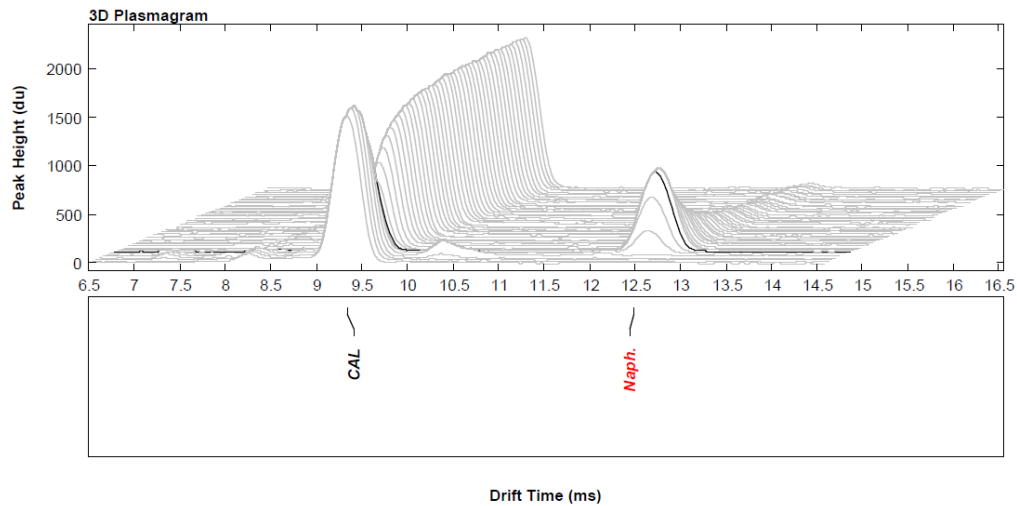
**Bar** – hodnota určující procentuální sílu alarmu



**Min.s.** – minimální počet segmentů

**Max.s.** – maximální počet segmentů

**Obrázek 9: Plasmagram detekovaného píku naphazolinu**

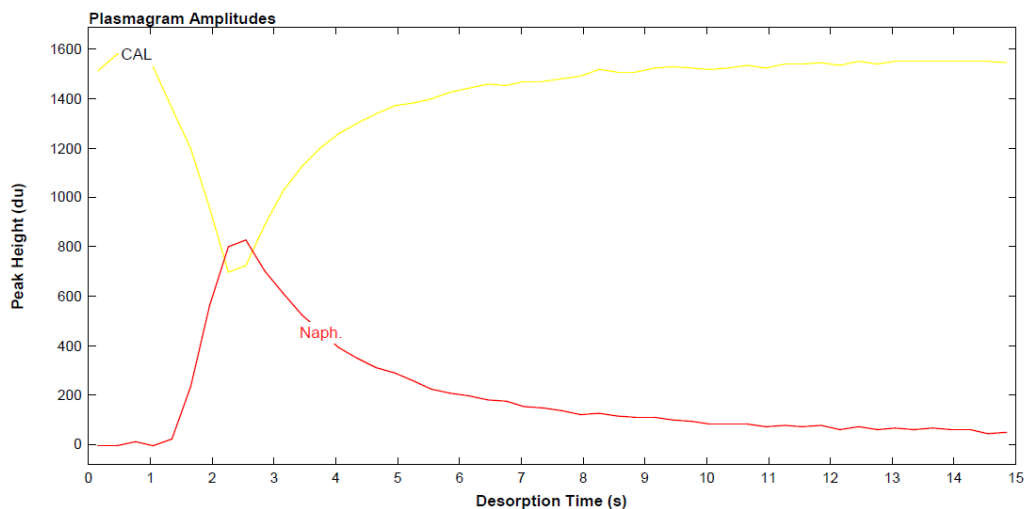


(Plasmagram: Pos\_Nap\_lin2. viz. Příloha II)

Vysvětlivky:

**Naph** – „zalarmovaný“ pík Naphazolinu

**Obrázek 10: Desorpční křivka vyjadřující závislost výšky píku na desorpčním čase**



Vysvětlivky

**CAL** - desorpční křivka kalibrantu

**Naph** – desorpční křivka Naphazolinu

**Obrázek 11: Podmínky měření**

Time: 14:25:23      Date: 24/02/2009      Instrument: IONSCAN-LS - 25326      Des. Time: 15.00 s      Segs: 50  
 Temps: (°C): Drift Tube: 236      Inlet: 296      Desorber: 290      Flows (cc/min): Drift: 300      Sample: 0  
 Path: C:\IONSCAN\_Data\Teva\DP\25326-(Pos\_Nap\_lin2)\\$25326-[POS\_NAP\_LIN2]-00001-0001716-058-[PRECONDITION-0.00-SAMPLE].POS  
 Alarms: Naph.

Channel Summary:

Channel	DTime	Ko	CF	Max Amp	Cum Amp	Delta	# Hits
CAL	9.342	1.8600	1.00000	1483		+46	
Naph.	12.485	1.3917	1.00000	817	10186	-35	45

Execution Details:

Procedure:Teflon Qual 01  
 AS Method:Aceton  
 HPI Method:No

KONIKOVA(KONIKOVA)

Vysvětlivky

Channel -označuje pík Naphazolinu a kalibrantu

DTime – drift time (ms) Naphazolinu a kalibrantu (viz. Plasmagram č.3, osa x)

K<sub>o</sub> – Iontová mobilita Naphazolinu a kalibrantu

Max Amp – maximální výška píku

Cum Amp – kumulativní výška píku

Delta – poměr DTime alarmu a detekovaného píku

Des.Time- čas desorpce

Segs – počet segmentů

Desorber – teplota desorberu 290 °C

Inlet – vstupní teplota 296 °C

Drift Tube – teplota v hnací trubici 236 °C

### 3.1.5.5. Opakované měření koncentrace pro optimalizaci metody

Provedla jsem opakované měření koncentrace, která dávala odezvu okolo 200 d.u. Provedla se změna nastavených parametrů metody a sledoval se vliv parametrů na vývoj odezvy vzorku o určité koncentraci.

Kontrolní parametry, které jsem měnila během analýz byly tyto, jsou uvedeny v tabulce 6.

Kompletní přehled kontrolních parametrů

(Sekvence: Pos\_Nap\_repeat2, Control Parametres, viz. Příloha II).

**Tabulka 6: Měněné kontrolní parametry**

<b>Instrument Control Parametres</b>
Inlet heater (°C)
Desorber heater (°C)
Scan period (ms)
Maximum analysis duration (s)
Maximum segments per analysis
Alarms
Numer of rinses with rinse
Rinse volume (µl)
Rinse fill rate
Sample volume (µl)
Sample fill rate
Pre-fill air volume (µl)
Post-fill air volume (µl)
Post dispense delay

### 3.1.5.6. Sledování odezvy při změně koncentrace

Provedla jsem měření vzorků o koncentracích ( 0,01 – 1 ppm). Odezva se zvyšovala s rostoucí koncentrací viz. obrázek 12.

Je vhodné měřit do koncentrace 1 ppm. U vyšších koncentrací by mohlo dojít k přesycení substrátu viz obrázek 13. Hodnota 0.01 ppm byla tak nízká, že ji přístroj nezaznamenal.

**Tabulka 7: Změna odezvy s rostoucí koncentrací:**

Actual µg/mL	maxA		cumA	
	Mean	RSD	Mean	RSD
0.020584	21	5.59%	21	5.59%
0.041168	32	13.82%	111	24.32%
0.061752	46	7.45%	257	10.19%
0.082336	91	7.52%	673	6.99%
0.10292	123	6.14%	881	5.10%
0.20584	261	5.08%	2560	2.47%
0.41168	420	3.02%	4852	2.23%
0.61752	547	1.67%	6417	2.36%
0.82336	682	1.26%	7832	1.85%
1.0292	681	1.31%	8112	1.93%

Vysvětlivky:

MaxA – maximální výška píku

CumA – kumulativní výška píku

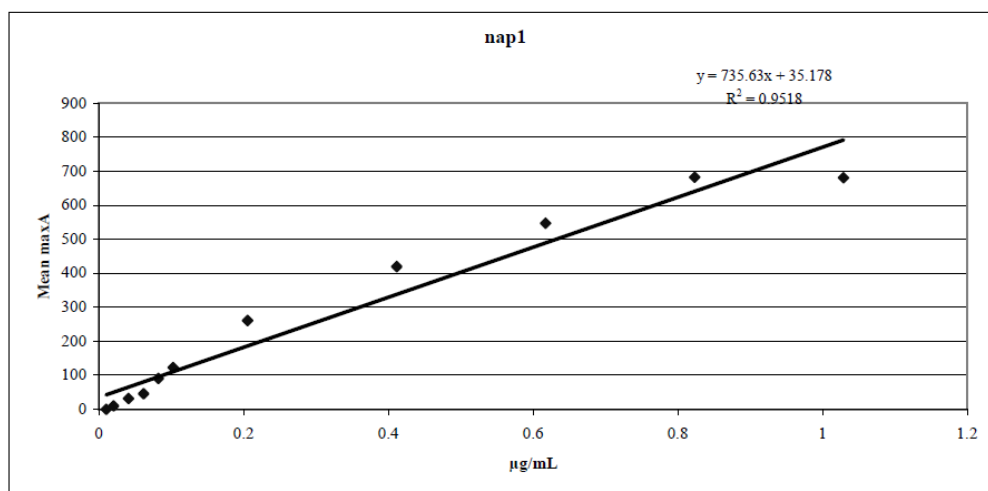
RSD – relativní směrodatná odchylka

**Obrázek 12: Závislost odezvy na koncentraci**

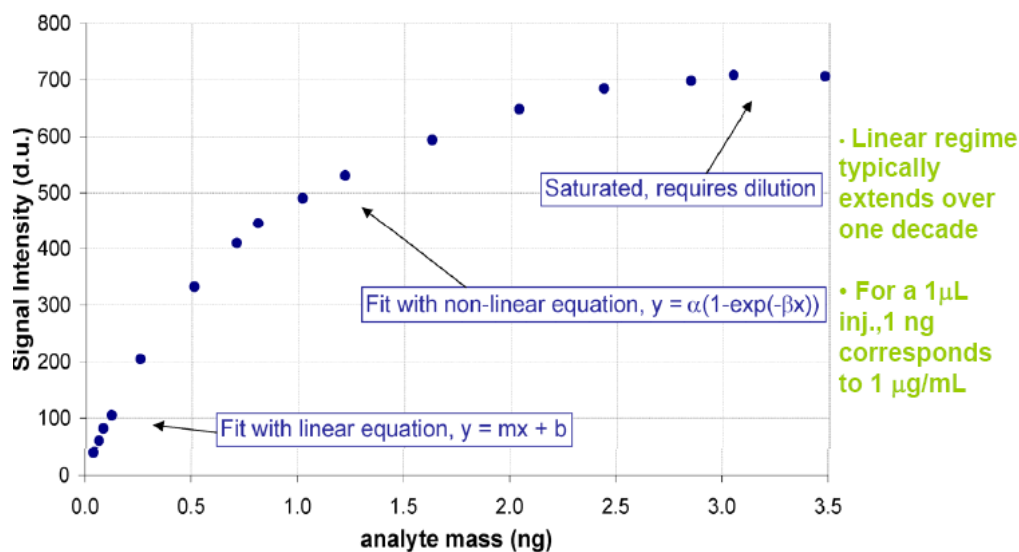
Instrument: IONSCAN-LS - 25326  
Peak: nap1 Ko: 1.3917

Mode: Positive  
Dtime: 12.298 ms

Method: Pos\_Nap\_DP\_1e-00007  
Est.Mass: 209 AMU



Obrázek 13: Výběr vhodné koncentrace



### 3.1.5.7. Určení následné kontaminace

Provedení střídavé analýzy blanku a vzorku k zjištění zda nedochází k tzv carry-over (kontaminaci). Pokud docházelo během analýzy ke kontaminaci, byly nastříkovány blanky i mezi jednotlivé vzorky, u vyšších koncentrací bylo třeba zvýšit počet nástřiků jednotlivých blanků.

Kontaminace může být způsobena teflonovým substrátem, teflonovým kroužkem, septem vialky, znečištěnou jehlou, kontaminovaným blankem, ionizační oblastí.

Tabulka 8: Příklad carry over:

SmpType	$\mu\text{g/mL}$	maxA(du)	cumA(du)	Hits
Cal.Standard	0.100756	235	1405	15
Cal.Standard	0.100756	242	1403	15
Blank	0	<b>30</b>	<b>57</b>	<b>2</b>
Blank	0	0	0	0
Blank	0	0	0	0

Protože při měření došlo ke carry-over, zavedla jsem nástřik blanků mezi vzorky. Zvyšovala jsem počet nástřiků blanků a používala jsme 99.9 % aceton pro HPLC.

**Tabulka 9: Eliminace carry over**

SmpType	µg/mL	maxA(du)	cumA(du)	Hits
Cal.Standard	0.618744	685	5367	37
Cal.Standard	0.618744	700	5151	32
Blank	0	0	0	0
Blank	0	0	0	0
Cal.Standard	0.824992	734	6448	42
Cal.Standard	0.824992	751	5683	30
Cal.Standard	0.824992	762	6489	39
Blank	0	0	0	0
Blank	0	0	0	0

#### 3.1.5.8. Kontrola desorpčního profilu

Optimalizace desorpčního profilu se provádí změnou nastavení desorpční teploty a teploty vstupní jako kontrolních parametrů metody.

#### 3.1.5.9. Optimalizace post dispense delay

Post dispense delay je čas potřebný k odpaření rozpouštědla. Každé rozpouštědlo potřebuje různou dobu k odpaření. Zkoušela jsem měnit v kontrolních parametrech metody Post dispense delay v rozmezí od 2 do 7 sekund, jako optimální čas jsem zvolila 5-6 sekund pro aceton a 20 sekund pro ethanol.

#### 3.1.5.10. Předpokládané hodnoty LOQ a LOD

PŘEDPOKLÁDANÉ LOD a LOQ na základě maximální odezvy o hodnotách 16 du a 40 du dle rovnic:

$$\text{LOD} = \text{mass of Sample} \times (16\text{d.u.} / R)$$

$$\text{LOQ} = \text{mass of Sample} \times (40\text{d.u.} / R)$$

LOD je nejnížší detekovatelná koncentrace látky.

LOQ je nejnížší koncentrace látky, kterou lze stanovit s přijatelnou přesností a správností.

**Tabulka 10: Vypočítané hodnoty LOQ a LOD vzorku o koncentraci 0.01 – 1 ppm:**

<b>koncentrace</b>	<b>odezva</b>	<b>LOD</b>	<b>LOQ</b>
0.010225	0	0	0
0.02045	0	0	0
0.040899	29	0.023	0.056
0.061349	33	0.030	0.074
0.081798	46	0.028	0.071
0.102248	77	0.021	0.053
0.204496	153	0.021	0.053
0.408992	354	0.018	0.046
0.613488	449	0.022	0.055
0.817984	606	0.022	0.054
1.02248	710	0.023	0.462

(Sekvence: Pos\_Nap\_linearity-00003, viz. Příloha II)

Rozsah je interval mezi nejnižším a nejvyšším stanoveným množstvím analytu, ve kterém je dosaženo deklarované správnosti, přesnosti a linearity. <sup>[13]</sup>

Výpočtem LOD a LOQ byl dán rozsah kalibrace 0.06-0.8 ppm.

Výpočtem LOD a LOQ byl dán rozsah kalibrace 0.06-0.8 ppm. Tyto hodnoty jsou pouze předpoklad, mohou se měnit v závislosti na různých podmínkách a nastavení.

V tabulce 10 jsou odezvy u koncentrace 0.01 a 0.02 tak nízké, že nevykazují žádnou odezvu.. Hodnota kvantifikačního limitu je 0.06 ppm, ale na základě výsledků předchozích měření jsem zvolila hodnotu vyšší - 0.08 ppm, která zajišťuje opakovatelnost odezev. Jako limit detekce byla vypočtena hodnota 0.02 ppm.

#### 3.1.5.11. Linearita

Linearita je schopnost dané analytické metody poskytnout výsledky, které jsou přímo úměrné koncentraci analytu v daném rozsahu. Minimální počet koncentračních úrovní musí být šest. Dokládá se korelačním koeficientem  $R^2$  a lineární přímkou. <sup>[10]</sup>

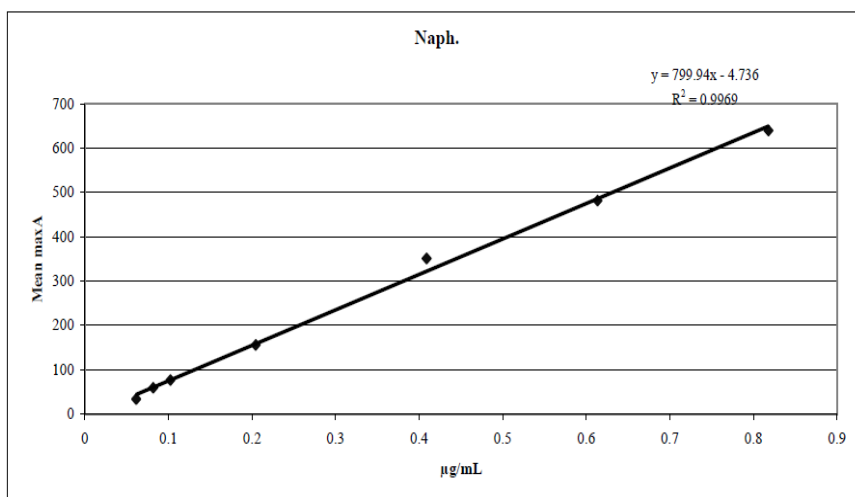
## 1. Měření linearity u koncentrací 0.06 – 0.8 ppm při dvou nástřicích

**Tabulka 11: Měření linearity u koncentrací 0.06-0.8ppm**

Actual µg/mL	maxA		cumA	
	Mean	RSD	Mean	RSD
0.061349	34	2.11%	228	1.55%
0.081798	59	9.59%	639	8.08%
0.102248	77	4.62%	847	12.61%
0.204496	156	5.44%	2055	13.80%
0.408992	351	3.22%	4291	4.71%
0.613488	482	3.23%	5897	4.33%
0.817984	640	2.43%	7528	3.56%

(Sekvence: Pos\_Nap\_lin2-00001, viz.Příloha II)

**Obrázek 14: Lineární přímka při prvním měření linearity (koncentrace 0.06-0.08ppm)**



## 2. Měření linearity při koncentracích 0.06 – 0.7 ppm při třech nástřicích

**Tabulka 12: Měření linearity při koncentracích 0.06-0.7 ppm**

Actual µg/mL	maxA		cumA	
	Mean	RSD	Mean	RSD
0.06131	60	7.64%	205	19.57%
0.081747	112	5.09%	541	2.52%
0.090961	130	3.88%	699	5.87%
0.102184	131	8.35%	724	4.16%
0.306552	402	1.08%	3257	3.97%
0.50534	621	0.92%	6435	1.54%
0.707476	726	1.86%	7710	3.50%



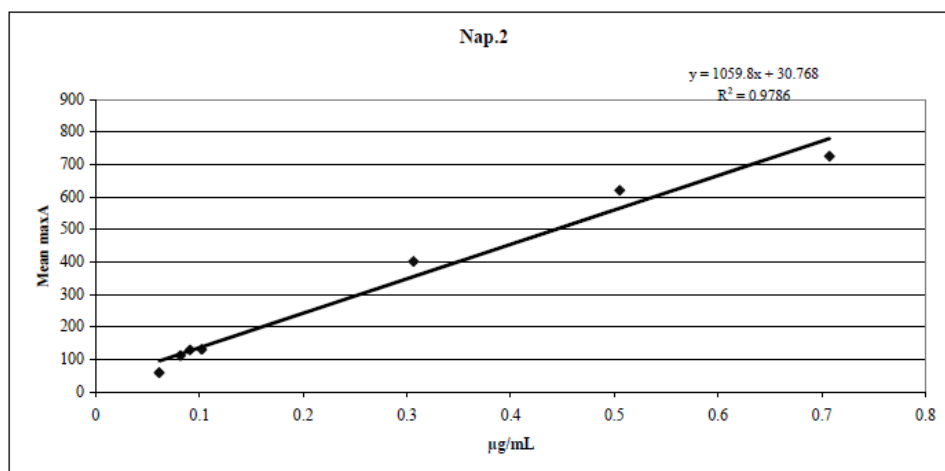
**Tabulka 13: Pořadí vzorků v sekvenci při druhém měření linearity**

SmpType	µg/mL	maxA(du)	cumA(du)	Hits
Cal.Standard	0.06131	65	173	4
Cal.Standard	0.06131	59	250	7
Cal.Standard	0.06131	56	192	5
Cal.Standard	0.081747	107	557	12
Cal.Standard	0.081747	110	535	10
Cal.Standard	0.081747	118	532	9
Cal.Standard	0.090961	125	658	12
Cal.Standard	0.090961	135	698	14
Cal.Standard	0.090961	129	740	15
Cal.Standard	0.102184	119	692	13
Cal.Standard	0.102184	140	752	15
Cal.Standard	0.102184	135	727	13
Cal.Standard	0.306552	400	3114	35
Cal.Standard	0.306552	407	3291	35
Cal.Standard	0.306552	399	3366	36
Cal.Standard	0.50534	627	6332	46
Cal.Standard	0.50534	619	6444	45
Cal.Standard	0.50534	616	6530	46
Cal.Standard	0.707476	740	7405	47
Cal.Standard	0.707476	726	7807	47
Cal.Standard	0.707476	713	7917	47

(Sekvence: Pos\_Nap\_kalibr2-00001, viz. Příloha II)

**Obrázek 15: Lineární přímka při druhém měření linearity**

UserID: KONIKOVA      Date: 03/12/2009  
 Instrument: IONSCAN-LS - 25326      Mode: Positive      Method: Pos\_Nap\_kalibr2-00001  
 Peak: Nap.2      Ko: 1.3997      Dtime: 12.414 ms      Est.Mass: 207 AMU



Počet nástřiků jsem při měření linearity zvyšovala, ale nepodařilo se mi při pěti nástřicích získat stejné odezvy. Nicméně dva nástřiky pro každou

koncentrační úroveň při měření linearity postačují i v případě HPLC. Při pěti nástřicích byla vždy jedna nebo dvě hodnoty mimo rozmezí. Také se lišily odezvy při použití starého a nového teflonového substrátu.

**Tabulka 14: Porovnání odezvy na starém a novém teflonovém substrátu**

Vzorek	koncentrace	Odezva u nového teflonu	Odezva u starého teflonu
Vzorek 1	0.08	96	25
Vzorek 1	0.08	110	34
Vzorek 1	0.08	114	34
Vzorek 2	0.09	144	42
Vzorek 2	0.09	146	41
Vzorek 2	0.09	154	41

Z tabulky vyplývá, že odezvy pro jednotlivé koncentrace se významně lišily. Zatímco u starého teflonového substrátu byly odezvy velice nízké, u nového teflonového substrátu dosahovaly vyšších hodnot. Při druhém měření linearity, byl použit nový teflonový substrát.

### Opakovatelnost

Opakovatelnost je mírou přesnosti, je naměření stejných výsledků v dané laboratoři v krátkém časovém úseku, stejným analytikem, na stejném zařízení, se stejnými chemikáliemi a roztoky. <sup>[13]</sup>

Přístroj Ioscan-LS zajišťuje velmi velkou přesnost výsledků, nicméně nebyla jsem schopna naměřit při dalších měřeních stejných vzorků stejné hodnoty, hlavně u velmi nízkých koncentrací. Opakovatelnost výsledků je zřetelná až u vyšších hodnot koncentrací. Před každým měřením bude třeba nejdříve provést kalibraci přístroje, aby podmínky měření byly identické. Nastavené parametry měření byly vždy stejné u dvou po sobě jdoucích měření, ale podmínky v laboratoři se mohly změnit.

## 3.2. VALIDACE ANALYTICKÉ METODY PRO VALIDACI ČIŠTĚNÍ

### 3.2.1. CHEMIKÁLIE

Viz vývoj metody.

### 3.2.2. PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

Viz vývoj metody.

- ocelová destička 5 x 5 cm<sup>2</sup>
- polyuretanový tampón- Large Swab TX 714A, Texwipe, NJ, USA

### 3.2.3. VZORKOVÁNÍ

Pro důkaz nečistot se používají následující způsoby vzorkování nečistot z vnitřních povrchů výrobních zařízení:

- odběr z oplachových tekutin
- odběr z poslední oplachové tekutiny
- stěry produktu <sup>[4]</sup>

Provedla jsem validaci analytické metody pomocí stěrů z ocelové destičky o velikosti plochy stěru 5 x 5 cm<sup>2</sup> simulující část výrobního zařízení, ze kterého se bude provádět stěr po ukončení výroby jednoho léčivého přípravku, aby se zabránilo kontaminaci následujícího léčivého přípravku účinnou látkou.

Kritéria přijatelnosti pro čistotu zařízení jsou dána maximálním znečištěním následného produktu (MAR, maximum allowable residue). Výpočet  $MAR_{API}$  je založen na minimální terapeutické dávce léčivé látky v maximální denní dávce v šarži následného produktu.

$$MAR_{API} = TD * SF * PDŠ / PDD$$

**TD** – minim.terapeutická dávka

**SF** – bezpečnostní faktor (závisí na povaze produktu i lékové formy)

**PDS** – počet dávek v šarži následného produktu

**PDD** – max. počet denní dávky následného produktu <sup>[4]</sup>

Jako kritérium přijatelnosti pro čistotu zařízení při výrobě Sanorinu-emulze, byla stanovena hodnota  $MAR_{API} = 3.27\mu\text{g} / 10 \text{ ml}$ . Proto jsem při validaci analytické metody vycházela z této hodnoty.

### **3.2.4. PŘÍPRAVA STĚRŮ**

Navážila jsem 32,7 mg standardu Naphazolinu do 25 ml odměrné baňky a rozpustila v acetonu a nechala na ultrazvukové lázni 10 minut. Poté jsem roztok temperovala po dobu 20 minut a doplnila acetonem po rysku. Z 50 ml baňky jsem odebrala 1 ml tohoto roztoku do 10 ml odměrné baňky a doplnila acetonem po rysku.

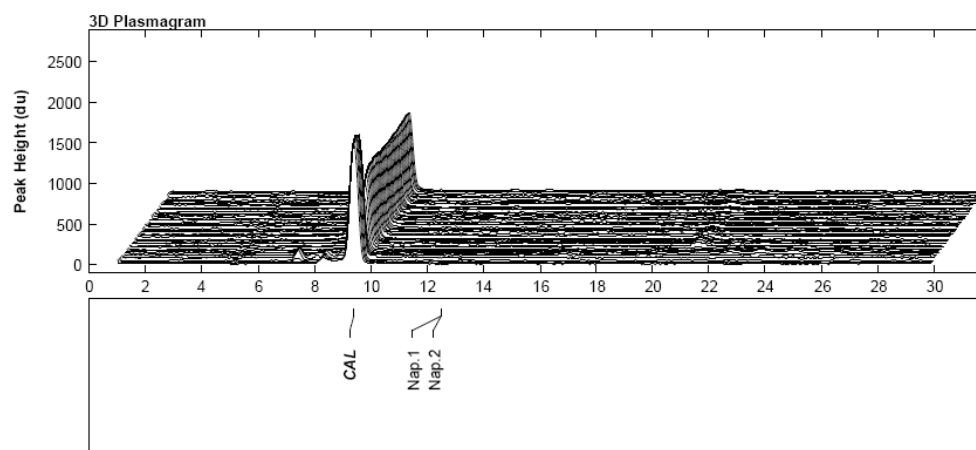
### **3.2.5. PROVEDENÍ STĚRU**

Z tohoto roztoku jsem odebrala pomocí Hamiltonovy mikropipety určité množství v  $\mu\text{l}$  na ocelovou destičku o ploše stěru  $5 \times 5 \text{ cm}^2$ . Rozpouštědlo jsem nechala volně odpařit a poté jsem stírala pomocí polyuretanových tamponů Large Swab do 25 ml odměrných baněk. Nejdříve jsem stírala pětkrát vertikálně a poté pětkrát horizontálně. Tampón jsem opláchla v baňce částečně naplněné acetonem a vyždímala tampón o hrdlo baňky. Baňky s tampónem jsem vložila do ultrazvukové lázně a poté tampóny opláchla acetonem a nechala vytemperovat a doplnila acetonem po rysku. Jednotlivými roztoky jsem naplnila vialky.

### 3.2.6. ODSTRANĚNÍ ZBYTKU REZIDUÍ ZE STĚROVÉ TYČINKY

Před každým měřením je třeba odstranit zbytky reziduí ze stěrových tampónů a to tak, že stěrový tampón jsem vložila do 10 ml baňky s acetonem a umístila na ultrazvukovou lázeň na 30 minut. Poté jsem tampóny opláchla acetonem, nechala vytemperovat po dobu 20 minut a doplnila acetonem po rysku. Roztok jsem převedla do vialek a provedla analýzu.

Obrázek č. 16: Odstranění zbytku reziduí ze stěrové tyčinky



(Plasmagram: Pos\_Nap\_EXTRAKCE, viz. Příloha II)

Na plasmagramu vidíme, že žádný pík neležel v blízkosti drift time produktu a stěrová tyčinka neobsahovala tudíž žádná rezidua.

Dále jsem postupovala dle validačního protokolu - **Cleaning Validation Protocol**, dle standardů Teva – Izrael QA FORM 944 (SOP LA-03-40).<sup>[14]</sup>

### 3.2.7. VLASTNÍ VALIDACE METODY

- **Základní informace**
- **Ověření blanku**
- **Určení limitu kvantifikace- QL**

- **Ověření limitu kvantifikace**
- **Přesnost**
- **Výtěžnost**
- **Test výtěžnosti stěru z ocelové destičky**

#### 3.2.7.1. Základní informace

**Název produktu:** Napahazolní nitras, šarže: 0360120001.

**Rozpouštědlo:** Aceton, šarže: 4404301J

**Typ stěru:** Polyuretanový tampón - Large Swab TX 714A.

**Metoda:** Swab injection indirect.

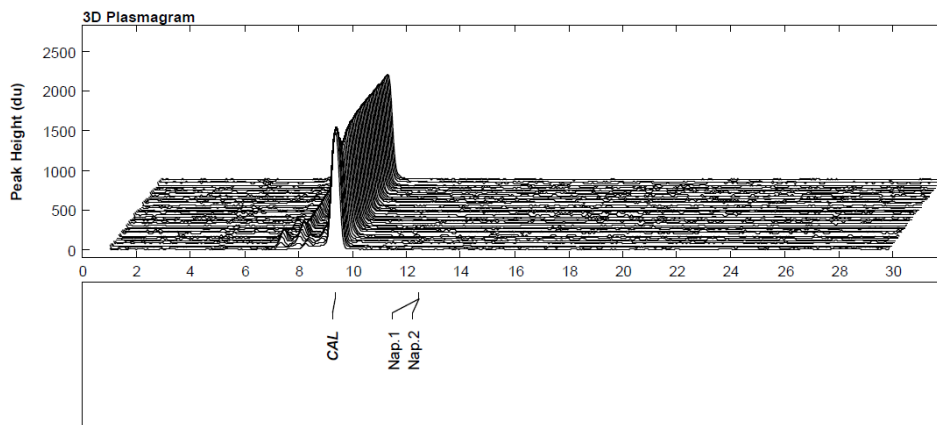
**Podmínky měření na IMS:** Ion mode Positive, Teflon dry.

#### 3.2.7.2. Ověření blanku

##### **Ověření blanku**

Na teflonový substrát jsem pomocí autosampleru nanesla rozpouštědlo a ověřila jsem, zda se na plasmagramu v místě očekávaného píku Napahazolinu, nevyskytuje v blanku nějaká nečistota, která by mohla narušit analýzu. Žádný pík neležel v blízkosti drift time produktu. Použitý blank vyhovoval analýze.

**Obrázek 17: Ověření blanku**



Na plasmagramu je jasně vidět, že blank neobsahoval žádné nečistoty.

(Plasmagram: Pos\_Nap-QL,blank,viz. Příloha II)

### **Ověření čistoty tampónů Large Swab analýzou blanku**

Postup stejný jako v kroku 3.2.6 (Odstranění zbytků reziduí ze stěrové tyčinky)

**Tabulka 15: Ověření čistoty tampónů Large Swab analýzou blanku**

SampleID	maxA			cumA	
	Mean	RSD	µg/mL	Mean	RSD
STYPE1	0	NA	NA	0	NA
STYPE2	0	NA	NA	0	NA
STYPE3	0	NA	NA	0	NA
STYPE4	0	NA	NA	0	NA
STYPE5	0	NA	NA	0	NA

(Sekvence: Pos\_Nap\_QL,blan3-00001, viz. Příloha II)

Označení v reportu v příloze

**Unknown1 – STYPE1**

**Unknown2 – STYPE2**

**Unknown3 – STYPE3**

**Unknown4 – STYPE4**

**Unknown5 – STYPE5**

## Ověření blanku ve stěru z ocelové destičky

Připravila jsem si 3 odměrné baňky o objemu 25 ml, do kterých jsem nalila asi 5 ml acetonu a vložila do nich polyuretanový tampón Texwipe. Smočeným tampónem jsem udělala 5 vertikálních a 5 horizontálních nátěrů a poté stejným postupem stěry. Tampón jsem opláchla acetonem do baňky a doplnila po rysku. Takto připravenými roztoky jsem naplnila vialky a vložila je do přístroje k analýze.

**Tabulka 16: Ověření blanku ve stěru z ocelové destičky**

SampleID	maxA			cumA	
	Mean	RSD	µg/mL	Mean	RSD
SWAB1	0	NA	NA	0	NA
SWAB2	0	NA	NA	0	NA
SWAB3	0	NA	NA	0	NA

(Sekvence:Pos\_Nap\_QL,blan3-00001, viz. Příloha II)

Označení v reportu v příloze

**Unknown6 – SWAB 1**

**Unknown7 – SWAB 2**

**Unknown8 – SWAB 3**

### 3.2.7.3. Určení limitu kvantifikace

Limit kvantifikace se určí tak, že se najde nejnižší koncentrace, při které produkt vykazuje odezvu. Provedla jsem měření od 0.02 po 0.7 ppm. Hodnoty okolo 0.02 a 0.04 ppm vykazují buď nízkou odezvu nebo žádnou.

Kvantifikačním limitem by měla být hodnota 0.06 ppm, ale při vývoji metody se ukázalo, že při některých měřeních vykazoval také nízkou odezvu, proto jsme jako kvantifikační limit zvolili koncentraci 0.08 ppm.



**Tabulka 17: Určení limitu kvantifikace**

Actual µg/mL	maxA		cumA	
	Mean	RSD	Mean	RSD
0,020392	26	19,41%	36	27,50%
0,040784	46	4,66%	218	16,87%
0,061176	87	8,99%	502	0,28%
0,081568	91	5,47%	575	0,49%
0,15294	181	0,39%	1417	6,94%
0,2549	246	8,05%	2051	10,55%
0,40784	411	2,93%	4430	3,03%
0,56078	481	2,06%	5862	4,34%
0,71372	554	5,24%	6611	4,83%

(Sekvence: Pos\_Nap\_QL,blan3-00001, viz. Příloha II)

#### 3.2.7.4. Ověření limitu kvantifikace

Připravila jsem si roztok o koncentraci kvantifikačního limitu 0.08 ppm a zanalyzovala ho šestkrát. Ověřila jsem RSD všech šesti analýz. Jejich průměrné RSD se nesmělo lišit o více jak 15%.

**Tabulka 18: Ověření kvantifikačního limitu 1**

SampleID	maxA			cumA		
	Mean	RSD	µg/mL	Mean	RSD	µg/mL
sample1	46	17,57%		335	30,17%	
sample2	64	5,81%		651	13,16%	

1. Sekvence Pos\_Nap\_QL,veri2- zde jsem měřila dva vzorky o koncentraci QL, RSD prvního vzorku byla 17.57 % , tato hodnota je vyšší než 15 % , ale je to způsobeno opakovanou analýzou konkrétní vialky ve více sekvencích. Druhý vzorek byla vialka s roztokem připraveným v čase měření, RSD vzorku bylo 5.81 %.

(Označení v reportu unknown1,2)

**Tabulka 19: Ověření kvantifikačního limitu 2**

SampleID	maxA			cumA		
	Mean	RSD	µg/mL	Mean	RSD	µg/mL
Sample1	63	14,18%		543	12,57%	

2. Sekvence Pos\_Nap\_QL,veri3 – zde jsem měřila pouze jeden vzorek, jednalo se o opakované měření vzorku 2 z 1. sekvence. Hodnota RSD se zvýšila na hodnotu 14.18 %, díky opakování analýzy stejného vzorku.

(označení v reportu unknown1)

### 3.2.7.5. Přesnost

Připravila jsem si dva zásobní roztoky A a B ze dvou navážek. Z každého zásobního roztoku jsem připravila roztoky o koncentracích 80, 100, 120 % QL.. Přesnost jsem testovala, tak, že se provedly 3 nástřiky každé koncentrace navážky A i B (tj. šesti roztoků). Ověřila jsem průměrné RSD ze tří nástřiků všech šesti roztoků a průměrné RSD koncentrační úrovně navážek A a B. Maximální přípustná hodnota RSD je 15 %.

**Zásobní roztok A** – 25.770 mg / 25 ml

**Zásobní roztok B** – 25.520 mg / 25 ml

**Tabulka 20: Koncentrace jednotlivých vzorků při dvou navážkách**

Standart / označení v sekv.	Zásobní roztok A / B	koncentrace
1 (Unknown1)	A	0.061848
2 (Unknown2)	A	0.082464
3 (Unknown3)	A	0.10308
4 (Unknown4)	B	0.061248
5 (Unknown5)	B	0.081664
6 (Unknown6)	B	0.10208

**Tabulka 21: Naměřené hodnoty odezev zásobních roztoků A a B**

SampleID	maxA			cumA		
	Mean	RSD	µg/mL	Mean	RSD	µg/mL
sample 0.06A	29	5.97%		114	51.85%	
sample 0.06B	24	14.43%		54	16.80%	
sample 0.08A	47	3.27%		382	18.61%	
sample 0.08B	53	6.58%		402	8.73%	
sample 0.1A	85	9.17%		766	9.88%	
sample 0.1B	80	11.77%		773	16.41%	

**Tabulka 22: Hodnoty RSD při 80, 100, 120 % koncentrace QL**

Standard	RSD 80 %	RSD 100 %	RSD 120 %
A	5.97	3.27	9.17
B	14.43	6.58	11.77
průměr	10.2	4.925	10.47

### 3.2.7.6. Provedení stěru a stanovení výtěžnosti

#### **Příprava zásobního roztoku:**

Navázila jsem 25mg standardu Naphazolinu do odměrné baňky o objemu 25 ml a rozpustila ho v 10 ml acetonu na ultrazvukové lázni po dobu 10 minut. Roztok jsem dala vytemperovat na 20 minut při teplotě 20 °C na vodní lázeň a po 20 minutách jsem roztok z lázně vytáhla a doplnila acetonem po rysku. Z takto připraveného roztoku jsem odebrala množství 1 ml do 10-ti ml odměrné baňky a doplnila asi 5 ml acetonu a dala opět vytemperovat za stejných podmínek. Po temperaci jsem roztok doplnila do objemu 10 ml acetonem. Z tohoto připraveného zásobního roztoku jsem provedla stěrovou metodu i kalibraci.

#### **Kalibrace**

Příprava standardu:

Ze zásobního roztoku jsem odebrala požadované množství dle tabulky 4 do odměrných baněk o objemu 25 ml, tak abych dostala koncentrace: **0.08; 0.17; 0.26; 0.33; 0.4; 0.55; 0.7**

V kalibraci musí být zahrnuty koncentrace o hodnotě 80, 100 a 120 % kritéria přijatelnosti.

**Tabulka 23: Kalibrační standardy**

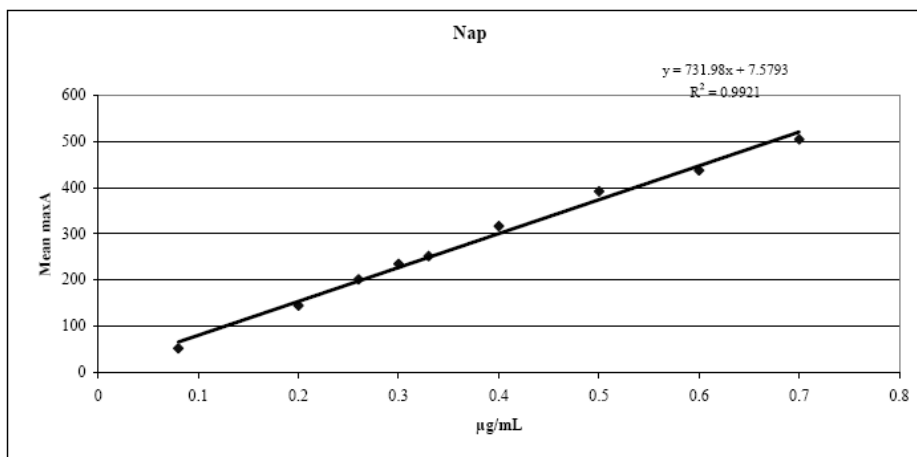
Actual µg/mL	maxA		cumA	
	Mean	RSD	Mean	RSD
0,08	86	13,16%	599	7,68%
0,17	200	0,00%	1619	11,23%
0,26	303	2,80%	2744	5,62%
0,33	388	3,28%	3632	5,47%
0,4	409	1,38%	4001	5,16%
0,55	512	0,69%	5204	2,34%
0,7	583	0,36%	6143	3,59%

**Obrázek 18: Kalibrační křivka**

UserID: KONIKOVA  
Instrument: IONSCAN-LS - 25326  
Peak: Nap Ko: 1.3997

Date: 04/30/2009  
Mode: Positive  
Dtime: 12.309 ms

Method: stery+kal-00001  
Est.Mass: 207 AMU



### Příprava stěru

Ze zásobního roztoku jsem odebrala vypočítané množství roztoku a nanesla ho na ocelovou destičku o ploše 5 x 5 cm<sup>2</sup> a stírala pětkrát vertikálně a pětkrát horizontálně tampónem Large Swab do 25 ml odměrných baněk. Tuto baňku jsem i s tampónem nechala 10 minut na ultrazvukové lázni a 20 minut nechala temperovat při teplotě 20 °C. Tampóny jsem opláchla acetonem a pořádně vyždímala o hrdlo baňky a opět nechala 20 minut temperovat a doplnila acetonem po rysku.

### Výpočet nanášeného množství na ocelovou destičku:

Jako kritérium přijatelnosti byl stanoven limit: 3.27 µg / 10 ml  
Jelikož jsem stírala do 25 ml odměrných baněk, které mají větší velikost hrdla,  
z důvodu rozměru tampónu, hodnota limitu se 2,5 krát zvýšila na hodnotu  
8.175 µg / 25 ml

### Výpočet :

100 µg.....1000 µl

8.175 µg.....x

x = 81.75 µl

8.175 µg / 25 ml = 0.327 µg / ml

0.327 µg / ml.....100 %

Toto je stoprocentní nanášená koncentrace, pro výtěžnost je důležité nanášet 3  
koncentrační úrovně a to 80, 100 a 120 % .

0.327 ppm je limit, čili 100 → 0.26 ppm - 80%

→ 0.4 ppm – 120 %

**0.26 ppm** – 80 % - nanese množství 66 µl

**0.33 ppm** –100% -nanese množství 82 µl

**0.4 ppm** - 120% -nanese množství 98 µl

### **Stanovení výtěžnosti - Recovery**

Výtěžnost stěrové metody byla hodnocena pomocí experimentu, kdy na  
destičku se stejným povrchem jako zařízení bylo nanese známé množství  
Naphazolinu na třech koncentračních úrovních, poté byl proveden stěr a  
vypočítalo se recovery, dle následujícího vzorce:

$$R_i = 100 \times \text{nalezené množství} / \text{nanesené množství} \quad [\%]$$

## Kalibrace

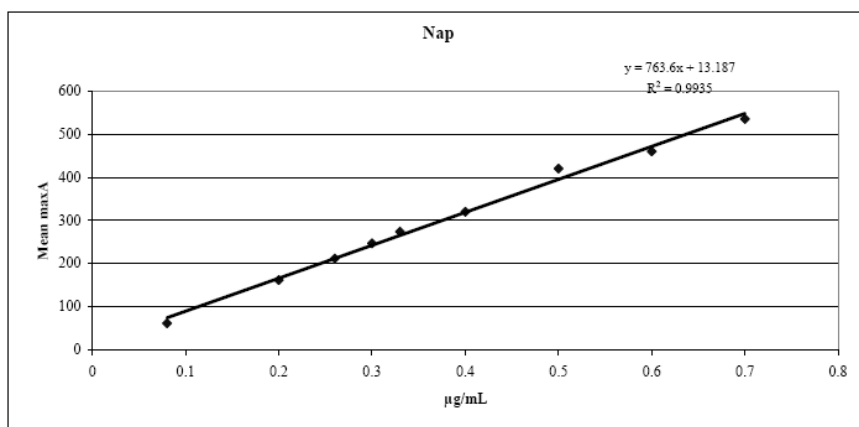
Před měřením výtěžnosti jsem provedla kalibraci přístroje. Jako kalibrační standardy byly použity roztoky o koncentracích uvedených v Tabulce 24.

**Tabulka 24: Kalibrace při měření výtěžnosti**

µg/mL	maxA	µg/mL	cumA
0,08	62	0,08	524
0,2	162	0,2	1774
0,26	212	0,26	2473
0,3	247	0,3	2972
0,33	274	0,33	3415
0,4	320	0,4	4184
0,5	420	0,5	5237
0,6	460	0,6	5724
0,7	535	0,7	6896

**Obrázek 19: Kalibrační křivka při měření výtěžnosti**

UserID: KONIKOVA  
 Instrument: IONSCAN-LS - 25326  
 Peak: Nap Ko: 1.3997  
 Date: 04/30/2009  
 Mode: Positive  
 Dtime: 12.31 ms  
 Method: stery+kal-00001  
 Est.Mass: 207 AMU



**Tabulka 25: Vypočítané koncentrace stěrů z kalibrační křivky**

SampleID	maxA			cumA		
	Mean	RSD	µg/mL	Mean	RSD	µg/mL
stěr 1	199	11,04%	0,2433353	2022	8,57%	0,2114635
stěr 2	218	3,24%	0,2682175	2282	2,97%	0,2368869
stěr 3	225	1,26%	0,2773846	2329	0,43%	0,2414826
stěr 4	321	4,41%	0,4031055	3244	7,41%	0,3309533
stěr 5	321	1,99%	0,4031055	3390	1,44%	0,3452294
stěr 6	350	3,44%	0,4410836	3767	4,19%	0,3820933
stěr 7	383	5,54%	0,4843002	4123	6,04%	0,4169037
stěr 8	424	0,33%	0,5379934	4623	0,60%	0,4657948
stěr 9	428	0,17%	0,5432318	4772	1,93%	0,4803643

(Sekvence:stery+kal-00001, viz.Příloha II)

**Tabulka 26: Vypočítané hodnoty výtěžnosti stěrů**

Číslo stěru	Nanesená Koncentrace (ppm)	Nalezená koncentrace (ppm)	Recovery (%)
<b>Stěr 1</b>	<b>0.26</b>	<b>0.2433353</b>	<b>93.59</b>
<b>Stěr 2</b>	<b>0.26</b>	<b>0.2682175</b>	<b>103.16</b>
<b>Stěr 3</b>	<b>0.26</b>	<b>0.2773846</b>	<b>106.69</b>
<b>Stěr 4</b>	<b>0.33</b>	<b>0.4031055</b>	<b>122.15</b>
<b>Stěr 5</b>	<b>0.33</b>	<b>0.4031055</b>	<b>122.15</b>
<b>Stěr 6</b>	<b>0.33</b>	<b>0.4410836</b>	<b>133.66</b>
<b>Stěr 7</b>	<b>0.4</b>	<b>0.4843002</b>	<b>121.07</b>
<b>Stěr 8</b>	<b>0.4</b>	<b>0.5379934</b>	<b>134.50</b>
<b>Stěr 9</b>	<b>0.4</b>	<b>0.5432318</b>	<b>135.81</b>

Hodnoty výtěžnosti by měly být v rozmezí 80 – 120 %. Naměřené hodnoty byly vyšší, a to mezi 93.59 – 135.81 %. Provedla jsem více měření, ale hodnoty výtěžnosti dosahovaly opakovaně vyšších hodnot. Bylo to způsobeno patrně tím, že jsem na ocelovou destičku nanášela velmi nízké koncentrace nebo špatnou technikou stěru. Při validaci metody pro HPLC docházelo velice často k těmto hodnotám.

### 3.2.7.7. Linearita

Linearitu jsem ověřovala pomocí zásobního roztoku připraveného ( viz vývoj metody) z jedné navážky na sedmi koncentračních úrovních. Pro každou koncentrační úroveň byly provedeny dva nástřiky.

**Tabulka 27: Měření linearity**

Actual µg/mL	maxA		cumA	
	Mean	RSD	Mean	RSD
0,08041	45	9,43%	410	5,52%
0,17087	88	5,66%	1238	13,66%
0,261331	147	9,17%	2441	11,10%
0,33169	192	4,42%	3181	7,80%
0,402048	238	6,54%	3810	7,89%
0,552816	316	4,92%	4846	9,68%
0,703584	418	4,06%	6574	8,23%

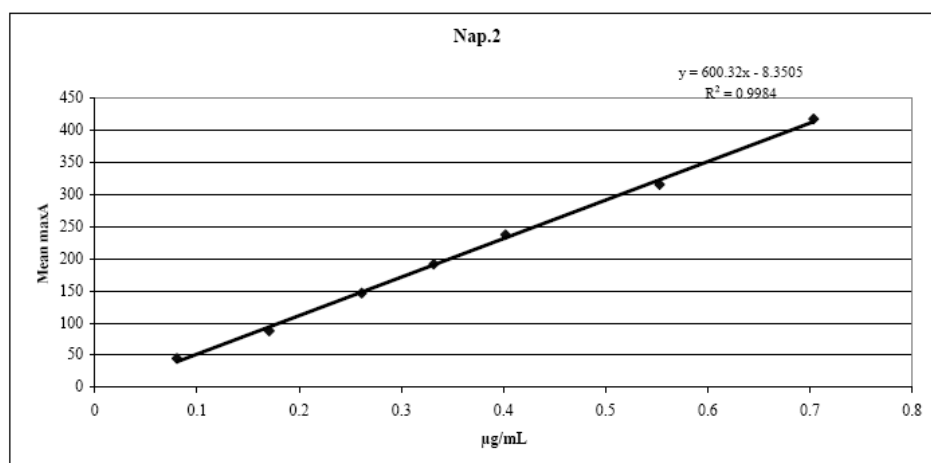
(Sekvence: Pos\_Nap\_ster-sp6-00001, viz. Příloha II)

**Obrázek 20: Lineární přímka**

UserID: KONIKOVA  
Instrument: IONSCAN-LS - 25326  
Peak: Nap.2 Ko: 1.3997

Date: 04/10/2009  
Mode: Positive  
Dtime: 12.419 ms

Method: Pos\_Nap\_ster-sp6-00001  
Est.Mass: 207 AMU





### 3.2.7.8. Opakovatelnost

Opakovatelnost jsem ověřila tak, že jsem z jedné navážky připravila zásobní roztok a z něj ředěním ( viz.tabulka č.4) standard o koncentraci 0.33 ppm, což je 100 % koncentrace kritéria přijatelnosti a sěr o koncentraci 0.33 ppm a provedla jsem 6 nástřiků obou roztoků.

**Tabulka 28: Měření opakovatelnosti standardu**

Actual µg/mL	maxA		cumA	
	Mean	RSD	Mean	RSD
0,33	194	6,92%	3397	7,71%

**Tabulka 29: Měření opakovatelnosti sěru**

SampleID	maxA			cumA		
	Mean	RSD	µg/mL	Mean	RSD	µg/mL
Unknown1	200	7,72%		2990	5,48%	

(Sekvence: Pos\_Nap\_0.33 ver-00001, viz. Příloha II)

Z výsledků je vidět jasná shoda odezev standardu a sěru o koncentraci 0.33 ppm.

## 4. KOMENTÁŘ K VÝSLEDKŮM A ZÁVĚR

V provedeném a dokumentovaném vývoji metody pro Naphazolini nitras dle zásad správné validace metody jsem provedla převážnou část předepsaných kroků a ověřila linearitu a přesnost metody. Během vývoje metody jsem se zabývala výběrem vhodného rozpouštědla, aby analýza proběhla co nejnadhěji. Na základě rozpustnosti a vhodných vlastností byl zvolen jako optimální rozpouštědlo aceton.

Bylo také potřeba zajistit správnou výkonnost přístroje pomocí IPC. Jako kontrolní látka byla zvolena substance tricyklického antidepressiva, amitriptylin.

Dalším krokem bylo stanovení pozitivního a negativního módu, na základě chemické struktury pozitivní mód vykazoval jednoznačnou odezvu. Následujícím bodem vývoje metody bylo nastavení alarmu pomocí funkce Gaussian fit. Následně jsem ověřila, že s rostoucí koncentrací roste odezva.

K optimalizaci metody byly třeba měnit nastavení jednotlivých kontrolních parametrů, během analýz jsem měnila hlavně sample volume, rinse volume, post - dispense delay. Byla provedena střídavá analýza blanku a vzorku k předcházení kontaminace, u vyšších koncentrací se toto riziko potvrdilo, proto byl zaveden větší počet nástřiků blanku mezi vzorky. Byla provedena linearita a z výsledných odezev byly vypočítány hodnoty detekčního a kvantifikačního limitu. Na základě vypočítaných hodnot byl proveden rozsah kalibrace. Naměřené signály byly adekvátní vypočítaným hodnotám. Posledním krokem vývoje metody je optimalizace metody, kterou se budou zabývat jiní pracovníci kolegové.

V další části experimentu jsem se podílela na validaci analytické metody pro validaci čištění při výrobě tekutých lékových forem. Vlastní validaci musela předcházet extrakce tampónu v rozpouštědle, aby se vyloučila možnost kontaminace. Během validace jsem částečně postupovala dle Validačního protokolu Tevy v Izraeli „Cleaning Validation Protocol, dle standardů Teva – Izrael QA FORM 944 (SOP LA-03-40)“.

Nejprve jsem ověřila blank, poté jsem určila kvantifikační limit a následně jej ověřila šesti nástřiky. Byla stanovena přesnost vzorků ze dvou

navážek o koncentracích 80, 100, 120 % kvantifikačního limitu. Bylo provedeno vzorkování standardem na ocelovou destičku, která simulovala výrobní zařízení a následně pomocí stěrů polyuretanovým tampónem vyhodnocena výtěžnost. Jako kritérium přijatelnosti pro stěry byla stanovena koncentrace 3,27mg/10 ml. V poslední části validace byla měřena linearita a opakovatelnost hodnot kritérií přijatelnosti ze stěru a standardu.

Z výsledků měření vyplývá, že se bude muset před každým měřením provést kalibrace, aby výsledky kalibrace korespondovaly s výsledky měření. Kalibrace může být buď vícebodová (tzn. z více koncentračních úrovní, minimálně šesti), jejíž výsledkem bude kalibrační křivka, nebo jednobodová kalibrace provedena pomocí jednoho standardu jak je tomu u HPLC, s nímž se porovná vzorek o koncentracích 80, 100 a 120 % limitu přijatelnosti.

Dalším řešením je u vícebodové kalibrace provést pouze jeden nástřik, aby hodnota RSD byla nulová, protože přístroj tuto hodnotou započítává do rovnice kalibrační přímky a to se projeví i na vypočtené koncentraci neznámého vzorku. Tato záležitost se bude řešit v následujícím období.

V budoucnu se začne validovat analytická metoda pomocí HPI. Tato metoda bude metodou přesnější a bude schopna zajisti lepší reprodukovatelnost výsledků.

## 5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. <http://teva.cz/> staženo 30.11.2008
2. PAVELEK, Z.  
GMP pro výrobu léčivých přípravků, Ivax Pharmaceuticals s.r.o,  
Opava, 2004, s. 37 - 55
3. KOMÁREK, P , RABIŠKOVÁ, M. A KOLEKTIV  
Technologie léků, třetí, přepracované vydání, Galén, s.r.o, Praha,  
2006, s. 361 - 375, ISBN 80 – 7262 – 423 -7
4. PAVELEK, Z.  
Validace, Galena a.s., 2000, s. 1 - 39
5. YANXI, T, DEBONO, R.  
IMS for drugmaking, Journal Today's Chemist at week, November  
2004, Vol.13, No II
6. MUNDEN , R.  
IMS limit test Improves Cleaning Verification and Metod  
Developement, Journal Pharmaceutical Technology Europe, October  
2002
7. [http:// TOC.cz/](http://TOC.cz/) staženo 1.2.2009

8. SMITH DETECTION  
User Guide for IMS, Smith Detection
  
9. [http:// smith.detection.com/](http://smith.detection.com/) staženo 3.12.2008
  
10. SMITH DETECTION  
Training course for IMS, Smith Detection
  
11. SMITH DETECTION  
Software manual for IMS, Smith Detection
  
12. MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČESKÉ REPUBLIKY, Český  
lékopis 2005, doplněk 2006, Evropská část, Praha – Grada  
Publishing a.s., 2006, s. 4318, ISBN 80-247-1939-8
  
13. HUSEK, A.  
Validace analytických metod, Útvar řízení jakosti, Opava, 2006, SOP/  
QA/025/V3
  
14. Cleaning Validation Protocol, Teva – Izrael QA FORM 944 (SOP)

## 6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Nap	Naphazolini nitras
IMS	Ion mobility Spectrometry
CumA	Kumulativní odezva
MaxA	Mmaximální odezva
OTC	Volně prodejné léčivé přípravky
API	Aktivní účinná látka
TAPI	Divize pro výrobu účinných substancí
QC	Útvar kontroly kvality
QA	Útvar jištění jakosti
SVP	Správná výrobní praxe
RA	Registrace
HAPI	Vysoce účinná aktivní farmaceutická látka
MZ ČR	Ministerstvo zdravotnictví
Mze ČR	Ministerstvo zemědělství
EHS	Evropské hospodářské společenství
FDA	Food and Drug Administration
CFR	Code of Federation Regulation
SOP	Standardní operační postup
SOP R	Standardní operační postup pro ruční čištění
SOP A	Standardní operační postup pro automatické čištění
SPC	Statistical Process Control
ANOVA	Analysis of Variety
PIC	Pharmaceutical inspection convention
VMP	Validační Master Plan
VP	Validační protokol
VR	Validační zpráva
SVR	Souhrnná validační zpráva
OQ	Operační kvalifikace
IQ	Instrumentální kvalifikace
PQ	Procesní kvalifikace
TOC	Total organic carbon

HPLC	Vysokoučinná Kapalinová Chromatografie
Ri	Výtěžnost stěrů
IPC	Instrument Performance Check
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
HPI	High Performance Injector

## 7. SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1</b>	Pohyb iontů pod vlivem elektrického pole <sup>[8]</sup>
<b>Obrázek 2:</b>	Princip IMS <sup>[10]</sup>
<b>Obrázek 3:</b>	Součásti HPI <sup>[10]</sup>
<b>Obrázek 4:</b>	Strukturní vzorec Naphazolinu <sup>[12]</sup>
<b>Obrázek 5:</b>	Způsob nanesení vzorku na teflonový substrát <sup>[8]</sup>
<b>Obrázek 6:</b>	Test amitriptylinu
<b>Obrázek 7:</b>	Příklady sloučenin projevující se v negativním a pozitivním módu <sup>[10]</sup>
<b>Obrázek 8:</b>	Plazmagram negativního a pozitivního módu naphazolinu
<b>Obrázek 9:</b>	Plazmagram detkovaného píku naphazolinu
<b>Obrázek 10:</b>	Desorpční křivka vyjadřující závislost výšky píku na desorpčním čase
<b>Obrázek 11:</b>	Podmínky měření
<b>Obrázek 12:</b>	Závislost odezvy na koncentraci ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>Obrázek 13:</b>	Výběr vhodné koncentrace
<b>Obrázek 14:</b>	Lineární přímka při prvním měření linearity
<b>Obrázek 15:</b>	Lineární přímka při druhém měření linearity
<b>Obrázek 16:</b>	Odstranění zbytků reziduí ze stěrové tyčinky
<b>Obrázek 17:</b>	Ověření blanku
<b>Obrázek 18:</b>	Kalibrační křivka
<b>Obrázek 19:</b>	Kalibrační křivka při měření výtěžnosti stěrů
<b>Obrázek 20:</b>	Lineární křivka
<b>Obrázek 21:</b>	HPI
<b>Obrázek 22:</b>	IMS



**Obrázek 23:** Příprava stěrů z ocelové destičky

## 8. SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1:</b>	Srovnání mezi HPLC a IMS <sup>[6]</sup>
<b>Tabulka 2:</b>	Přehled teplot součástí IMS <sup>[8]</sup>
<b>Tabulka 3:</b>	Přehled kalibrantů pro jednotlivé módy <sup>[8]</sup>
<b>Tabulka 4:</b>	Příprava vzorku o určité koncentraci
<b>Tabulka 5:</b>	Kritéria pro detekci píku
<b>Tabulka 6:</b>	Změněné kontrolní parametry
<b>Tabulka 7:</b>	Změna odezvy s rostoucí koncentrací
<b>Tabulka 8:</b>	Příklad carry-over
<b>Tabulka 9:</b>	Eliminace carry-over
<b>Tabulka 10:</b>	Vypočítané hodnoty LOQ a LOD vzorku
<b>Tabulka 11:</b>	Měření linearity u koncentrací 0.06-0.8ppm
<b>Tabulka 12:</b>	Měření linearity při koncentracích 0.06-0.7 ppm
<b>Tabulka 13:</b>	Pořadí vzorků v sekvenci při druhém měření linearity
<b>Tabulka 14:</b>	Porovnání odezev na starém a novém teflonovém substrátu
<b>Tabulka 15:</b>	Ověření čistoty tampónu LargeSwab analýzou blanku
<b>Tabulka 16:</b>	Ověření blanku ve stěru z ocelové
<b>Tabulka 17:</b>	Určení limitu kvantifikace
<b>Tabulka 18:</b>	Ověření kvantifikačního limitu
<b>Tabulka 19:</b>	Ověření kvantifikačního limitu 2
<b>Tabulka 20:</b>	Koncentrace jednotlivých roztoků při dvou navážkách
<b>Tabulka 21:</b>	Naměřené hodnoty odezev zásobních roztoků A a B
<b>Tabulka 22:</b>	Hodnoty RSD při 80, 100, 120 % koncentrace maximálního limitu

<b>Tabulka 23:</b>	Kalibrační standardy
<b>Tabulka 24</b>	Kalibrace při měření výtěžnosti
<b>Tabulka 25</b>	Vypočítané koncentrace stěrů z kalibrační křivky
<b>Tabulka 26</b>	Vypočítané hodnoty výtěžnosti stěrů
<b>Tabulka 27</b>	Měření linearity
<b>Tabulka 28</b>	Měření opakovatelnosti standardů
<b>Tabulka 29</b>	Měření opakovatelnosti stěrů

## 9. PŘÍLOHY

### 9.1. PŘÍLOHA I

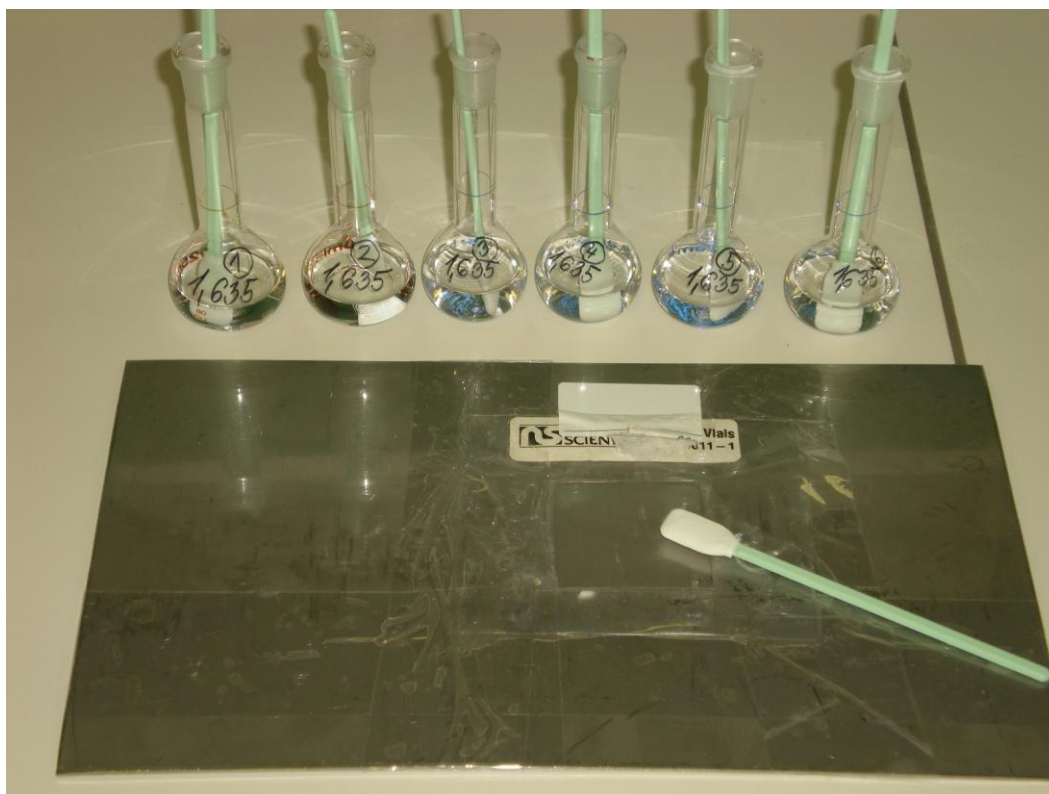
Obrázek 21: HPI (High Performance Injector)



Obrázek 22: IMS (Ion Mobility Spectrometry)



Obrázek 23: Příprava stěrů z ocelové destičky



## **9.2. PŘÍLOHA II**

### **Přehled spuštěných sekvencí v systému:**

**Amitryptilin2 – 00001**

**Pos\_Nap\_repeat2 Control Parametres**

**Pos\_Nap\_linearit – 00003**

**Pos\_Nap\_lin2-00001**

**Pos\_Nap\_kalibr2\_00001**

**Pos\_Nap\_QL,blan3 - 00001**

**Pos\_Nap\_QL,veri2 - 00001**

**Pos\_Nap\_QL,veri3 – 00001**

**Pos\_Nap\_stery + kal - 00001**

**Pos\_Nap\_ster-sp6 - 00001**

**Pos\_Nap-0.33 ver – 00001**

### **Přehled Plasmagramů:**

**Pos\_Nap\_lin2 – 00001**

**Pos\_Nap\_extrakce**

**Pos\_Nap\_QL,blank**