

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



MATEJA SKOK

UVEDBA ELEMENTOV DOBRE KONTROLNE LABORATORIJSKE PRAKSE V
ANALIZNE LABORATORIJE FAKULTETE ZA FARMACIJO

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom docenta dr. Staneta Pajka in somentorstvom docenta dr. Jožka Cesarja.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju docentu dr. Stanetu Pajku in somentorju docentu dr. Jožku Cesarju za zaupanje, strokovne nasvete, ter izredno pomoč pri izdelavi magistrske naloge.

Zahvalila bi se tudi partnerju Roku, hčerki Maruši in sinu Aljažu za vso ljubezen, podporo in potrpežljivost.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom docenta dr. Staneta Pajka in somentorstvom docenta dr. Jožka Cesarja.

Mateja Skok

Predsednik diplomske komisije:

prof. dr. Janez Kerč

Član diplomske komisije:

doc. dr. Tomaž Bratkovič

Ljubljana, 2016

VSEBINA

Povzetek	4
Summary.....	5
Seznam okrajšav	6
1. Uvod.....	8
Cilji GMP:	8
Zahteve GMP:	8
1.1 Razvoj dobre proizvodne prakse	9
1.2 Zakonodaja, povezana z GMP.....	10
1.3 Farmakopeja	13
1.4 Dobra laboratorijska praksa.....	15
Poglavje 1: Zagotavljanje kakovosti (23).....	16
Poglavje 2: Osebe (24).....	16
Poglavje 3: Prostori in oprema (25)	16
Poglavje 4: Dokumentacija (26).....	17
Poglavje 5: Proizvodnja (27).....	18
Poglavje 6: Kontrola kakovosti	18
Poglavje 7: Pogodbeno delo (31)	22
Poglavje 8: Pritožbe, odpoklic izdelkov in razkrivanje v nujnih primerih (32)	22
Poglavje 9: Notranji nadzor (33).....	23
2. Namen dela.....	24
3. Predloge SOP za izvajanje analiz v analiznih laboratorijih FFA.....	25
3. 1. SOP-HPLC	27
3. 2. SOP-Tehtnica	33
3. 3. SOP-pH-meter.....	36
3. 4. SOP-UV-VIS-Spektrofotometer	39
3. 5. SOP-FT-IR-Spektrofotometer.....	42
3. 6. SOP-GC.....	45
4. Sklep.....	49
5. Literatura:	50

Povzetek

Zdravila imajo pomembno vlogo v življenju, saj z njimi podaljšujemo in zvišujemo kakovost življenja. Da zdravila izpolnjujejo namen, morajo biti varna, učinkovita in kakovostna. Zahteve za dokazovanje varnosti in učinkovitosti zdravil so v zakonodajo prvi vnesli v ZDA leta 1938 po tragediji, ko so kot topilo za sulfanilamid uporabili toksičen dietilen glikol. Zahteve glede varnosti in učinkovitosti natančno definirata Dobra laboratorijska praksa in Dobra klinična praksa.

Zahteve glede kakovosti zdravil so jasneje definirali kasneje, žal še po eni tragediji; kontaminaciji tablet s sulfotiazolom s fenobarbitalom (ZDA, leta 1941). Tedaj so prvič tudi definirali izraz Dobra proizvodna praksa (GMP), del katere je tudi Dobra kontrolna laboratorijska praksa (GCLP). Od takrat dalje se je regulativa na področju farmacije začela močno razvijati in postopoma je zatem večina razvitih držav sprejela smernice GMP. Nadaljni razvoj je v devedesetih letih prejšnjega stoletja prinesel harmonizacijo dobrih praks v izogib podvajanju testiranj in s tem povezanim stroškom (ICH-smernice GMP).

Namen GMP je doseganje kakovosti in s tem zagotavljanje dosledne izdelave in kontrole izdelka po merilih za kakovost. Del GMP je tudi GCLP, pomembne elemente slednje, predvsem iz stališča nadaljnje priprave Standardnih operativnih postopkov (SOP), smo podrobneje opisali v drugem delu magistrske naloge. V nadaljevanju sledijo opisani SOP-ji za inštrumente, ki se nahajajo v izobraževalno raziskovalnem laboratoriju za analizo zdravil na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. SOP-ji predstavljajo pomembnejši dejavnik GCLP. Z uvedbo le-teh v laboratorije bomo pripomogli k izboljšanju kakovosti izvajanja analiz, zaupanja do dela v takšnih laboratorijih in pripomogli k zmanjšanju števila okvar drage analizne opreme. V prihodnje bi bilo seveda smotno vpeljati tudi ostale smernice GCLP, kot so npr. Dobra dokumentacijska praksa. S tem bi predvsem izboljšali sledljivost vseh aktivnostih, povezanih z opremo in vzorci v analiznih laboratorijih.

Summary

Medicinal products have an important role in life; they prolong our lives and improve the quality of life. To serve their purpose they must be safe, efficient and of good quality. The requirement to prove their safety and efficiency was first introduced to the legislation in the USA in 1938. This act was a consequence of a tragic event where toxic diethylene glycol was used as solvent for sulphanilamide. The requirements on safety and efficiency are defined in detail by Good Laboratory Practice and Good Clinical Practice.

A clear definition of required quality of medicinal products was formed later, unfortunately after another tragedy; a contamination of sulfathiazole pills with phenobarbital (USA, 1941). At that time the term Good Manufacturing Practice (GMP) was first defined. Part of GMP is also Good Control Laboratory Practice (GCLP). Since then the regulations in the field of pharmacy has began to develop greatly and gradually most of the developed countries accepted the GMP directives. Further development has brought harmonization of good practices in the nineties. The reason was to avoid the duplication of tests and associated costs (ICH-GMP directives).

The aim of GMP is to achieve quality and to ensure consistent manufacturing and control of the product according to the set criteria. GCLP is also part of GMP. Important GCLP elements, primarily from the preparation of standard operation procedures (SOP) point of view, are described in the second part of Master's thesis. In continuation, the SOPs for the instruments in the educational research laboratory for analytics at Faculty of pharmacy in Ljubljana of medicinal products are described. SOPs are one of the more important GCLP aspects. By introducing SOPs in the laboratories we will improve the quality of implemented analyses, confidence to work in such laboratories and contribute to reduced number of failures of the expensive analytical equipment. In the future it would be prudent to introduce also other GCLP directives, such as Good Documentation Practice. The main benefit of doing this would be an improved traceability of all activities associated with the equipment and samples in the analytical laboratories.

Seznam okrajšav

ATC	Avtomatsko upravljanje temperature (ang. <i>Automatic temperature compensation</i>)
[A]	Avtomatski zaključek meritev (ang. <i>Auto endpoint</i>)
CFR	Zbirka zveznih predpisov (ang. <i>Code of Federal Regulations</i>)
CTD	Skupni Tehnični dokument (ang. <i>Common Technical Document</i>)
EDQM	Evropski direktorat za kakovost zdravil (ang. <i>European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care</i>)
EMA	Evropska agencija za zdravila (ang. <i>European Medicines Agency</i>)
EU	Evropska unija
ES	Evropski svet
FDA	Zvezni urad za hrano in zdravila (ang. <i>Food and Drug Administration</i>)
FS	Nacionalni dodatek k evropski farmakopeji (<i>Formularium Slovenicum</i>)
GC	Plinska kromatografija (ang. <i>Gas Chromatography</i>)
GCP	Dobra klinična praksa (ang. <i>Good Clinical Practice</i>)
GLP	Dobra laboratorijska praksa (ang. <i>Good Laboratory Practice</i>)
GCLP	Dobra kontrolna laboratorijska praksa (ang. <i>Good Control Laboratory Practice</i>)
GMP	Dobra proizvodna praksa (ang. <i>Good Manufacturing Practice</i>)
He	Helij
H ₃ PO ₄	Fosforjeva (V) kislina
HPLC	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
ICH	Mednarodna konferenca za harmonizacijo (ang. <i>International conference on Harmonization</i>)
FT-IR	Infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo (ang. <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
JAZMP	Javna agencija za zdravila in medicinske pripomočke
KBr	Kalijev bromid
MeCN	Acetonitril
MeOH	Metanol
MRA	Sporazum o medsebojnem priznavanju (ang. <i>Mutual Recognition Agreement</i>)
NF	Nacionalni dodatek k ameriški farmakopeji (ang. <i>National Formulary</i>)

OECD	Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj (ang. <i>Organization for economic Co-operation and Development</i>)
OMCL	Uradni kontrolni laboratorij (ang. <i>Official Medicine Control Laboratories Network</i>)
OOS	Izven meja specifikacij (ang. <i>Out of specifications</i>)
RC	Regenerirana celuloza
SOP	Standardni operativni postopek
TEA	Trietanolamin
TFA	Trifluoroocetna kislina (ang. <i>Trifluoroacetic acid</i>)
ZZDr	Zakon o zdravilih
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (ang. <i>World Health Organization</i>)
USP	Ameriška farmakopeja (ang. <i>United States Pharmacopeia</i>)
UV-VIS	Območje valovnih dolžin elektromagnetnega valovanja, ki ustreza ultravijoličnemu in vidnemu delu spektra

1. Uvod

Dobra proizvodna praksa (GMP) je sistem za doseganje kakovosti, ki zagotavlja dosledno izdelavo in kontrolo izdelka po vnaprej pripravljenih predpisanih in potrjenih protokolih. S tem zagotavljamo ustreznost namenu uporabe, kakor zahteva dokumentacija za pridobitev dovoljenja za promet z zdravilom oziroma specifikacije izdelka (1).

Dobra laboratorijska praksa (GLP) predstavlja sistem kakovosti, ki se navezuje na organizacijo, procese, pogoje, načrtovanje, nadzorovanje, izvajanje in arhiviranje nekliničnih študij. Kot del proizvodne prakse uvrščamo tudi dobro kontrolno laboratorijsko prakso (GCLP), s katero izvajamo kontrolo kakovosti izdelka (2). V najzgodnejših fazah razvoja zdravila (bazične raziskave, slika 1) je v akademskih krogih, kot tudi v nekaterih industrijskih raziskovalnih laboratorijih, skladnost z GLP še vedno pomanjkljiva. Zato je zavedanje vedno večje, da je potrebno slediti zakonom regulatornih organov (3).



Slika 1: Regulatorna od začetka raziskav do prihoda zdravila na trg; GLP (dobra laboratorijska praksa), GCP (dobra klinična praksa), GMP (dobra proizvodna praksa)

Cilji GMP:

- varovanje zdravja,
- preprečiti napake, ki bi lahko vplivale na kakovost, varnost in učinkovitost,
- vključitev kakovosti v celoten proces.

Zahteve GMP:

- primerno osebje (kvalificirano in usposobljeno) in primerni prostori ter oprema,
- odobreni postopki,
- primerno skladiščenje in transport,
- vsak odstop od kakovosti izdelka je potrebno raziskati in dokumentirati,
- urejen sistem arhiviranja, ki zagotavlja sledljivost,
- izvedba notranjih presoj,

- uspešen sistem za odpoklic iz trga,
- v primeru reklamacije izdelka, je potrebno raziskati in ugotoviti vzroke napak ter z ustreznimi korektivnimi ukrepi preprečiti ponovno pojavljanje,
- odobritev izdelkov za prodajo in distribucijo je možna samo s strani pooblaščen osebe (2).

1.1 Razvoj dobre proizvodne prakse

Leta 1905 je ameriški novinar Upton Sinclair izdal knjigo *The Jungle*, kjer je opisoval nehigienske razmere v mesno predelovalni industriji in o bednih pogojih in trpljenju delavcev v tovarni. Poročal je tudi o vsebnosti ostankov zastrupljenih podgan v mletem mesu in padcih delavcev v tovarniške stroje. Knjiga je imela tako velik vpliv na ameriško javnost, da je leto kasneje Kongres sprejel zakon, imenovan *Pure Food and Drug*. Zakon je zahteval pravilno označevanje in prepovedal nadaljnjo prodajo kontaminirane hrane. In tako je bila ustanovljena prva vladna regulativna agencija (zdaj znana pod imenom FDA; Food and Drug Administration). Leta 1937 je eliksir s sulfanilamidom (antiinfektiv), narejen s toksičnim topilom (dietilenglikol), povzročil 107 smrtnih žrtev prav tako v Združenih državah Amerike (ZDA). Zato so leta 1938 sprejeli zakon, ki predpisuje inšpekcije v proizvodnji zdravil, kozmetike in živil. Proizvajalci so morali od takrat naprej dokazati, da je zdravilo varno, preden gre lahko na trg. Zaradi dogodka med drugo svetovno vojno (leta 1941), ko je umrlo skoraj 300 ljudi zaradi uporabe sulfatiazolnih tablet, ki so bile kontaminirane s fenobarbitalom, je FDA temeljito spremenila oz. popravila zahteve glede kontrole kakovosti in proizvodnje. To je bil začetek izraza in pomena GMP. V Evropi je leta 1962 uporaba zdravila talidomid pri nosečnicah povzročila na tisoče primerov deformiranosti novorojenčkov. Čeprav zdravilo ni dobilo dovoljenja za vstop na trg v ZDA, so zaradi te tragedije sprejeli dodatek k zakonu, ki zahteva, da morajo proizvajalci dokazati učinkovitost izdelkov pred trženjem in zagotoviti strožji nadzor nad preskušnji zdravil. Leta 1968 je svetovna zdravstvena organizacija (WHO) izdala svoj prvi osnutek smernic GMP (4,5). Tri leta kasneje je tudi Velika Britanija izdala svoje smernice GMP v vodniku, bolj znanim pod imenom *Orange guide*. Vodnik, ki je obsegal 30 strani, je bil namenjen proizvajalcem za boljše razumevanje zahtev regulatornih organov pri proizvodnji farmacevtskih izdelkov. V ZDA so bile smernice GMP za zdravila in medicinske pripomočke izdane leta 1978. Izdane smernice so bile namenjene zagotavljanju varnosti in učinkovitosti vseh izdelkov. V poznih

80. letih in zgodnjih 90. letih prejšnjega stoletja je zavedanje glede usklajenosti regulative vedno bolj naraščalo in tako so nastale evropske smernice GMP, ki so bile ustvarjene predvsem iz dveh vodilnih smernic tistega časa, britanske in francoske (4,6).

V Sloveniji je Slovensko farmacevtsko društvo izdalo GMP smernice leta 1993 in 1995. Z letom 1997 pa so postale te smernice tudi veljavne (2).

1.2 Zakonodaja, povezana z GMP

Področje razvoja, proizvodnje in nadzora zdravil sodi v večini držav med najstrožje regulirane dejavnosti. Poznamo zakonsko obvezne in zakonsko neobvezne dokumente. Med zakonsko obvezne dokumente spadajo direktive, uredbe, zakon o zdravilih, številni pravilniki in farmakopeja. V Evropski uniji (EU) je uredbe potrebno v celoti uporabljati v vseh državah EU, medtem ko pri direktivah lahko vsaka država sprejme predpise za doseg cilja, ki ga mora doseči. Med zakonsko neobvezne dokumente pa uvrščamo smernice, ki so priporočila oz. navodila, ki predlagajo določena ravnanja (7,8).

V Sloveniji je varovanje javnega zdravja v pristojnosti Javne agencije za zdravila in medicinske pripomočke (JAZMP). Glavni zakon, ki ureja področje zdravil je Zakon o zdravilih (ZZdr). Trenutno je v veljavi ZZdr-2, ki določa ukrepe in pogoje za zagotavljanje ustrezne kakovosti, varnosti in učinkovitosti zdravil. Po priključitvi Slovenije k EU leta 2004 je evropska zakonodaja postala del slovenske zakonodaje (9).

Najbolj pomembne in pogosto uporabljene GMP smernice po svetu so:

- Eudralex (smernice EU) – veljavne v Evropi
- CFR (Code of Federal Regulations) – veljavne v ZDA
- WHO – veljavne v državah, kjer nimajo svoje regulative
- ICH (International Conference on Harmonisation) – usklajevanje regulativ različnih držav

Eudralex (smernice EU)

Načela in smernice GMP so opisane v Eudralex-Volume 4, ki jih je sprejela evropska komisija in so navedene v dveh direktivah:

- Direktiva 2003/94/ES za zdravila za uporabo v humani medicini in zdravila za uporabo v humani medicini v preskušanju

- Direktiva 91/412/EEC za zdravila za uporabo v veterinarski medicini

Smernice o skladju z načeli iz teh dveh direktiv so bolj podrobno objavljene v Vodniku za dobro proizvodno prakso. Vodnik je razdeljen na tri dele in 20 aneksov:

- **I. del** se nanaša na osnovne zahteve za zdravila (preglednica I),
- **II. del** se nanaša na osnovne zahteve za aktivne snovi, ki se uporabljajo kot vhodne snovi,
- **III. del** vsebuje sorodne dokumente (primera: quality risk management, slo. *upravljanje kakovostnih tveganj*; MRA (Mutual Recognition Agreement) batch certificate, slo. (Sporazum o medsebojnem priznavanju) *certifikat serije*),
- na voljo so tudi **aneksi** (proizvodnja sterilnih preparatov, biološka zdravila, radiofarmaki, vzorčenje, računalniški sistemi, kvalifikacija, validacija, itd) (10).

Preglednica I: Sestavni deli smernic EU (osnovne zahteve za zdravila)

Zagotavljanje kakovosti
Osebj
Prostori in oprema
Dokumentacija
Proizvodnja
Kontrola kakovosti
Pogodbeno delo
Pritožbe, odpoklic izdelkov in razkrivanje v nujnih primerih
Notranji nadzor

CFR

V ZDA je za nadzor nad zdravili zadolžena FDA, ki je del ministrstva ZDA za zdravje (U.S. Department of Health and Human Services). Za vstop zdravila na ameriški trg je potrebno dobiti dovoljenje za promet od FDA. Predpisi, ki jih je treba upoštevati oz. uporabljati, da pridobimo dovoljenje za promet, pa so opisani v CFR.

CFR je zbirka predpisov, objavljena v zveznem registru agencij zvezne vlade ZDA. Razdeljena je na 50 poglavij (11). Najbolj pomembni smernici, ki vključujeta GMP, sta:

- Del 210; Trenutna dobra proizvodna praksa v proizvodnji, predelavi, pakiranju in skladiščenju zdravil,
- Del 211; Trenutna dobra proizvodna praksa za gotova zdravila.

ICH-smernice

ICH je bila ustanovljena leta 1990. ICH je program, ki združuje regulatorne organe za zdravila in farmacevtsko industrijo v Evropski uniji, na Japonskem, v Združenih državah Amerike, Kanadi in Švici. Cilj ICH je doseči čim večjo usklajenost pri razlagi in uporabi tehničnih smernic ter zahtev za registracijo farmacevtskih izdelkov, s čimer bi se zmanjšalo ali odpravilo podvajanje testiranj opravljenih za raziskave in razvoj novih zdravil.

Smernice so razvili strokovnjaki s področja regulative in industrije z medsebojnim sodelovanjem.

ICH-smernice so razdeljene v naslednje štiri kategorije:

- Q (Quality, slo. kakovost) – smernice v povezavi s kakovostjo (stabilnostne študije, testiranje nečistot..). Smernice dobre proizvodne prakse so opisane v poglavju Q7,
- S (Safety, slo. varnost) – varnostne smernice pri predkliničnih študijah (genotoksičnost, karcinogenost, reproduktivnost..),
- E (Efficacy, slo. učinkovitost) – smernice, ki se nanašajo na načrtovanje, varnost in poročanje kliničnih študij,
- M (Multidisciplinary, slo. večdisciplinarnost) – teme, ki ne spadajo pod nobeno izmed zgornjih kategorij (medicinska terminologija, CTD (Common Technical Document, slo. skupni tehnični dokument)...) (12).

WHO-smernice

WHO-smernice (preglednica II) uporablja več kot 100 držav po svetu. Večina držav, ki nima svoje GMP-regulative, je sprejela predpise in pristop pri opredelitvi v svoji nacionalnih GMP-zahtevah (5).

Preglednica II: Sestavni deli WHO-smernic (13)

Glavna načela za farmacevtske proizvode
Vhodni materiali
Specifični farmacevtski proizvodi
Inšpekcija

1.3 Farmakopeja

Beseda farmakopeja izhaja iz besed pharmakon (zdravilo) in poiein (izdelava), kar skupaj pomeni izdelava zdravil. Najstarejši zapis, ki omenja zdravila, je bil Ebersov papirus, spisani okoli 16. st. p.n.š (slika 2). Ebersov papirus opisuje zdravila in zdravljenje v 879 formulah.



Slika 2: Ebersov papirus (14)

Prva tiskana farmakopeja je bila kitajska farmakopeja, izdana leta 973 n.š. Ta dosežek pripisujemo večstoletnim strokovnim pripravam in raziskovanjem.

Po letu 1240 so se lekarne počasi začele uveljavljati kot samostojno področje medicine. Prva farmakopeja, ki je zavezovala evropski narod, je bila Pharmacopeia Londinensis, izdana leta 1618 za kraljevino Anglije, ki je tudi osnova današnje britanske farmakopeje. Večina evropskih narodov je farmakopejo urejala skladno z napredkom znanosti. V Evropi je bila ideja o poenotenju standardov neuspešna do leta 1964, ko so podpisali konvencijo o ustanovitvi Evropske farmakopeje.

PhEur (evropska farmakopeja)

je knjiga zahtev oz. predpisov o izdelavi, identiteti, čistoti in kakovosti zdravil. Izdaja jo Evropski direktorat za kakovost zdravil (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare - EDQM).

Razdeljena je na splošna poglavja in monografije:

- Poglavlje 1 (Splošna obvestila; razlaga definicij, okrajšav in enot),
- Poglavlje 2 (Analizne metode; opis aparatur, fizikalne in fizikalno-kemijske metode, identifikacija ionov in funkcionalnih skupin, biološki testi...),
- Poglavlje 3 (Surovine za izdelavo vsebnikov, vsebniki),

- Poglavlje 4 (Reagenti; nanaša se na analitske snovi (standardne raztopine, pufrske raztopine, volumetrični standardi)),
- Poglavlje 5 (Splošna besedila na področju mikrobiologije (sterilni produkti) in bioloških produktov (cepiva)),
- Monografije.

Obvezna je v vseh evropskih državah, podpisnicah Konvencije (15,16).

Evropska farmakopeja je v Sloveniji veljavna od leta 1993, pred tem pa je bila v uporabi Jugoslovanska farmakopeja. Ker evropska farmakopeja ni bila izdana v slovenskem jeziku, je komisija za Evropsko farmakopejo in Formularium Slovenicum pripravila svoj nacionalni dodatek, imenovan Formularium Slovenicum (17).

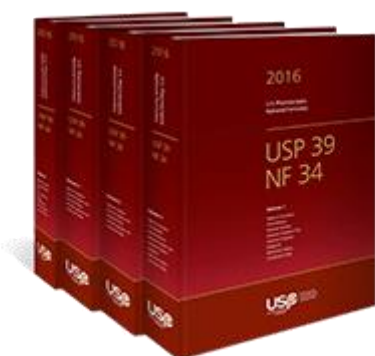
USP (United States Pharmacopeia)

USP-NF je kombinacija dveh zbirk, ameriške farmakopeje (USP) in National Formulary (NF) (slika 3). V USP so opisane monografije za učinkovine, farmacevtske oblike in priprave spojin. Monografije za prehranska dopolnila in sestavine so v ločenem delu USP, monografije pomožnih snovi (ekscipientov) pa so opisane v NF.

Poglavja v USP so razdeljena na tri tipe poglavij:

- poglavja pod <1000> so obvezna
- poglavja od <1000> do <2000> so smernice
- poglavja nad <2000> so dodatki.

FDA je priznala USP-NF kot uradno zbirko za zdravila, ki se tržijo v ZDA. Vsa zdravila, ki so na ameriškem trgu, morajo biti skladna s standardi v USP-NF (18).



Slika 3: Ameriška farmakopeja (19)

1.4 Dobra laboratorijska praksa

Formalni izraz dobra laboratorijska praksa (dobra laboratorijska praksa se nanaša na neklinične študije, medtem ko je dobra kontrolna laboratorijska praksa del GMP) izvira iz začetka 70. let prejšnjega stoletja iz ZDA zaradi pomislekov o verodostojnosti nekliničnih podatkov o varnosti, ki so bili predloženi FDA. Inšpekcija je ugotovila ogromno napak, kot so neustrezno načrtovanje, pomanjkanje dokumentacije in celo goljufije. Namreč odkrili so, da dokumentacija za zamenjavo mrtvih preskusnih živali z novimi ne obstaja, izbris podatkov in celo ponarejanje surovih podatkov. To je privedlo do objave FDA o predlaganih uredbah GLP. Tri leta kasneje, leta 1979, so bili ti predpisi tudi uzakonjeni (20). FDA-načela GLP so bila osnova za OECD (Organization for economic Co-operation and Development) -načela GLP, objavljena leta 1981. Revizija je bila narejena leta 1997, po več kot 15 letih uspešne uporabe smernic GLP (21).

Glavna namena načel Dobre laboratorijske prakse sta:

- zagotovitev ustvarjanja verodostojnih podatkov, ki se navezujejo na varnost ljudi in okolja,
- zmanjševanje podvajanja preskusov na živalih in posledično zmanjševanje stroškov nadzornih organov (22).

Skladnost z GMP in GLP-smernicami zahteva spremljanje osebja, odgovornega za zagotavljanje kakovosti, ki deluje neodvisno od osebja, ki sodelujejo pri proizvodnji ali pri raziskavah. Medtem ko smernice GMP uporabljamo pri industrijskem proizvodnem procesu, smernice GLP uporabljamo pri testiranjih, povezanih s postopki. GLP zahteva samostojno enoto za zagotavljanje kakovosti, katere glavna naloga je zagotoviti, da so študije opravljene v skladu z načeli GLP. Določitev osebja in sredstev, vključno s časom, ki se zahtevajo za dodelitev te funkcije, ostaja še naprej velik problem akademskih laboratorijev.

Zaželeno je vključiti čim več načel dobre laboratorijske prakse v programe zgodnjega razvoja zdravila. Glavne značilnosti GLP, ki jih je potrebno sprejeti v raziskave in razvoj laboratorija, so: sledljivost reagentov in materialov, upoštevanje pisnih protokolov (SOP) in študijskih protokolov (raziskovalni in razvojni), kjer je to mogoče, ter določitev osebja, ki bo odgovorno za tovrstne študije (3).

Poglavje 1: Zagotavljanje kakovosti (23)

Vključuje organizacijske ukrepe, ki so potrebni, da so zdravila takšne kakovosti, kot je zahtevano v skladu z zahtevami dovoljenja za promet z zdravili, oz. kot je to zahtevano za njihovo predvideno uporabo.

Doseganje kakovosti je odgovornost višjega vodstva in zahteva sodelovanje vseh zaposlenih in vseh oddelkov, kot tudi distributerjev in dobaviteljev podjetja.

Sistem kakovosti mora biti celovito zasnovan in pravilno izveden z vključitvijo dobre proizvodne prakse in upravljanjem kakovostnih tveganj.

Poglavje 2: Osebjje (24)

Pravilna izdelava zdravil je odvisna od ljudi. Proizvajalec mora imeti ustrezno število osebja s potrebnimi strokovnimi znanji in praktičnimi izkušnjami. Med ključno osebjje sodijo vodja proizvodnje in vodja kontrole kakovosti ter kvalificirane osebe. Vodja proizvodnje in vodja kontrole kakovosti morata biti neodvisna drug od drugega.

Zagotovljeno mora biti začetno, kot tudi nadaljnje izobraževanje:

- celotnemu osebju, ki lahko vplivajo na kakovost izdelka (osebje v proizvodnji, skladiščih, kontrolnih laboratorijih (vključno z vzdrževalci in čistilnim osebjem)),
- osebju, ki niso neposredno vključeni v proizvodnjo in kontrolo, lahko pa vseeno vplivajo na vidik kakovosti (razvoj in raziskave, obiskovalci..).

Izobraževanje mora vključevati teoretični in praktični del o sistemu zagotavljanja kakovosti in dobro proizvodno prakso.

Poglavje 3: Prostori in oprema (25)

Prostori in oprema morajo biti nameščeni, oblikovani, zgrajeni in vzdrževani na tak način, da se zmanjša tveganje napak, omogoča učinkovito čiščenje ter prepreči navzkrižna kontaminacija ali karkoli, kar bi lahko negativno vplivalo na kakovost proizvodov.

Poglavje 4: Dokumentacija (26)

Vzpostavitev sistema dokumentiranja je zelo pomemben del zagotavljanja kakovosti in je ključnega pomena za delovanje v skladu z zahtevami GMP. Glavni cilj sistema dokumentacije je vzpostavitev, nadzor, spremljanje in beleženje vseh aktivnosti, ki posredno ali neposredno vplivajo na vse vidike kakovosti zdravil.

Poznamo dve vrsti dokumentov:

- navodila (zahteve),
- poročila.

Obvezna dokumentacija GMP:

- *Site master plan* (dokument opisuje vse GMP-aktivnosti proizvajalca)
- *Navodila (zahteve)*:
 - a) specifikacije (opisuje zahteve, katerim morajo ustrezati vhodne surovine, končni produkti in intermediati)
 - b) postopki (standardni operativni postopki)
 - c) protokoli (navodila za izvajanje zaupnih postopkov)
 - d) tehnični sporazumi (pogodbena dela)
- *Poročila*:
 - a) certifikati analiz (povzetek rezultatov analiz vzorcev proizvoda in ocena skladnosti z navedenimi specifikacijami)
 - b) poročila (dokumenti projektov skupaj z rezultati, sklepi in priporočili)
 - c) zapisi (*raw data* - surovi oz. neobdelani podatki)

Med glavnimi cilji sistema dokumentacije je tudi nadzor nad dokumentacijo:

- dokumente je potrebno redno pregledovati in posodabljeni,
- dokumente, ki vsebujejo navodila, morajo odobriti, podpisati in datirati pooblašcene osebe,
- opredelitev datuma začetka veljavnosti.

Dobra dokumentacijska praksa

Z dobro dokumentacijsko prakso zagotavljamo natančnost, sledljivost in integriteto dokumentov. Zahteve so sledeče:

- ročni zapisi morajo biti čitljivi, jasni in neizbrisljivi,
- vsaka sprememba vpisa v dokument mora biti podpisana in datirana,
- zapisi morajo biti napisani na tak način, da so vse pomembne aktivnosti, povezane s proizvodnjo zdravil, sledljive.

Obstajati morajo postopki, protokoli, poročila, povezana z ukrepi, za naslednje primere:

- validacija in kvalifikacija procesov in opreme,
- inštalacija in kalibracija opreme,
- prenos tehnologije,
- vzdrževanje in čiščenje,
- seznam podpisov oseb vključenih v aktivnosti GMP.

Poglavje 5: Proizvodnja (27)

Dostop do proizvodnje je omogočen samo pooblaščenim osebam.

Vsi proizvodni postopki se morajo izvajati po vnaprej določenimih navodilih in v skladu z dobro proizvodno prakso. Končni proizvodi morajo biti v skladu z proizvodnimi in tržnimi dovoljenji.

Poglavje 6: Kontrola kakovosti

Vsak izdelovalec zdravil (imetnik dovoljenja za promet z zdravili) mora imeti oddelek za kontrolo kakovosti, ki pa mora biti neodvisen od proizvodnje. Kontrola kakovosti se ukvarja z vzorčenji, specifikacijami, organizacijo, dokumentacijo, postopki za sproščanje proizvodov, ki zagotavljajo, da se noben material za uporabo ali proizvod za prodajo ne sprost, dokler ni kakovost zadovoljiva. Osebe za kontrolo kakovosti mora imeti dostop do vseh proizvodnih prostorov za vzorčenje. Končna ocena proizvoda vključuje vse dejavnike (pogoji proizvodnje, rezultati medprocesne kontrole, skladnost proizvoda z njegovimi specifikacijami, pregled celotne proizvodnje, vključno s pakiranjem). Kontrola kakovosti sodeluje pri vseh odločitvah, ki lahko kakorkoli vplivajo na kakovost proizvoda.

Dobra kontrolna laboratorijska praksa

Prostori in oprema

Prostori in oprema kontrolnega laboratorija morajo ustrezati zahtevam smernic, ki so opisane v poglavju 3 (prostori in oprema).

Dokumentacija

Bistven del kontrolne laboratorijske prakse je dokumentacija, ki mora upoštevati načela, navedena v poglavju 4 (dokumentacija).

Oddelku za nadzor kakovosti morajo biti na voljo naslednji dokumentacijski podatki:

- tehnični podatki (specifikacije),
- postopki, ki opisujejo vzorčenje, preskušanje (vključno z laboratorijskimi dnevniki),
- postopki in zapisi kalibracij / kvalifikacij inštrumentov in vzdrževanja opreme,
- postopek za preiskavo OOS (Out of specifications; slo. *izven zahtevanih meja*),
- poročila preskušanj,
- okoljski podatki (zrak, voda),
- zapisi validacij preskusnih metod, kjer je to primerno.

Nekatere vrste podatkov (npr. preskusni rezultati, okoljski nadzor) morajo biti zabeleženi na način, ki omogoča ocenjevanje trendov.

Vzorčenje

Vsak odvzem vzorca je potrebno izvesti in zabeležiti v skladu z odobrenimi pisnimi postopki, ki opisujejo:

- postopek vzorčenja in količino vzorca,
- uporabljeno opremo za vzorčenje,
- tip vsebnikov za vzorec,
- identifikacijo vzorčenih vsebnikov,
- v primeru vzorčenja sterilnih ali nevarnih vzorcev je potrebno upoštevati vse posebne varnostne ukrepe,
- pogoje skladiščenja,
- navodila za čiščenje in shranjevanje opreme za vzorčenje.

Vsebniki z vzorci morajo imeti nalepko, ki označuje vsebino, serijsko številko in datum vzorčenja.

Preskusi

Preskušanje izvajamo po odobrenih metodah, ki so opisane v tehnični dokumentaciji ali dovoljenju za promet. V primeru razvitih metod morajo le-te biti validirane.

Vse pridobljene rezultate preskušanj je potrebno zabeležiti in izračune kritično pregledati.

Opravljeni preskusi in zapisi morajo vključevati vsaj naslednje podatke:

- ime materiala ali izdelka (odmerna oblika, kjer je to primerno),
- serijsko številko in proizvajalca in/ali dobavitelja (kjer je to primerno),
- sklic na ustrezne specifikacije in preskušanje postopkov,
- rezultate preskusov, vključno z ugotovitvami in izračuni,
- datum preskušanja,
- začetnice osebe, ki je opravil preskus in preveril,
- jasno navedbo odobritve ali zavrnitve z datumom in podpisom odgovorne osebe,
- sklic na uporabljeno opremo.

Vse medprocesne kontrole morajo biti izvedene v skladu z odobreni metodami kontrole kakovosti.

Zelo pomembna je priprava laboratorijskih reagentov, raztopin, steklovine in referenčnih standardov. Ti morajo biti pripravljene in nadzorovani v skladu s pisnimi postopki. Označevanje laboratorijskih reagentov, raztopin in referenčnih standardov je treba jasno opredeliti z nalepkami, na katerih morajo biti navedeni naslednji podatki:

- priprava in podpis osebe, ki jih je pripravila,
- datum odprtja,
- rok uporabe.

Vsak referenčni standard, ki ga uporabimo pri analizi, mora imeti certifikat.

Spremljanje stabilnosti po registraciji (ongoing stability)

V času razvoja in tudi po prihodu zdravila na trg je potrebno spremljati stabilnost v skladu z ustreznim programom. Namen programa stabilnosti je spremljanje proizvoda med njegovim rokom trajanja in določiti, da proizvod ostaja in da lahko pričakujemo, da bo tudi ostal znotraj specifikacij. Protokol za program tekoče (ongoing) stabilnosti je potrebno razširiti do konca roka uporabe zdravila.

Vključevati mora naslednje parametre:

- število serij,
- pomembne fizikalne, kemijske, mikrobiološke in biološke preskusne metode,
- merila sprejemljivosti,
- sklic na preskusno metodo,
- opis sistema zapiranja vsebnika,
- interval preskušanja (časovne točke),
- opis pogojev skladiščenja,
- druge ustrezne parametre, značilne za zdravila.

Vsi rezultati stabilnostnih študij morajo biti na voljo kvalificiranemu osebju. Vsak atipičen trend ali rezultat izven zahtevanih meja je potrebno raziskati. V primeru potrditve negativnega trenda, ki ima vpliv na serijo izdelkov, sproščenih na trgu, je potrebno poročati ustreznim pristojnim organom.

Tehnični prenos preskusnih metod

Pred prenosom preskusne metode je potrebno preveriti, ali je preskusna metoda v skladu z metodami, opisanimi v dovoljenju za promet z zdravilom ali tehnični dokumentaciji. Prav tako je potrebno pregledati validacijo preskusne metode, da se zagotovi skladnost z zahtevami za validacijo metod.

Prenos preskusnih metod iz enega laboratorija v drug laboratorij je potrebno podrobno opisati v protokolu. Protokol za prenos mora vključevati naslednje parametre:

- identifikacijo preskušanja in preskusne metode,
- identifikacijo standardov in vzorcev,
- opredelitev transportnih in skladiščnih pogojev vzorcev,
- merila sprejemljivosti trenutne validacijske študije.

Vsakršno odstopanje od protokola je potrebno raziskati pred zaključkom tehničnega prenosa (28). V Sloveniji uradno kontrolo zdravil izvaja uradni kontrolni laboratorij pod pristojnostjo Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano in je del evropske mreže uradnih kontrolnih laboratorijev s področja analize zdravil (Official Medicine Control Laboratories Network - OMCL Network), ki deluje pod okriljem Evropskega direktorata za kakovost zdravil. Da lahko uradni kontrolni laboratorij izvaja kontrolo nad zdravili, mora pridobiti

certifikat (slika 4), ki zagotavlja, da je sistem za zagotavljanje kakovosti v skladu z ISO/IEC 17025 (29).



Slika 4: Potrdilo o skladnosti delovanja po ISO/IEC 17025 (30)

Poglavje 7: Pogodbeno delo (31)

Vsaka izdelava in analiza, ki se izvaja po pogodbi, mora biti jasno definirana, kako se bo izvajala in je del pisne pogodbe. Pogodbo skleneta delodajalec in delojemalec, kjer so natančno opisane odgovornosti obeh strank. Vsi sklenjeni dogovori morajo biti v skladu z dovoljenjem za promet.

Poglavje 8: Pritožbe, odpoklic izdelkov in razkrivanje v nujnih primerih (32)

Za zaščito zdravja ljudi in živali je potrebno vzpostaviti ustrezen sistem pregledovanja in preiskovanja pritožb ter odpoklica zdravil za humano in veterinarsko uporabo s trga, kadar je to potrebno. Na voljo morajo biti postopki, ki opisujejo, kako ravnati po prejemu pritožb. Vse pritožbe je potrebno dokumentirati.

Načela upravljanja kakovosti tveganja je potrebno uporabiti za oceno in preiskavo napak v kakovosti. Prav tako je potrebno definirati korektivne in preventivne ukrepe. Pristojni organi morajo biti pravočasno obveščeni v primeru neskladnosti z dovoljenjem za promet z zdravili.

Poglavje 9: Notranji nadzor (33)

Redno izvajanje notranjih inšpekcij s strani izdelovalca je potrebno za spremljanje skladnosti z načeli dobre proizvodne prakse in da se predlaga korektivne ukrepe. Po vnaprej pripravljenem programu se pregleda opremo, prostore, dokumentacijo, kontrolo kakovosti, kadrovske zadeve. Notranji nadzor izvajajo pristojne osebe, zaposlene v podjetju. Vsa dokumentacija o vsakem notranjem nadzoru mora biti shranjena.

2. Namen dela

Namen magistrske naloge je napisati predloge SOP za inštrumente, ki se nahajajo v analiznih laboratorijih na Fakulteti za farmacijo. Predloge smo zasnovali tako, da bodo čim bolj prijazne uporabniku. Glavno vodilo postopkov bo, da bodo le-ti razumljivi in obenem kratki. Z napisanimi SOP pričakujemo samostojnejše, hitrejše in hkrati tudi lažje delo na teh inštrumentih. Pričakujemo tudi zmanjšanje števila napak in s tem okvar inštrumentov.

3. Predloge SOP za izvajanje analiz v analiznih laboratorijih FFA

SOP je pisni dokument, ki podrobno opisuje navodila izvajanja določenih procesov. Postopki morajo biti jasni in imeti edinstveno identifikacijsko številko. Odobri jih (kot tudi revizije) ustrežna in pooblaščen oseba s podpisom in datumom.

Kot dopolnilo k standardnim operativnim postopkom lahko uporabljamo tudi priročnike in strokovno literaturo.

Standardni operativni postopki morajo biti na voljo za naslednje dejavnosti:

- prejem, rokovanje, preskušanje in shranjevanje preskusnih in referenčnih snovi,
- preskusne sisteme (priprava prostorov in pogojev okolja),
- opremo (uporaba, vzdrževanje, kalibracija, čiščenje),
- materiale, raztopine in reagente (označevanje in priprava),
- računalniške sisteme (delovanje, validacija, nadzor nad spremembami),
- dokumentacijo (obdelava podatkov, shranjevanje, dostop),
- postopke za zagotavljanje kakovosti (delovanje osebja) (26,34).

Predno smo se lotili pisanja predlog SOP-jev, smo se naprej seznanili z inštrumenti (preglednica III), ki se nahajajo v izobraževalno raziskovalnem laboratoriju za analizo zdravil. Nato smo začeli z zbiranjem podatkov o inštrumentih (navodila za delo od proizvajalca), smernicah pisanja in strukturi SOP-jev.

Pisali smo jih v skladu s smernicami Eudralex-Volume 4 (poglavje 4-dokumentacija), kjer smo upoštevali, da dokumenti, ki vsebujejo navodila, morajo biti potrjena, podpisana in datirana s strani pooblaščen (odgovorne) osebe. Poleg tega mora vsak dokument imeti svojo identifikacijsko številko in definiran datum veljave. Upoštevali smo tudi priporočila, da so navodila jasna in uporabniku prijazna. Pomagali smo si s predlogo, ki jo navaja EMA (European Medicine Agency). Iz te predloge smo črpali strukturo in vnesli naslednje elemente (odgovornost, namen, okrajšave, postopek in zgodovina dokumenta (35)).

Strukturo naših SOP-jev smo prilagodili potrebam in zmožnostim laboratorija. Na vsakem inštrumentu smo izvedli poskusno vajo in postopoma spisali SOP. O problemih z inštrumenti smo opravili tudi nekaj pogovorov z uporabniki, ki so izpostavili predvsem nezadostno poznavanje opreme s strani nekaterih uporabnikov in posledično neprimerno delo z opremo. Na podlagi teh problemov smo pri opisu poudarili, kje moramo biti pri izvedbi procesov še

posebno pozorni. Na koncu smo za potrditev, da so SOP-ji razumljivi uporabniku, izvedli še eno poskusno vajo.

Preglednica III: Seznam inštrumentov v izobraževalno raziskovalnem laboratoriju za analizo zdravil

Inštrument	Tip
Analitska tehtnica	AG245 Mettler Toledo
pH-meter	MP220 Mettler Toledo
UV-spektrofotometer	Cary 100 Bio UV spectrophotometer–Varian
IR-spektrofotometer	FT-IR Spektrofotometer Perkin Elmer Spectrum BX
Plinski kromatograf	GC2010 Plus-Shimadzu
HPLC	HP1100-Agilent Technologies

3. 1. SOP-HPLC

SOP (Tekočinski kromatograf HP1100-Agilent Technologies)		Stran 1 od 6	
Izdelač	Datum/Podpis	Odobril	Datum/Podpis

1. Namen

Standardni operativni postopek opisuje pripravo HPLC-sistema za izvajanje analiz.

2. Odgovornost

Odgovornost vsakega uporabnika je, da sledi navodilom tega postopka.

3. Okrajšave

TFA – Trifluoroacetic acid

HPLC – High performance liquid chromatography

H₃PO₄ – Fosforjeva (V) kislina

MeCN – Acetonitril

MeOH – Metanol

RC – Regenerirana celuloza

TEA – Trietanolamin

4. Oprema

Tekočinski kromatograf HP 1100 (Agilent Technologies):

- analizna kolona: Agilent EclipsePlus C₁₈, 150 x 4,6 mm I.D., 5 µm + predkolona (ali druga ustrežna kolona)

5. Postopek

5.1. Priprava vzorca

Koncentracija analita naj bo med 0,05-0,25 mg/mL.

Vzorec raztopimo v mobilni fazi oz. začetni sestavi gradienta in ga prefiltriramo skozi RC 0,45-µm filter v 2-mL vialo za HPLC.

5.2. Mobilna faza

Vedno uporabljamo BIDEŠTILIRANO vodo (Milli-Q, 1. nadstropje, soba 121, inventarna št. 12036).

Uporabljamo topila HPLC grade (MeOH, MeCN), za pripravo pufrov uporabljamo ekstra čiste reagente (npr. TFA, H₃PO₄, TEA,...).

Kadar uporabimo trdne topljence (fosfatni, acetatni,...), jih najprej raztopimo, uravnamo pH in **OBVEZNO** prefiltriramo skozi 0,45- μ m filter, po potrebi zmešamo z organskim topilom (vedno dodajamo topilo k topljencu in ne obratno).

Kadar pri gradientu uporabljamo trdne topljence, predhodno preverimo, da se ne obarjajo pri maksimalnem % org. topila (npr., če imamo gradient 10% - 70% MeCN, zmešamo pufer in MeCN v razmerju 30/70 ter se prepričamo, da se soli ne obarjajo).

5.3. Pregled sistema

Prepričamo se, da so vsa topila v zadostnih količinah in na ustreznih kanalih (A, B, C in D).

Preverimo nivo odpadnih topil in po potrebi zamenjamo kanister za odpadna topila.

Preverimo kolono in predkolono, ki je trenutno na sistemu, in ju po potrebi zamenjamo.

Preverimo, da je kolona pravilno obrnjena (smer toka mobilne faze je od desne proti levi).

Ko zaženemo sekvenco, vedno počasi zvišujemo pretok do želenega. Pazimo tudi, da ne prekoračimo maksimalnega tlaka kolone.

5. 4. Sistem HPLC

5.4.1. Vklp

1. Prižgemo vsako komponento sistema s pritiskom na gumb (prižge se zelena lučka).

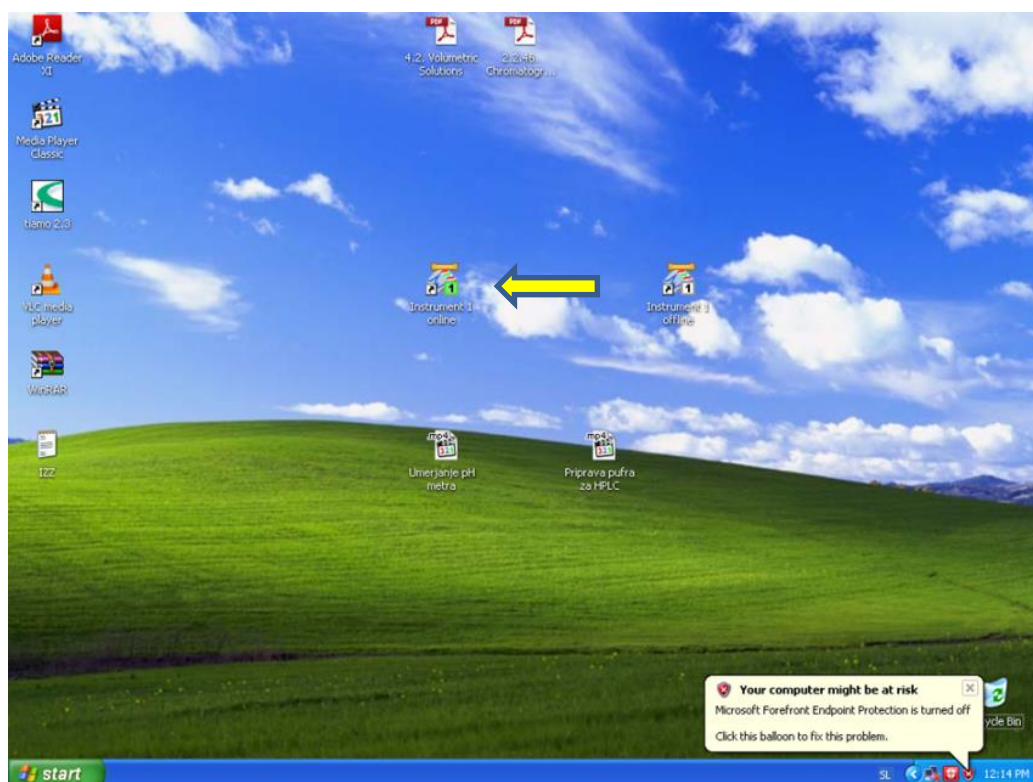
2. Prižgemo računalnik

USERNAME: _ _ _ _

PASSWORD: _ _ _ _

3. Vrata lovilca frakcij zapremo, ko zaslišimo »klik«.

4. Odpremo program Chemstation tako, da odpremo ikono *Instrument ONLINE* na namizju (slika 5).



Slika 5: prikaz vklop programa Chemstation

5.4.2. Priprava sistema in postavitve metode

Preverimo nivo topil in ga po potrebi korigiramo.

Sistem odzračimo (odstranitev zračnih mehurčkov iz cevk in črpalke) tako, da odpremo ventil za odzračevanje in nastavimo pretok 5 ml/min za posamezen kanal in črpamo topilo mimo kolone približno 3 min.

Postopek izvedemo za vse kanale, katerim smo zamenjali topilo oz. jih bomo uporabili pri analizi (tudi če topila nismo menjali, se lahko po daljšem mirovanju v sistemu pojavijo mehurčki zraka).

Ustavimo pretok in zapremo ventil za odzračevanje.

Odpremo eno od obstoječih metod (glej razpredelnico na koncu) (*File* ⇒ *Load Method*).

1. Preverimo pogoje metode: *Method* ⇒ *Edit entire Method*. Sistem nas nato vodi skozi pogovorna okna, kjer lahko po potrebi spreminjamo kromatografske pogoje.

2. Če smo metodo spremenili, jo shranimo pod novim imenom: ***File ⇒ Save Method (As)***.
3. Zaženemo celoten sistem s klikom na ***'on'*** (sestava mob. faze je v primeru gradienta enaka začetni).
4. Sistem ekvilibriramo (spiramo z mobilno fazo), dokler nista tlak in bazna linija stabilna (vsaj 20 minut).

5.4.3. Analiza več vzorcev/postavitve sekvence

(Če injiciramo posamezni vzorec, pojdi na 5.4.4.)

Sekvenco uporabimo, kadar želimo injicirati več vzorcev zaporedoma, ali če želimo, da se sistem po koncu dela samodejno zaustavi.

Odpremo eno od že postavljenih sekvenc (***File ⇒ Load Sequence***).

S klikom na ***Sequence ⇒ Sequence Table*** odpremo tabelo, kjer nastavimo pogoje snemanja (slika 6): izberemo mesta vial, nastavimo imena vzorcev in izberemo metode. Na začetku in koncu sekvence običajno posnamemo kromatogram slepega vzorca (topilo, ki smo ga uporabili za raztapljanje).

S klikom na ***Sequence ⇒ Sequence Parameters*** se odpre okno, kjer nastavimo mapo, kamor se shranjujejo rezultati. Če želimo, da se sistem po koncu sekvence zaustavi, obkljukamo ***Post-sequence Command/Macro*** in izberemo ***"SHUTDOWN.MAC",go***.

Sekvenco shranimo s klikom na ***File ⇒ Save As ⇒ Sequence...*** ali klikom na ***Sequence ⇒ Save Sequence (As)***.

Sekvenco zaženemo z ukazom ***Run Control ⇒ Run Sequence***.

Sequence Table: Instrument 1

Currently Running
 Line: Method: Location: Inj:

Sample Info for Vial 4:
 Plate 1 ID:
 Plate 2 ID:

Line	Location	Sample Name	Method Name	Inj/Location	Sample Type	Cal Level	Update RF	Update RT	Interval	Sample Amount
1	Vial 1	Low Level	QUANT	1	Calibration	1	Replace	Replace		
2	Vial 2	Medium Level	QUANT	1	Calibration	2	Replace	Replace		
3	Vial 3	High Level	QUANT	1	Calibration	3	Replace	Replace		
4	Vial 1	Low Level	QUANT	1	Calibration	1	Average	Average	2	
5	Vial 2	Medium Level	QUANT	1	Calibration	2	Average	Average	2	
6	Vial 3	High Level	QUANT	1	Calibration	3	Average	Average	2	
7	Vial 4	isocratic test	QUANT	4	Sample					

Sample Amount will be used in calibrated reports of type ESTD% or ISTD%

Slika 6: Grafični prikaz napisane sekvence

5.4.4. Injiciranje posameznih vzorcev

Kadar vzorce injiciramo posamezno (ne v sekvenci).

1. Za nastavitev parametrov odpremo **Run Control** ⇒ **Sample Info**.
2. Nastavimo mapo in ime datoteke, v katero nam bo inštrument shranil podatke, ter vpišemo ime našega vzorca in lokacijo viala, iz katere vzorec injiciramo.
3. Metodo poženemo s klikom na **Run Control** ⇒ **Run Method**.

5.4.5. Spiranje in zaustavitev sistema

Vedno, kadar uporabimo pufre (tudi tekoče, kot npr. TFA), sistem in kolono na koncu speremo z mobilno fazo, ki vsebuje vsaj 90 % vode, da odstranimo pufer (uporabimo lahko metode spiranje_MeOH ali spiranje_MeCN).

Kolono speremo še z mobilno fazo, ki vsebuje vsaj 90 % organskega topila, da odstranimo morebitne zaostale komponente (uporabimo lahko metode spiranje_MeOH ali spiranje_MeCN).

Kadar imamo sekvenco, na koncu v zadnji vrstici uporabimo metodo za spiranje sistema (brez vzorca - celico za št. vialo pustimo prazno).

Kadar smo uporabili trdne topljence, po koncu analiz pufer odstranimo in ga nadomestimo z vodo. Kolono odstranimo, kapilari povežemo z vmesnikom in sistem spiramo z vodo pri pretoku 0,5 mL/min vsaj 6 ur (detektor naj bo v tem času ugasnjen).

Celoten sistem ustavimo s klikom na '*off*'. Zapremo program in ugasnemo računalnik (ugasne se zelena lučka).

Zaustavimo vsako komponento sistema s pritiskom na gumb.

Pospravimo vso steklovino, raztopine, vzorce...

6. Reference

Dora Mrše, HPLC v praksi, fakulteta za farmacijo (36)

<http://www.chem-agilent.com/pdf/G2170-90041.pdf> (37)

7. Zgodovina dokumenta

Oddelek/št. dokumenta	Odgovorna oseba	Opis sprememb	Datum
		Prvi SOP	

3. 2. SOP-Tehtnica

SOP (Tehtnica Mettler Toledo AG245)		Stran 1 od 3	
Izdelal	Datum/Podpis	Odobril	Datum/Podpis

1. Namen

Standardni operativni postopek opisuje delovanje in uporabo tehtnice.

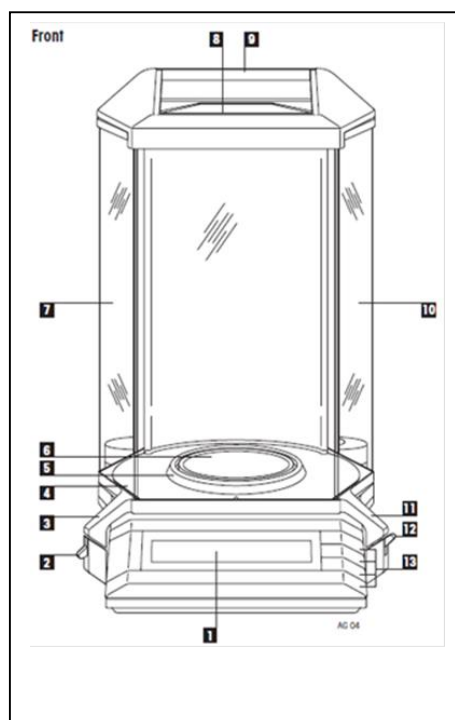
2. Odgovornost

Odgovornost vsakega uporabnika je, da sledi navodilom tega postopka.

3. Oprema

Mettler Toledo AG245 (slika 7)

1. Zaslona
2. Zatič za leva steklena vrata
3. Ročka za upravljanje levih steklenih vrat
4. Tehtalna komora
5. Zaščitni element (za AG135, AG285)
6. Tehtalna plošča
7. Leva steklena vrata
8. Ročka za upravljanje zgornjih steklenih vrat
9. Drsnik za kratka navodila za delo
10. Desna steklena vrata
11. Ročka za upravljanje desnih steklenih vrat
12. Zatič za desna steklena vrata
13. Upravljalne tipke



Slika 7: Slika tehtnice

3.1 Ostala oprema

- tehtalna posoda (tehtalni papir, bučka, čaša..)
- pinceta
- čopič za odstranjevanje prahu

3.2. Reagenti:

- 70 % etanol (za čiščenje tehtnice)

4. Postopek

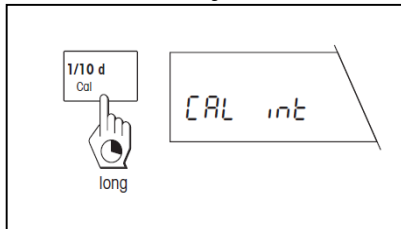
4.1. Izravnava tehtnice

Izravnano tehtnice preverjamo vsakodnevno oz. pred pričetkom prvega tehtanja ali pri zamenjavi lokacije. Za zagotavljanje ponovljivosti rezultatov postavimo tehtnico v povsem horizontalen položaj. Vrtimo obe nivelirni nogi na zadnji strani ohišja toliko časa, dokler ne spravimo mehurčka vodne tehtnice v sredino. Preprečimo preveliko cirkulacijo zraka (klimatske naprave, preprih).

4.2. Kalibracija tehtnice

Interna kalibracija (z notranjimi utežmi)

Interno kalibracijo (slika 8) izvajamo vsakodnevno, pred pričetkom prvega tehtanja.



Slika 8: Grafični prikaz interne kalibracije

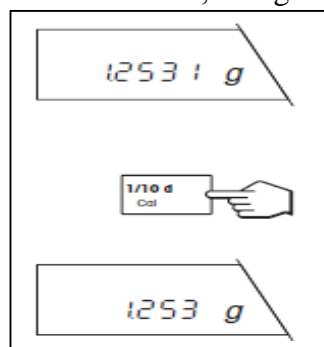
Pritisnemo tipko Cal in držimo tipko toliko časa, dokler se na zaslonu ne izpiše CAL int.

Kalibracija je končana, ko se na zaslonu pojavi Cal done.

4.3 Enostavno tehtanje

Vklop

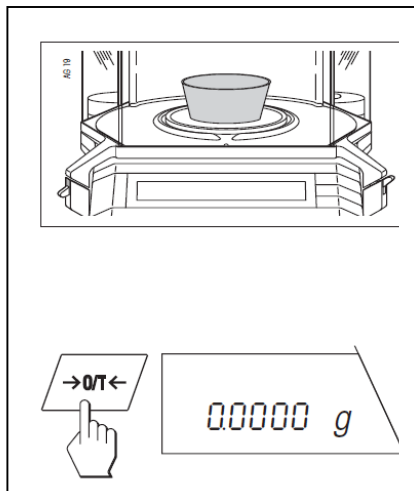
Pritisnemo tipko 'On'. Tehtnica je pripravljena za delo, ko se prikažejo ničle na zaslonu. Tehnica omogoča, da lahko znižamo občutljivost (slika 9). Kadar tehtamo 50 mg vzorca ali več, nastavimo natančnost na 0,0 mg, v primeru tehtanja pod 50 mg vzorca, nastavimo natančnost na 0,00 mg.



S tipko **1/10d**

znižamo občutljivost (manj decimalnih mest) in povečamo hitrost tehtanja.

Slika 9: Grafični prikaz znižanja občutljivosti



Položimo tehtalno posodo na tehtalno ploščo.

Pritisnemo →**O/T**←, da tariramo tehtnico (slika 10).

Počakamo, da se prikažejo ničle na zaslonu.

Naložimo maso na tehtalno posodo in odčitamo rezultat.

Vedno lahko dodajamo maso, dokler ne dosežemo želene mase. Odvzete mase ne smemo vrniti nazaj v originalni vsebnik.

Slika 10: Grafični prikaz tehtalne komore in tariranja

Po vsakem tehtanju očistimo tehtnico s čopičem in dezinfeciramo s 70 % etanolom.

Izklop

Pritisnemo tipko '*Off*' in jo držimo toliko časa, dokler se na zaslonu ne prikaže beseda OFF.

5. Čiščenje in vzdrževanje

5.1. Enostavno čiščenje

Odstranimo tehtalno posodo in tehtalno ploščo. Očistimo tehtalno komoro s čopičem.

5.2. Temeljito čiščenje

Izvedba je opisana v navodilih za delo, določenih od proizvajalca (za aparaturo).

6. Reference

Operating instructions METTLER TOLEDO AG balances

<http://www.americaninstrument.com/pdf/0674B-BALANCE.pdf> (38)

7. Zgodovina dokumenta

Oddelek/št. dokumenta	Odgovorna oseba	Opis sprememb	Datum
		Prvi SOP	

3. 3. SOP-pH-meter

SOP (pH-meter Mettler Toledo MP 220)		Stran 1 od 3	
Izdelal	Datum/Podpis	Odobril	Datum/Podpis

1. Namen

Standardni operativni postopek opisuje delovanje pH-metra.

2. Odgovornost

Odgovornost vsakega uporabnika je, da sledi navodilom tega postopka.

3. Okrajšave

ATC – automatic temperature compensation (slo. *avtomatsko upravljanje temperature*)

[A] – auto endpoint (slo. *avtomatski zaključek meritve*)

4. Oprema

pH-meter Mettler Tolledo MP220 (slika 11).

4.1 Ostala oprema

- robčki za brisanje elektrode
- steklovina



slika 11: pH-meter MP220

4.2 Reagenti:

- kalibracijski pufri (pH 1,68, pH 4,01, pH 7,00, pH 10,01)
- shranjevalna raztopina za elektrode
- puhalka z destilirano vodo

5. Postopek

5.1. Priprava sistema na merjenje

Vklopimo pH-meter (pritisnemo tipko 'ON').

5.2. Nastavitev temperature

pH-meter ima v nastavitvah nastavljeno temperaturo 25 °C. Ročno lahko vnesemo temperaturo med -5 °C in 105 °C. (ATC razveljavi ročno kompenzacijo.) Pritisnemo Mode in vnesemo želeno temperaturo.

5.3. Kalibracija

Priprava na kalibracijo:

Kalibracijske pufre prelijemo v časo (vsakega cca 25 ml). Rok uporabe pufrov je 1 mesec.

Izbor kalibracijskih pufrov.

Pritisnemo in držimo tipko *Mode* 2 sekundi, dokler se na zaslonu ne izpiše *Prog.*

Nato pritisnemo tipko *Mode* tolikokrat, dokler se na zaslonu ne izpiše *pH buffer selection.*

Na voljo so kalibracijski seti pufrov:

- set 1 = 7,00, 4,00, 10,01, 1,68
- set 2 = 7,00, 4,01, 9,21, 2,00, 11,00
- set 3 = 6,87, 4,01, 9,18, 1,68

izberemo želeni set s pritiskom na tipki *M* in *R* in potrdimo izbiro s tipko *Mode.*

Nato izberemo tri pufre iz seta za kalibracijo. Za lažjo kalibracijo izberemo pufre v takem vrstnem redu, kot bo potekala kalibracija.

Npr: set 1

Cal 1 = 4,00, Cal 2 = 7,00, Cal 3 = 10,01

5.3.1. Enotočkovna kalibracija (če je pričakovan pH med 6 in 8, oz. razlika 2 enot)

Odstranimo pokrovček s shranjevalno raztopino in gumijasti pokrovček iz luknje za polnjenje elektrode. Elektrodo speremo z destilirano vodo.

- Korak 1

Potopimo elektrodo v pufrsko raztopino. Pritisnemo *Cal.* Decimalna pika med umerjanjem utripa, dokler se ne pojavi indikator stabilnosti.

- Korak 2

Elektrodo speremo z destilirano vodo in obrišemo z vpojnimi robčki.

5.3.2. Dvotočkovna kalibracija (če je pričakovan npr. pH med 3 in 6 ali med 7 in 10)

Ponovimo koraka 1) in 2) z drugo pufrsko raztopino.

Izberemo dva kalibracijska pufra tako, da je pričakovana izmerjena vrednost vzorca znotraj tega območja. Razlika med kalibracijskema pufroma naj ne bo večja od 4 pH-enot.

5.4. Merjenje pH

Pritisnemo tipko *Mode* in izberemo način merjenja pH (po potrebi lahko izberemo mV).

Potopimo elektrodo v čašo z vzorcem in pritisnemo tipko *Read.*

Pritisnemo tipko [A] za avtomatsko ustavitev meritve (zaslon zamrzne meritev, ko je stabilna točka dosežena), v primeru ročne zaustavitve pritisnemo tipko Read.

Odčitamo rezultat in ga vpišemo v laboratorijski dnevnik. Po končanem merjenju elektrodo speremo z destilirano vodo, popivnemo do suhega z vpojnimi robčki (ne brišemo) in jo shranimo v shranjevalno tekočino za elektrode.

5.5. Opozorilo

Kalibracijski pufri so obstojni 6 mesecev po odprtju.

Ne uporabljamo pufrov, katerim je potekel rok uporabe.

Največjo natančnost dosežemo, če sta pufer in vzorec enake temperature.

Brisanje elektrode lahko povzroči polarizacijo in počasnejši odziv le-te. Zato uporabljamo vpojne robčke.

Pazimo, da se shranjevalna tekočina ne izsuši, vedno dopolnimo, kadar pade nivo tekočine na več kot 25 mm pod odprtino za polnjenje. Shranjevalno tekočino za elektrode menjamo 1× mesečno.

5.6. Izklop

Izklopimo inštrument (pritisnemo tipko OFF).

6. Reference

pH Mettler Tolledo manual, <http://www2.egr.uh.edu/~nvaradar/private/Inst/mp220.pdf> (39)

7. Zgodovina dokumenta

Oddelek/št. dokumenta	Odgovorna oseba	Opis sprememb	Datum
		Prvi SOP	

3. 4. SOP-UV-VIS-Spektrofotometer

SOP (Spektrofotometer Cary 100 Bio UV-visible)		Stran 1 od 3	
Izdelal	Datum/Podpis	Odobril	Datum/Podpis

1. Namen

Standardni operativni postopek opisuje snemanje UV/VIS-spektrov in merjenje absorbance.

2. Odgovornost

Odgovornost vsakega uporabnika je, da sledi navodilom tega postopka.

3. Okrajšave

UV – Ultravijolično

VIS – Visible spectroscopy

4. Oprema

- Spektrofotometer Cary 100 Bio UV-visible

4.1. Ostala oprema

- kivete (kvarčne, za VIS so lahko plastične)
- puhalka z destilirano vodo

5. Postopek

5.1 Vklon spektrofotometra

Vklonimo spektrofotometer.

Prižgemo računalnik in počakamo eno minuto, da se računalniška oprema poveže s spektrofotometrom.

5.2 Priprava na merjenje vzorcev

Vzamemo dve čisti kiveti (kivete vedno prijemamo od zgoraj). Speremo jih s topilom, ki smo ga uporabili za pripravo naše raztopine. Napolnimo kiveti do $\frac{3}{4}$ višine (volumna) kivet s slepim vzorcem (topilo, v katerem je raztopljen vzorec). Obrišemo kiveti z robčki. Vstavimo kiveti v aparaturo. Pritisnemo tipko Zero (ničenje), nato pritisnemo Baseline (snemanje bazne korekcije). Napolnimo kiveto z vzorcem raztopine in vstavimo v celico za vzorec (kiveto nekajkrat speremo z vzorcem) in pritisnemo Start. Odpre se okno Save as. Vpišemo ime eksperimenta in pritisnemo Save. Odpre se okno Sample name. Vpišemo ime vzorca in

pritisnemo OK. Po potrebi shranimo metodo.

5.3. Snemanje spektra (Scan)

Na namizju odpremo bližnjico Cary WinUV Scan. Nato odpremo generično metodo za snemanje spektra z imenom snemanje spektra.

Pritisnemo tipko Setup. Po potrebi nastavimo naslednje parametre:

- Cary (nastavitve inštrumenta): v X-mode nastavimo zgornjo in spodnjo mejo valovne dolžine,
- Options (nastavitve žarnice),
- Baseline (nastavitve korekcije bazne linije),
- Accessories: poskrbimo, da noben od parametrov ni odkljukan,
- Reports (nastavitve za poročilo in tiskanje),
- Auto storage (nastavitve shranjevanja podatkov).

Ko zaključimo z nastavitvami parametrov, kliknemo OK in zapremo okno Setup.

5.4 Merjenje absorbance (Advanced reads)

Na namizju odpremo bližnjico Cary WinUV Adv Reads. Nato odpremo generično metodo za snemanje absorbance z imenom snemanje absorbance.

Pritisnemo tipko Setup. Po potrebi nastavimo naslednje parametre:

- Cary (nastavitve inštrumenta): v polju '*wavelength*' nastavimo valovno dolžino,
- Options (nastavitve žarnice),
- Accessories: poskrbimo, da noben od parametrov ni odkljukan,
- Samples: Vnesemo število vzorcev in jih poimenujemo (vnesemo lahko največ 20 vzorcev),
- Reports (nastavitve za poročilo in tiskanje),
- Auto storage (nastavitve shranjevanja podatkov).

Ko zaključimo z nastavitvami parametrov, kliknemo OK in zapremo okno Setup. Po potrebi shranimo metodo.

Pritisnemo tipko Zero (ničenje). Vstavimo kiveto s slepim vzorcem v aparaturo in pritisnemo OK. Odpre se okno Samples selection. Izberemo vzorec in pritisnemo OK. Vstavimo vzorec

v celico za vzorec in pritisnemo OK. Za vse naslednje vzorce postopek ponovimo.

Po končanem merjenju kliknemo na zavihek File, izberemo Save data as, vnesemo ime eksperimenta in pritisnemo Save.

5.5. Izklop

Izklopimo računalnik, nato spektrofotometer.

6. Reference

- CaryWinUV software manual Agilent Technologies (40)
- Operating instructions-Cary 100 Bio UV-visible Spectrophotometer (41)

7. Zgodovina dokumenta

Oddelek/št. dokumenta	Odgovorna oseba	Opis sprememb	Datum
		Prvi SOP	

3. 5. SOP-FT-IR-Spektrofotometer

SOP (FT-IR-Spektrofotometer Perkin Elmer Spectrum BX)		Stran 1 od 3	
Izdelal	Datum/Podpis	Odobril	Datum/Podpis

1. Namen

Standardni operativni postopek opisuje delovanje IR-spektrofotometra.

2. Odgovornost

Odgovornost vsakega uporabnika je, da sledi navodilom tega postopka.

3. Okrajšave

FT-IR – Fourier transform infrared spectroscopy

KBr – Kalijev bromid

4. Oprema

- Spektrofotometer FT-IR Perkin Elmer Spectrum BX

4. 1. Ostala oprema

- kivete
- ahatna terilnica
- pinceta
- pečat za izdelavo tablet
- ročna stiskalica tablet Graceby Specac
- set za stiskanje tablet

4. 2. Reagenti

- KBr

5. Postopek

5.1. Priprava vzorcev

Natehtamo 200-250 mg KBr in 2-5 mg vzorca (vsakega v svojo tehtalno ladjico) in ju prenesemo v ahatno terilnico in ju premešamo. Nato sestavimo set (matrico; slika 12) za stiskanje tablet. Vzamemo cilindrični podstavek, nanj namestimo cilinder za vzorec. S spatulo prenesemo vzorec v vdolbino cilindra. Na koncu vstavimo cilindrični bat. Set obrnemo za 180° in prenesemo v ročno stiskalnico. Na vrhu stiskalnice vrtimo gumb v smeri urnega kazalca, dokler potisni bat ne pride do stika z matrico. Ob strani stiskalnice gumb zavrtimo v

smeri urnega kazalca in z ročko nastavimo tlak na 9 ton. Pustimo 2 minuti. Nato odvijemo gumb (na desni strani stiskalnice) v levo. Dvignemo vrata stiskalnice in vzamemo matrico ven. Odstranimo bat, tableto s pinceto prenesemo v celico za tablete. Tableta mora biti prosojna pri pogledu proti svetlobi.



Slika 12: Matrica za stiskanje tablet



Slika 13: Nosilec za IR-vzorec

Odpremo pokrov spektrofotometra in vzamemo nosilec za vzorec. Nosilec je sestavljen iz celice za vzorec (a) in dveh kovinskih obročkov (slika 13). Razstavimo in v celico namestimo obroček s palico (b), vstavimo tableto in zatesnimo z drugim obročkom (c). Nosilec z vzorcem namestimo v spektrofotometer. Zapremo pokrov.

5.2. Vklop spektrofotometra FT-IR

Inštrumenta nikoli ne izklapljam in je že prižgan.

Prižgemo računalnik in na namizju odpremo mapo Spectrum. Odpre se okno

Login Name: _ _ _ _ . Kliknite OK.

5.3. Scan (snemanje ozadja)

Kliknemo scan. Odpre se okno in izberemo zavihek Setup in kliknemo Options. Po potrebi nastavimo parametre in potrdimo s klikom na OK. Kliknemo na zavihek Instrument in izberemo scan background.

5.4. Scan (snemanje vzorca)

Kliknemo scan sample. Izberemo zavihek file in napišemo želeno ime vzorca. Potrdimo s klikom na OK. Počakamo, da se spekter posname in ga preverimo. Če spekter ustreza (spekter

ustreza, kadar je transmitanca 2000 cm^{-1} vsaj 60% (razen, kadar so v tem območju specifični absorpcijski trakovi)), ga obdelamo po naslednjem zaporedju: s klikom označimo želeni spekter, kliknemo Smooth, nato assign peaks, save in print. V primeru, da spekter ne ustreza, popravimo tableto z vzorcem in ponovno posnamemo. Če spekter še vedno ne ustreza, pripravimo nov vzorec.

6. Izklop

Izklopimo računalnik, spektrofotometra ne ugašamo (pustimo prižganega).

7. Reference

<http://www.specac.com/products/pellet-press-dies/evacuable-pellet-dies/509> (42)

http://web.nmsu.edu/~kburke/Instrumentation/KBr_New.html (43)

8. Zgodovina dokumenta

Oddelek/št. dokumenta	Odgovorna oseba	Opis sprememb	Datum
		Prvi SOP	

3. 6. SOP-GC

SOP (Plinski kromatograf GC-2010 Plus-Shimadzu)		Stran 1 od 4	
Izdelal	Datum/Podpis	Odobril	Datum/Podpis

1. Namen

Standardni operativni postopek opisuje pripravo GC-sistema za izvajanje analiz.

2. Odgovornost

Odgovornost vsakega uporabnika je, da sledi navodilom tega postopka.

3. Okrajšave

GC – Gas Chromatography

He – Helij

4. Oprema

Plinski kromatograf GC-2010 Plus (Shimadzu).

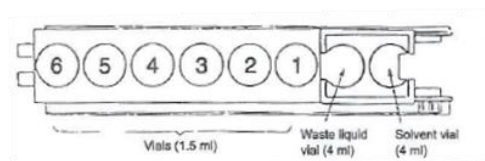
5. Postopek

5.1. Priprava vzorca

Koncentracija analita naj bo med 1,0-10 µg/mL.

Vzorec raztopimo v mobilni fazi in ga prefiltriramo skozi 0,45-µm filter v 2-mL vialo.

Viale z vzorci vstavimo na lokacije od 1-6 (slika 14).



Slika 14: grafična shema stojala za vzorce

Na lokacijo *Solvent vial* (topilo za spiranje igle) vstavimo 4-ml vialo, napolnjeno z istim topilom, kot smo ga uporabili za pripravo našega vzorca).

Na lokacijo *Waste liquid* (odpad) vstavimo prazno 4-ml vialo.

Stojalo z vzorci, vialo s topilom za spiranje igle in vialo za odpad potisnemo v avtomatski vzorčevalnik (iz desne proti levi), dokler ne zaslišimo »klik« in pritisnemo gumb reset na avtomatskem vzorčevalniku.

5.2. Plini

Vedno uporabljamo pline z oznako 5.0 (ali višje).

5.3. Sistem GC

5.3.1. Vkllop

Prižgemo glavno stikalo GC, nato prižgemo računalnik.

USERNAME: _ _ _ _

PASSWORD: _ _ _ _

Na namizju odpremo program GC-solution, izberemo ikono Analysis in potrdimo s klikom na OK.

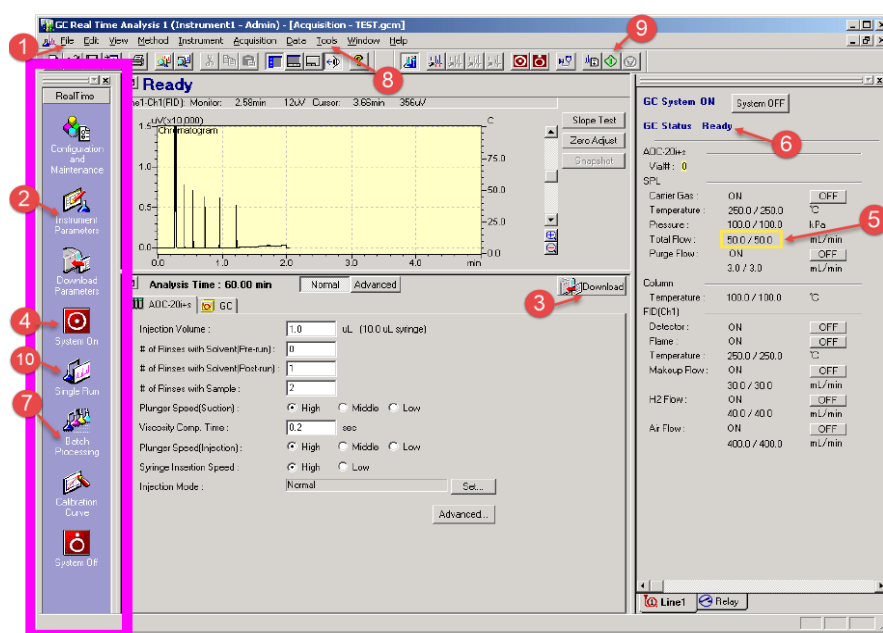
5.3.2. Priprava sistema

Pred pričetkom analize odpremo jeklenke plinov (helij, vodik in sintetični zrak):

- Helij (rjava jeklenka): najprej odpremo glavni ventil, nato regulacijski ventil, na koncu pa manjši ventil (vse ventile odpiramo v nasprotni smeri urnega kazalca);
- Sintetični zrak (zelena jeklenka): najprej odpremo glavni ventil na jeklenki (v nasprotni smeri urnega kazalca), nato regulacijski (v smeri urnega kazalca);
- Vodik (rdeča jeklenka): najprej odpremo glavni ventil (v nasprotni smeri urnega kazalca), nato regulacijski ventil (v smeri urnega kazalca).

Preverimo, da je na vseh jeklenkah (helij, vodik in sintetični zrak) zadosti tlaka.

5.3.3. Postavitev metode



Slika 15: Grafični prikaz sekvence

1 Odpremo eno od obstoječih metod (slika 15).

V zavihku *File* izberemo:

open method → open method file → programske datoteke → common files → data → generična metoda.gcm. Potrdimo z ok.

2 Preverimo pogoje metode s klikom na *Instrument parameters* in po potrebi spremenimo in shranimo pod drugim imenom.

3 V primeru, da spremenimo nastavitve, moramo klikniti *download*.

4 Pritisnemo *GC system ON*.

Sistem začne preprihovati 10 min s helijem. Preverimo pretok He (*total flow* (54,0ml/min)).

5 Če pretok ni ustrezen, je obarvan rumeno (uravnavamo pretok na jeklenki He). Po 10 minutah se sistem samodejno zažene.

6 Počakamo, da temperatura injektorja, kolone in detektorja doseže operativno temperaturo. Potem preverimo pretok vodika in sintetičnega zraka (uravnavamo pretoke na regulacijskih ventilih na jeklenkah, dokler se desno zgoraj ne izpiše *GC ready*).

5.3.4. Analiza večih vzorcev/postavitvev sekvence

7 Odpremo eno že postavljenih sekvenc (*Batch processing* ⇒ *open batch file*).

Odpre se tabela, kjer izberemo lokacije vial in nastavimo imena vzorcev. Potrdimo s klikom na ok.

8 Če želimo, da se sistem po koncu sekvence zaustavi:

kliknemo na zavihek *tools* ⇒ *autosystem OFF/ON* in odkljukamo *after analysis*.

9 Sekvenco zaženemo z ukazom *Start*.

5.3.5. Injiciranje posameznih vzorcev

Kadar vzorce injiciramo posamezno (ne v sekvenci).

10 Za nastavitve parametrov odpremo *Single run* ⇒ *Sample Login*.

Vpišemo ime našega vzorca in lokacijo vial, iz katere vzorec injiciramo, potrdimo s klikom na ok.

Analizo zaženemo z ukazom *Start*.

5.3.6. Zaustavitev sistema

Celoten sistem ustavimo s klikom na *system off*. Sistem se samodejno ustavi po 30 minutah.

Šele nato ugasnemo inštrument in računalnik in zapremo jeklenke.

Pospravimo vso steklovino, raztopine, vzorce...

V primeru težav/napak se obrni na skrbnika naprave (Jožko Cesar).

6. Reference

Quick Manual, Shimadzu GC solution, Chromatography Data System, Version 2.3, 223-60098 (44)

7. Zgodovina dokumenta

Oddelek/št. dokumenta	Odgovorna oseba	Opis sprememb	Datum
		Prvi SOP	

4. Sklep

Cilj magistrskega dela je bil podrobno spoznati, predstaviti in vpeljati nekatere smernice GCLP v izobraževalno raziskovalni laboratorij za analizo zdravil. V tem okviru smo napisali predloge za standardne operativne postopke (SOP) za opremo, ki se nahaja v izobraževalno raziskovalnem laboratoriju za analizo zdravil. Slednjo uporablja veliko ljudi in je zato tudi verjetnost napačnega rokovanja z opremo pri izvajanju analiz zelo velika. Te vodijo do napačnih rezultatov, kakor tudi do okvar drage opreme.

Ob pisanju predlogov SOP-jev smo se držali vodil, da so le-ti napisani karseda razumljivo, a obenem kratki, da uporabnika ne odtegnejo od uporabe. SOP-ji naj bi se v končni obliki nahajali na vidnem mestu poleg opreme in v elektronski obliki na namizju vsakega računalnika, s katerim upravljamo dotično napravo. Predlogi SOP-jev upoštevajo smernice GCLP; poleg jasnih navodil za delo z inštrumentom definirajo odgovorno osebo (ki jo določi predstavnik katedre), osebo, ki je SOP odobril, ter pričetek veljave. Z napisanimi SOP pričakujemo samostojnejše, hitrejše in hkrati tudi lažje delo na teh inštrumentih ter manjše število napak in okvar na opremi.

Seveda bi bilo za še bolj kakovostno delo smiselno uvesti še nekatere druge elemente dobre kontrolne laboratorijske prakse (kolikor je to mogoče): omogočiti delo na napravah le pooblaščenim osebam, slednje primerno izobraziti, v kolikor ustreznih znanj nimajo, voditi dnevnik uporabe/validacije posamezne opreme (kdo uporablja opremo, čas uporabe, opis opravljenih analiz ...).

5. Literatura:

1. Zakon o zdravilih (Uradni list RS, št. 31/2006), člen 6
2. Peter Raspor, Jelisava Adamič, Marjan Milohnoja, Peter Božič, Priročnik za postavljanje in vodenje sistema HACCP, Ljubljana – Slovenski inštitut za kakovost in meroslovje: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2002, 18-36
3. Alasdair J. Shepherd, GeneTherapy Technologies, Application sand Regulations, Good Laboratory Practice in the Research and Development Laboratory, Edited by Anthony Meager Copyright© 1999JohnWiley & Sons, 375-381
4. Barbara K. Immel, A brief history of GMPs, Immel Resources LLC, Pharmaceutical Technology, July 2001, 44-52
5. http://www.who.int/biologicals/vaccines/good_manufacturing_practice/en, dostop januar 2016
6. <http://inspiredpharma.com/2012/03/12/history-of-the-orange-guide>, dostop januar 2016
7. Sabina Zalar, Postopki pridobivanja dovoljenja za promet z zdravilom, Fakulteta za farmacijo, gradivo za predmet ILLR (Intelektualna lastnina, legislativa in regulative), 2011
8. http://europa.eu/eu-law/decision-making/legal-acts/index_sl.htm, dostop marec 2016
9. Zakon o zdravilih (Uradni list RS, št. 31/2006), člen 6
10. http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index_en.htm, dostop marec 2015
11. <http://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>, dostop april 2016
12. <http://www.ich.org/about/vision.html>, dostop marec 2015
13. R.M, Haleem, Maissa Y. Salem, Faten A. Fatahallah, Laila E. Abdelfattah, Quality in the pharmaceutical industry-A literature review. Saudi Pharmaceutical Journal, 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2013.11.004>
14. https://en.wikipedia.org/wiki/Ebers_Papyrus, dostop april 2016
15. Aleš Krbavčič, Pharmacopoeias, University of Ljubljana, Faculty of Pharmacy, gradivo za izbirni predmet Kakovost zdravil
16. http://www.jazmp.si/farmakopeja/evropska_farmakopeja, dostop, marec 2015
17. <http://www.jazmp.si/farmakopeja>, dostop marec 2015
18. <http://www.usp.org/usp-nf>, dostop marec 2015

19. <http://www.usp.org/store/products-services/usp-nf>, dostop april 2016
20. <http://www.who.int/tdr/publications/documents/glp-handbook.pdf>, stran 5, dostop januar 2016
21. Robin Cooper-Hannan,³ John W. Harbell,⁴ Sandra Coecke,⁵ Michael Balls,⁵ Gerard Bowe,⁵ Miroslav Cervinka,⁶ Richard Clothier,⁷ Frauke Hermann,⁸ Lynn K. Klahm,⁹ Jan de Lange,⁵ Manfred Liebsch¹⁰ and Philippe Vanparys¹¹, The Principles of Good Laboratory Practice: Application to In Vitro Toxicology Studies, ATLA 27, 1999, 539-577
22. http://www.uk.gov.si/si/delovna_podrocja/dobra_laboratorijska_praksa, dostop marec 2016
23. Eudralex, The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, volume 4, chapter 1, http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/vol4-chap1_2013_01_en.pdf, dostop marec 2015
24. Eudralex, The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, volume 4, chapter 2, http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/2014-03_chapter_2.pdf, dostop marec 2015
25. Eudralex, The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, volume 4, chapter 3, http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/chapter_3.pdf, dostop marec 2015
26. Eudralex, The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, volume 4, chapter 4, http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/chapter_4.pdf, dostop marec 2015
27. Eudralex, The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, volume 4, chapter 5, http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/chapter_5.pdf, dostop marec 2015
28. Eudralex, The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, volume 4, chapter 6, http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/2014_11_vol4_chapter_6.pdf, dostop marec 2015
29. <http://www.nlzoh.si/index.php/organiziranost/uradni-kontrolni-laboratorij-zakakovost-zdravil>, dostop marec 2016
30. http://www.nlzoh.si/images/dokumenti/usposobljenost/certifikat_EDQMAudit_Attestation_099_MJA0215.pdf, dostop april 2016

31. Eudralex, The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, volume 4, chapter 7, http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/pdfs-en/cap7en_en.pdf, dostop marec 2015
32. Eudralex, The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, volume 4, chapter 8, http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/2014-08_gmp_chap8.pdf, dostop marec 2015
33. Eudralex, The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, volume 4, chapter 9, http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/pdfs-en/cap9_en.pdf, dostop marec 2015
34. Pravilnik o načelih dobre laboratorijske prakse (Uradni list RS, št. 38/00 in 2/04)
35. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Standard_Operating_Procedure_-_SOP/2009/09/WC500002644.pdf, dostop maj 2016
36. Dora Mrše, HPLC v praksi, Fakulteta za farmacijo, katedra za farmacevtsko kemijo
37. <http://www.chem-agilent.com/pdf/G2170-90041.pdf>, dostop maj 2016
38. <http://www.americaninstrument.com/pdf/0674B-BALANCE.pdf>, dostop februar 2015
39. <http://www2.egr.uh.edu/~nvaradar/private/Inst/mp220.pdf>, dostop januar 2015
40. <http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/1625.pdf>, dostop januar 2015
41. http://www.cif.iastate.edu/sites/default/files/uploads/Other_Inst/UV_VIS/Cary%20100%20UV-Vis%20Operating%20Instructions.pdf, dostop januar 2015
42. <http://www.specac.com/products/pellet-press-dies/evacuable-pellet-dies/509>, dostop junij 2015
43. http://web.nmsu.edu/~kburke/Instrumentation/KBr_New.html, dostop junij 2015
44. Quick Manual, Shimadzu GC solution, Chromatography Data System, Version 2.3, 223-60098