

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO  
VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ

VESNA BLATNIK

**OBRAVNAVA REZULTATOV IZVEN ZAHTEVANIH MEJA V  
LABORATORIJU ZA KONTROLO KAKOVOSTI**

**DEALING WITH OUT – OF – SPECIFICATIONS RESULTS  
IN LABORATORY QUALITY CONTROL**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo sem opravila v Krki d.d. Novo mesto (Služba za laboratorijsko kontrolo kakovosti) pod mentorstvom izr. prof. dr. Vojka Kmetca, mag. farm. in somentorstvom dr. Urške Roglič, univ.dipl.inž.kem.inž..

### **Zahvala**

Za strokovno pomoč in nasvete se zahvaljujem izr. prof. dr. Vojku Kmetcu, dr. Urški Roglič, in dr. Nataši Gornik, ki mi je omogočila izvedbo diplomske naloge v Službi za laboratorijsko kontrolo kakovosti na Oddelku za tekočinsko kromatografijo.

Posebej se zahvaljujem moji družini za razumevanje in podporo v času študija.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Vojka Kmetca in somentorstvom dr. Urške Roglič.

Vesna Blatnik

Ljubljana, april 2009

Komisija:

1. izr. prof. dr. Janja Marc, predsednica
2. izr. prof. dr. Vojko Kmetec, mentor
3. dr. Urška Roglič, somentorica
4. izr. prof. dr. Darko Černe, član

# VSEBINA

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
2. ZGODOVINA RAZISKAVE REZULTATOV IZVEN ZAHTEVANIH MEJA	3
3. POTEK RAZISKAVE REZULTATOV IZVEN ZAHTEVANIH MEJA	5
3.1. OOS	5
3.2. STANDARDNI OPERATIVNI POSTOPEK (SOP)	6
3.3. RAZISKAVA REZULTATOV IZVEN ZAHTEVANIH MEJA	6
3.3.1. LABORATORIJSKA RAZISKAVA PRVE STOPNJE	7
3.3.2. RAZISKAVA DRUGE STOPNJE	8
3.3.3. RAZISKAVA TRETJE STOPNJE	9
3.4. ZAKLJUČEVANJE RAZISKAVE REZULTATOV IZVEN ZAHTEVANIH MEJA	11
3.5. ODGOVORNOST LABORATORIJSKEGA OSEBJA	11
3.5.1. ODGOVORNOST ANALITIKA	11
3.5.2. ODGOVORNOST ODGOVORNE NADREJENE OSEBE V LABORATORIJU	13
3.5.3. ODGOVORNOST ODGOVORNE OSEBE ZAGOTAVLJANJA KAKOVOSTI	14
4. VREDNOTENJE REZULTATOV IZVEN ZAHTEVANIH MEJA	15
4.1. POVPREČENJE REZULTATOV	15
4.2. NEDOVOLJENI ODSTOPI ("OUTLIER TESTI")	16
5. UKREPI	17
5.1. PREVENTIVNI UKREPI	17
5.2. KOREKTIVNI UKREPI	18
6. DOKUMENTIRANJE REZULTATOV IZVEN ZAHTEVANIH MEJA	19
6.1. DOKUMENT RAZISKAVE PRVE STOPNJE	19
6.2. DOKUMENT RAZISKAVE DRUGE STOPNJE	19
6.3. DOKUMENT RAZISKAVE TRETJE STOPNJE	19
6.4. SHEMA POTEKA RAZISKAVE	20
<b>7. NAMEN DELA</b>	<b>22</b>
<b>8. EKSPERIMENTALNI DEL</b>	<b>23</b>
8.1. PROBLEMATIKA GASTROREZISTENCE PELET	23
8.2. PROBLEMATIKA SORODNIH SUBSTANC V VHODNI SUROVINI	25
8.3. PROBLEMATIKA KROMATOGRFSKE ČISTOTE V VHODNI SUROVINI	28
8.4. PROBLEMATIKA VSEBNOSTI UČINKOVINE V TABLETAH	29
8.5. PROBLEMATIKA VSEBNOSTI UČINKOVINE V TABLETNI MASI	32
<b>9. REZULTATI IN RAZPRAVA</b>	<b>35</b>
9.1. PROBLEMATIKA GASTROREZISTENCE PELET	36
9.2. PROBLEMATIKA SORODNIH SUBSTANC V VHODNI SUROVINI	38
9.3. PROBLEMATIKA KROMATOGRFSKE ČISTOTE V VHODNI SUROVINI	39
9.4. PROBLEMATIKA VSEBNOSTI UČINKOVINE V TABLETAH	40
9.5. PROBLEMATIKA VSEBNOSTI UČINKOVINE V TABLETNI MASI	43
<b>10. SKLEPI</b>	<b>46</b>
<b>11. LITERATURA</b>	<b>48</b>

## POVZETEK

Farmacevtska industrija stremi k temu, da izdelava dobro, kakovostno in učinkovito zdravilo. Poznavanje vpliva proizvodne faze in laboratorijske faze na kakovost farmacevtskega izdelka je pomembna za vse, ki pri izdelavi sodelujejo. Dobri vstopni materiali (GSP), dobra proizvodna praksa (GMP) ter na koncu dobra laboratorijska praksa (GLP) so glavnega pomena pri sprostitvi učinkovitega, varnega in kakovostnega zdravila na tržišče. Zaključek proizvodnje izdelka ne pomeni, da je kakovostno izdelano zdravilo pripravljeno za tržišče. Kakovost izdelka mora preveriti in ovrednotiti še laboratorij za kontrolo kakovosti.

Pri testiranju farmacevtskega proizvoda lahko pride do analiznega rezultata izven zahtevanih meja. Zavedati se je treba, da so vzrok temu lahko dejavniki proizvodnje kot dejavniki laboratorijskega testiranja.

Namen dela je bil na različnih primerih laboratorijske raziskave rezultatov, ki ne ustrezajo določenim zahtevam specifikacijskih meja, pokazati potek raziskave, ter skladno z dobro laboratorijsko prakso celotno raziskavo dokumentirati, ovrednotiti in kjer je mogoče, opredeliti korektivne ukrepe za preprečitev napak v bodoče. Prikazali smo odstopne rezultate na različnih farmacevtskih oblikah in omejili smo se izključno na HPLC analize. Izbrani primeri laboratorijske raziskave rezultatov izven zahtevanih meja in literaturni podatki kažejo, da se napake lahko pojavljajo tako med proizvodnim procesom izdelka kot med laboratorijsko kontrolo izdelka.

Izvedene laboratorijske raziskave rezultatov izven zahtevanih meja dajejo vpogled, kako pristopiti k raziskavi rezultata izven zahtevanih meja v laboratoriju za kontrolo kakovosti.

## SEZNAM OKRAJŠAV

FDA	agencija za hrano in zdravila (Food and drug administration)
GLP	dobra laboratorijska praksa (Good Laboratory Practise)
GMP	dobra proizvodna praksa (Good Manufacturing Practise)
GSP	dobra skladiščna praksa (Good Storage Practise)
GxP	dobra praksa (Good Practise)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (High Performance Liquid Chromatography)
HVLP	high volume, low pressure
MP	preventivno vzdrževanje (Maintenance procedure)
OOS	rezultat izven zahtevanih meja (Out of specification result)
OQ	kvalifikacija delovanja (Operational qualification)
p.a.	za analizo (pro analyse)
Ph.Eur.	Evropska farmakopeja (European Pharmacopoeia)
PQ	kvalifikacija po zagonu (Performance qualification)
RSD	relativni standardni odklon (Relative standard deviation)
SOP	standardni operativni postopek (Standard operation procedure)
USP	Ameriška farmakopeja (United States Pharmacopoeia)

## 1. UVOD

Proizvodnja in kontrola zdravil je proces, ki mora biti skrbno načrtovan in dokumentiran, z namenom izdelave zdravil, ki bodo resnično dosegla naša pričakovanja. To pomeni, da bodo zdravila varna, učinkovita in kakovostna. Zato je potrebno že v naprej natančno proučiti sam proces izdelave izdelka in njegovo kontrolo kakovosti.

Med testiranjem surovin, medizdelkov, polizdelkov, končnih izdelkov pa se lahko pojavi neustrezen rezultat, ki je **izven specifikacijskih meja (OOS rezultat)**. Kadar se pojavi tak rezultat, moramo ugotavljati vzroke, ki privedejo do rezultata izven zahtevanih meja in s tem zagotoviti čimbolj točno oceno kakovosti preiskovanega vzorca. Celotno raziskavo je potrebno pravilno dokumentirati in voditi v skladu s smernicami dobre laboratorijske prakse (GLP).

Izdelavo zdravila je potrebno spremljati že od samega začetka. Skladišče surovin je odgovorno, da se surovine, ki vstopajo v končni produkt pravilno hranijo. Proizvodnja je odgovorna, da izdela zdravilo po predpisanem tehnološkem postopku, ter s tem zagotovi izdelavo varnega zdravila za končnega uporabnika. Oddelek za kontrolo kakovosti pa je med drugim odgovoren, da končni izdelek analizira in s tem preveri njegovo ustreznost. Kakovost izdelka se preverja s pomočjo različnih analiznih tehnik, med katerimi je tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) ena izmed najbolj uporabnih.

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti je najbolj široko uporabna separacijska analizna tehnika za določevanje komponent, pri kateri posamezne komponente vzorca najprej ločimo med seboj in nato ovrednotimo (Slika 1). Njena široka uporabnost se kaže v tem, ker je tehnika primerna za različna področja analiz. Do separacije pride zaradi različnega porazdeljevanja komponent med stacionarno in tekočo mobilno fazo. Kot mobilno fazo pogosto uporabljamo mešanice pufernih raztopin in organskih topil, stacionarna faza pa je nanešena na delce polnila v kromatografskih kolonah. Odlikuje jo možnost kvantitativnega vrednotenja, hitrost, občutljivost, ločljivost. S tekočinsko kromatografijo izvajamo analize istovetnosti, vsebnosti in enakomernosti vsebnosti učinkovin, sorodnih substanc, vsebnosti po testu raztapljanja, kromatografske čistote, itd. Po končani analizi dobimo rezultate, ki jih nato vrednotimo z različnimi metodami (metoda zunanjega standarda, procentna metoda, itd.).



Slika 1: Primer tekočinskega kromatografa  
HPLC sistem Waters Alliance

## **2. ZGODOVINA RAZISKAVE REZULTATOV IZVEN ZAHTEVANIH MEJA**

Pojem rezultatov izven zahtevanih meja je star toliko, kolikor tudi sama kontrola kakovosti farmacevtskega proizvoda. Ker ni bilo napisanih nobenih jasnih pravil glede postopanja z rezultati izven zahtevanih meja, je vsako farmacevtsko podjetje to izvajalo na svojstven način. Začetna točka pravilne uporabe in rokovanja z rezultati izven zahtevanih meja je bila leta 1993, ko je predstavnik agencije FDA (Food and drug administration) v farmacevtskem podjetju Barr Laboratories odkril veliko nepravilnosti in pomanjkljivosti pri raziskavi neustreznih rezultatov. Tako je leta 1993 med podjetjem Barr Laboratories in FDA prišlo do pravne odločitve, ki jo je vodil sodnik Wolin. Njegova teorija je bila, da se je potrebno zavedati, kaj se lahko pričakuje tekom proizvodnega procesa izdelka in kaj tekom testiranja izdelka v laboratoriju in s tem povezanim rezultatom izven zahtevanih meja. Zato je poudaril na to, da je za ugotovljeno napako potrebno ugotoviti vzrok.

Ugotovljene nepravilnosti so bile sledeče:

**- večkratno ponavljanje analize**

V laboratoriju so analizo izvajali toliko časa, dokler niso dobili ustreznega rezultata, ki je ustrezal zahtevam specifikacije.

**- povprečenje rezultatov**

Pri povprečenju rezultatov so vzeli rezultate izven specifikacijskih meja in znotraj specifikacijskih meja. Pri tem je šlo za prikrivanje neustreznih rezultatov.

**- prikrivanje dokumentacije**

Laboratorijsko testiranje ni vsebovalo vse dokumentacije (zavrgli so vsa neustrezna poročila o testiranju, kromatograme oziroma pripadajočo dokumentacijo).

**- neustrezna raziskava vzrokov**

Pri pojavu neustreznega rezultata ni bilo odločitve za nadaljnjo laboratorijsko in proizvodno raziskavo in s tem ugotavljanja vzroka za takšen rezultat (1).

Vse te pomanjkljivosti so privedle, da je agencija FDA morala postaviti določena pravila, načela oziroma norme glede raziskave rezultatov izven zahtevanih meja. Tako je leta 1998 izšel dokument agencije FDA, kako pristopiti k raziskavi rezultata izven zahtevanih meja v farmacevtskem podjetju. Le-ta je bil leta 2006 dopolnjen (2).



FDA se zaveda, da je sam proces nastanka farmacevtskega proizvoda zelo zahteven in da se pri delu lahko pojavljajo napake, ki jih ne gre zanemariti. FDA poudarja, da je neustreznost rezultat testiranja vedno potrebno raziskati, kajti le raziskava pripelje do končne točke vzroka rezultata izven zahtevanih meja. Da bi pridobili čimbolj natančne in pravilne rezultate raziskave OOS rezultatov, uradni FDA dokument **Guidance for Industry - Investigating Out-of-Specification (OOS) Test Results for Pharmaceutical Production** (2006) vsebuje navodila, ki natančneje opisujejo naslednje zahteve pri raziskavi rezultatov izven zahtevanih meja (3):

- odgovornost laboratorijskega osebja (analitik, odgovorna nadrejena oseba laboratorija, odgovorna nadrejena oseba kakovosti)
- laboratorijsko fazo raziskave
- ponovno vzorčenje
- povprečenje rezultatov
- uporabo nedovoljenih odstopov ("outlier testov")
- dodatna testiranja
- dokumentacijo rezultatov
- ocenitev rezultatov

Tako kot FDA tudi evropska zakonodaja (Ph.Eur.) poudarja, da ko se pojavi neustrezen rezultat, ga je potrebno vedno raziskati. Evropska zakonodaja izhaja iz istih priporočil kot jih navaja FDA.

Zaradi čimbolj kakovostne raziskave izdelkov in čimmanj odstopanj pri raziskavi, je priporočljivo, da se dokument *Guidance for Industry - Investigating Out-of-Specification (OOS) Test Results for Pharmaceutical Production* - uporablja pri kemijskem testiranju zdravil, učinkovin in pomožnih snovi, polizdelkov, končnih izdelkov kar velja za proizvodnega ali pogodbenega izvajalca. Pomembno je, da se dokument uporablja v proizvodnji in analitiki (4).

Dokument vsebuje pristope, ki niso zakonsko obligatorni in so trenutna priporočila FDA, če posamezne regulatorne oblasti zakonsko ne navajajo drugače.

Priporočila dobrih praks so, da vsaka serija določenega izdelka doseže kriterije v specifikaciji. Zato morajo biti vse napake serije ali katere od komponent temeljito raziskane. Obenem se lahko raziskava razširi na druge serije istega izdelka ali tudi drugih sorodnih izdelkov. Raziskava, ki vključuje zaključke raziskave in kasnejše ukrepe mora biti dokumentirana (4).

### 3. POTEK RAZISKAVE REZULTATOV IZVEN ZAHTEVANIH MEJA

#### 3.1 OOS

**OOS rezultat** je rezultat, ki je izven specifikacijske meje, določene iz uradnega dokumenta ali jih je določil proizvajalec pri registracijski dokumentaciji zdravila (4). Specifikacija je seznam kemijskih, bioloških, fizikalnih in mikrobioloških preizkusov, referenc za analizne postopke in ustreznosti meril, ki jim mora zdravilo ustrezati, da je sprejemljivo za uporabo. Je zakonsko obvezujoč standard kakovosti, ki ga predlaga in utemelji proizvajalec in odobri regulatorni organ. Da bi se izognili takšnim neskladnostim s specifikacijo izdelka, je pomembno takojšnje ukrepanje ob nepravilnostih. Raziskava rezultatov izven zahtevanih meja temelji na tem, da ob neustreznem rezultatu izdelka skušamo dokazati in odkriti, katere nepravilnosti oziroma vzroki so privedli do tega.

Vzroki, ki privedejo do rezultata izven zahtevanih meja so lahko:

- nepravilnosti tekom proizvodnega procesa izdelka
- nepravilnosti pri vzorčenju izdelka
- nepravilnosti pri testiranju izdelka
- druge nepravilnosti (npr. neustrezna vhodna surovina)
- problematika izdelka

Da bi čimbolj natančno in hitro ugotovili, kaj je vzrok neustreznemu rezultatu je pomembno, da je raziskava:

- pravočasna
- temeljito raziskana (najden vzrok neustreznega rezultata)
- znanstveno utemeljena
- nepristranska
- dobro in pravilno dokumentiran vsak korak raziskave (dokument o raziskavi)
- zaključena v časovno določenem terminu, ki ga običajno navaja SOP (Standardni operativni postopek) (3)

Zahtevano je, da ima farmacevtsko podjetje dokumentiran postopek SOP, ki vsebuje predpise in napotke poteka, kako se lotiti raziskave neustreznega rezultata ter navodila in ukrepe, da se napake, ki so vzrok za neustrezen rezultat odpravijo.

### 3.2 STANDARDNI OPERATIVNI POSTOPEK (SOP)

Agencija FDA priporoča, da ima farmacevtsko podjetje napisana pravila, kakšen je postopek raziskave v primeru rezultata izven zahtevanih meja.

SOP je dokument, ki nam definira kaj je rezultat izven zahtevanih meja in v katerem imamo napisano proceduro postopanja v primeru rezultata izven zahtevanih meja.

SOP naj vsebuje:

- korake, ki pomagajo najti vzrok za rezultat izven zahtevanih meja
- definirane opcije v primeru, da znanega razloga ne najdemo
- ustrezne, definirane čase za določene faze raziskave
- dokumentacijo, ki jo uporabljamo
- zahteve odgovornosti laboratorijskega osebja (analitik, odgovorna oseba laboratorija, oseba zagotavljanja kakovosti)
- definicijo začetne točke raziskave
- popoln opis celotnega postopka oziroma poteka
- število ponovitev testiranja
- določitev točke, kjer prenehamo s ponavljanjem testiranja in začnemo z vrednotenjem
- opredelitev uporabe "outlier teste" (uporaba teh testov - kdaj, kje)
- priložni dokument o raziskavi izven specifikacijskih meja, v katerem so zapisani vsi podatki raziskave (4)

### 3.3 RAZISKAVA REZULTATOV IZVEN ZAHTEVANIH MEJA

FDA navodila zahtevajo, da se laboratorijska raziskava izvede, ob sumu na rezultat izven zahtevanih specifikacij. Namen raziskave je določiti vzrok za rezultat izven zahtevanih meja, ki se lahko pojavi tekom proizvodnega procesa določenega izdelka ali tekom laboratorijske raziskave (3).

Raziskava rezultatov izven zahtevanih meja vsebuje naslednje stopnje:

- **laboratorijska raziskava prve stopnje**
- **raziskava druge stopnje**
- **raziskava tretje stopnje**

### 3.3.1 LABORATORIJSKA RAZISKAVA PRVE STOPNJE

V tej fazi je pomembno, da dobimo natančne podatke pridobljene iz laboratorija o raziskavi neustreznega rezultata določenega izdelka. Raziskavo vodita analitik, ki je izvedel analizo, pri kateri smo dobili neustrezen rezultat in odgovorna nadrejena oseba laboratorija. Skupaj z analitikom poskušata ugotoviti vzrok za neustrezen rezultat. Raziskava običajno traja 1-2 dni, kar je zapisano v dokumentu o raziskavi prve stopnje (poglavje 6.1).

Pri tej fazi hočemo ugotoviti ali je rezultat izven zahtevanih meja posledica nepravilnega laboratorijskega testiranja izdelka. Vse ugotovitve odgovorna nadrejena oseba laboratorija dokumentira v dokument o raziskavi prve stopnje (3).

Analitik in nadrejena oseba laboratorija skupaj preverita dejavnike, ki bi lahko privedli do neustreznega rezultata. Ti dejavniki so lahko različni, nekaj pa je ključnih:

- uporaba napačnega analiznega postopka
- napaka v izračunu
- nedosledno izvajanje analiznega postopka (neustrezni reagenti, nepravilne redčitve, uporaba neustrezne kolone, itd.)
- napaka pri pripravi testnih raztopin
- uporaba neustreznega referenčnega standarda (rok uporabnosti, vsebnost standarda)
- uporaba nekalibriranega analiznega instrumenta
- izguba standardne ali testne raztopine med pripravo

Po pregledu možnih vzrokov in ob ugotovljenem vzroku, je rezultat izven zahtevanih meja, razveljavljen in sicer:

- če se ugotovi napaka v izračunu in je rezultat po ponovnem izračunu znotraj zahtevanih specifikacijskih meja
- če se ugotovi napaka pri sami izvedbi analize in so rezultati po ponovnem testiranju sprejemljivi oziroma ustrezajo specifikacijskim mejam

V kolikor dobimo pri ponovnem testiranju rezultat znotraj specifikacijske meje, se le tega uporabi kot ustrezen rezultat, neustrezen rezultat pa se ovrže. V kolikor se v raziskavi prve stopnje vzroka ne ugotovi in če je rezultat ponovnega testiranja izven specifikacijske meje, je potrebno v dokument prve stopnje navesti, da se v raziskavi druge stopnje izvede dodatno testiranje.

### 3.3.2 RAZISKAVA DRUGE STOPNJE

Ko v prvi fazi raziskave ne moremo potrditi, da je laboratorijska napaka vzrok za rezultat izven zahtevanih meja, preidemo v fazo raziskave druge stopnje. Ta raziskava vključuje:

- pregled proizvodnega procesa za določen izdelek
- dodatno laboratorijsko testiranje
- ponovno vzorčenje (izvede se skladno z raziskavo tretje stopnje ali če je bila odkrita napaka pri vzorčenju, kar dovoljuje SOP) (3).

V tej fazi hočemo ugotoviti vzrok za rezultat izven zahtevanih meja ter opredeliti ukrepe, da se napake, ki so vzrok za neustrezen rezultat ne bi ponavljale.

Raziskavo druge stopnje vodi oddelek za kontrolo kakovosti (vodja laboratorija oziroma odgovorna oseba) v katero je vključen tudi oddelek za zagotavljanje kakovosti. V tej fazi se pregleda proizvodni proces izdelka in če je potrebno se izvede dodatno laboratorijsko raziskavo. Nadaljevanje raziskave je odvisno od posameznega primera (dodatno testiranje, ponovno vzorčenje) (3).

V kolikor v raziskavi prve stopnje nismo ugotovili vzroka in obenem ponovno testiranje ni bilo zadovoljivo, je potrebno opraviti dodatno testiranje v sklopu raziskave druge stopnje. Pri določenih testih (npr. test enakomernosti vsebnosti in test raztapljanja) je potrebno paziti, ker se dodatna testiranja izvajajo skladno s farmakopejskimi predpisi.

Pri vseh ostalih testih pa dodatno testiranje izvedeta dva analitika, ki pripravita nove raztopine vzorca iz prvotnega vzorca (isti homogen material – raztopina, prah, itd.) v več paralelkah oziroma kakor je določeno po SOP-u. Dodatno testiranje se izvaja na prvotnem vzorcu, ki mora biti od ugotovitve rezultata izven zahtevanih meja do ponovnega testiranja ustrezno hranjen. V SOP-u o rezultatih izven zahtevanih meja mora imeti podjetje zahteve za posamezen test pri raziskavi druge stopnje. Pomembno je, kakšna je lahko maksimalna dopustna razlika med posameznimi rezultati enega izvajalca analize, kar pomeni, da izračunamo RSD "novih" rezultatov ter razliko med povprečji rezultatov obeh izvajalcev analize. Dovoljeni mejni RSD rezultatov posameznega izvajalca in razlika med povprečji rezultatov obeh izvajalcev sta predpisani v SOP-u. Vsi rezultati dodatnega testiranja obeh analitikov morajo biti znotraj specifikacijskih meja. Po izvedenem dodatnem testiranju se izpolni dokument o raziskavi druge stopnje (poglavje 6.2). Ta vsebuje prvotni testni

rezultat in rezultate dodatnih testiranj. Prvotni testni rezultat, ki je izven zahtevanih meja se ne upošteva v povprečje z rezultati dodatnih testiranj. Kot rezultat v raziskavi druge stopnje podamo povprečje rezultatov prvega in drugega analitika oziroma samo prvega analitika, če se je raziskava druge stopnje zaključila samo z izvedbo enega analitika.

V dokumentu je potrebno navesti ali je bil prvotni rezultat potrjen ali razveljavljen. V kolikor je bil prvotni rezultat, ki je izven meja potrjen, se začne raziskava tretje stopnje.

Pri vzorčenju vzorca v proizvodnji je pomembno, da je vzorec pravilno odvzet za laboratorijsko analizo. To pomeni, da mora vzorčenje potekati skladno s predpisano metodo vzorčenja za posamezni izdelek (SOP o vzorčenju). Potrebe po ponovnem vzorčenju za laboratorijsko raziskavo so zelo redke. V teku raziskave prve in druge stopnje se ponovno vzorčenje ne izvaja, razen če je bilo ugotovljeno da:

- vzorčenje ni bilo pravilno izvedeno
- porabimo vzorec med testiranjem
- vprašljiva stabilnost vzorca (3).

### **3.3.3 RAZISKAVA TRETJE STOPNJE**

Če raziskava druge stopnje potrdi prvoten testni rezultat, ki je izven specifikacijskih meja, mora odgovorna oseba oddelka za zagotavljanje kakovosti začeti raziskavo tretje stopnje.

Pri raziskavi tretje stopnje je potreben:

- širši pregled dokumentov od začetka proizvodnje serije izdelka z rezultatom izven zahtevanih meja in izpostavitve morebitnih dejavnikov v proizvodnji, ki bi lahko privedli do rezultata izven zahtevanih meja
- pregled načina vzorčenja izdelka, ki bi lahko pripeljalo do oporečnega vzorca in obenem do rezultata izven zahtevanih meja
- pregled ustreznosti analizne metode, s katero smo določili rezultat izven zahtevanih meja
- pregled analiznih rezultatov vhodnih materialov
- letni pregled kakovosti končnega izdelka, pri katerem je bil ugotovljen rezultat izven zahtevanih meja
- pregled ugotovljenih nepravilnosti med proizvodnjo in analitiko določenega izdelka
- pregled dokumentov o raziskavi prve in druge stopnje

Pregled proizvodnega procesa vodi oddelek za zagotavljanje kakovosti, v katero vključimo tudi proizvodnjo, vzdrževanje, inženiring in analitiko. Pomembno je, da temeljito pregledamo dokumentacijo celotnega proizvodnega procesa, v kateri mogoče najdemo vzrok za rezultat izven zahtevanih meja. Raziskava proizvodnega procesa mora biti pravočasna, hitra in dobro dokumentirana (3).

Dokument pregleda proizvodnega procesa naj vsebuje:

- jasen razlog za raziskavo
- povzetek pregleda proizvodnega procesa
- rezultate pregleda dokumentacije
- pregled zgodovine
- opis korektivnih ukrepov.

Pri raziskavi tretje stopnje lahko pridemo do naslednjih ugotovitev:

- **vzrok je najden** (razveljavimo rezultat izven zahtevanih meja, poročamo rezultate dodatnega testiranja)
- **rezultat izven zahtevanih meja je potrjen** (poročamo rezultat izven zahtevanih meja, zavrnitev in uničenje serije)
- **vzrok ni najden** (vse rezultate vključimo v razpravo o kakovosti serije)

Ugotovitve o kakovosti izdelka in ukrepe se zapiše v dokument o raziskavi izven zahtevanih meja tretje stopnje (poglavje 6.3).

### **3.4 ZAKLJUČEVANJE RAZISKAVE REZULTATOV IZVEN ZAHTEVANIH MEJA**

Ko zaključujemo raziskavo rezultatov izven zahtevanih meja tretje stopnje za določen izdelek, je potrebno v celoto strniti vse ugotovitve tekom retestiranja, kajti glede na to se ovrednoti kakovost serije in odloči glede sprostitve serije na tržišče. Za zaključevanje in odobritev raziskave ter za končno oceno kakovosti izdelka je odgovorna oseba iz oddelka za zagotavljanje kakovosti. Do te točke raziskava sledi SOP-u (3).

Ocena serije je odvisna od več dejavnikov. Pomembno je, katere surovine so vstopale v izdelek, in kako je potekal sam proces proizvodnje. Pri različnih farmacevtskih oblikah (Slika 3, poglavje 9) na ustreznost serije vpliva več dejavnikov. Pri tabletah npr. na ustreznost serije vplivajo fizikalne lastnosti, masa tablet, razpustnost, debelina tablet. Pri tem je zelo pomembno vedeti, kakšna je zgodovina izdelka (problemi, ki se morebiti že pojavljajo na tem izdelku, trendi). Po končani raziskavi rezultata izven zahtevanih meja moramo biti pozorni tudi na ostale serije istega izdelka, ki so bile analizirane istočasno.

Po neustreznem rezultatu in zavrnitvi serije, je potrebno podati ukrepe proizvodnji ali laboratoriju. Ukrepi naj bi se realizirali v čim krajšem času, kajti le tako bomo pripomogli k manjšemu številu rezultatov izven zahtevanih meja.

Po končani kontroli kakovosti zdravila se moramo zavedati, da mora oddelek za zagotavljanje kakovosti vedno zavarovati uporabnika farmacevtskega izdelka.

### **3.5 ODGOVORNOST LABORATORIJSKEGA OSEBJA**

#### **3.5.1 ODGOVORNOST ANALITIKA**

Analitikova osnovna dolžnost je testiranje z doseganjem zanesljivih laboratorijskih rezultatov. Analitiki se morajo zavedati potencialnih problemov, ki se lahko pripetijo med samo izvedbo testiranja ter težav, ki bi lahko povzročile neustrezen rezultat. Kadar pride pri analizi do neustreznega rezultata, so analitiki odgovorni, da to takoj sporočijo odgovorni nadrejeni osebi laboratorija.

Analitik in odgovorna nadrejena oseba laboratorija sta zadolžena, da skupaj preverita izvedbo analize in ustrezne analizne dokumente, da bi ugotovila vzrok za rezultat, ki je izven zahtevanih meja.



Analitik je odgovoren, da analizo izvede po pravilih dobre laboratorijske prakse in s tem zagotovi, da je rezultat pravilno ugotovljen. Zato je odgovornost analitika da:

**- uporabi prave analizne metode**

Analitik se mora prepričati, da uporablja analizno metodo za testiran izdelek.

**- uporabi validirane in kalibrirane inštrumente**

Inštrumenti, ki jih uporabljajo analitiki pri analizi morajo biti ustrezno validirani (HPLC sistem – preventivno vzdrževanje, kvalifikacija delovanja in kvalifikacija po zagonu) in da so ustrezno kalibrirani (pH meter, pipetorji, itd.) (3,4).

**- preveri ustreznost kromatografskega sistema**

Del analiznih metod vsebuje zahteve za ustreznost kromatografskega sistema, ki so določene ob validaciji metode (ponovljivost, razmerje signal/šum, faktor simetrije, učinkovitost kolone in drugo). Da preverimo ustreznost kromatografskega sistema injiciramo raztopino (standard, vzorec, itd.) in izmerimo za analizno metodo pomembne parametre, katere navaja posamezna analizna metoda. Če dosežemo ustreznost kromatografskega sistema, je naš inštrument primeren za nadaljnjo analizo. V primeru, neustreznosti kromatografskega sistema, pa analitiki analize na inštrumentu ne smejo nadaljevati (3,4).

**- preveri ustreznost rezultata**

- preden analitik po končani analizi oziroma testiranju zavrže vse vzorce in standardne raztopine, se mora prepričati o ustreznosti rezultata testiranja
- v primeru, da pride do razlitja oziroma izgube vzorca med samo analizo, analitik analize ne sme nadaljevati, ker bi dobili nepravilen rezultat
- kadar je rezultat neustrezen in zanj ne vidimo razloga, je potrebno takoj obvestiti nadrejeno osebo laboratorija in obdržati vse pripravljene raztopine, ki smo jih uporabili pri analizi (standardna raztopina, vzorec itd.).

**- dokumentira analizo**

- vse korake tekom analize mora analitik zapisati v laboratorijski dnevnik
- v primeru rezultata izven zahtevanih meja "zamrzne" delovno površino ter takoj pokliče odgovorno nadrejeno osebo laboratorija (3,4).

### **3.5.2 ODGOVORNOST ODGOVORNE, NADREJENE OSEBE V LABORATORIJU**

Ko je rezultat izven zahtevanih meja že identificiran, mora biti nadaljnja odločitev nadrejene osebe laboratorija objektivna in pravočasna. Nadrejena oseba laboratorija mora od analitika, ki je izvedel analizo, dobiti čimveč informacij o poteku analize. S tem hočemo ugotoviti ali pripišemo neustrezen rezultat napaki v laboratoriju ali napaki med proizvodnim procesom (3).

Kot del ocene rezultata izven zahtevanih meja v prvi fazi raziskave, se mora s strani nadrejene osebe laboratorija opraviti:

- pogovor z analitikom o analizni metodi (znanje in pravilna izvedba analize)
- pregled podatkov analize in identificirati odstopanja (izpisi iz inštrumenta kot npr. kromatogrami)
- preveritev končnega izračuna rezultata
- preveritev ustreznosti kromatografskega sistema
- pregled analitske opreme
- preveritev referenčnih standardov, reagentov, topil, kolone, mobilne faze
- pregled steklovine
- nadrejena oseba laboratorija skupaj z analitikom napišeta dokument raziskave prve stopnje
- dokumentiranje in hranjenje laboratorijskih zaključkov analize (3).

Odgovorna, nadrejena oseba laboratorija je zadolžena, da vsak korak raziskave ustrezno dokumentira (poglavje 6). Zelo pomembno je, da odgovorna oseba sledi novim trendom ter v dokument zapiše tudi trend zgodovine rezultatov. S tem se eventuelno lahko ugotovi problematičnost izdelka.

### **3.5.3 ODGOVORNOST ODGOVORNE OSEBE ZAGOTAVLJANJA KAKOVOSTI**

Poleg analitika in odgovorne nadrejene osebe laboratorija ima svoj del odgovornosti pri raziskavi rezultatov izven zahtevanih meja tudi oseba oddelka zagotavljanja kakovosti.

Oseba zagotavljanja kakovosti je zadolžena za:

- nadzor nad celotno raziskavo rezultatov izven zahtevanih meja
- oceno in zaključitev raziskave
- zagotovitev izvedbe korektivnih ukrepov

## 4. VREDNOTENJE REZULTATOV IZVEN ZAHTEVANIH MEJA

Pri dokumentiranju testnih rezultatov je potrebno paziti, kako jih podati kot končni rezultat. Načina, ki se jih lahko poslužujemo sta način povprečenja rezultatov in uporaba "outlier" testov (4,5,6).

### 4.1 POVPREČENJE REZULTATOV

Pri povprečenju rezultatov FDA ločuje dve točki povprečja tekom originalnega testiranja ali tekom testiranja rezultatov izven zahtevanih meja. To je **pravilna uporaba povprečja** in **nepravilna uporaba povprečja**.

#### PRAVILNA UPORABA POVPREČJA

Povprečje uporabljamo takrat, kadar želimo videti homogenost vzorca. Pomembno pa je, da vsi rezultati posameznih paralelk ustrezajo specifikacijski meji za določen izdelek.

Povprečje uporabljamo v primeru da:

- **isto raztopino vzorca injiciramo večkrat** (npr. dvakrat, trikrat) in kot rezultat podamo povprečje)
- **zagotovimo bolj natančne rezultate iz homogenega vzorca**

V analizni metodi je lahko predpisano, da pripravimo več paralelk vzorca in nato kot končni rezultat podamo povprečje le-teh (4,5).

#### NEPRAVILNA UPORABA POVPREČJA

Povprečja ne uporabljamo takrat, kadar so rezultati izven in znotraj zahtevanih meja. S tem prikrivamo neustrezne rezultate.

Povprečenja rezultatov se izogibamo, ker s tem:

- **prikrivamo spremenljivost med posameznimi meritvami**

Primer: test vsebnosti učinkovine

Specifikacijska meja: od 95,0% - 105,0% predpisane vsebnosti aktivne učinkovine

Rezultati vsebnosti aktivne učinkovine:

1.) 92,0%

2.) 96,0%

3.) 99,0%

povprečje = 95,7%

Pri teh meritvah je povprečni rezultat znotraj specifikacijske meje, vendar opazimo, da gre za spremenljivost rezultatov. Vsi rezultati morajo biti znotraj specifikacijske meje.

**- povprečenje originalnih rezultatov in rezultatov dobljenih med raziskavo rezultatov izven zahtevanih meja ni dovoljeno (4,5).**

#### **4.2 NEDOVOLJENI Odstopi ("OUTLIER TESTI")**

Pri laboratorijskem testiranju je pričakovano, da se lahko pojavijo analizni rezultati, ki zelo odstopajo od vrednosti ostalih rezultatov. V laboratorijski raziskavi jih klasificiramo kot "ubežniki". Raziskujemo jih s pomočjo statističnega postopka, ki ga imenujemo "outlier" test. Ubežnik je statistično relativno majhna ali velika vrednost, ki je različna in ne pripada glavni sredini podatkov. Ubežnik velikokrat kaže na nehomogenost izdelka. FDA dokument in USP farmakopeja ne dovoljujeta uporabo "outlier" testov za kemijske analize ampak le za "bio" vsebnosti. "Outlier" testi se lahko uporabljajo pri metodi določevanja enakomernosti vsebnosti in metodi raztapljanja trdnih oblik. V primeru, da te teste uporabljamo pri raziskavi rezultatov izven zahtevanih meja, moramo imeti uporabo le-teh definirano tudi v SOP-u (kateri test bomo uporabili in kje ga bomo uporabili ter določiti minimalno število rezultatov za statistično obdelavo določenega testa) (5,6).

## **5. UKREPI**

### **5.1 PREVENTIVNI UKREPI**

Farmacevtsko podjetje stremi k temu, da proizvede najboljši izdelek, ki zadovolji najvišje standarde varnosti, skladnosti, vsebnosti, čistote in kakovosti. Zato podjetja izvajajo ukrepe, s katerimi se odpravi morebitne potencialne vzroke neskladnosti s specifikacijami, ter prepreči njihova ponovitev. Vzpostaviti je potrebno dokumentiran postopek za:

- določitev potencialnih neskladnosti
- ocenitev potreb za ukrepanje, da se prepreči pojav neskladnosti
- določitev in izvedba potrebnih ukrepov
- zapise rezultatov izvedenih ukrepov
- pregledovanje preventivnih ukrepov

Odgovornost izdelave dobrega in kakovostnega izdelka leži tako na proizvodnji kot tudi na oddelku za kontrolo kakovosti. Da bi se izognili napakam v laboratoriju je pomembno, da osebje deluje v skladu z vsemi predpisi smernic GMP in GLP. Tako bo napaka v laboratoriju vse redkejša. Da bi preprečili rezultat izven zahtevanih meja je pomembno, da vestno in natančno spremljamo proizvodni proces in laboratorijsko testiranje določenega izdelka. V primeru, da ugotovimo napako, je pomembno, da jo odpravimo takoj, ko jo opazimo in se tako izognemo nadaljnim neustreznim rezultatom.

Za preprečevanje napak in z njimi povezan rezultat izven zahtevanih meja, pa nas lahko privedejo naslednji dejavniki (4):

#### **a) laboratorij**

- čistost laboratorija (pomembno pri določevanju sorodnih substanc)
- motiviranost in vzdušje v laboratoriju

#### **b) osebje laboratorija**

- ustrezno in redno izobraževanje
- znanje laboratorijskih tehnik (tehtanje, pipetiranje, itd.)
- priprava standardnih raztopin in raztopin vzorcev
- pravilna uporaba analiznih inštrumentov
- izračun rezultatov

### **c) analizna metoda**

- pomembna dobro razvita in preprosta metoda (ustrezni parametri za ustreznost kromatografskega sistema)
- pomemben dober prenos metode (iz razvojne analitike v laboratorij za kontrolo kakovosti)
- dobro dokumentirana (vsebina, priloge, kromatogrami)

### **d) analitska oprema**

- pomembna redna validacija analitske opreme
- pomembno redno vzdrževanje analitske opreme

### **e) posodabljanje**

- pomembno je, da zaposleni v laboratoriju za kontrolo kakovosti stremijo k novostim na področju analitike (nadgradnja analitske opreme, izobraževanja, vpeljava in primerjava novih metod skupaj z razvojno analitiko)

## **5.2 KOREKTIVNI UKREPI**

Vsak laboratorij mora imeti postopke za izvedbo korektivnih ukrepov ter mora določiti izboljšave za tehnične neskladnosti ali neskladnosti v sistemu kakovosti (4).

Uvedba korektivnih ukrepov po zaključku raziskave rezultatov izven zahtevanih meja je zelo pomembna, kajti z uvedbo le-teh bomo preprečili ponovne rezultate izven specifikacij. Pri tem je potrebno definirati, kdo je po zaključku raziskave odgovoren za uvedbo ukrepov, kdaj in kakšni ukrepi naj bi se izvedli. Vsak korak izvajanja ukrepov naj bo ustrezno dokumentiran (4).

## **6. DOKUMENTIRANJE REZULTATOV IZVEN ZAHTEVANIH MEJA**

Pri raziskavi rezultatov je pomembno, da se vsak korak raziskave ustrezno dokumentira. Dokument naj vsebuje pomembne podatke glede na stopnjo raziskave.

### **6.1 DOKUMENT RAZISKAVE PRVE STOPNJE**

Dokument raziskave prve stopnje naj v glavi vsebuje ključne podatke o seriji (ime izdelka, oznaka vzorca oziroma serije), ime testa in specifikacijske meje, datum in rezultat prvega testiranja ter podatke o izvajalcu prvega testiranja. Dokument naj vsebuje tudi preveritve (poglavje 3.3.1), ki sta jih po opravljeni analizi izvedla izvajalec testa in odgovorna, nadrejena oseba laboratorija. Vsebuje naj tudi ugotovitve, ukrepe ter zaključke raziskave prve stopnje, potrebne podpise s strani oddelka za kontrolo kakovosti (odgovorna, nadrejena oseba laboratorija ter vodstvo službe) in oddelka za zagotavljanje kakovosti ter datum začetka in zaključka raziskave prve stopnje (7).

### **6.2 DOKUMENT RAZISKAVE DRUGE STOPNJE**

Dokument raziskave druge stopnje naj v glavi vsebuje ključne podatke o seriji (ime izdelka, oznaka vzorca oziroma serije), ime testa in specifikacijske meje, datum začetka in zaključka prvega testiranja ter podatke o izvajalcu prvega testiranja. Dokument druge stopnje raziskave naj vsebuje rezultate prve stopnje testiranja ter rezultate testiranja na drugi stopnji. Rezultati testiranj naj bodo podani tako kot je to določeno v SOP-u (poglavje 3.3.2). Vsebuje naj tudi zaključke raziskave druge stopnje ter podpise s strani oddelka za kontrolo kakovosti in oddelka za zagotavljanje kakovosti z datumom začetka in zaključka raziskave druge stopnje (7).

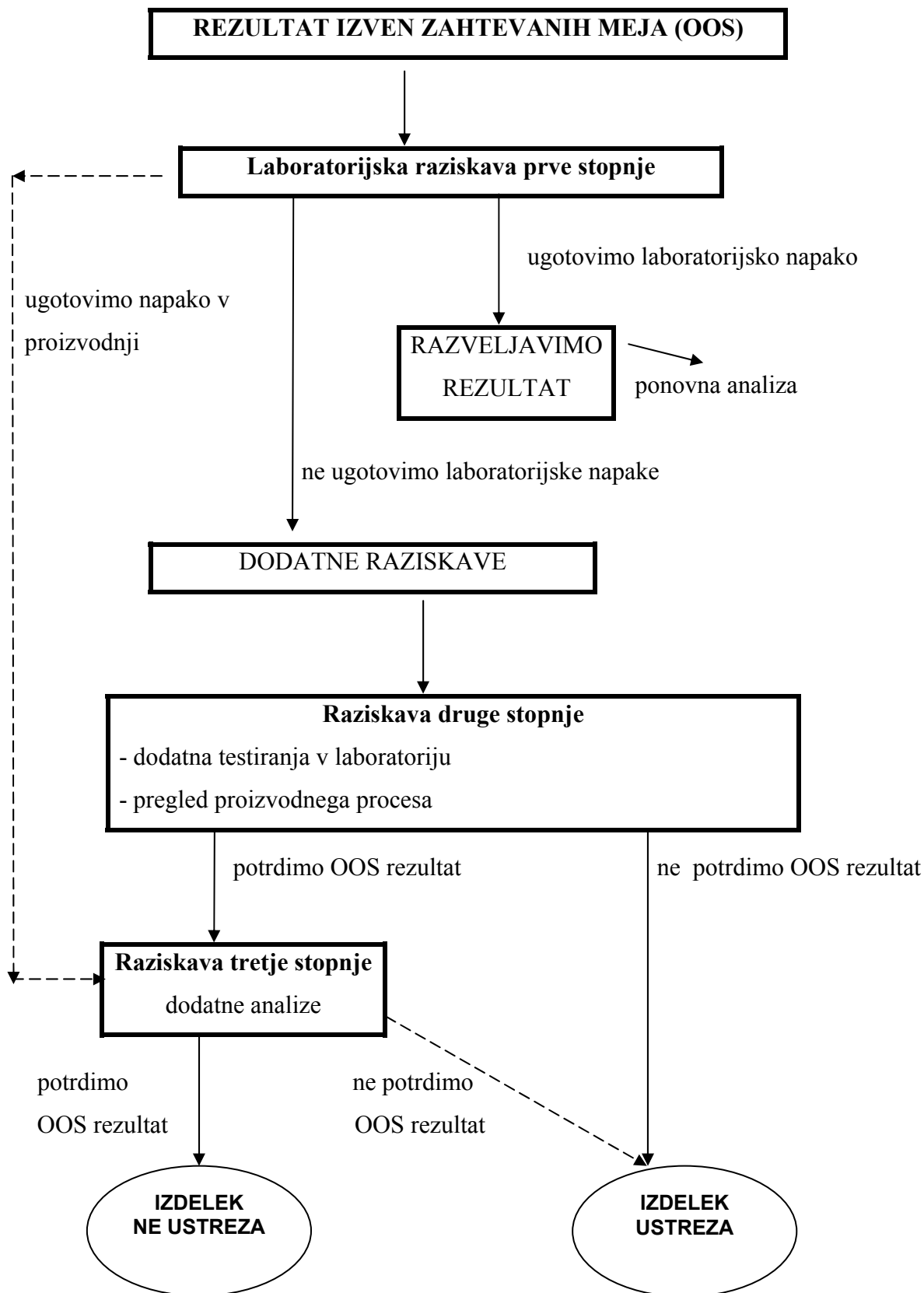
### **6.3 DOKUMENT RAZISKAVE TRETJE STOPNJE**

Dokument raziskave tretje stopnje naj v glavi vsebuje ključne podatke o seriji (ime izdelka, oznaka vzorca oziroma serije), ime testa in specifikacijske meje, datum začetka prvega testiranja ter podatke o izvajalcu prvega testiranja. Zaključno poročilo vsebuje ugotovitve in ukrepe po opravljeni raziskavi prve in druge stopnje raziskave ter podpise s strani odgovorne osebe oddelka za zagotavljanje kakovosti in odgovorne osebe proizvodnje (poglavje 3.3.3) (7).



## 6.4 SHEMA POTEKA RAZISKAVE

Shema (Slika 2) prikazuje potek raziskave rezultatov izven zahtevanih meja. Raziskavo pričnemo v laboratoriju (laboratorijska raziskava prve stopnje), kjer je možnost, da ugotovimo napako analitika. V primeru, da se napaka analitika ugotovi, se izvede ponovna analiza in razveljavimo prvoten neustrezen rezultat. Ko se napake ne more identificirati, se v laboratoriju izvedejo dodatne raziskave oziroma dodatna testiranja (raziskava druge stopnje). V primeru, da se v raziskavi druge stopnje potrdi neustrezen rezultat laboratorijske raziskave prve stopnje, izdelek ne ustreza zahtevam in se nadaljuje z raziskavo tretje stopnje. Če ovržemo neustrezen rezultat laboratorijske raziskave prve stopnje, izdelek ustreza zahtevam. V določenih primerih lahko po laboratorijski raziskavi prve stopnje preidemo na raziskavo tretje stopnje (npr. da je napaka za neustrezen rezultat potrjena v proizvodnji). Včasih z dodatnimi analizami v sklopu raziskave tretje stopnje ovržemo neustrezen rezultat.



Slika 2: Shematski prikaz poteka raziskave rezultata izven zahtevanih meja

## 7. NAMEN DELA

Farmacevtska proizvodnja in laboratorijska kontrola zdravil je proces, ki mora biti skrbno načrtovan in dokumentiran, z namenom izdelave varnega, učinkovitega in kakovostnega zdravila. Med laboratorijskim testiranjem surovin, medizdelkov, polizdelkov in končnih izdelkov se lahko pojavi neustrezen rezultat, ki je izven specifikacijskih meja.

Zato je namen diplomske naloge na različnih farmacevtskih oblikah - vhodnih materialov, polizdelkov - s HPLC metodo prikazati posamezne stopnje raziskav rezultatov izven zahtevanih meja. V nalogo bo vključenih pet primerov raziskave rezultatov izven specifikacijskih zahtev. Obravnavali bomo problematiko gastrorezistence v peletah, sorodnih substanc v vhodni surovini, kromatografske čistote v vhodni surovini, vsebnosti učinkovine v tabletah ter vsebnosti učinkovine v tabletni masi. Z omenjenimi primeri bomo prikazali specifičnost posamezne raziskave izven zahtevanih meja in kako raziskavo voditi, dokumentirati ter na osnovi ugotovitev raziskave neustreznih rezultatov podati zaključke in ukrepe skladno z dobro laboratorijsko prakso.

## 8. EKSPERIMENTALNI DEL

Obravnavali bomo pet primerov raziskave rezultatov izven zahtevanih meja s HPLC analizo tehniko in sicer test gastrorezistence v peletah, test sorodnih substanc učinkovine v vhodni surovini, test kromatografske čistote učinkovine v vhodni surovini, test vsebnosti učinkovine v tabletah ter test vsebnosti učinkovine v tabletni masi.

### 8.1 PROBLEMATIKA GASTROREZISTENCE PELET

Zdravilna učinkovina se iz gastrorezistentnega zdravila sprosti šele po prehodu v tanko črevo, kjer pH znatno naraste. V farmaciji je gastrorezistentnost lastnost farmacevtske oblike, ki ostane enaka tekom prehoda skozi želodec. Test gastrorezistence se izvaja na šestih zatehtah pelet istega vzorca. Analiza gastrorezistence pelet je sestavljena iz dveh delov. Prvi del je raztapljanje pelet v umetnem želodčnem soku pH 2,0 (medij za raztapljanje) na aparaturi za raztapljanje. Posode za raztapljanje napolnimo s predpisano količino medija in nato v njih spustimo pelete. Vključimo vrtenje skladno s predpisanim analiznim postopkom in po dveh urah pelete iz vsake posode prenesemo v predpisano merilno bučko. Raztopine vzorca naprej obdelujemo in vrednotimo s tehniko tekočinske kromatografije visoke ločljivosti.

Specifikacijska meja: **ne manj kot 90% določene vsebnosti v 120 minutah v umetnem želodčnem soku**. Delež preostale učinkovine A se preračuna na standard znane kvalitete in se ga vrednoti glede na razmerje površin vzorca in standarda na kromatogramu, koncentracijo standarda, volumen raztopine vzorca, zatehto vzorca in določeno vsebnost vzorca.

#### Metoda

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, HPLC. Metoda zunanjega standarda.

#### Aparature za merjenje in pogoji okolja

- tekočinski kromatograf Waters 2690D z računalniškim programom Millennium<sup>32</sup>
- tehtnica Mettler Toledo (mikro tehtnica)
- tehtnica Mettler Toledo (analitska tehtnica)

- ultrazvočna kopel Sonis 20, ISKRA
- pH meter; pHM 240 pH/ION meter; Meter Lab
- temperatura kolone: skladno s pripadajočim analiznim postopkom

### **Topila in reagenti**

- prečiščena voda (instrument: Milli Q gradient A<sub>10</sub>)
- acetonitril, CH<sub>3</sub>CN; HPLC kvaliteta, J.T.Baker
- trietilamin, Fluka, p.a.
- fosforjeva (V) kislina, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, min.85%, extrapure, Merck
- kalijev dihidrogenfosfat, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Merck, p.a.
- 0,05 M raztopina KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: V 1000 ml merilno bučo natehtamo 6,8 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in dopolnimo z vodo do oznake.

Topilo = acetonitril : voda : trietilamin = 40 : 60 : 1 (v/v/v); pH vrednost naravnomo na 10,0 s 85 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

### **Kromatografski pogoji**

#### **Priprava mobilne faze**

Acetonitril : 0,05 M raztopina KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 130 : 120 (v/v)

Mobilno fazo filtriramo skozi filter Millipore tip HVLP 0,45µm.

#### **Kolona**

C18, 250 x 4,6 mm, 5µm delci

**Pretok:** 1,5 ml/min

**Volumen injiciranja:** 10 µl

**Valovna dolžina detekcije:** 285nm

### **Raztopine za HPLC meritve**

#### Raztopina standarda (RS)

V 10 ml merilno bučko natehtamo približno 12 mg standarda učinkovine A, raztopimo v topilu in dopolnimo s topilom do oznake (RS1). V 10 ml merilno bučko pipetiramo 1,0 ml raztopine standarda RS1 in dopolnimo s topilom do oznake (RS).

(RS: približno 0,12 mg učinkovine A/ml)

#### Raztopina sorodne substance (RSS)

V 50 ml merilno bučko natehtamo približno 3 mg standarda učinkovine L, raztopimo v topilu in dopolnimo s topilom do oznake (RSS).

(RSS: približno 0,06 mg učinkovine L/ml)

#### Raztopina za kontrolo selektivnosti (RKS)

V 10 ml merilno bučko odpipetiramo 1,0 ml RS1 in 1,0 ml raztopine RSS ter dopolnimo s topilom do oznake (RKS).

(RKS: približno 0,12 mg učinkovine A/ml in 0,006 mg učinkovine L/ml)

#### Raztopina vzorca (RV)

V 250 ml merilno bučko kvantitativno prenesemo pelete po raztapljanju v mediju na aparaturi za raztapljanje in dopolnimo s topilom do oznake. Mešamo na magnetnem mešalu približno 30 minut in nato obdelujemo še 20 minut v ultrazvočni kopeli. Ohladimo na sobno temperaturo, dobro premešamo in del raztopine centrifugiramo 10 minut pri 3500 obratih/minuto.

(RV: približno 0,12 mg učinkovine A/ml)

#### **Postopek HPLC meritve**

V uravnotežen kromatografski sistem injiciramo topilo, raztopino za kontrolo selektivnosti ter petkrat raztopino standarda. Preverimo ustreznost kromatografskega sistema (RSD standardov in faktor ločbe med vrhoma učinkovine A in L na kromatogramu RKS). Nato injiciramo raztopino vzorca ter vrednotimo z metodo zunanjega standarda % preostale učinkovine A po raztapljanju v umetnem želodčnem soku.

### **8.2 PROBLEMATIKA SORODNIH SUBSTANC V VHODNI SUROVINI**

Sorodna substanca je zdravilni učinkovini strukturno sorodna snov in predstavlja nečistoto, kot sestavino zdravila, ki ni kemično definirana učinkovina ali pomožna snov.

Specifikacijska meja za sorodno substanco B: **ne več kot 0,2%**. Delež sorodne substance B se preračuna glede na referenčno substanco z znano vsebnostjo učinkovine ob

upoštevanju razmerja površin vzorca in standarda na kromatogramu, koncentracije standarda, zatehte vzorca in volumna raztopine vzorca.

### **Metoda**

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, HPLC. Metoda zunanjega standarda.

### **Aparature za merjenje in pogoji okolja**

- tekočinski kromatograf Waters 2690D z računalniškim programom Millennium<sup>32</sup>
- tehtnica Mettler Toledo (mikro tehtnica)
- tehtnica Mettler Toledo (analitska tehtnica)
- ultrazvočna kopel Sonis 20, ISKRA
- pH meter; pHM 240 pH/ION meter; Meter Lab
- temperatura kolone: skladno s pripadajočim analiznim postopkom

### **Topila in reagenti**

- prečiščena voda (instrument: Milli Q gradient A<sub>10</sub>)
- acetonitril, CH<sub>3</sub>CN; HPLC kvaliteta, J.T.Baker
- metanol, CH<sub>3</sub>OH; HPLC kvaliteta, J.T.Baker
- fosforjeva (V) kislina, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, min.85%, extrapure, Merck
- diamonijev hidrogenfosfat, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Fluka, p.a.
- puferna raztopina pH 5,5: V 1000 ml merilno bučo natehtamo 1,326 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> raztopimo v približno 950 ml vode in pH raztopine naravnamo na 5,5 s 85 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ter dopolnimo z vodo do oznake.

Topilo = metanol : voda = 50 : 50 (v/v)

### **Kromatografski pogoji**

#### **Priprava mobilne faze**

Linearni gradient po analiznem postopku

Mobilna faza A = puferna raztopina pH 5,5 : acetonitril = 75 : 25 (v/v)

Mobilna faza B = acetonitril

Mobilno fazo filtriramo skozi filter Millipore tip HVLP 0,45µm.

#### **Kolona**

C18, 250 x 4,6 mm, 4µm delci

**Pretok:** 1,5 ml/min

**Volumen injiciranja:** 20  $\mu$ l

**Valovna dolžina detekcije:** 220nm

### **Raztopine za HPLC meritve**

#### Raztopina za kontrolo selektivnosti (RKS)

V 5 ml merilno bučko natehtamo približno 1,0 mg učinkovine M; 1,0 mg učinkovine N; 1,0 mg učinkovine O in 1,0 mg učinkovine B jih raztopimo v topilu ter dopolnimo s topilom do oznake (RKS1). V 20 ml merilno bučko odpipetiramo 1,0 ml raztopine za kontrolo selektivnosti RKS1 ter dopolnimo s topilom do oznake (RKS).

(RKS: približno 0,01 mg učinkovine M/ml, 0,01 mg učinkovine N/ml, 0,01 mg učinkovine O/ml, 0,01 mg učinkovine B/ml)

#### Raztopina standarda (RS)

V 20 ml merilno bučko natehtamo približno 4,0 mg standarda učinkovine B, raztopimo v topilu in dopolnimo s topilom do oznake (RS1). V 20 ml merilno bučko pipetiramo 2,0 ml raztopine standarda RS1 in dopolnimo s topilom do oznake (RS2). V 20 ml merilno bučko pipetiramo 2,0 ml raztopine standarda RS2 in dopolnimo s topilom do oznake (RS).

(RS: približno 0,002 mg učinkovine B/ml)

#### Raztopina vzorca (RV)

V 50 ml merilno bučko natehtamo približno 50 mg vzorca, raztopimo v 2,5 ml metanola in dopolnimo s topilom do oznake (RV).

(RV: približno 1,0 mg učinkovine B/ml)

### **Postopek HPLC meritve**

V uravnovežen kromatografski sistem injiciramo topilo, raztopino za kontrolo selektivnosti ter trikrat raztopino standarda. Preverimo ustreznost kromatografskega sistema (RSD in učinkovitost kolone na kromatogramu standarda ter faktor ločbe med vrhoma učinkovine N in B na kromatogramu RKS). Nato injiciramo raztopino vzorca. Postopek določevanja sorodnih substanc se izvaja in določa na zatehti vzorca po metodi zunanega standarda.



### 8.3 PROBLEMATIKA KROMATOGRFSKE ČISTOTE V VHODNI SUROVINI

Kromatografska čistota je delež učinkovine C glede na prisotne ostale nečistote v vzorcu. Specifikacijska meja za kromatografsko čistoto učinkovine C: **ne manj kot 97,0%**. Pri procentni metodi rezultat vrednotimo tako, da vzamemo razmerje površine učinkovine C z vsoto površin vseh vrhov (razen vrhov topila in placeba) na kromatogramu raztopine vzorca.

#### Metoda

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, HPLC. Procentna metoda na osnovi površin.

#### Aparature za merjenje in pogoji okolja

- tekočinski kromatograf Waters 2690D z računalniškim programom Millennium<sup>32</sup>
- tehtnica Mettler Toledo (mikro tehtnica)
- ultrazvočna kopel Sonis 20, ISKRA
- pH meter; pHM 240 pH/ION meter; Meter Lab
- temperatura kolone: skladno s pripadajočim analiznim postopkom

#### Topila in reagenti

- prečiščena voda (instrument: Milli Q gradient A<sub>10</sub>)
- acetonitril, CH<sub>3</sub>CN; HPLC kvaliteta, J.T.Baker
- trietilamin, Fluka, p.a.
- fosforjeva (V) kislina, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, min.85%, extrapure, Merck

Topilo = mobilna faza

#### Kromatografski pogoji

##### Priprava mobilne faze

Prečiščena voda : acetonitril : trietilamin = 900 : 100 : 1 (v/v/v), pH mobilne faze naravnano na 3,5 s fosforjevo (V) kislino

Mobilno fazo filtriramo skozi filter Millipore tip HVLP 0,45µm.

##### Kolona

C8, 250 x 4,6 mm, 5µm delci

**Pretok:** 1,0 ml/min

**Volumen injiciranja:** 20  $\mu$ l

**Valovna dolžina detekcije:** 195nm

### **Raztopine za HPLC meritve**

#### Raztopina standarda (RS)

V 10 ml merilno bučko natehtamo približno 20 mg standarda učinkovine C, raztopimo v topilu in dopolnimo s topilom do oznake. (RS: približno 2,0 mg učinkovine C/ml)

#### Raztopina vzorca (RV)

V 10 ml merilno bučko natehtamo približno 20 mg vzorca učinkovine, raztopimo v topilu in dopolnimo s topilom do oznake. (RV: približno 2,0 mg učinkovine C/ml)

### **Postopek HPLC meritve**

V uravnotežen kromatografski sistem injiciramo topilo in trikrat raztopino standarda ter preverimo ustreznost kromatografskega sistema (RSD standardov). Kromatografsko čistoto izvajamo na dveh zatehtah vzorca. Injiciramo raztopino vzorca ter delež učinkovine C določimo s procentno metodo na osnovi površin.

## **8.4 PROBLEMATIKA VSEBNOSTI UČINKOVINE V TABLETAH**

Vsebnost je delež zdravilne učinkovine v tableti. Pri testu vsebnosti se skladno z analiznim postopkom zatehta deset tablet v predpisano merilno bučko. Za test enakomernosti vsebnosti pa se da po eno tableto v predpisano merilno bučko. Test enakomernosti vsebnosti se izvaja na desetih tabletah.

Specifikacijska meja za vsebnost učinkovine v tabletah je od **95,0% - 105,0% predpisane vsebnosti**, za enakomernosti vsebnosti učinkovine v tabletah je meja od **85,0% - 115,0% predpisane vsebnosti (RSD – desetih tablet: ne več kot 6,0%)**. Vsebnost učinkovine D se preračuna glede na referenčno substanco znane kvalitete. Pri rezultatu se upošteva še razmerje površin vzorca in standarda na kromatogramu, koncentracija standarda, zatehta in volumen raztopine vzorca, povprečna masa tablete in predpisana vsebnost učinkovine D v tableti.

## **Metoda**

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, HPLC. Metoda zunanjega standarda.

## **Aparature za merjenje in pogoji okolja**

- tekočinski kromatograf Waters 2690D z računalniškim programom Millennium<sup>32</sup>
- tehtnica Mettler Toledo (mikro tehtnica)
- tehtnica Mettler Toledo (analitska tehtnica)
- ultrazvočna kopel Sonis 20, ISKRA
- pH meter; pHM 240 pH/ION meter; Meter Lab
- temperatura kolone: skladno s pripadajočim analiznim postopkom

## **Topila in reagenti**

- prečiščena voda (instrument: Milli Q gradient A<sub>10</sub>)
- acetonitril, CH<sub>3</sub>CN; HPLC kvaliteta, J.T.Baker
- metanol, CH<sub>3</sub>OH; HPLC kvaliteta, J.T.Baker
- trietilamin, Fluka, p.a.
- fosforjeva (V) kislina, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, min.85%, extrapure, Merck
- puferna raztopina pH 3,0: V 1000 ml merilno bučo odpipetiramo 7,0 ml trietilamina in dopolnimo z vodo do oznake, pH raztopine naravnamo na 3,0 s 85 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

Topilo = mobilna faza

## **Kromatografski pogoji**

### **Priprava mobilne faze**

A : B = 50 : 50 (v/v)

A = acetonitril : metanol = 30 : 70 (v/v)

B = puferna raztopina pH 3,0

Mobilno fazo filtriramo skozi filter Millipore tip HVLP 0,45µm.

### **Kolona**

C18, 150 x 3,9 mm, 5µm delci.

**Pretok:** 2,0 ml/min

**Volumen injiciranja:** 10 µl

**Valovna dolžina detekcije:** 237nm

## **Raztopine za HPLC meritve**

### Raztopina standarda (RS)

V 10 ml merilno bučko natehtamo približno 14 mg standarda učinkovine D, raztopimo v topilu in dopolnimo s topilom do oznake (RS1). V 100 ml merilno bučko pipetiramo 5,0 ml standarda RS1 in dopolnimo s topilom do oznake (RS).

(RS: približno 0,07 mg učinkovine D/ml)

### Raztopina vzorca (RV) - vsebnost

V 50 ml merilno bučko natehtamo 10 tablet, dodamo 40 ml topila in obdelujemo v ultrazvočni kopeli 20 minut ter dopolnimo s topilom do oznake. Raztopino dobro premešamo in ponovno obdelujemo v ultrazvočni kopeli približno 30 minut. Nato del raztopine centrifugiramo 10 minut pri 3500 obratih/minuto. V 100 ml merilno bučko odpipetiramo 5,0 ml bistrega centrifugata ter dopolnimo s topilom do oznake.

(RV: približno 0,07 mg učinkovine D/ml)

### Raztopina vzorca (RV) – enakomernosti vsebnosti

V 100 ml merilno bučko damo po eno tableto, dodamo 80 ml topila in obdelujemo v ultrazvočni kopeli 20 minut ter dopolnimo s topilom do oznake. Raztopino dobro premešamo in ponovno obdelujemo v ultrazvočni kopeli približno 30 minut. Nato del raztopine centrifugiramo 10 minut pri 3500 obratih/minuto. Bistri centrifugat je raztopina vzorca (RV1 – RV10).

(RV: približno 0,07 mg učinkovine D/ml)

## **Postopek HPLC meritve**

V uravnovežen kromatografski sistem injiciramo topilo in petkrat raztopino standarda ter preverimo ustreznost kromatografskega sistema (RSD standardov). Nato injiciramo raztopino vzorca ter vrednotimo z metodo zunanjega standarda % učinkovine D glede na predpisano vsebnost v tableti.

## 8.5 PROBLEMATIKA VSEBNOSTI UČINKOVINE V TABLETNI MASI

Vsebnost je delež zdravilne učinkovine v tabletni masi.

Specifikacijska meja: **95,0% - 105,0% predpisane vsebnosti učinkovine v 1 gramu tabletne mase**. Vsebnost učinkovine E se preračuna glede na referenčno substanco znane kvalitete. Pri rezultatu se upošteva še razmerje površin vzorca in standarda na kromatogramu, koncentracija standarda, zatehta in volumen raztopine vzorca in predpisana vsebnost učinkovine E v tabletni masi.

### Metoda

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, HPLC. Metoda zunanjega standarda.

### Aparature za merjenje in pogoji okolja

- tekočinski kromatograf Waters 2690D z računalniškim programom Millenium<sup>32</sup>
- tehtnica Mettler Toledo (mikro tehtnica)
- tehtnica Mettler Toledo (analitska tehtnica)
- ultrazvočna kopel Sonis 20, ISKRA
- pH meter; pHM 240 pH/ION meter; Meter Lab
- temperatura kolone: skladno po pripadajočem analiznem postopku

### Topila in reagenti

- prečiščena voda (instrument: Milli Q gradient A<sub>10</sub>)
- acetonitril, CH<sub>3</sub>CN; HPLC kvaliteta, J.T.Baker
- očetna kislina, CH<sub>3</sub>COOH; min.99%, Merck, p.a.
- dinatrijev hidrogenfosfat, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Fluka, p.a.
- fosforjeva (V) kislina, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, min.85%, extrapure, Merck
- natrijev hidroksid, NaOH, Fluka, p.a.
- 5M NaOH: V 100 ml merilno bučko natehtamo 20 g NaOH raztopimo v vodi in dopolnimo z vodo do oznake.
- 20% (m/V) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: V 100 ml merilno bučko odpipetiramo 13,8 ml 85 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in dopolnimo z vodo do oznake.

- puferna raztopina pH 4,5: V 1000 ml merilno bučo natehtamo 3,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> raztopimo v 900 ml, naravnamo pH vrednost na 4,5 z 20% (m/V) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in dopolnimo z vodo do oznake.

Topilo = V 1000 ml merilno bučo damo 900 ml vode, dopipetiramo 3,0 ml očetne kisline min. 99%, naravnamo pH vrednost na 4,0 s 5M NaOH in dopolnimo z vodo do oznake. K 200 ml te raztopine dodamo 800 ml acetonitrila in premešamo.

### **Kromatografski pogoji**

#### **Priprava mobilne faze**

A : B = 65 : 35 (v/v)

A = acetonitril

B = puferna raztopina pH 4,5

Mobilno fazo filtriramo skozi filter Millipore tip HVLP 0,45µm.

#### **Kolona**

C18, 250 x 4,6 mm, 5µm delci

**Pretok:** 2,0 ml/min

**Volumen injiciranja:** 10 µl

**Valovna dolžina detekcije:** 238nm

### **Raztopine za HPLC meritve**

#### Raztopina standarda (RS)

V 20 ml merilno bučko natehtamo približno 20 mg standarda učinkovine E, raztopimo v topilu in dopolnimo s topilom do oznake (RS1). V 10 ml merilno bučko odpipetiramo 1,0 ml standarda RS1 in dopolnimo s topilom do oznake (RS).

(RS: približno 0,1 mg učinkovine E/ml)

#### Raztopina vzorca (RV)

V 250 ml merilno bučko natehtamo približno 0,895 g vzorca granulata, dodamo 10,0 ml vode in mehansko stresamo približno 30 minut, dodamo 200 ml topila in nadaljujemo s stresanjem še približno 30 minut. Vzorec nato še približno 30 minut obdelujemo v ultrazvočni kopeli. Raztopino nato dopolnimo s topilom do oznake. Nato del raztopine

centrifugiramo 10 minut pri 3000 obratih/minuto. V 20 ml merilno bučko odpipetiramo 5,0 ml bistrega centrifugata ter dopolnimo s topilom do oznake.

(RV: približno 0,1 mg učinkovine E/ml)

### **Postopek HPLC meritve**

V uravnovežen kromatografski sistem injiciramo petkrat raztopino standarda ter preverimo ustreznost kromatografskega sistema (RSD standardov). Vsebnost se izvaja in določa na dveh zatehtah vzorca. Nato injiciramo raztopino vzorca ter vrednotimo z metodo zunanjega standarda % učinkovine glede na predpisano vsebnost v 1 gramu tabletne mase.

## 9. REZULTATI IN RAZPRAVA

Pri testiranju farmacevtskega proizvoda lahko pride do analiznega rezultata izven zahtevanih meja, kar pomeni, da je potrebno le tega raziskati. Problematika rezultatov izven zahtevanih meja ima v laboratoriju za kontrolo kakovosti zelo velik pomen. V nadaljevanju bomo prikazali kako pristopiti k raziskavi neustreznih rezultatov na različnih stopnjah. Pomembno je, da k raziskavi rezultatov izven zahtevanih meja pristopimo čim hitreje in s tem zmanjšamo delež pojavljanja napak in delež neustreznih rezultatov v bodoče. Predstavljeni bodo rezultati laboratorijske raziskave rezultatov izven zahtevanih meja na različnih farmacevtskih oblikah (Slika 3) z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti. V raziskavo je vključenih pet primerov raziskave rezultatov izven zahtevanih meja in sicer problematika gastrorezistence v peletah, sorodnih substanc v vhodni surovini, kromatografske čistote v vhodni surovini, vsebnosti učinkovine v tabletah ter vsebnosti učinkovine v tabletni masi.



Slika 3: Različne farmacevtske oblike (tablete, kapsule, praški, dražeji)



Raziskavo izven zahtevanih meja smo začeli na prvi stopnji skladno s shemo poteka OOS raziskav (poglavje 6, Slika 2). V prvi stopnji raziskave smo pri vseh analizah preverili ustreznost rezultatov glede na specifikacijsko mejo. Zato smo skupaj z odgovorno, nadrejeno osebo laboratorija pričeli iskati vzrok za neustrezen rezultat. Preglednica I nam prikazuje pregled analizne dokumentacije in poteka analize v prvi stopnji raziskave, ki ga izvedeta analitik in odgovorna, nadrejena oseba v laboratoriju. Obenem so bile narejene posamezne vizualne in računske preveritve ter izpolnjen dokument o raziskavi rezultatov izven zahtevanih meja prve stopnje (poglavje 6.1).

Preglednica I: Pregled analizne dokumentacije in poteka analize v prvi stopnji raziskave

<b>Test (poglavje)</b>	<b>9.1</b>	<b>9.2</b>	<b>9.3</b>	<b>9.4</b>	<b>9.5</b>
<b>Preveritev dejavnikov</b>					
<b>Uporaba napačnega analiznega postopka</b>	NE	NE	NE	NE	NE
<b>Napaka v izračunu</b>	NE	NE	NE	NE	NE
<b>Napaka pri pripravi testnih raztopin (standard, vzorec)</b>	NE	NE	NE	NE	NE
<b>Uporaba nekalibriranega analiznega instrumenta</b>	NE	NE	NE	NE	NE
<b>Nedosledno izvajanje analiznega postopka (neustrezni reagenti, nepravilne redčitve, uporaba neustrezne kolone, itd.)</b>	NE	NE	NE	NE	NE
<b>Izguba standardne ali testne raztopine med pripravo</b>	NE	NE	NE	NE	NE
<b>Drugi vzroki</b>	NE	NE	NE	NE	NE

Po raziskavi prve stopnje smo ugotovili, da vzrok za rezultat izven zahtevanih meja ni bil nobeden izmed dejavnikov, ki so naštetih v Preglednici I. Kjer nam test dovoljuje, smo nadaljevali z raziskavo druge stopnje oziroma prešli na raziskavo tretje stopnje, skladno s shematskim prikazom poteka raziskave izven zahtevanih meja (poglavje 6, Slika 2).

## 9.1 PROBLEMATIKA GASTROREZISTENCE PELET

Zdravilna učinkovina se iz gastrozistentnega zdravila sprosti šele po prehodu v tanko črevo, kjer pH znatno naraste. V farmaciji je gastrozistentnost lastnost farmacevtske oblike, ki ostane enaka tekom prehoda skozi želodec.

Test določevanja gastrozistence smo se odločili predstaviti zato, ker nam specifikacija za test gastrozistenosti po pridobljenem neustreznem rezultatu ne dovoljuje ponovitve. Za

potrditev kakovosti izdelka morajo biti vsi rezultati raztapljanja učinkovine znotraj specifikacijskih meja (poglavje 8.1).

Specifikacijska meja za test gastrozestizenosti učinkovine A je **ne manj kot 90% določene vsebnosti v 120 minutah v umetnem želodčnem soku**.

Preglednica II: Rezultati testa gastrozestizenosti

Vzorec A	% preostale učinkovine A
1.	<b>88%</b>
2.	91%
3.	92%
4.	<b>89%</b>
5.	90%
6.	<b>84%</b>

**Ugotovitve:**

Po končani izvedbi analize gastrozestizenosti smo opazili, da posamezni rezultati raztapljanja učinkovine A ne ustrezajo specifikacijski meji, kar nam prikazuje Preglednica II. Rezultati, ki so izven specifikacijskih meja so zatehta 1 (88%), zatehta 4 (89%) in zatehta 6 (84%). Preostale tri zatehte so na spodnji meji specifikacije. Da bi preverili ustreznost rezultatov glede na specifikacijsko mejo, smo skupaj z odgovorno, nadrejeno osebo laboratorija pričeli iskati vzrok za neustrezen rezultat. Narejene so bile posamezne vizualne in računske preveritve (Preglednica I) ter izpolnjen dokument o raziskavi rezultatov izven zahtevanih meja prve stopnje (poglavje 6.1).

Preverjena je bila fizična izvedba testa raztapljanja (priprava in volumen medija, temperatura medija po kadičkah, nastavitvev hitrosti vrtenja po posameznih kadičkah), kjer nismo opazili odstopov. Izvedba testa raztapljanja ni vzrok za neustrezen rezultat.

Po pregledu celotne analizne dokumentacije po vrednotenju s HPLC tehniko, pri raziskavi rezultatov izven zahtevanih meja prve stopnje nismo ugotovili vzroka za neustrezen rezultat. Preverili smo tudi zgodovino rezultatov za učinkovino A na predpisani šifri izdelka. Pri pregledu rezultatov smo ugotovili, da večjih odstopov pri testu gastrozestizenosti do sedaj ni bilo.

### **Zaključek:**

Analizni postopek gastrorezistence ne dovoljuje ponovitve testa, zato z raziskavo ne nadaljujemo. Laboratorijsko raziskavo rezultatov izven zahtevanih meja zaključimo na prvi stopnji kot neustrezno.

## **9.2 PROBLEMATIKA SORODNIH SUBSTANC V VHODNI SUROVINI**

Test sorodnih substanc je pomemben parameter kakovosti izdelka. Sorodne substance lahko po določenem času naraščajo, kar pomeni, da se kakovost izdelka spreminja. Test sorodnih substanc učinkovine B smo izvajali na seriji kot reanalizo (ponovna analiza po določenem času). Z reanalizo ugotavljamo ali je vzorec še skladen s specifikacijo in primeren za uporabo po določenem času.

Pri testu sorodnih substanc je specifikacijska meja za sorodno substanco B: **ne več kot 0,2%** (poglavje 8.2).

V prvi stopnji raziskave smo dobili rezultat sorodne substance B **0,27%**.

### **Ugotovitve:**

Po končani analizi testa sorodnih substanc smo ugotovili, da sorodna substanca B ne ustreza specifikacijski meji (ne več kot 0,2%), saj je bila določena vrednost 0,27%. Opravljen je bil pregled pripadajoče analizne dokumentacije (kromatogrami, zatehte) ter celoten pregled poteka analize (vsa pripadajoča uporabljena steklovina in aparature). Narejene so bile preveritve (Preglednica I) in izpolnjen je bil dokument o raziskavi rezultatov izven zahtevanih meja prve stopnje (poglavje 6.1).

Pregledali smo tudi trend rezultatov izven zahtevanih meja za sorodno substanco B na predpisani šifri izdelka. Pri pregledu rezultatov smo ugotovili, da odstopov pri testu sorodnih substanc ni bilo. Vzorec je bil že dvakrat v analizi. Postopek reanaliz se lahko ponovi večkrat, če rezultati retestiranja ustrezajo specifikacijskim mejam. Do zadnje analize so rezultati sorodne substance B ustrezali specifikacijski meji. Glede na predhodne analize opazamo, da sorodna substanca B s časom narašča.

Pri raziskavi rezultatov izven zahtevanih meja prve stopnje nismo ugotovili analitske napake za neustrezen rezultat. Raziskavo rezultatov izven zahtevanih meja zaključimo na

prvi stopnji. Z laboratorijsko raziskavo na drugi stopnji in dodatnimi analizami ne nadaljujemo.

**Zaključek:**

Ker sorodna substanca ne ustreza specifikacijskim mejam, se vzorec oceni kot neustrezen.

### 9.3 PROBLEMATIKA KROMATOGRFSKE ČISTOTE V VHODNI SUROVINI

Test kromatografske čistote je pomemben parameter kakovosti izdelka.

Pri testu določevanja kromatografske čistote smo v prvi stopnji laboratorijske raziskave dobili neustrezen rezultat, v drugi stopnji laboratorijske raziskave pa smo rezultat prve stopnje ovrgli.

Specifikacijska meja za kromatografsko čistoto učinkovine C je **ne manj kot 97,0%** (poglavje 8.3).

V prvi stopnji raziskave smo dobili rezultat testa kromatografske čistote učinkovine C **96,7%**. Ker je bil rezultat neustrezen, smo nadaljevali z raziskavo druge stopnje. Rezultati raziskave druge stopnje so zbrani v Preglednici III.

Preglednica III: Rezultati testa kromatografska čistota učinkovine C

Vzorec C	Kromatografska čistota učinkovine C (%)	
	Analitik I	Analitik II
1. paralelka	97,8%	97,8%
2. paralelka	98,1%	97,9%
3. paralelka	97,4%	97,9%
Povprečje	97,8%	97,9%
Povprečje (Analitik I in Analitik II)		97,8%

**Ugotovitve:**

Po končani analizi je bilo ugotovljeno, da rezultat testa kromatografska čistota učinkovine C ne ustreza specifikacijski meji (ne manj kot 97,0%), saj je bila določena vrednost 96,7%. Ker rezultat ne ustreza, je bil izveden celotni pregled pripadajoče analizne dokumentacije ter pregled poteka analize (Preglednica I). Izpolnjen je bil dokument o raziskavi rezultatov izven zahtevanih meja prve stopnje (poglavje 6.1).

Pregled zgodovine rezultatov kromatografske čistote je bil izveden in ugotovljeno je bilo, da odstopov na šifri izdelka ni bilo. Opaženo pa je bilo, da so v vzorcu prisotne grudice, kar bi bil lahko vzrok za neustrezen rezultat. Da bi ugotovili ali je nehomogenost vzorca vzrok za neustrezen rezultat, smo nadaljevali z raziskavo druge stopnje, kjer smo posebno pozornost namenili pripravi raztopine vzorca. Prisotne grudice smo želeli čimbolj razbiti. Raziskavo rezultatov izven zahtevanih meja druge stopnje sta izvajala dva analitika. Dodatno testiranje je bilo narejeno na treh paralelnih vzorcih (Preglednica III). Po končani raziskavi druge stopnje je bilo ugotovljeno, da vsi rezultati ustrezajo specifikacijski meji. Povprečje rezultatov obeh analitikov dodatnega testiranja je 97,8%. Izpolnjen je bil dokument o raziskavi rezultatov izven zahtevanih meja druge stopnje (poglavje 6.2).

Vzrok za prvotni rezultat je bila nepravilna priprava vzorca analitika. Vzorec je potrebno pred analizo dobro homogenizirati in razbiti grudice.

**Zaključek:**

Z laboratorijsko raziskavo druge stopnje smo ovrgli prvoten neustrezen rezultat raziskave prve stopnje in vzorec zaključili kot ustrezen. Da bi odpravili napako analitika v laboratoriju, se analitika izobrazijo po analizni metodi s poudarkom na pripravi raztopine vzorca. Glede na videz vzorca se poda pripomba na analizni postopek, kjer je pri pripravi vzorca le - tega potrebno pred analizo dobro homogenizirati.

**9.4 PROBLEMATIKA VSEBNOSTI UČINKOVINE V TABLETAH**

Test vsebnosti učinkovine je osnovni parameter kakovosti izdelka. Pri testu določevanja vsebnosti učinkovine D smo v laboratorijski raziskavi prve stopnje dobili neustrezen rezultat. V raziskavi druge stopnje pa smo potrdili neustrezen rezultat prve stopnje (93,5%), vendar s spremenljivimi rezultati vsebnosti učinkovine D.

Specifikacijska meja za vsebnost učinkovine v tabletah je od **95,0% - 105,0% predpisane vsebnosti**, za enakomernost vsebnosti učinkovine v tabletah je meja od **85,0% - 115,0% predpisane vsebnosti (RSD: ne več kot 6,0%)** (poglavje 8.4).

V raziskavi prve stopnje smo dobili rezultat testa vsebnosti učinkovine D 93,5%. Istočasno s testom vsebnosti smo izvedli še test enakomernosti vsebnosti, da smo preverili kakšna je vsebnost učinkovine v posamezni tableti. Rezultati testa enakomernosti vsebnosti v desetih tabletah so podani v Preglednici IV. Povprečje rezultatov testa enakomernosti vsebnosti v desetih tabletah je 92,4%. Rezultati testa enakomernosti vsebnosti ustrezajo specifikacijskim zahtevam za omenjeni test (širše zahteve).

Preglednica IV: Rezultati testa enakomernosti vsebnosti učinkovine D

Tableta	Enakomernost vsebnosti učinkovine D (%)
1.	89,8%
2.	92,8%
3.	90,5%
4.	94,9%
5.	94,0%
6.	93,4%
7.	92,6%
8.	90,3%
9.	92,0%
10.	94,1%
Povprečje $x_{10} = 92,4\%$ , RSD = 1,9%	

Ker je bil rezultat vsebnosti neustrezen, smo nadaljevali z raziskavo druge stopnje. Rezultati so prikazani v Preglednici V.

Preglednica V: Rezultati testa vsebnosti učinkovine D

Vzorec D	Vsebnost učinkovine D (%)
	Analitik I
1. paralelka	95,3%
2. paralelka	96,4%
3. paralelka	93,9%
Povprečje	95,2%

**Ugotovitve:**

Ugotovili smo, da rezultat vsebnosti učinkovine D (93,5%) odstopa od specifikacijske meje (95,0% - 105,0% predpisane vsebnosti). Izveden je bil celotni pregled analizne dokumentacije ter pregled poteka analize (Preglednica I). Izpolnjen je bil dokument o raziskavi rezultatov izven zahtevanih meja prve stopnje (poglavje 6.1).

Narejen je bil pregled zgodovine rezultatov testa vsebnosti učinkovine D. Ugotovljeno je bilo, da nismo beležili odstopov na šifri izdelka. V preteklosti je bil zabeležen odstop vsebnosti učinkovine D, vendar ne na isti šifri izdelka.

Pri pregledu rezultatov postopka in izvedbe analize testa vsebnosti učinkovine D ni bilo ugotovljenih napak. Poleg vsebnosti učinkovine D je bila istočasno izvedena analiza enakomernosti vsebnosti učinkovine D na desetih tabletah (Preglednica IV) na istem kromatografskem sistemu. Rezultati testa enakomernosti vsebnosti (povprečje  $x_{10} = 92,4\%$ ) kažejo na nizko vsebnost učinkovine D v tabletah in s tem potrjujejo nizko vsebnost učinkovine D (93,5%). Preidemo na raziskavo rezultatov izven zahtevanih meja druge stopnje.

Raziskavo rezultatov izven zahtevanih meja druge stopnje je izvajal en analitik. Dodatno testiranje je bilo izvedeno na treh paralelnih vzorcih.

Po raziskavi druge stopnje je analitik potrdil neustrezen rezultat (93,5%) laboratorijske raziskave prve stopnje. Iz rezultatov, ki so prikazani v Preglednici V je razbrati, da so rezultati tako znotraj kot zunaj specifikacijskih meja. Rezultati dobljeni pri laboratorijski raziskavi prve stopnje (93,5%) in druge stopnje (95,2%) ne morejo podati končne ocene izdelka. Izpolnjen je bil dokument o raziskavi rezultatov izven zahtevanih meja druge stopnje (poglavje 6.2). Zaradi spremenljivosti vzorca predlagamo raziskavo tretje stopnje.

### **Zaključek:**

Zaradi spremenljivosti rezultatov vsebnosti učinkovine D v tabletah, predlagamo da preidemo na raziskavo tretje stopnje. V sklopu tretje stopnje raziskave predlagamo raziskavo na razširjenem vzorcu, ki bo bolj natančno opredelil homogenost serije (Slika 2, poglavje 6.4).

### **9.5 PROBLEMATIKA VSEBNOSTI UČINKOVINE V TABLETNI MASI**

Test vsebnosti učinkovine je osnovni parameter kakovosti izdelka. Pri testu določevanja vsebnosti učinkovine E v tabletni masi smo v laboratorijski raziskavi prve stopnje dobili neustrezen rezultat. V raziskavi druge stopnje pa smo potrdili neustrezen rezultat prve stopnje (120,6%) ter prešli in prikazali potek raziskave tretje stopnje, skladno s shemo poteka raziskave rezultatov izven zahtevanih meja (Slika 2, poglavje 6.4).

Specifikacijska meja za vsebnost učinkovine v tabletni masi je od **95,0% - 105,0% predpisane vsebnosti učinkovine v 1 gramu tabletne mase** (poglavje 8.5).

V raziskavi prve stopnje smo dobili rezultat testa vsebnosti učinkovine E 120,6%. Ker je bil rezultat vsebnosti neustrezen, smo nadaljevali z raziskavo druge stopnje, kjer smo dobili rezultate, ki jih prikazuje Preglednica VI.

Preglednica VI: Rezultati testa vsebnosti učinkovine E

	Vsebnost učinkovine E (%)
Vzorec E	Analitik I
1. paralelka	119,9%
2. paralelka	121,7%
3. paralelka	119,3%
Povprečje	120,3%

### **Ugotovitve:**

Rezultat testa vsebnosti učinkovine E (120,6%) zelo odstopa od specifikacijske meje (95,0% - 105,0% predpisane vsebnosti učinkovine v 1 gramu tabletne mase). Izveden je bil celotni pregled analizne dokumentacije ter pregled poteka analize (Preglednica I).



Izpolnjen je bil dokument o raziskavi rezultatov izven zahtevanih meja prve stopnje (poglavje 6.1). Opravljen je bil pregled zgodovine rezultatov vsebnosti učinkovine E v tabletni masi, kjer do sedaj nismo beležili odstopov. V sklopu analize vsebnosti učinkovine E je bilo poleg analiziranih še pet drugih serij, ki so ustrezale specifikacijskim mejam. Pri pregledu rezultatov testa vsebnosti učinkovine E ni bilo ugotovljenih napak.

Raziskava rezultatov izven zahtevanih meja smo nadaljevali z raziskavo rezultatov izven zahtevanih meja druge stopnje. Dodatno testiranje je izvedel analitik na treh paralelnih vzorcih. Z rezultati dodatnega testiranja istega vzorca na drugi stopnji raziskave je bil potrjen neustrezen rezultat raziskave prve stopnje (120,6%), kar nam prikazuje Preglednica VI. Povprečje dodatnega testiranja vsebnosti učinkovine E je 120,3% predpisane vsebnosti v enem gramu tabletno mase. Izpolnjen je bil dokument o raziskavi rezultatov izven zahtevanih meja druge stopnje (poglavje 6.2). Zaradi neustreznega rezultata serije se raziskava nadaljuje na tretji stopnji.

Pri raziskavi tretje stopnje so prisotni odgovorne osebe oddelka za kontrolo kakovosti, oddelka za zagotavljanje kakovosti in odgovorne osebe iz proizvodnje. Pri raziskavi tretje stopnje se podajo vse ugotovitve tekom proizvodnje izdelka kot nadaljnji ukrepi.

#### Ugotovitve:

1. Neustrezen rezultat je bil potrjen z delno raziskavo rezultatov izven zahtevanih meja druge stopnje.
2. Preverjeno je bilo, da je bila serija izdelana deseta po vrsti v procesu izdelave dvanajstih serij. Vsebnost učinkovine E ostalih serij je bila ustrezna.
3. Med samo proizvodnjo izdelka ni bilo opaženih nobenih posebnosti.
4. V serijo je vstopala ista surovina učinkovine E kot v ostale serije v procesu izdelave. Surovina, ki je vstopala v serije je ustrezala specifikacijskim zahtevam.

#### Ukrepi:

1. Pregleda se celotna dokumentacija surovine, ki je vstopala v serijo.
2. Raziskati je potrebno potek in način vzorčenja pri neustrezni seriji.
3. Izvede se dodatno vzorčenje in analiza na vseh vzorcih dodatnega vzorčenja.
4. Na izdelku se spremlja rezultate vsebnosti (6 mesecev).
5. Ker gre za tabletno maso – granule, je potrebno preveriti možnost uvedbe dodatne faze homogenizacije vzorca.

**Zaključek:**

Neustrezna serija se ne odobri. Počakamo rezultate dodatnega vzorčenja na razširjenem vzorcu. Izpolni se dokument o raziskavi rezultatov izven zahtevanih meja tretje stopnje (poglavje 6.3).

Po dodatnem vzorčenju smo v sklopu raziskave tretje stopnje izvedli dodatno laboratorijsko raziskavo, skladno s shemo o raziskavi rezultatov izven zahtevanih meja (Slika 2, poglavje 6). Rezultati vsebnosti učinkovine E so podani v Preglednici VII.

Preglednica VII: Rezultati testa vsebnosti učinkovine E

Vzorec		Vsebnost učinkovine E (%)
1.vreča	vrh	97,8%
	dno	97,8%
2.vreča	vrh	100,2%
	dno	99,1%
3.vreča	vrh	100,0%
	dno	100,2%
4.vreča	vrh	97,4%
	dno	96,5%
5.vreča	vrh	99,6%
	dno	98,9%
6.vreča	vrh	98,5%
	dno	100,2%
Povprečje $x_{12}$		98,9%

Na seriji je bilo izvedeno dodatno, razširjeno vzorčenje. Vzorčenje je bilo izvedeno na šestih vrečah (mesto vzorčenja vrh – dno). Povprečje rezultatov po dodatnem vzorčenju je 98,9% (Preglednica VII), kar je znotraj specifikacijskih meja.

**Zaključek:**

Vzrok za neustrezen rezultat je bila napaka v vzorčenju. Predlagamo, da se poskusno tabletira del tabletne mase ter se preveri ustreznost vsebnosti na probnih tabletah. Zaradi napake pri vzorčenju, je potrebno dodatno izobraziti vzorčevalca.

## 10. SKLEPI

- Na osnovi predstavljenih primerov laboratorijskih raziskav rezultatov izven zahtevanih meja je na različnih farmacevtskih oblikah z metodo HPLC prikazan pristop k posamezni raziskavi neustreznih rezultatov.
- Raziskava rezultatov izven zahtevanih meja mora biti vodena skladno s trenutnimi smernicami dobre laboratorijske prakse.
- Težnja vsake raziskave rezultatov izven zahtevanih meja je odkriti napako oziroma vzrok za neustrezen rezultat.
- V laboratorijski raziskavi prve stopnje je ključnega pomena celovit pregled analizne dokumentacije in potek analize z vsemi ključnimi dejavniki (uporaba pravega analiznega postopka, pravi izračun, dosledno izveden analizni postopek, pravilna priprava testnih raztopin, uporaba kalibriranega analiznega instrumenta).
- Vsaka posamezna stopnja raziskave mora biti pravilno dokumentirana in zaključena s strani odgovornih oseb v določenem časovnem obdobju.
- Ukrepe raziskav rezultatov izven zahtevanih meja je potrebno realizirati v čim krajšem času, da se prepreči oziroma zmanjša pojavljanje napak v bodoče.
- Pri testu gastrorezistence analizni postopek ne dovoljuje ponovitve testa, zato se z raziskavo ne nadaljuje. Laboratorijska raziskava rezultatov izven zahtevanih meja se zaključi na prvi stopnji kot neustrezno.
- Pri problematiki sorodnih substanc v vhodni surovini se vzorec oceni kot neustrezen, ker sorodna substanca ne ustreza specifikacijskim mejam. Z dodatnimi analizami se ne nadaljuje.

- Pri problematiki kromatografske čistote v vhodni surovini je bil z laboratorijsko raziskavo druge stopnje ovržen prvoten neustrezen rezultat raziskave prve stopnje in vzorec zaključen kot ustrezen. Vzrok za neustrezen rezultat je bila napaka analitika. Izvedeno je bilo izobraževanje po analizni metodi s poudarkom na pripravi raztopine vzorca. Podana je bila pripomba na analizni postopek.
- Pri testu vsebnosti učinkovine D v tabletah smo z raziskavo druge stopnje dobili spremenljive rezultate vsebnosti. V sklopu tretje stopnje raziskave je bila predlagana raziskava na razširjenem vzorcu, ki bo bolj natančno opredelil homogenost serije.
- Pri problematiki vsebnosti v tabletni masi je bilo v sklopu raziskave tretje stopnje izvedeno dodatno vzorčenje na razširjenem vzorcu. Vzrok za neustrezen rezultat je bila napaka pri vzorčenju. Zato je bilo izvedeno dodatno izobraževanje vzorčevalca.

## 11. LITERATURA

1. Belupo d.d. Istraživanje rezultata izvan specifikacije ili trenda dobivenim kemijskom analizom ali <http://www.belupo.si/>
2. BioPharm International. History of the OOS Problem ali <http://www.biopharminternational.findpharma.com/>
3. FDA . Guidance for Industry: Investigating Out-of-specification (OOS) Test Results for Pharmaceutical Production; Pharmaceutical CGMPs, oktober 2006.
4. Q – SATIS. Praktična znanja na zanimiv način; gradivo seminarja »Kaj če je analitski rezultat izven meja?« Ljubljana, april 2007.
5. GMP News. FDA Requirements on Reporting and Interpreting OOS Results ali [http://www.gmp-navigator.com/eca\\_news\\_879.html](http://www.gmp-navigator.com/eca_news_879.html)
6. Pharmaceutical Technology. A Review of Statistical Outlier Methods ali <http://www.pharmtech.com/pharmtech/content/>
7. SOP Krka. Raziskava analiznih rezultatov, ki so izven zahtevanih meja, izdaja 05, 14.9.2007.
8. Strokovno posvetovanje ob predstavitvi prvega dopolnila k drugi izdaji Formulariuma Slovenicuma (FS 2.1), Ljubljana, oktober 2006.