

# Kontaminacija, unakrsna kontaminacija i validacija čišćenja u farmaceutskoj industriji

---

**Ažić, Lucija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:983738>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-07**

*Repository / Repozitorij:*



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA

Diplomski sveučilišni studij  
Istraživanje i razvoj lijekova

Lucija Ažić

**Kontaminacija, unakrsna kontaminacija i validacija čišćenja u  
farmaceutskoj industriji**

Diplomski rad

Rijeka, 2024.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA  
Diplomski sveučilišni studij  
Istraživanje i razvoj lijekova

Lucija Ažić

Kontaminacija, unakrsna kontaminacija i validacija čišćenja u  
farmaceutskoj industriji

Diplomski rad

Rijeka, 2024.

Mentor rada: doc. dr. sc. Stribor Marković

Diplomski rad obranjen je dana \_\_\_\_\_

pred povjerenstvom:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Rad ima 45 stranica, 9 slika, 24 tablica i 15 literaturnih navoda

## Sažetak

Prema zahtjevima dobre proizvođačke prakse, farmaceutska industrija dužna je provoditi validaciju čišćenja kako bi se osigurala kvaliteta i sigurnost proizvoda. Validacija čišćenja je dokumentirani dokaz da su postupkom čišćenja primjereno i dosljedno uklonjeni svi ostaci prethodnog proizvoda, nusproizvodi, mikroorganizmi i ostaci sredstva za čišćenje. Njena svrha je pravovremena identifikacija i ispravljanje mogućih problema. Kako bi se ocijenio postupak čišćenja, potrebno je odrediti kriterij prihvatljivosti – prihvatljivu razinu ostataka. Cilj ovog rada dijeli se na dva dijela. Prvi je analiza i eksperimentalno ispitivanje problema učinkovitosti čišćenja proizvoda na specifičnom mješaču. Laboratorijski su se stimulirali uvjeti čišćenja, analizirajući različite metode pranja. Cilj je utvrditi koji od šest mogućih proizvoda ostavlja zaostatke nakon čišćenja te koja od ispitanih metoda osigurava najbolju razinu čistoće. Ovaj eksperiment je obuhvatio vaganje pločica, nanošenje proizvoda, sušenje te primjenu različitih metoda pranja – pročišćena voda, otopine COSA CIP92 i CIP72 deterdženta i ClearKlens Mega deterdženta. Drugi cilj je usmjeren na validaciju učinkovitosti postojeće metode čišćenja, kako bi se osiguralo da nema ostataka aktivnog sastojka i deterdženta na opremi. Kako bi se potvrdilo da nema zaostataka korištene su metoda HPLC-a i TOC-a. Rezultati eksperimenta ukazuju na to da su primijenjeni deterdženti učinkovitiji od pročišćene vode. Najveće probleme su stvarali proizvodi 2 i proizvod 4 te su zahtijevali specifične pristupe. Na kraju se za proizvod 4 hladna 1%-tna otopina CIP92 deterdženta pokazala učinkovita, dok je za proizvod 2 još uvijek neodgovoreno to pitanje te su potrebne dodatne analize. Validacijom čišćenja potvrđena je učinkovitost postojeće metode. Pokazalo se da su svi uzorci bili unutar prihvatljivih granica.

Ključne riječi: čišćenje, validacija čišćenja, prihvatljiva razina ostataka, HPLC, TOC

## Summary

According to the requirements of Good Manufacturing Practice, the pharmaceutical industry is obligated to perform cleaning validation to ensure the quality and safety of products. Cleaning validation is documented evidence that the cleaning process appropriately and consistently removes all residues of previous product, by-product, microorganisms and cleaning agents. Its purpose is the timely identification and correction of potential issues. To evaluate the cleaning process, it is necessary to determine the acceptance criteria - Acceptable Residue Level (ARL). The aim of this thesis is divided into two parts. Firstly, the analysis and experimental examination of the problem of cleaning efficiency of products on a specific mixer. The cleaning conditions were stimulated in the laboratory, analyzing different washing methods. The aim is to determine which of the six possible products leaves residues after cleaning and which of the tested methods ensures the best level of cleanliness. The experiment included weighing the plates, applying the product, drying and applying washing methods – purified water, COSA CIP92 and CIP72 detergent solution and ClearKlens Mega detergent. The second aim is focused on validating the effectiveness of the existing cleaning method to ensure that there are no residues of the active ingredient and detergent on the equipment. The HPLC and TOC methods were used to confirm the absence of residues. The experimental results indicate that the applied detergents are more effective than purified water. The biggest problems were caused by product 2 and product 4, which required specific approaches. In the end, a cold 1%-CIP92 detergent solution was effective for product 4, while the issue with product 4 remains unresolved and requires further analysis. The cleaning validation confirmed the effectiveness of the existing method. All samples were found to be within acceptable limits.

Key words: cleaning, cleaning validation, Acceptable Residue Level, HPLC, TOC

## Sadržaj

1.	Uvod .....	1
1.1.	Kontaminacija i unakrsna kontaminacija .....	4
1.2.	Čišćenje .....	6
1.2.1.	CIP čišćenje .....	7
1.2.2.	COP čišćenje .....	8
1.2.3.	Ručno čišćenje .....	9
1.3.	Uzorkovanje .....	10
1.3.1.	Uzorkovanje uzimanjem brisa .....	10
1.3.2.	Uzorkovanje ispiranjem .....	12
1.3.3.	Placebo uzorkovanje .....	13
1.4.	Analitičke metode .....	14
1.4.1.	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) .....	15
1.4.2.	Ukupni organski ugljik (TOC) .....	15
1.4.3.	Spektrofotometrija .....	16
1.4.4.	Vodljivost i pH .....	16
2.	CILJ RADA .....	17
3.	MATERIJALI I METODE .....	18
3.1.	Provedba eksperimenta .....	18
3.2.	Validacija čišćenja .....	19
3.2.1.	Uzorkovanje .....	19
3.2.2.	Priprema uzorka za analizu ukupnog organskog ugljika .....	19
3.2.3.	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) .....	21
3.2.4.	Priprema uzoraka za analizu HPLC-a .....	21
4.	REZULTATI .....	23
4.1.	Provedba eksperimenta .....	23
4.2.	Analiza ukupnog organskog ugljika .....	36
4.3.	HPLC .....	37

5.	RASPRAVA .....	41
5.1.	Eksperiment .....	41
5.2.	TOC analiza .....	43
5.3.	HPLC .....	43
6.	ZAKLJUČAK .....	45
7.	LITERATURA .....	46
8.	ŽIVOTOPIS .....	48



## 1. Uvod

Farmaceutska industrija mora zadovoljiti sve zahtjeve dobre proizvođačke prakse (engl. *Good manufacturing practice, GMP*) koji zahtijevaju visoke standarde vezane uz postupak čišćenja proizvodnog prostora i opreme (1). Postupak čišćenja, prema zahtjevima Europske regulative, treba biti detaljno opisan u pisanim standardnim operativnim postupcima (SOP), uključujući različite scenarije između serija istog ili različitih serija (2). Ukoliko se proizvod želi staviti na tuđe tržište, primjerice američko, također će trebati zadovoljiti zahtjeve Američke agencije za hranu i lijekove (eng. Food and Drug Administration, FDA) Dokumentirani postupak koji utvrđuje da je postupak čišćenja proveden na učinkovit i dosljedan način jest validacija čišćenja (1). Ona dokazuje da su sa procesom čišćenja primjereno i dosljedno uklonjeni svi ostaci prethodnog proizvoda i procesa te okolišni kontaminanti (3). Čišćenje se ne smatra učinkovito ukoliko su na proizvodnoj opremi prisutni: ostaci aktivnog farmaceutskog sastojka (engl. *Active pharmaceutical ingredient, API*), nusproizvodi i/ili produkti razgradnje API-a, prethodni proizvod, mikroorganizmi ili ostaci sredstva za čišćenje (4). Svrha validacije je pravovremena identifikacija i ispravljanje eventualnih problema, kako bi se mogla osigurati kvaliteta, sigurnost i učinkovitost sljedećih serija lijeka proizvedena na istoj opremi (1) i minimalizacije rizika pojave kontaminacije i unakrsne kontaminacije (5).

Slučajevi u kojima će se provoditi validacije čišćenja su:

1. Početna kvalifikacija metode čišćenja ili nova oprema
2. Kritična promjena u postupku čišćenja
3. Promjena sredstva za čišćenje
4. Promjena u procesu čišćenja
5. Promjena u formulaciji proizvoda (5,6)

Kao i kod procesa čišćenja, regulatorne agencije zahtijevaju napisane opće postupke na koji način će se provoditi validacija. To uključuje informacije tko je odgovoran za izvođenje i odobravanje validacijske studije, kriterij prihvaćanja, kada je potrebna ponovna validacija, postupak uzorkovanja te

koje će se analitičke metode koristiti. Na kraju cijele studije, provođenje validacijskih studija u skladu sa protokolima i dokumentiranje rezultata ključno je kako bi se osigurala kvaliteta i sigurnost farmaceutskih proizvoda (2).

Jedan od ključnih elemenata validacije čišćenja jest postavljanje granica čišćenja i kriterija prihvatljivosti. Ona trebaju biti iskazana u stvarnom brojčanom obliku, praktična, dostižna i znanstveno utemeljena. Trebaju biti praktična u smislu da odabrana granica treba biti prikladna za stvarnu situaciju čišćenja koju treba validirati. Vrlo je važno da granice ne budu odabrane proizvoljno, već utemeljena na logičnim i znanstvenim osnovama.

Ograničenja se temelje na medicinskoj/farmakološkoj aktivnosti lijeka ili toksičnosti ostataka(3). U nastavku će biti opisana osnova izračunavanja dopuštenih količina koje se mogu prenijeti sa jedne serije na drugu.

Prihvatljiva razina ostatka (engl. Acceptable Residue Level, ARL) se definira kao maksimalno dopuštena koncentracija u sljedećem proizvodu temeljeno na medicinskim, farmakološkim i sigurnosnim problemima. Najčešće se izražava u  $\mu\text{g/g}$  ili  $\mu\text{g/mL}$ . Prvi način izračunavanja, najčešće korišten, je preko prihvatljive dnevne doze (engl. Acceptable Daily Exposure, ADE). Prva informacija potrebna za izračun ADE-a jest razina lijeka kod koje nema uočenih štetnih učinaka (engl. No-Observed-adverse-effect-Level, NOAEL) te je najčešće dobivena na studijama na životinjama. Osim navedenog potrebna je tjelesna masa pacijenta, kompozitivni faktor (određuje se na temelju razlike između vrsta, razlika unutar vrsta), MF faktor koji određuje toksikolog te farmakokinetički faktor.

$$ADE = \frac{NOAEL \times BW}{UF \times MF \times PK}$$

Gdje je:

ADE – prihvatljiva dnevna doza (engl. Acceptable Daily Exposure, ADE)

NOAEL - razina lijeka kod koje nema uočenih štetnih učinaka (engl. No-Observed-adverse-effect-Level, NOAEL)

BW – tjelesna masa pacijenta

UF – kompozitni faktor

MF –faktor određen od strane toksikologa

PK – farmakološki faktor

Nakon izračunatog ADE-a, može se dobiti ARL prema formuli:

$$ARL = \frac{ADE}{LDD}$$

gdje je LDD maksimalna dnevna doza sljedećeg lijeka koji će se proizvoditi na istoj opremi.

Dodatan način izračunavanja jest da se ARL određuje se kao jedna tisućinka minimalne dnevne doze lijeka u maksimalnoj dnevnoj dozi sljedećeg proizvoda. U nastavku je prikazana jednadžba:

$$ARL = \frac{MDD \times SF}{LDD}$$

gdje je ARL prihvatljiva razina ostaka, MDD minimalna dnevna doza aktivne tvari očišćenog proizvoda, SF faktor sigurnosti (obično iznosi 0,001) i LDD najveća dnevna doza sljedećeg lijeka koji će se proizvoditi u istoj opremi

Nakon što je izračunata vrijednost ARL-a, može se definirati maksimalni dopušteni prijenos (engl. Maximum Allowable Carryover, MAC, MACO). MAC se definira kao ukupna količina ciljanog ostataka dopuštenog u seriji sljedećeg proizvoda. Dobiva se množenjem ARL-a sa minimalnom veličinom serije sljedećeg proizvoda (MBS) (3).

$$MAC = ARL \times MBS$$

Dva bitna pojma koja se povezuju uz validaciju čišćenja su vrijeme stajanja prljave opreme (engl. Dirty Equipment Hold Time, DEHT) i vrijeme čuvanja čiste opreme (engl. Clean Equipment Hold Time, CEHT). DEHT se definira kao vrijeme proteklo od kraja proizvodnje do početka procesa čišćenja, dok je CEHT vrijeme proteklo od završetka procesa čišćenja do početka korištenja opreme za daljnju proizvodnju. Važnost vremena zadržavanja čiste opreme je u tome što ništa ne ostaje zauvijek čisto. Uvijek postoji način na koji se čista oprema može kontaminirati, primjerice osoblje i sustav grijanja ili hlađenja može utjecati na čistoću. Ukoliko se oprema skladištena mokra, velika je mogućnost razvoja mikrobiološke kontaminacije. Dakle, svrha CEHT-a je adekvatna zaštita opreme tijekom vremenskog razdoblja. U slučaju ako je oprema na adekvatan način oprana i skladištena u skladištu koje ima kontrolirane uvjete, moguće je CEHT opravdati od nekoliko tjedana ili mjeseci. DEHT je bitan u validaciji čišćenja jer se priroda nečistoća tj. prljavštine na površinama opreme može s vremenom promijeniti (npr. sušenje prljavštine ili razmnožavanje mikroba) što može otežati uklanjanje standardnim postupcima. Prilikom dizajniranja procesa čišćenja, trebalo bi uzeti u obzir demonstraciju učinkovitosti pod najdužim DEHT-om (7). Ne postoji standardno trajanje tipičnog DEHT-a. Može trajati od 1 sata do 30 dana no najčešće je to 3 do 7 dana (8).

### **1.1. Kontaminacija i unakrsna kontaminacija**

Kontaminaciju općenito možemo podijeliti na unakrsnu kontaminaciju i kontaminaciju stranim tijelom(5). Jedni od najvećih izvora kontaminacije u farmaceutskoj industriji su ljudi, zrak, oprema, voda i sirovine, dok su najopasniji potencijalno alergeni materijali kao što su sulfonamidi i penicilin; potencijalno toksične tvari poput ciklosporina i daunorubicina te mikroorganizmi poput *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*.

Unakrsnu kontaminaciju definiramo kao proces kojim se strane kemijske, fizikalne ili mikrobne tvari nenamjerno prenose s jedne na drugu seriju proizvoda što može utjecati na čistoću, sigurnost i kvalitetu gotovog proizvoda. Najčešće se odnosi na aktivni sastojak koji se iz jedne serije

prenese u sljedeću seriju uslijed neadekvatnog postupka čišćenja. Ovo može uzrokovati klinički značajne interakcije između različitih farmakološki aktivnih tvari te neželjene farmakološke učinke.

Druga vrsta kontaminacije jest kontaminacija stranim tijelom te u nju ubrajamo mikrobiološku kontaminaciju, kontaminaciju sredstvom za čišćenje i održavanje te kontaminaciju drugim materijalima (1). Najveću prijetnju predstavlja mikrobiološka kontaminacija jer se može razviti u bilo kojem trenutku, čak i nakon čišćenja. Uvjeti održavanja, čišćenja i čuvanja opreme mogu biti pogodni za rast i razvoj mikroorganizama stvarajući tako probleme za sigurnost i kvalitetu proizvoda. Jedno od glavnih faktora koji pridonose tome je skladištenje opreme u vlažnim uvjetima koji su prirodni uvjeti za razvoj bakterija. Kao glavni izvor mikrobne kontaminacije mogu biti ljudi koji u normalnoj flori imaju niz patogenih mikroorganizama poput *Staphylococcus aureus*. Ovakav način kontaminacije ima kliničke implikacije jer može biti način unošenja bakterijskih toksina ili živih patogena u gotove proizvode koji su dalje povezani sa pojavom bakterijskih sojeva otpornih na lijekove. Kako bi se ovakve situacije spriječile, GMP zahtjeva da u farmaceutskoj industriji svi radnici nose posebnu odjeću prije ulaska u proizvodni prostor (9).

Čišćenje tvrdokornih ostataka nakon proizvodnje lijekova zahtijeva korištenje prilično toksičnih sredstava. Ovakva sredstva predstavljaju potencijalnu prijetnju kao kontaminanti. Jedno rješenje ovog problema jest korištenje sredstva za čišćenje sa manjom toksičnošću, koja će i dalje biti učinkovita u uklanjanju ostataka (5). Osim navedenih potencijalnih kontaminanata u farmaceutskoj industriji, postoje razni drugi materijali koji također mogu uzrokovati kontaminaciju kao što su čestice gumenih rukavica, vlakna krpa, mikro filteri i čekinje četki (10).

## 1.2. Čišćenje

Čišćenje je proces uklanjanja ostataka od prethodnih serija i tragova sredstva za čišćenje (11). Cilj mu je smanjiti ostatke na razine koje će osigurati sigurnost i kvalitetu budućih proizvoda proizvedenih na istoj opremi. Učinkovitim postupkom čišćenja smanjuje se mogućnost pojave kontaminacije i unakrsne kontaminacije te se produljuje životni vijek opreme. Ono treba biti robusno do granice da na prihvatljiv način ukloni i najgore moguće zaprljane tvari do razine znatno ispod prihvatljivih razina. Također, trebao bi biti primjenjiv na sve nove vrste kemikalija i proizvoda (8). Prilikom dizajniranja nove metode čišćenja treba uzeti u obzir kritične parametre procesa (temperatura, tlak, vrijeme, koncentracija sredstva za čišćenja,...) i kritične atribute kvalitete (vizualna čistoća, ostaci proizvoda, vodljivost,...). Čišćenje se sastoji od 4 glavna koraka, a to su pred ispiranje ili usisavanje, pranje sa sredstvom za čišćenje, ispiranje i sušenje (3).

Kako bi se osiguralo ponovljivo i validirano čišćenje potrebno je zadovoljiti četiri glavna čimbenika – vrijeme, djelovanje, sredstvo za čišćenje/kemikalija i temperatura. Ti su čimbenici poznati pod akronimom TACT (engl. Time, Action, Chemical and Temperature). Vrijeme se definira kao duljina trajanja cijelog postupka (3). Ponovljivi proces čišćenja podrazumijeva isto vremensko trajanje za svaki put kada se obavlja bez obzira na fazu u kojoj se odvija(8). Djelovanje je mehanizam koji se koristi za isporuku sredstva za čišćenje i u njega ubrajamo namakanje, miješanje, ribanje, sudaranje ili turbulentno strujanje. Na primjer, miješanjem se pojačava kemijsko djelovanje sredstva za čišćenje te na taj način povećava učinkovitost sredstva za čišćenje – skraćuje vrijeme kontakta. U svakom koraku čišćenja treba razumjeti mehanizam djelovanja. Primjerice, u cjevovodima pažnju treba posvetiti brzini ispiranja kako bi se osigurala odgovarajuća pokrivenost i turbulencija. Kako bi djelovanje bilo ispravno, jako je bitna koncentracija i vrsta sredstva za čišćenje. Kemikalije su najčešće u koncentriranim oblicima koji se naknadno razrjeđuju i koriste. Učinkovitost čišćenja može biti povezana sa njihovom koncentracijom.

Ukoliko se odluči na premalu koncentraciju, postoji mogućnost neadekvatnog uklanjanja zaostataka proizvoda, dok prevelika koncentracija može zahtijevati dodatna ispiranja zbog zaostataka sredstva za čišćenje. Ono što također utječe na djelovanje sredstva za čišćenje jest temperatura. Optimalni temperaturni raspon se razlikuje za pojedine korake čišćenja. Tako je za pred ispiranje optimalna temperatura sobna temperatura koja neće uzrokovati denaturaciju ili razgradnju proizvoda. Nasuprot tome, prilikom pranja sa otopinom sredstva za čišćenje, mogu se koristiti više temperature koje mogu povećati učinkovitost(3).

Metode čišćenja dijelimo u 3 grupe:

1. CIP čišćenje (engl. Clean In Place)
2. COP čišćenje (engl. Clean Out Place)
3. Ručno čišćenje (8)

#### **1.2.1. CIP čišćenje**

Pod CIP čišćenjem se podrazumijeva automatizirani sustav koji uključuje razne spremnike, raspršivače i cjevovode za isporuku otopine za čišćenje kroz opremu. Koriste se za čišćenje velikih dijelova opreme na licu mjesta, bez potrebe za rastavljanjem, u koje ubrajamo proizvodne spremnike, miješalice, reaktore i spremnike za fermentaciju (3). Načelo na kojem se temelji cijeli CIP sustav čišćenja jest uklanjanje nepoželjnih aktivnih tvari i kemikalija sa površina na način da se mobiliziraju kroz strujanje ili raspršivanje u suspenziji ili otopini. Bitno je napomenuti da se mobilizacija postiže kombinacijom udarnog i kaskadnog površinskog djelovanja i topljivosti(8). Ovakav postupak može biti kontroliran ručno ili automatski putem programskih sustava te omogućuje dosljednu i reproducibilnu metodu čišćenja(6).

Centralizirani sustav CIP čišćenja omogućava upravljanje sredstvima za čišćenje sa jedne lokacije čime se smanjuju zahtjevi za opremom i infrastrukturom u postrojenju. Nasuprot tome, mogu zahtijevati složenije

dizajne cjevovoda. Često se zbog različitih zahtjeva čišćenja koriste namjenski CIP sustavi (3).

### **1.2.2. COP čišćenje**

*Clean – out place* je metoda čišćenja kod koje se manji dijelovi opreme i prijenosna procesna oprema koja se teško čisti, rastavlja i transportira do određenog mjesta za čišćenje. Ono što ovaj način čišćenja čini složeniji i zahtjevniji za validaciju za razliku od CIP čišćenja jest to što uključuju dodatne aktivnosti poput prijevoz opreme, rastavljanje i sastavljanje opreme. Također, izazov je osigurati kontakt i/ili protok sredstva za čišćenje kroz sve dijelove opreme(8).

Oprema potrebna za provođenje COP čišćenje uključuje COP stanice, perilice i ultrazvučne čistače. COP stanice se koriste za čišćenje posuda, tj. njenih unutarnjih dijelova, dok se vanjski dijelovi peru ručno. Preporuča se prvo pranje vanjskih dijelova kako se unutrašnje površine ne bi ponovno onečistile tijekom vanjskog čišćenja. Prednost korištenja COP stanice jest u tome da je ovo gotovo automatiziran proces. Za razliku od COP stanica, perilice provode čišćenje i unutarnje i vanjske površine opreme. Jako je važno na ispravan način postaviti i rasporediti opremu u perilici za optimalne rezultate. Ultrazvučni čistači, koji čiste pomoću ultrazvučnih valova, mogu biti izuzetno korisni, no pronalaženje optimalnih kombinacije temperature i frekvencije može biti izazov. Primjerice, povećanje temperature može rezultirati smanjenjem efikasnosti kavitacije, ali nasuprot tome neke tvari iziskuju višu temperaturu kako bi se efikasno očistile. Alternativno, ultrazvučni čistači se mogu koristiti kao prvi korak u ručnom čišćenju (8).





**Slika 1** - COP perilice (8)

### **1.2.3. Ručno čišćenje**

Ručno čišćenje se definira kao izravno čišćenje opreme koje provodi obučena osoba korištenjem raznih ručnih alata i sredstva za čišćenje (3). Koristi se u slučajevima kada oprema nije prilagodljiva za CIP ili COP sustav čišćenja (8). Neki od važnih parametara ručnog čišćenja su volumen sredstva za čišćenje, volumen otopine za ispiranje, temperatura, trajanje pojedinih koraka, koncentracija sredstva za čišćenje,... (3) Jedan od bitnijih parametara jest vrijeme, tj. minimalno vrijeme čišćenja za svaki dio opreme kako bi se ispitivane varijable svele na najmanju moguću vrijednost (8). Kako bi se osigurala dosljednost, potrebno je imati odgovarajući nadzor, dobro definiran postupak čišćenja te ljude koji su kvalificirani za to (3). Osoblje mora znati opseg rastavljanja svakog dijela opreme kako bi se na adekvatan način obavilo čišćenje. Najčešće se provode kvalifikacije osoblja za svaku grupu opreme (npr. spremnici) ili reprezentativni dio opreme (npr. preša za tablete). Razlika između ručnog čišćenja i CIP/COP čišćenja jest mogućnost mjerenja kritičnih procesnih parametara. Automatizirani sustavi rutinski bilježe i kontroliraju temperaturu, vodljivost i vrijeme, dok se ručno čišćenje oslanja na dokumentaciju vođenu od strane operatera (8).

### **1.3. Uzorkovanje**

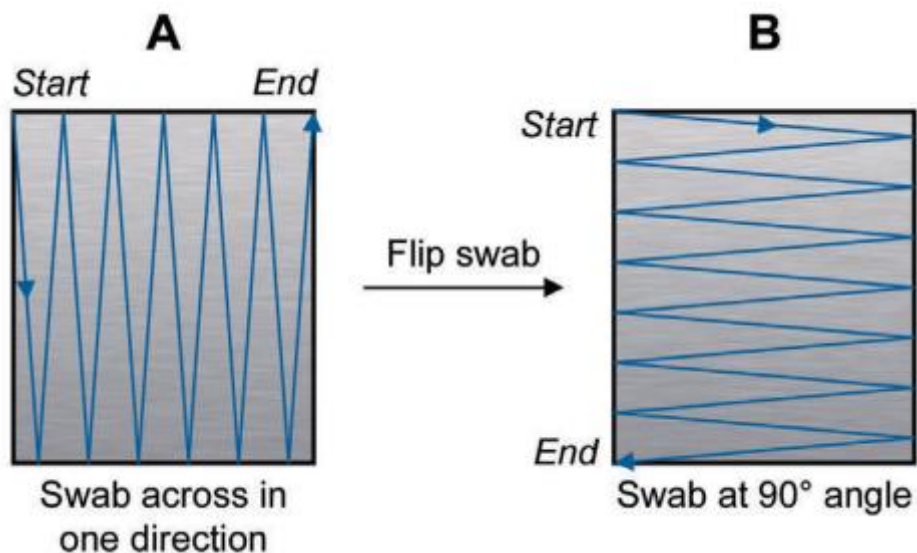
Uzorkovanje spada u kritičnu komponentu validacije čišćenja. To je postupak koji se provodi nakon čišćenja i prije upotrebe kako bi se pružio točan prikaz razine čišćenja opreme koja je u izravnom kontaktu s proizvodom. Prvi korak prilikom uzimanja uzorka jest vizualni pregled cijele opreme - aktivno promatranje svih vidno dostupnih kontaktnih površina farmaceutske proizvodne opreme s proizvodom. Ukoliko se vizualnim pregledom utvrdi prisutnost vidljivih ostataka na površini, oprema se smatra nečistom i ne dozvoljava se daljnje uzimanje uzoraka.

Postoje dvije primarne vrste tehnika uzorkovanja: izravno površinsko uzorkovanje (uzimanje brisa ili kontakt ploče) i neizravno površinsko uzorkovanje (uzorkovanje ispiranjem). Regulatorne agencije prednost daju direktnom uzorkovanju jer se na taj način uzorak uzima direktno sa površine opreme (8).

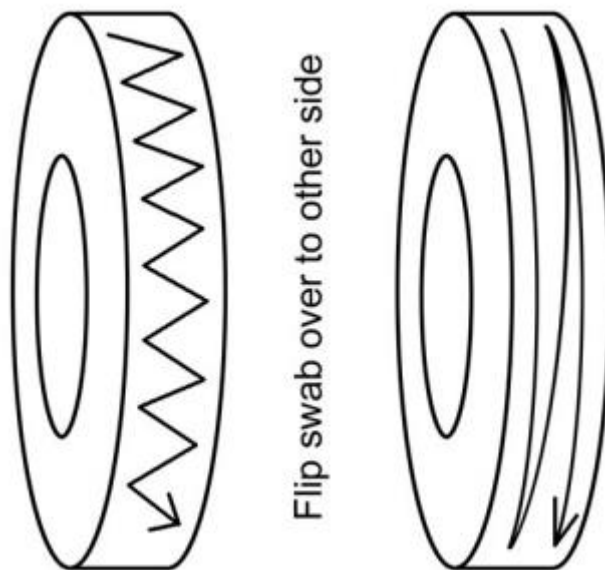
#### **1.3.1. Uzorkovanje uzimanjem brisa**

Uzorkovanje uzimanjem brisa uključuje brisanje površine vlaknastim materijalom kojim se smatra neka vrsta tekstila bilo pletenog, tkanog ili netkanog pričvršćenog na plastični štapić. U posebnim slučajevima mogu se koristiti pamučne kuglice/jastučići koji se pincetom pomiču po površini(3). Ovaj način uzorkovanja poznat je još kao metoda izravnog površinskog uzorkovanja. Temeljeno je na fizičkom uklanjanju ostataka sa opreme nakon što je ona očišćena i suha. Vlaknasti materijal s otapalom nanosi se na površinu kako bi pokupio sve moguće zaostatke te se zatim stavlja u otapalo kako bi se ostatak prenio u otapalo koje se dalje analizira odgovarajućim i validiranim metodama (5) Otapala koja se koriste trebali bi moći otopiti ostatke sa površina, ne smiju poticati degradaciju spojeva (10) i trebali bi biti kompatibilni sa analitičkim metodama (3). Na primjer, ako će se provoditi tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*), otapalo koje se koristi može biti mobilna faza(3). Mjesto na kojem će se uzorkovati određeno je najgorim mogućim uvjetima (eng. *worst-case condition*), dakle područja koja se

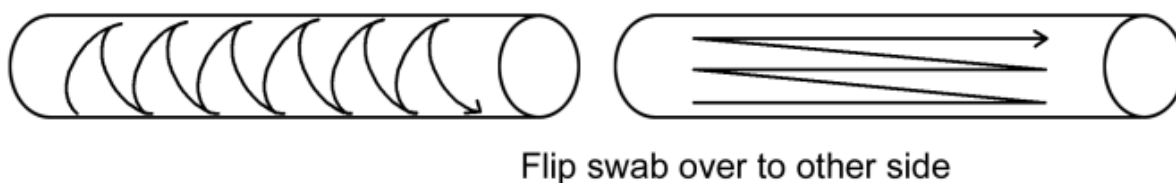
teško čiste ili mjesta gdje se onečišćenje lako zadržava. Takva područja se identificiraju na temelju iskustva i dizajna opreme(6). Preporučljiva veličina brisa je  $5 \times 5 \text{ cm}^2$  ( $25 \text{ cm}^2$ ). Ova mjera omogućuje dovoljno veliki prostor da se dobiju reprezentativni uzorak za analizu, ali i dovoljno mali za višestruke uzorke. Ne preporuča se korištenje predloška za bris jer on može biti izvor kontaminacije, potrebno ga je očistiti ili promijeniti između svakog uzorkovanja te se ne može koristiti na područjima poput cijevi i ventila (8).Prednosti uzorkovanjem uzimanjem brisa su to što je omogućena analiza ostataka na specifičnom području, omogućen je odabir mjesta uzorkovanja – mjesta teža za čišćenje, prilagodljivost raznim površinama te raznim ostacima (aktivni, mikrobni, ostaci sredstva za čišćenje) te je ekonomičan i široko dostupan. S druge strane, nedostaci su to uzorkovano mjesto predstavlja cjelokupnu opremu – treba pažljivo birati mjesto uzorkovanja, sam vlaknasti materijal može predstavljati prijetnju kao izvor kontaminacije te određena područja opreme ne mogu biti uzorkovana na ovaj način - npr.cijevi (3).



**Slika 2** - Tehnika uzimanja uzorka brisom(8)



**Slika 3** - Uzorkovanje neregularnih površina brisom(8)



**Slika 4** - Uzorkovanje unutarnjih površina brisom(8)

### 1.3.2. Uzorkovanje ispiranjem

Uzorkovanje ispiranjem predstavlja indirektno uzorkovanje kojim se strujanjem otapala preko željenih površina opreme dobiva uzorak za analizu. Strujanjem se omogućuje efikasno uklanjanje potencijalnih kontaminanata sa površine (3). Potrebna je kontrola nad otapalom koje se koristi za ispiranje i vremenom kontakta kako bi se osigurala potpuna pokrivenost i uklanjanje ostataka (10). Otapala koja se koriste trebaju imati visoku topljivost za ostatak koji se uklanja te moraju doprijeti do svih površina opreme. Nadalje, otapalo ne smije degradirati proizvod, ne smije biti štetno za okoliš, mora biti kompatibilno sa opremom i ne smije ometati daljnje analize (8). Najčešće se koriste voda, vodene otopine, organska

otapala ili mješavina vode i organskog otapala (3). Otapala poput benzena i etilnog klorida se ne bi trebala koristiti (8).

Jedna moguća tehnika uzimanja uzorka jest tzv. 'zahvatni' uzorak (engl. grab sample) koji se izdvaja iz posljednjeg dijela otapala za ispiranje u procesu čišćenja. Ovaj pristup ne zahtijeva dodatne količine otapala jer je osnovni korak čišćenja. Također, oprema je spremna za daljnje korištenje bez dodatnih koraka. Nasuprot tome ovaj način ne omogućuje ispiranje ostataka na površinama nakon završenog posljednjeg ispiranja.

Druga vrsta uzorkovanja ispiranjem jest prikupljanje uzorka nakon posebnog ispiranja koje je provedeno nakon procesa čišćenja. Najčešće se oprema puni otapalom do određene razine i homogenizira miješanjem. Dobivamo stvarnu sliku onog što je ostalo na površinama nakon čišćenja. Ovakav način uzorkovanja zahtijevaju dodatan korak čišćenja, upotrebu veće količine otapala te mogućnost razvoja kontaminacije zbog dodavanja otapala za ispiranje(3).

### **1.3.3. Placebo uzorkovanje**

Placebo uzorkovanje nije jedno od preporučljivih metoda uzorkovanja. Prilikom ovog načina uzorkovanja, proces čišćenja se ocjenjuje tijekom izrade placebo serije – lijeka bez aktivnog farmaceutskog sastojka (8). Ovaj način može identificirati aktivne ostatke, mikrobne kontaminante te ostatke sredstva za čišćenje. Eliminira se potreba za dodatnim koracima uzorkovanja te se osigurava kontakt sa svim površinama sa kojima je i proizvod što uključuje i teško dostupna mjesta. Nasuprot tome, postoji niz nedostataka koje treba uzeti u obzir. Prvo, ostatci možda neće biti homogeno raspoređeni u uzorku i nema izravnog mjerenja ostataka na površinama koje su u kontaktu s proizvodom. Drugo, smanjenje analitičke specifičnosti što može dovesti do nepreciznih ili netočnih rezultata tj. zaključaka. Osim toga, ovakav način iziskuje više vremena i veće troškove zbog ponovnog čišćenja opreme nakon korištenja placeba (11).

#### **1.4. Analitičke metode**

Nakon uzimanja uzoraka površine opreme slijedi ispitivanje različitim analitičkim metodama kako bi se dokazalo da je proces čišćenja ispravno proveden. Odabrane analitičke metode moraju biti prikladne u smislu da mogu na adekvatan način detektirati i izmjeriti potencijalne ostatke (3). Osjetljivost takvih metoda mora biti na razini nižoj od granica čišćenja za analit od interesa. Ukoliko ovaj uvjet nije zadovoljen, potrebno je ili poboljšati ili promijeniti metodu(8). Ne smije se događati da u prisustvu drugih tvari metoda nije u stanju detektirati analit od interesa (10). U stvarnom okruženju izbor analitičke metode može biti ograničen praktičnim razlozima kao što je izbor metoda u tvrtki. Na primjer, ukoliko u tvrtki postoji već metoda za namijenjenu svrhu, nije vjerojatno da će tvrtka investirati u novu metodu i na taj način stvoriti dodatne troškove (obuka analitičara, kupnja nove aparature, održavanje opreme). Međutim, potreba za novom metodom se javlja ako u ponudi internih metoda niti jedna nije adekvatna za namjeravanu svrhu. Dodatni uvjeti koji se razmatraju prije odabira metode su dostupnost instrumenata, brzina analize, specifičnost, ograničenja uzorkovanja (otapalo) i trošak(3). Također, metode moraju biti validirane za uzorak koji se uzima(8).

Analitičke metode možemo podijeliti na specifične i nespecifične. Odabir će se temeljiti na prirodi ostataka koji će zaostati nakon čišćenja. Specifične metode mogu mjeriti ostatke aktivnog sastojka, uz prisutnost određenih smetnji kao što su pomoćne tvari, sredstva za čišćenje ili proizvodi razgradnje. Dakle, ove metode odabiremo samo onda kada znamo da se aktivni sastojak neće razgraditi tijekom procesa čišćenja - preživljava visoke temperature i ekstremne pH vrijednosti u vodenom okruženju (3). Pruža se mogućnost testiranja manjeg volumena uzorka kako bi se povećala osjetljivost metode te ove metode nisu ograničene otapalom koje se koristi prilikom uzimanja brisa. Nasuprot tome, potrebno je više vremena za razvoj ovakvih metoda(8). Primjeri specifičnih metoda su tekućinska kromatografija – HPLC i tankoslojna kromatografija (eng. Thin Layer

Chromatography, TLC). Za izvedbu ovih metode potreban je referentni standard.

Nasuprot tome, nespecifične metode mjere opća svojstva koja su rezultat svih različitih analita iz uzorka(3). Nedostatak ovih metoda jest to što zahtijevaju veći faktor razrjeđenja što može utjecati na osjetljivost, limitiran izbor otapala za uzorkovanje (voda)(8). Primjer ovakvih metoda su vodljivost i ukupni organski ugljik (eng. Total Organic Carbon, TOC)(3).

#### **1.4.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)**

HPLC je metoda tekućinske kromatografije koja se temelji na odvajanju komponenti kromatografskim postupkom(3) -uzorak prolazi kroz napunjenu kolonu i odvaja analit od interesa od ostalih komponenti(8) , a zatim slijedi mjerenje tih komponenti. Za mjerenje se koriste, najčešće, ultraljubičasti (UV) detektori(3). To je najčešće korištena specifična metoda u validaciji čišćenja (8). Ova metoda se najprije uvijek razvija i koristi za ispitivanje potentnosti aktivnog sastojka te je potrebna samo manja izmjena kako bi metoda bila prikladna za upotrebu u validaciji čišćenja (3). Osjetljivost HPLC-a ovisi o kemijskoj strukturi ostataka i detektoru, no obično su ove metode dizajnirane na kvantificiranje razina do 0,1% API-ja(8).

#### **1.4.2. Ukupni organski ugljik (TOC)**

TOC je najčešće korištena nespecifična metoda u validaciji čišćenja(8). Može se primijeniti na sve uzorke koje sadrže značajne količine organskog ugljika. Temelji se na oksidaciji prisutnog ugljika i mjerenju nastalog ugljikovog dioksida(3). Tehnike koje se koriste za mjerenje nastalog ugljikovog dioksida uključuju vodljivost, membransku vodljivost i infracrveno zračenje. Osjetljivost metode je do ppm-a (eng. parts per million) ili ppb-a (eng. parts per billion) (8). Jedno ograničenje ove metode jest to što ciljani ostatak mora imati određenu topljivost u vodenom mediju. Također, uvijek se pretpostavlja da je dobiveni ugljikov dioksid uzrokovan ciljanim ostatkom(3).

#### **1.4.3. Spektrofotometrija**

Ultraljubičasta/vidljiva (UV/Vis) spektrofotometrija je specifična metoda(11) koja mjeri koncentraciju analita, ostatka/kontaminanta, u prozirnoj tekućini (12). Uključuje mjerenje apsorbirane ili transmisijske energije određene valne duljine na uzorcima koji imaju kromofor (3). Prednosti ove metode su specifičnost, visoka osjetljivost, jednostavnost i mogućnost upotrebe i u početnim koracima razvoja lijeka kao što su identifikacija i probir. (11).

Infracrvena spektrofotometrija uključuje NIR (engl. Near InfraRed ) i FTIR (engl. Fourier Transform InfraRed) te se koriste u situacijama kada postoji mogućnost za identifikaciju organskih ostataka (3).

#### **1.4.4. Vodljivost i pH**

Još jedna nespecifična metoda jest mjerenje vodljivosti. Ova metoda se koristi za otkrivanje disociranih ionskih tvari u uzorcima vode te linearno korelira sa njihovom koncentracijom. Dakle, prvo ograničenje metode jest da otapalo mora biti voda te očitavanje vodljivosti uvelike ovisi o temperaturi uzorka. Također, ne može razlikovati pozitivne od negativnih iona, stoga, kao i kod TOC-a, svi rezultati iznad bazne linije vode (engl. water baseline) se definiraju kao kontaminanti. Najčešće se koristi za mjerenje ostataka sredstava za čišćenje ili za kontrolu koncentracije sredstva za čišćenje u automatiziranim procesima čišćenja (CIP) (3). U nekim slučajevima, ostatke sredstva za čišćenje se pokušalo otkriti mjerenjem pH vrijednosti, no to nije pouzdana metoda u nepuferiranim sustavima (13). Još jedan razlog zašto je pH manje koristan od mjerenja vodljivosti jest to jer ima logaritamsku vezu sa koncentracijom vodika, dok vodljivost ima izravan tj. linearan odnos s ionima. Osim navedene upotrebe, ispitivanje vodljivosti se može koristiti za mjerenje ostataka ionskog aktivnog sastojka (3).



## 2. CILJ RADA

Prvi cilj ovog istraživačkog rada jest analiza i provedba eksperimenta u svrhu otkrivanja problema u proceduri čišćenja farmaceutskih proizvoda partnerske kompanije na specifičnom mješaču. Zbog prethodnih problema s učinkovitošću čišćenja, potrebno je utvrditi koji od 6 mogućih proizvoda ostavlja zaostatke nakon završetka postupka čišćenja. Eksperimentalni dio istraživanja uključivat će simulaciju procesa čišćenja u laboratorijskom okruženju pod posebnim uvjetima brzine miješanja i trajanja procesa. Ovim ispitivanjima prikupit će se podaci koji će biti ključni za daljnje analize trenutne situacije. Također, dodatni cilj je otkriti koja bi od različitih metoda čišćenja bila najbolje za postizanje zadovoljavajućih rezultata – uklanjanja zaostataka i postizanje zadovoljavajuće razine čistoće. Svi proizvodi biti će ispitivani na više različitih metoda to jest upotrebe različitih deterdženata. Dakle, potrebno je detektirati koje se od provedenih metoda mogu koristiti u proizvodnom pogonu, a da zadovoljavaju zahtjeve farmaceutske industrije te osiguravaju kvalitetu sljedećih proizvoda.

Drugi cilj ovog rada jest validacija učinkovitosti postojeće metode čišćenja pogona nakon proizvodnje lijeka protiv akni. Validacija će uključivati dva ispitivanja. Prvo, specifično ispitivanje, je HPLC analiza kako bi se provjerilo ima li zaostataka aktivnog farmaceutskog sastojka. Drugo, nespecifična metoda, je TOC analiza pomoću koje otkrivamo postoje li ostaci deterdženta za pranje na opremi. Ovim ispitivanjem osigurava se da je primijenjena metoda čišćenja učinkovita i u skladu s industrijskim standardima i regulatornim zahtjevima, što na kraju osigurava zaštitu krajnjih korisnika.

## **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. Provedba eksperimenta**

Prvi korak u provedbi eksperimenta bilo je vaganje praznih inox pločica koristeći vagu Mettler Toledo XPR225 kako bi se dobila početna masa pločice. Na svaku pločicu je kaban jedan od šest proizvoda, pri čemu su za svaki proizvod pripremljene tri pločice. Nakon apliciranja proizvoda, pločice sa proizvodom su stavljanje u sušionik kako bi se osiguralo potpuno isparavanje tekućine. S ciljem osiguranja preciznosti i mogućnosti uspoređivanja, ovaj se postupak ponavljao sve dok masa zaostalog proizvoda na pločici nije iznosila 0,035 g.

Nakon sušenja, svaka serija od tri pločice bila je podvrgnuta različitoj metodi pranja. Prva metoda uključivala je pranje u hladnoj pročišćenoj vodi, druga metoda jest pranje u 0,5%-tnoj otopini COSA CIP 92 deterdženta, dok je treća metoda bila pranje u 0,5%-tnoj otopini COSA CIP 72 deterdženta. Kako bi se stimulirao rad mješača u proizvodnim pogonima, korišten je mješač HEIDOLPH RZR 2102 control.

Nakon što prethodne metode nisu pokazale zadovoljavajuću učinkovitosti u uklanjanju zaostalih tragova proizvoda sa inox pločica, u eksperiment su još uvedene dodatne metode čišćenja koje uključuju 1%-tnu i 3,5%-tnu otopina ClearKlens Mega HP deterdženta, pranje u toploj vodi (80°C) zagrijanoj pomoću uređaja za zagrijavanje IKA ETS – D5 te pranje u toploj i hladnoj 1%-tnoj otopini COSA CIP 92 deterdženta.

Prilikom provođenja eksperimenta, učinkovitost metoda kontinuirano se pratila u vremenskim intervalima od 15, 30 i 45 minuta.

COSA CIP 92 deterdžent je lužnato tekuće sredstvo za čišćenje koje sadrži surfaktante namijenjeno upotrebi u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, posebno u CIP sustavima. Glavni sastojak koji određuje njegovu lužnatost jest natrijev oksid. Nasuprot tome, COSA CIP 72 deterdžent je kiselo tekuće sredstvo namijenjeno uklanjanju anorganskih naslaga. Glavni sastojak ovog deterdženta jest mravlja kiselina. ClearKlens Mega HP je lužnato sredstvo

za čišćenje i dezinfekciju, koje u svom sastavu sadrži lužine, sekvestrante te nisko pjenušave surfaktante.

## **3.2. Validacija čišćenja**

### **3.2.1. Uzorkovanje**

Uzorci za nespecifičnu analizu ukupnog organskog ugljika (TOC) uzeti su pomoću brisova sa tri najkritičnije lokacije spremnika – poklopca, izlaznog ventila i unutarnje stijenke sa sredine spremnika. Dodatno je uzeta i slijepa proba tako što se brisom mahalo oko spremnika kako bi se dokazalo da eventualni negativni rezultati nisu posljedica kontaminacije iz zraka. Sterilno zapakirani brisovi su prije upotrebe umočeni u pročišćenu vodu. Nakon što je uzimanje uzoraka provedeno na pažljiv način kako bi se dobio reprezentativni uzorak, bris je pohranjen u sterilnu posudu te odnesen na analizu. Osim uzoraka brisova, uzeti su uzorci ispirka - koji je izveden tako da je spremnik ispran sa 10 litara pročišćene vode, osiguravajući da je voda došla u kontakt sa svim unutarnjim površinama. Uzorak ispirka uzet je s izlaznog ventila.

Za specifičnu analizu pomoću HPLC-a uzorci su uzeti s istih lokacija, no razlika je u tome da su prije korištenja umočeni u acetonitril. Ovo se otapalo koristi jer je dokazano da najučinkovitije ekstrahira aktivni farmaceutski sastojak lijeka koji je prethodno proizveden na toj opremi. Nakon uzorkovanja, brisovi su pohranjeni u sterilne odmjerne tikvice i spremne za daljnju analizu. Također, uzet je uzorak slijepa probe koji je proveden na isti način kao i kod uzimanja uzorka slijepa probe za analizu ukupnog organskog ugljika.

### **3.2.2. Priprema uzorka za analizu ukupnog organskog ugljika**

Prvi korak pripreme uzoraka za analizu jest u prikupljene brisove koji se nalaze u Erlenmeyerovim tikvicama staviti 50 mL ultra čiste vode koja služi kao otapalo za ekstrakciju eventualnih zaostataka s brisova. Nakon dodavanja vode, tikvice se postavljaju na mućkalicu u trajanju od sat vremena kako bi se osiguralo potpuno otapanje svih mogućih tvari s brisova u vodi. Intenzitet mućkanja nije propisan, već ga se prilagodi tako da ne

dolazi do prevelikih udaraca vode o stijenke čime se izbjegava gubitak uzoraka. Optimalna jačina mućkanja osigurava da se svi zaostaci s brisova ravnomjerno prenesu u vodeni medij.

Nakon završetka mućkanja, uzorci se dodatno pripremaju za analizu stavljanjem u vialu. Ovisno o tipu uzorka, bris ili ispirak, razlikuju se pripreme uzorka. U slučaju slijepe probe, uzorci su odmah spremni, dakle nakon mućkanja slijepe probe, tekućina se odmah ulijeva u vialu. Kod uzoraka koji su dobiveni brisom, potrebno je napraviti dodatnu otopinu. Postupak započinje stavljanjem 10 mL otopine koja je bila na mućkalici u odmjernu tikvicu te se tikvica dopunjuje ultra čistom vodom do volumena od 100 mL. Što se tiče uzoraka ispirka, oni također zahtijevaju dodatno razrjeđenje. Jedina razlika u odnosu na uzorke brisova jest ta da se odmjerna tikvica nadopunjava slijepom probom. Nakon pripremljenih viala, one se slažu u uređaj prema unaprijed zadanom redoslijedu (sekvenci) u računalnom software-u.

Osim uzoraka potrebno je napraviti i uzorka potrebne za kalibraciju i prikladnost sustava. Kalibracija se provodi pomoću standardne otopine sukroze pripremljene u dvije koncentracije: 500 ppb-a i 2000 ppb-a.

Prikladnost sustava provjerava se korištenjem otopine benzokinona u koncentraciji od 500 ppb-a. Pripremljena otopina se prije korištenja mora držati 2 dana u hladnjaku na temperaturi  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ . Analiza je provedena na uređaju TOC – L firme Shimadzu.



**Slika 5** - TOC uređaj (izvor: <https://www.ssi.shimadzu.com/products/total-organic-carbon-analysis/toc-analysis/toc-l-series/option.html>)

### **3.2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)**

Analiza HPLC-a provedena je na aparatu firme Agilent Technologies. U sklopu ove analize korišten je DAD (engl.: Diode Array Detector) detektor. Volumen injektiranja određen je na 100  $\mu$ L, što osigurava dovoljnu količinu uzorka za preciznu analizu i detekciju. Korištena je kolona Luna Phenyl-Hexyl, dimenzija 250x4,6 mm, s veličinom čestica stacionarne faze od 5  $\mu$ m. Mobilna faza u analizi sastoji se od vode za kromatografiju i acetonitrila za kromatografiju u omjeru 35:65 (V/V%). Cijeli proces kromatografiranja trajao je 16 minuta. Za otapalo je korištena ista mobilna faza.

### **3.2.4. Priprema uzoraka za analizu HPLC-a**

Priprema uzoraka brisa i ispirka za analizu HPLC-om se međusobno razlikuju. U Erlenmeyerove tikvice, u kojima se nalazi bris od uzorkovanja, dodaje se 20.0 mL otapala, koje je u našem slučaju mobilna faza. Zatim se tikvica stavlja u ultrazvučnu kupelj, gdje se puštaju 10 minuta s uključenim ultrazvukom kako bi se omogućila potpuna ekstrakcija željenog analita iz brisa. Nakon završene ultrazvučne obrade, uzorci su spremni za stavljanje u viala te analizu.

Priprema uzorka ispirka uključuje odmjeravanje 7.0 mL uzorka ispirka koji je donesen sa uzorkovanja u odmjernu tikvicu od 20 mL. Nakon dodavanja ispirka, tikvica se nadopunjuje acetonitriom za kromatografiju do oznake te je spremno za stavljanje u viala.

Kako bi se provjerila prikladnost sustava, pripremaju se dvije poredbene otopine. Prva – osnovna poredbena otopina priprema se tako da se u odmjernu tikvicu od 100 mL odvaže oko 80 mg poredbene supstance, što je u ovom slučaju benzoil peroksid, te se nadopuni tikvica do oznake acetonitriom za kromatografiju. Pripremaju se dvije paralele. Druga poredbena otopina se priprema na način da se u odmjernu tikvicu od 100 mL uzme 1.0 mL osnovne poredbene otopine te nadopuni do oznake otapala. Zatim od pripremljene otopine ponovno uzima 1.0 mL te stavlja u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopunjuje otapalom do oznake. Također, pripremaju se dvije poredbene otopine.

Kako bi se potvrdila prikladnost sustava, moraju se zadovoljiti slijedeći uvjeti:

1. Relativna standardna devijacija određena na ponovljenim iniciranjima poredbene otopine ( $n=6$ ) mora biti manja ili jednaka 5%
2. Faktor simetrije pika benzoil peroksida u poredbenim otopinama manja ili jednaka 2.0
3. Razlika u odgovorima poredbene otopine i verifikacijske poredbene otopine mora biti manja ili jednaka 5%

## 4. REZULTATI

### 4.1. Provedba eksperimenta

U eksperimentalnom istraživanju učinkovitosti različitih metoda čišćenja na šest različitih proizvoda, analizirani su rezultati otklanjanja zaostalih tvari s inox pločica. Za svaki proizvod su u prvom dijelu eksperimenta korištene tri metode pranja - u pročišćenju vodi (eng. purified water, PW), 0,5%-tnoj otopini CIP92 i 0,5%-tnoj otopini CIP72 deterdženta. Kasnije u eksperiment su uvedene dodatne metode pranja za proizvod 2 i proizvod 4, koje uključuju 3,5% i 1% otopinu ClearKlens Mega HP, toplu pročišćenu vodu te 1% otopinu CIP92. Rezultate očitujemo kroz masu pločica prije i nakon pranja.

**Tablica 1** - Prikaz masa pločica prije i nakon pranja za slijepe probe







	<b>0.5% CIP92</b>	<b>0.5% CIP72</b>
<b>Masa prazne pločice (g)</b>	4.88140	4.87818
<b>Masa pločice nakon pranja (g)</b>	4.88123	4.87814
<b>Razlika</b>	-0.00017	-0.00004

U okviru ovog istraživanja provedene su i slijepe probe za deterdžente CIP92 i CIP72 kako bi se utvrdilo ostavljaju li sami deterdženti tragove na pločicama nakon pranja. Prema rezultatima u tablici 1, zabilježeni su negativni rezultati koji ukazuju na to da niti jedan od korištenih deterdženata na ostavlja tragove na pločicama

**Tablica 2** - Prikaz masa pločica prije i nakon pranja te rezultati eksperimenta za proizvod 1

<b>PROIZVOD 1</b>			
	<b>PW</b>	<b>0,5% CIP92</b>	<b>0,5% CIP72</b>
<b>masa prazne pločice (g)</b>	4.87634	4.88430	4.88298
<b>masa pločice sa osušenim proizvodom (g)</b>	4.91289	4.91989	4.92000
<b>masa oprane pločice (g)</b>	4.87634	4.88429	4.88297
<b>masa proizvoda (g)</b>	0.03655	0.03559	0.03702
<b>zaostatak nakon pranja (g)</b>	0.00000	-0.00001	-0.00001

**Tablica 3** - Tablični prikaz slika pločica prije i nakon pranja za proizvod 1

<b>PROIZVOD 1</b>			
	<b>PW</b>	<b>0,5% CIP92</b>	<b>0,5% CIP72</b>
<b>PRIJE PRANJA</b>			
<b>NAKON PRANJA</b>			




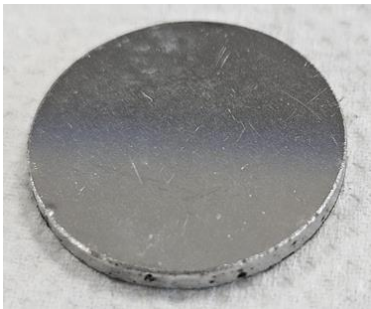
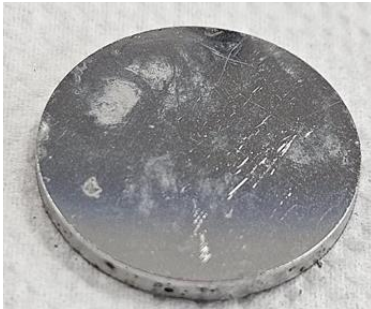



U slučaju proizvoda 1, prema rezultatima prikazanim u tablici 2 vidljivo je da je masa pločica nakon pranja bila gotovo identična početnoj masi pločice, što ukazuje da su sve tri metode pranja bile učinkovite. Vizualna inspekcija potvrdila je ove rezultate, pločice su potpuno čiste bez ikakvih vidljivih ostataka, što je zabilježeno u tablici 3. Ovi rezultati su postignuti nakon 15 minuta pranja.

**Tablica 4** - Prikaz masa pločica prije i nakon pranja te rezultati eksperimenta za proizvod 2

<b>PROIZVOD 2</b>			
	<b>PW</b>	<b>0,5% CIP92</b>	<b>0,5% CIP72</b>
<b>masa prazne pločice (g)</b>	4.87792	4.89277	4.88173
<b>masa pločice sa osušenim proizvodom (g)</b>	4.90184	4.91727	4.90605
<b>masa oprane pločice (g)</b>	4.87628	4.88987	4.87827
<b>masa proizvoda (g)</b>	0.02392	0.0245	0.02432
<b>zaostatak nakon pranja (g)</b>	-0.00164	-0.00290	-0.00346






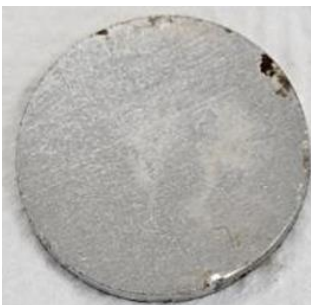
**Tablica 5** - Tablični prikaz slika pločica prije i nakon pranja za proizvod 2

<b>PROIZVOD 2</b>			
	PW	0,5% CIP92	0,5% CIP72
<b>PRIJE PRANJA</b>			
<b>NAKON PRANJA</b>			

**Tablica 6** - Prikaz masa pločica prije i nakon pranja te rezultati dodatnih testiranja za proizvod 2

<b>PROIZVOD 2 DODATNO</b>			
	<b>PW</b>	<b>0,5% CIP92</b>	<b>0,5% CIP72</b>
<b>masa prazne pločice (g)</b>	4,88269	4,88871	4,88200
<b>masa pločice sa osušenim proizvodom (g)</b>	4,89182	4,89684	4,88944
<b>masa oprane pločice (g)</b>	4,87855	4,88359	4,87671
<b>masa proizvoda (g)</b>	0,00913	0,00813	0,00744
<b>zaostatak nakon pranja (g)</b>	-0,00414	-0,00512	-0,00529







**Tablica 7** - Tablični prikaz slika pločica prije i nakon pranja za dodatna ispitivanja za proizvod 2

<b>PROIZVOD 2 DODATNO</b>			
	PW	0,5% CIP92	0,5% CIP72
<b>PRIJE PRANJA</b>			
<b>NAKON PRANJA</b>			

**Tablica 8** - Prikaz masa pločica prije i nakon pranja te rezultati dodatnih testiranja za proizvod 2

<b>PROIZVOD 2 DODATNO (nove metode)</b>			
	<b>Topla PW</b>	<b>Topli 1% CIP92</b>	<b>Hladni 1% CIP92</b>
<b>masa prazne pločice (g)</b>	4,87865	4,88395	4,88690
<b>masa pločice sa osušenim proizvodom (g)</b>	4,88594	4,89141	4,89299
<b>masa oprane pločice (g)</b>	4,87470	4,87913	4,88195
<b>masa proizvoda (g)</b>	0,00729	0,00746	0,00609
<b>zaostatak nakon pranja (g)</b>	-0,00395	-0,00482	-0,00495

**Tablica 9** - Tablični prikaz slika pločica prije i nakon pranja za dodatna ispitivanja za proizvod 2

<b>PROIZVOD 2 DODATNO (nove metode)</b>			
	PW	Topla 1% CIP92	Hladna 1% CIP92
<b>PRIJE PRANJA</b>			
<b>NAKON PRANJA</b>			

Međutim, ovako pozitivni rezultati nisu uočeni za proizvod 2 nakon prvog testiranja. Prema rezultatima u tablici 4, mjerenja nakon pranja su pokazala negativne vrijednosti, što nije bilo u skladu sa vizualnim izgledom samih pločica, čak ni nakon pranja u trajanju od 45 minuta, vidljivo u tablici 5. Zbog ovakvih neprihvatljivih negativnih vrijednosti i nesklada između očekivanih i dobivenih rezultata, eksperiment sa ovim proizvodom je kasnije ponovljen s modifikacijom u postupku sušenja. Kako bi se potpuno oponašali realni uvjeti, sušenje u sušioniku je zamijenjeno sušenjem na zraku.







U ponovljenom testiranju za proizvod 2, uz već korištene metode pranja, uvedene su tri nove metode – pranje u toploj vodi (80°C) te pranje u toploj i hladnoj 1%-tnoj otopini CIP92 deterdženta. Bez obzira na uvedene promjene, nova mjerenja, prikazana u tablici 6, također su pokazala

negativne vrijednosti zaostatka proizvoda nakon pranja. Niti jedna metoda nije zadovoljila ni vizualnu inspekciju. Iako ovakva metoda sušenje prikazuje realne uvijete, nije rezultirala prihvatljivim vrijednostima. Ovo potvrđuje potrebu za detaljnije analize postupka čišćenja i mogućom promjenom metoda za postizanje točnijih rezultata.

**Tablica 10** - Prikaz masa pločica prije i nakon pranja te rezultati eksperimenta za proizvod 3

<b>PROIZVOD 3</b>			
	<b>PW</b>	<b>0,5% CIP92</b>	<b>0,5% CIP72</b>
<b>masa prazne pločice (g)</b>	4.88506	4.87956	4.87903
<b>masa pločice sa osušenim proizvodom (g)</b>	4.91948	4.91641	4.91533
<b>masa oprane pločice (g)</b>	4.88518	4.87954	4.87902
<b>masa proizvoda (g)</b>	0.03442	0.03685	0.03630
<b>zaostatak nakon pranja (g)</b>	0.00012	-0.00002	-0.00001

**Tablica 11** - Tablični prikaz slika pločica prije i nakon pranja za proizvod 3





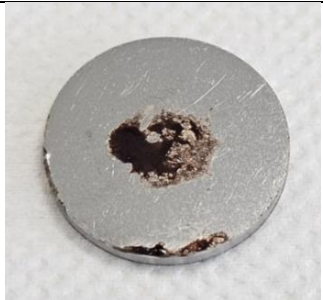
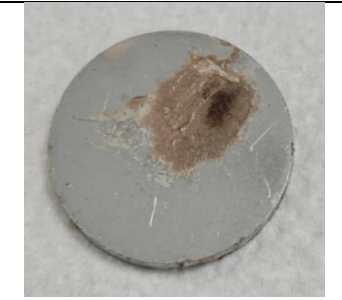
<b>PROIZVOD 3</b>			
	<b>PW</b>	<b>0,5% CIP92</b>	<b>0,5% CIP72</b>
<b>PRIJE PRANJA</b>			
<b>NAKON PRANJA</b>			

Testiranja na proizvodu 3 rezultirala su variranjem u rezultatima ovisno o primijenjenoj metodi čišćenja. Metode pranja sa deterdžentom CIP92 i CIP72 rezultirale su minimalnim zaostatkom nakon pranja, što se može prepisati pogrešci vage. Nasuprot tome, čišćenje pročišćenom vodom rezultiralo je malim zaostatkom proizvoda nakon pranja, iako je pločica bila vizualno čista, kako je vidljivo u tablici 11. Ovo ukazuje na to da metoda čišćenja pročišćenom vodom nije dovoljno efikasna za ovaj tip proizvoda.

**Tablica 12** - Prikaz masa pločica prije i nakon pranja te rezultati eksperimenta za proizvod 4

<b>PROIZVOD 4</b>			
	<b>PW</b>	<b>0,5% CIP92</b>	<b>0,5% CIP72</b>
<b>masa prazne pločice (g)</b>	4.88931	4.88292	4.88380
<b>masa pločice sa osušenim proizvodom (g)</b>	4.92615	4.91809	4.92072
<b>masa oprane pločice (g)</b>	4.89078	4.88366	4.88384
<b>masa proizvoda (g)</b>	0.03684	0.03517	0.03692
<b>zaostatak nakon pranja (g)</b>	0.00147	0.00074	0.00004

**Tablica 13** - Tablični prikaz slika pločica prije i nakon pranja za proizvod 4


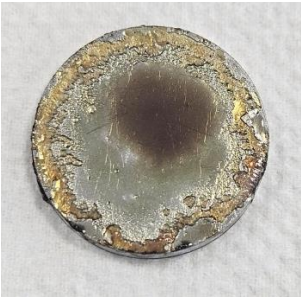

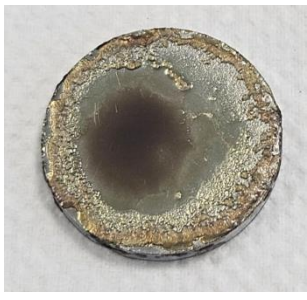




<b>PROIZVOD 4</b>				
	PW	0,5% CIP92	0,5% CIP72	
<b>PRIJE PRANJA</b>				
<b>NAKON PRANJA</b>				

Eksperiment za proizvod 4 zahtijevao je dva testiranja. Prvo testiranje uključivalo je pločice sušene u sušioniku. Niti jedna metoda nije pokazala zadovoljavajuće rezultate. Prema tablicama 12 i 13, vidljivi su ostaci proizvoda na pločicama što se očituje i u rezultatima mjerenja.

**Tablica 14** - Prikaz masa pločica prije i nakon pranja te rezultati dodatnih testiranja za proizvod 4

<b>PROIZVOD 4 - DODATNO</b>				
	<b>3.5% ClearKlens Mega HP</b>	<b>1% ClearKlens Mega HP</b>	<b>topla PV</b>	<b>1% CIP92</b>
<b>masa prazne pločice (g)</b>	4.88500	4.87627	4.88155	4.88455
<b>masa pločice sa osušenim proizvodom (g)</b>	4.9215	4.91254	4.91804	4.91954
<b>masa oprane pločice (g)</b>	4.88458	4.87714	4.88201	4.88415
<b>masa proizvoda (g)</b>	0.03650	0.03627	0.03649	0.03499
<b>zaostatak nakon pranja (g)</b>	-0.00042	0.00087	0.00046	-0.00040

**Tablica 15** - Tablični prikaz slika pločica prije i nakon pranja za dodatna ispitivanja za proizvod 4



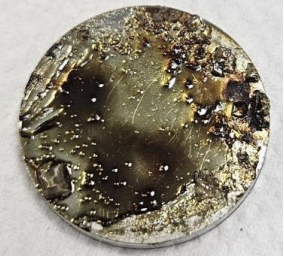

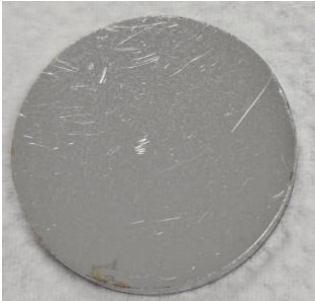



PROIZVOD 4 - DODATNO				
	3.5% ClearKlens Mega HP	1% ClearKlens Mega HP	1% CIP92	topla PV
<b>Prije pranja</b>				
<b>Nakon pranja</b>				

**Tablica 16** - Prikaz masa pločica prije i nakon pranja te rezultati dodatnih testiranja za proizvod 4

PROIZVOD 4 – DODATNO (II)				
	Worst case	REALNI UVJETI		
		Topla PW	Topla 1%-tna CIP92	Hladna 1%-tna CIP92
<b>masa prazne pločice (g)</b>	4,87670	4,88863	4,87715	4,87615
<b>masa pločice sa osušenim proizvodom (g)</b>	4,91249	4,92377	4,91389	4,91117
<b>masa oprane pločice (g)</b>	4,87642	4,88833	4,87658	4,87587
<b>masa proizvoda (g)</b>	0,03579	0,03514	0,03674	0,03502
<b>zaostatak nakon pranja (g)</b>	-0,00028	-0,00030	-0,00057	-0,00028



**Tablica 17** - Tablični prikaz slika pločica prije i nakon pranja za dodatna ispitivanja za proizvod 4

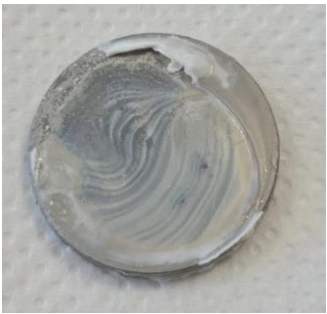





<b>PROIZVOD 4 – DODATNO (II)</b>				
	<b>Worst case</b>	<b>REALNI UVJETI</b>		
		<b>Topla PW</b>	<b>Topli 1%-tni CIP92</b>	<b>Hladni 1%-tni CIP92</b>
<b>Prije pranja</b>				
<b>Nakon pranja</b>				

Dodatna ispitivanja uključila su upotrebu novih sredstava za čišćenja – ClearKlens Mega HP i toplu pročišćenu vodu, i različite metode sušenja. Dodatne pločice su se pripremile tako da je jedna pločica sušena u sušioniku i to je predstavljalo najgori slučaj, dok su 3 pločice stavljene da se suše na zraku te su one predstavljale realne uvjete. Nakon što se postigla željena masa proizvoda na pločici (0,035 g), one su podvrgnute različitim načinima pranja – topla voda, topla 1% otopina COSA CIP92 deterdženta i hladna 1% otopina COSA CIP92 deterdženta. Rezultati dodatnih ispitivanja prikazani su u tablicama 14, 15, 16 i 17. Testiranja koja su uključivala nova sredstva za čišćenje i toplu pročišćenu vodu, također nisu pokazala prihvatljive rezultate. Zaostatak proizvoda nakon pranja na pločicama pranim u 3,5% otopini ClearKlens Mega HP deterdženta i 1% otopini CIP92 deterdženta bila su u minusu, ali prema vizualnoj provjeri nisu zadovoljili. Što se tiče testiranja koje je provedeno sušenjem pločica na zraku, jedina metoda koja je se pokazala uspješnom je pranje u hladnoj 1%-tne otopini CIP92 deterdženta. Ostale metode pranja nisu pokazale zadovoljavajuće rezultate.

**Tablica 18** - Prikaz masa pločica prije i nakon pranja te rezultati eksperimenta za proizvod 5

<b>PROIZVOD 5</b>			
	<b>PW</b>	<b>0,5% CIP92</b>	<b>0,5% CIP72</b>
<b>masa prazne pločice (g)</b>	4.88470	4.87878	4.88164
<b>masa pločice sa osušenim proizvodom (g)</b>	4.92458	4.91662	4.91932
<b>masa oprane pločice (g)</b>	4.88465	4.87874	4.88174
<b>masa proizvoda (g)</b>	0.03988	0.03784	0.03768
<b>zaostatak nakon pranja (g)</b>	-0.00005	-0.00004	0.00010

**Tablica 19** - Tablični prikaz slika pločica prije i nakon pranja za proizvod 5

<b>PROIZVOD 5</b>			
	<b>PW</b>	<b>0,5% CIP92</b>	<b>0,5% CIP72</b>
<b>PRIJE PRANJA</b>			
<b>NAKON PRANJA</b>			







Ispitivanja različitih metoda na proizvodu 5 pokazala su slične rezultate. Pločice oprane pročišćenom vodom i 0,5%-tnom otopinom CIP92 deterdženta pokazale su vrlo male negativne vrijednosti nakon pranja, što sugerira da se metode mogu smatrati uspješnim u uklanjanju ostataka. Nasuprot tome, pranje u 0,5%-tnoj otopini ostavilo je minimalne zaostatke, ali to je metoda koja se inače ne koristi u proizvodnom pogonu prilikom čišćenja.

**Tablica 20** - Prikaz masa pločica prije i nakon pranja te rezultati eksperimenta za proizvod 6

<b>PROIZVOD 6</b>			
	<b>PW</b>	<b>0,5% CIP92</b>	<b>0,5% CIP72</b>
<b>masa prazne pločice (g)</b>	4.88321	4.87688	4.87825
<b>masa pločice sa osušenim proizvodom (g)</b>	4.91598	4.91110	4.91313
<b>masa oprane pločice (g)</b>	4.88320	4.87683	4.87817
<b>masa proizvoda (g)</b>	0.03277	0.03422	0.003488
<b>zaostatak nakon pranja (g)</b>	-0.00001	-0.00005	-0.00008

Za proizvod 6, sve metode čišćenja pokazale su pozitivne rezultate. Zaostatak nakon pranja, u svim slučajevima, bio je u jako malim negativnim vrijednostima što ukazuje na visoku učinkovitost svih metoda u uklanjanju ostataka proizvoda. Nadalje, učinkovitost metoda mogla se potvrditi sa vizualnim pregledom. Prikaz rezultata i slika nalazi se u tablicama 20 i 21.

**Tablica 21** – Tablični prikaz slika pločica prije i nakon pranja za proizvod 6

<b>PROIZVOD 6</b>			
	PW	0,5% CIP92	0,5% CIP72
<b>PRIJE PRANJA</b>			
<b>NAKON PRANJA</b>			

#### 4.2. Analiza ukupnog organskog ugljika

Provedbom analize ukupnog organskog ugljika (TOC) određuje se razina zaostalog ugljika na ključnim dijelovima sustava nakon postupka čišćenja. Kritične točke koje su se analizirale su izlazni ventil, sredina spremnika te poklopac. Postavljeni zahtjevi, prikazani u tablici 22, predstavljaju referentne vrijednosti koje bi ukazivale na neadekvatno čišćenje sustava.

Svi rezultati TOC analize pokazuju značajno niže vrijednosti organskog ugljika na svim analiziranim točkama u odnosu na postavljene zahtjeve. Slijepe probe brisa i ispirka nisu pokazale prisutnost organskog ugljika. Ovim rezultatima se dokazalo da je spremnik gotovo potpuno očišćen od organskog ugljika, odnosno da nema nikakvih zaostatka deterdženta za pranje, što je ključan pokazatelj kvalitetne i pouzdane metode čišćenja.

**Tablica 22** - Zahtjevi za TOC analizu

<b>ZAHTJEVI</b>	
<b>Slijepa proba brisa</b>	Nije primjenjivo
<b>Izlazni ventil</b>	371,951 ppm
<b>Sredina spremnika</b>	371,951 ppm
<b>Poklopac</b>	371,951 ppm
<b>Slijepa proba ispirka</b>	Nije primjenjivo
<b>Ispirak</b>	687,936 ppm

**Tablica 23** - Rezultati TOC analize

<b>REZULTATI</b>	
<b>Slijepa proba brisa</b>	Nije primjenjivo
<b>Izlazni ventil</b>	1,681 ppm
<b>Sredina spremnika</b>	1,441 ppm
<b>Poklopac</b>	1,158 ppm
<b>Slijepa proba ispirka</b>	Nije primjenjivo
<b>Ispirak</b>	1,402 ppm

#### 4.3. HPLC

Analiza HPLC-om u validaciji čišćenja omogućuje temeljitu procjenu učinkovitosti postupka čišćenja. Uz pomoć ovih rezultata moguće je vidjeti ima li ostataka aktivnog farmaceutskog sastojka na opremi nakon proizvodnje. Takva provjera je od ključne važnosti jer čak i najmanji zaostaci mogu uzrokovati unakrsnu kontaminaciju između različitih serija.

Prije same analize postavljene su granice detekcije i kvantifikacije. Granica detekcije (eng. Limit of Detection, LOD) se definira kao najniža razina analita koja se može detektirati, ali ne nužno kvantificirati, dok je granica

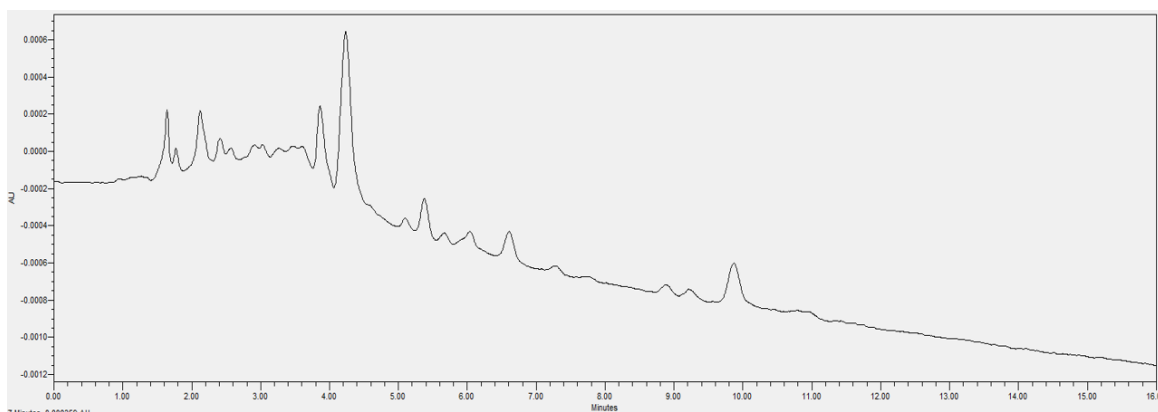
kvantifikacije (eng. Limit of Quantitation, LOQ) najniža razina analita koja se može pouzdano izmjeriti uz prihvatljivu točnost i preciznost (8). U ovoj metodi, za uzorke uzete brisom, granica detekcije iznosi 0,00004 µg/cm<sup>2</sup>, a granica kvantifikacije jest 0,00008 µg/cm<sup>2</sup>. S druge strane, za ispirak, LOD iznosi 0,003 µg/mL, a LOQ jest 0,006 µg/mL.

**Tablica 24** - Prikaz zahtjeva i rezultata HPLC analize

		<b>Zahtjev</b>	<b>Detektirano</b>
<b>Bris</b>	<b>Izlazni ventil</b>	0,0536 µg/mL 0,011 µg/cm <sup>2</sup>	<0,00004 µg/cm <sup>2</sup>
	<b>Stijenka</b>	0,0536 µg/mL 0,011 µg/cm <sup>2</sup>	0,00050 µg/cm <sup>2</sup>
	<b>Poklopac</b>	0,0536 µg/mL 0,011 µg/cm <sup>2</sup>	<0,00004 µg/cm <sup>2</sup>
	<b>Ispirak</b>	0,097 µg/mL	<0,006 µg/mL

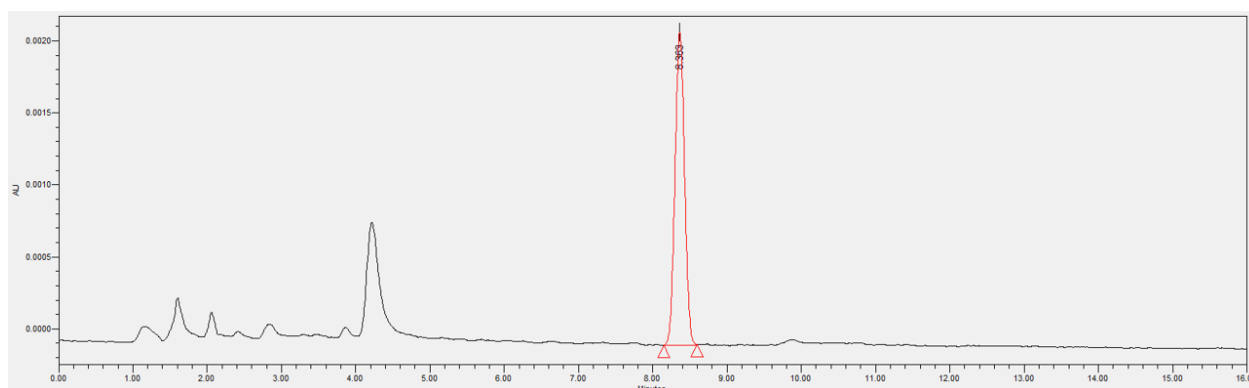
Rezultati analize briseva i ispirka, prikazani u tablici 24, ukazuju na prisutnost izuzetno niskih količina benzoil peroksida na gotovo svim uzorcima opreme nakon čišćenja. Detektirane količine na svim uzorcima, osim brisa stijenke, bile su ispod granica detekcije i ispod postavljenih granica.

Kako je opisano u dijelu materijali i metode, tijekom provedbe HPLC analize, analizirani su i otapalo i poredbena otopina. Kromatogram otapala služi kao kontrola za provjeru čistoće otapala koje smo koristili tijekom analize. Omogućuje nam da utvrdimo postoji li nečistoća u otapalu koja bi mogla dati lažno pozitivne rezultate. Kromatogram otapala prikazan je na slici 6.



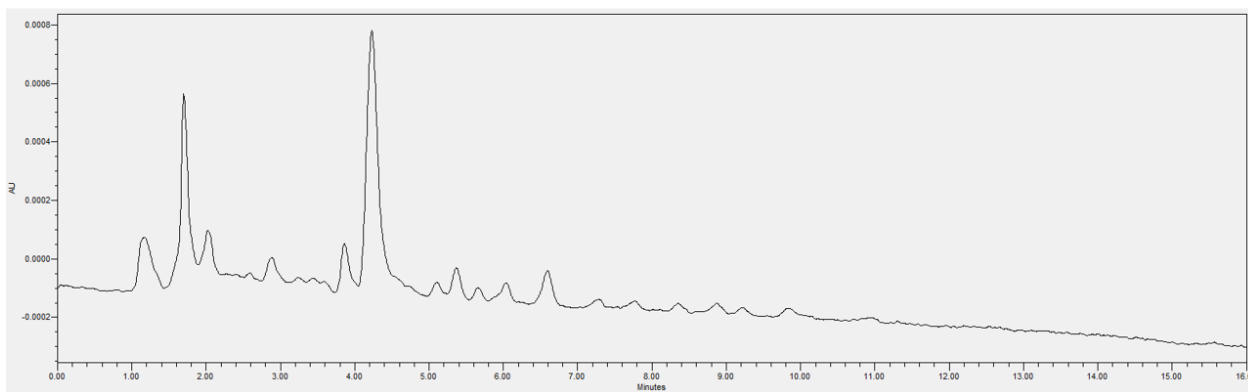
**Slika 6** - Kromatogram otapala (voda za kromatografiju + acetonitril za kromatografiju)

Kako bi se utvrdila točnost, pouzdanost i vjerodostojnost rezultata HPLC analize, analizira se i kromatogram poredbene otopine. On služi za identificiranje i kvantificiranje analiza u uzorku koji sadrži poznatu koncentraciju ciljanog spoja. U ovom slučaju je to benzoil peroksid. Prikaz kromatograma poredbene otopine se nalazi na slici 7.



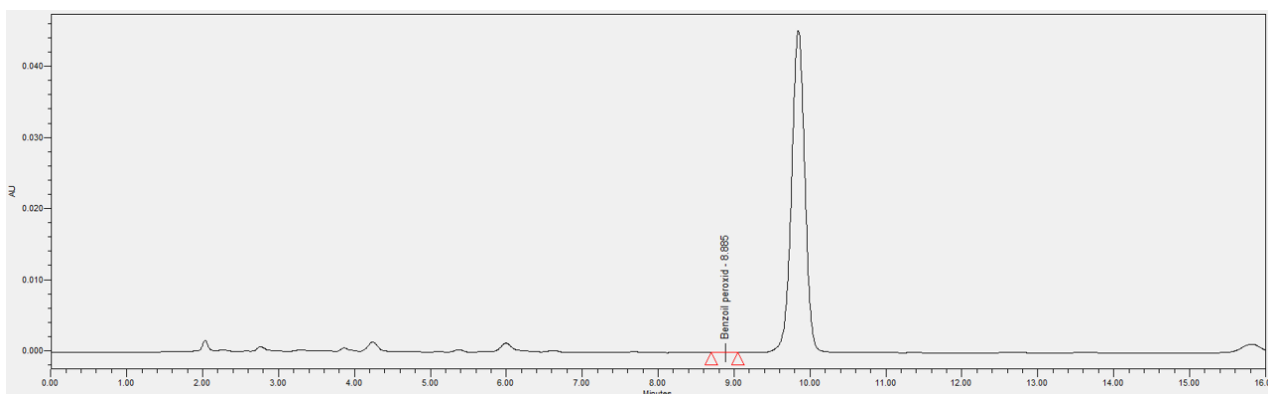
**Slika 7** – Kromatogram poredbene otopine

Na temelju analize poredbene otopine, zaključili smo da metoda HPLC-a pokazuje visoku pouzdanost i točnost te se može koristiti za validaciju čišćenja. Kromatogram na slici 8 predstavlja uzorak ispirka. Vidljivo je da nije prisutan pik koji bi odgovarao piku benzoil peroksida, stoga možemo zaključiti kako prema uzorku ispirka možemo reći da je proces čišćenja napravljen na ispravan način.



**Slika 8** – Kromatogram ispirka

Nasuprot tome, u uzorku brisa utvrđena je prisutnost benzoil peroksida. Detektirano je  $0,00050 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Iako je detektirana količina benzoil peroksida unutar postavljenih zahtjeva, ovo ukazuje na postojanje tragova spoja nakon čišćenja. Na slici 9, prisutnost benzoil peroksida je istaknuta crvenom bojom. Uz navedeni pik, u blizini se pojavljuje drugi pik koji je tipičan za bris te predstavlja nečistoće koje su prirodno prisutne u brisu.



**Slika 9** – Kromatogram brisa



## **5. RASPRAVA**

### **5.1. Eksperiment**

Rezultati provedenog istraživanja jasno pokazuju razlike u učinkovitosti metoda kada se primjenjuju na različite proizvode. Dakle, varijabilnosti rezultata otkrivaju značajne razlike u efikasnosti ovisno o karakteristikama proizvoda i vrsti korištene metode pranja. Možemo zaključiti da metode čišćenja koje koriste deterdžente, posebno CIP92 i CIP72, pokazuju veću učinkovitost u uklanjanju zaostataka proizvoda sa inox pločica u usporedbi sa pročišćenom vodom. Izuzetak ovome jest proizvod 5 koji je imao male zaostatke proizvoda prilikom pranja sa deterdžentom CIP72, no to nije od veće važnosti s obzirom da se taj deterdžent nije koristio za pranje proizvodnog pogona nakon proizvodnje ovog proizvoda. Nasuprot tome, proizvodi 1, 5 i 6 pokazali su da pranje pročišćenom vodom također može biti učinkovito. Ovo dokazuje da i pročišćena voda može biti preferirana opcija zbog manje kemijske izloženosti i manjeg rizika od kontaminacija.

Unatoč rezultatima prikazanim u odlomku prije, kod nekih proizvoda nisu uočeni pozitivni rezultati. Primjer takvog proizvoda jest proizvod 2. bez obzira na primijenjenu metodu čišćenja, nije se postigla potpuna čistoća. Najveći problem je bio ne slaganje rezultata sa vizualnom kontrolom. Svi dobiveni rezultati su bili negativni, što bi teoretski sugeriralo da su pločice nakon pranja bile lakše nego prije nanošenja proizvoda, dok su na pločicama okom vidljivi ostaci proizvoda. Kako bi se dodatno ispitali ove rezultate, ponovili smo eksperiment, ali sa promjenom u načinu sušenja. Umjesto sušenja u sušioniku, ovaj put pločice su puštene da se suše na zraku, u realnim uvjetima, te su kasnije prane istim metodama kao i prvi put. Unatoč napravljenj promjeni, rezultati su ostali isti – u minusu. Jedno od mogućih objašnjenja je to da je došlo do oštećenja tj. korozije pločica uslijed djelovanja proizvoda.

Razlika između pločica korištenih u eksperimentu i opreme u proizvodnji je da je oprema elektroporirana. Elektroporacija je elektrokemijski postupak kojima se brojne legure obrađuju kako bi se dobila površina koja pokazuje

otpornost na koroziju u usporedbi s neobrađenim materijalima (14). Prilikom kapanja proizvoda postoji mogućnost da je došlo do stvaranja oksida (engl. 'rouge formation'). Ovo može zahtjevati dodatna istraživanja i detaljnije analize s ciljem optimizacije.

Izazov prilikom eksperimenta predstavljao je i proizvod 4. Prvobitna ispitivanja se nisu pokazala uspješnim. Nakon pranja, uključujući i deterdžente, na pločicama su i dalje bili prisutni ostaci proizvoda. Za razliku od proizvoda 2, kod ovog proizvoda nije bilo neslaganja između rezultata i vizualne kontrole. Kako bi se pokušao pronaći odgovarajući način čišćenja, uvedena su dva dodatna ispitivanja koja su rezultirala pozitivnim odgovorom. Od osam dodatnih ispitivanja, jedno se pokazalo učinkovitim – pranje u hladnoj 1%-tna otopini CIP92 deterdženta. Treba naglasiti da se ovaj pozitivan rezultat postigao na pločici koja je sušena na zraku.

Tijekom provođenja eksperimenta suočili smo se s nekoliko problema koji su mogli utjecati na finalni rezultat i njihovu interpretaciju. Prvi problem bio je postizanje željene mase na pločicama. Iako je naš cilj bio postići masu od 0,035g, veća masa, poput 0,1g, bila bi praktičnija jer bi realnije simulirala uvjete iz proizvodnje. Postizanje takve mase pokazalo se izuzetno teškim zbog specifičnosti postupka dokapavanja. Prilikom dodavanja proizvoda na pločice dolazilo bi do prolijevanja i gubitka proizvoda izvan pločice, što bi rezultiralo fluktuacijama u masi te otežalo postizanje željene mase proizvoda. Zbog ovih razloga, kod proizvoda 2, gdje smo simulirali realne uvjete, smo zaustavili dokapavanje proizvoda na različitim masama.

Osim prethodno navedenog, još jedna stvar koja može utjecati na rezultate jest položaj pločice. Cilj je bio postaviti pločice na način da budu u stalnom kontaktu sa sredstvom za čišćenje i što bolje simulirati uvjete rada miješalice, a to bi se postiglo kada bi pločice visile sa strane. Ovakav pristup bi omogućio bolju cirkulaciju sredstva za čišćenje oko pločica te potencijalno doveo do boljeg uklanjanja zaostataka proizvoda. Ovakav položaj pločica nismo uspjeli ostvariti pa su pločice bile postavljene na dno čaše.

U budućim ispitivanjima moglo bi se više pažnje posvetiti ispitivanju učinaka različitih koncentracija deterdženta kako bi se pronašla optimalna koncentracija deterdženta potrebnih za učinkovito čišćenje. Nadalje, potrebno je obratiti pažnju na metodu sušenja. Prema rezultatima vidljivo je da sušenje ima važnu ulogu u postizanju čistih površina bez zaostataka. Ovo se potvrđuje sa proizvodom 4, kojim smo promjenom metode sušenja pronašli odgovarajuću metodu čišćenja. Osim optimizacije koncentracije deterdženta i metoda sušenja, daljnja istraživanja bi još mogla uključiti precizniju analizu interakcije između proizvoda i površine pločice.

## **5.2. TOC analiza**

Rezultati provedene analize ukupnog organskog ugljika jasno ukazuju da je postupak čišćenja opreme bio izuzetno učinkovit, sa gotovo potpunim uklanjanjem organskog ugljika sa mjesta uzorkovanja. Svi rezultati TOC-a pokazali su značajno niže vrijednosti organskog ugljika u usporedbi sa postavljenim zahtjevima. Ovime se potvrđuje da je odabrana metoda pranja adekvatna za korištenje te da osigurava kvalitetu i sigurnost budućih proizvoda. Također, pozitivan rezultat su bile slijepa probe brisa i ispirka na kojima nije pronađen nikakav trag ugljika. Ovime se potvrđuje da nema nepoznatih izvora kontaminacije iz okoline.

Ovim rezultatima ne samo da se potvrđuje učinkovitost provedenog postupka čišćenja, već se ima i utjecaj na održavanje kvalitete i sigurnosti proizvodnog procesa. Iako su trenutni rezultati pokazali visoku učinkovitost, redovitom kontrolom omogućuje se pravovremenu identifikaciju potencijalnih problema te rješavanje istih.

## **5.3. HPLC**

HPLC analizom dobivamo uvid o učinkovitost metode čišćenja u uklanjanju aktivnog farmaceutskog sastojka. Omogućuje nam detekciju i kvantifikaciju rezidualnih tragova benzoil peroksida. Glavni zaključak iz provedene analize

jest da je postupak čišćenja proveden na ispravan način. Iako je glavni zaključak pozitivan, benzoil peroksid je bio detektiran na uzorku brisa, dok uzorci ispirka nisu pokazali njegovu prisutnost. Detektirana količina benzoil peroksida u uzorku je bila unutar postavljenih zahtjeva. To nam ukazuje na količinu koja je prihvatljiva prema standardima industrije.

Prema teoriji prezentiranoj u uvodom dijelu, ovi rezultati potvrđuju važnost korištenja HPLC metode u validaciji čišćenja. Ona omogućava preciznu kvantifikaciju zaostalih tragova API-ja na opremi te na taj način osigurava kvalitetu i sigurnost farmaceutskih proizvoda. Također, dokazali smo da korištena metoda pranja zadovoljava postavljene kriterije.

Prilikom analize identificirana je prisutnost tragova benzoil peroksida u jednom uzorku. Detektirane količine su jako male i unutar postavljenih granica. Razlog pronalaženju benzoil peroksida može biti ili kratka izloženost deterdžentu ili neadekvatno ispiranje opreme. Iako trenutno nema razloga za zabrinutost i promjenama zbog vrlo niskih razina prisutnog sastojka, ovo daje mogućnost za unaprjeđenje procesa čišćenja.

Pitanje koje se može postavi jest zašto je benzoil peroksid bio prisutan u uzorku brisa, ali ne i u ispirku? Odgovor se može pronaći u karakteristikama postupka uzimanja uzorka. Uzorkovanje brisom ima prednost u tome što omogućuje testiranje mjesta koja su najteže dostupna, na kojima postoji mogućnost zaostataka koju su isušeni ili netopljivi. Nasuprot tome, uzorci ispirka omogućuju uzorkovanje veće površine, ali mogu biti manje učinkoviti u otkrivanju spojeva koji nisu dovoljno topljivi. S obzirom na ovo, postoji mogućnost da se benzoil peroksid nije u potpunosti otopio prilikom uzorkovanja zbog čega nije detektiran u uzorku (15).

## 6. ZAKLJUČAK

Rezultati provedenog eksperimenta jasno naglašuju važnost optimizacije metoda čišćenja u farmaceutskoj industriji. Metode pranja koje uključuju deterdžente, CIP92 i CIP72, pokazali su se učinkovitijim u uklanjanju zaostataka proizvoda na pločicama u usporedbi sa pranjem u pročišćenoj vodi. Ovime smo dobili gotovo potpuno rješenje na pitanje koji od 6 korištenih proizvoda ostavlja zaostatke nakon pranja. Najkritičniji proizvodi su bili proizvod 2 i proizvod 4, no za proizvod 4 se pronašao način odgovarajući način pranja – hladna 1%-tna otopina CIP92 deterdženta. Nasuprot tome, za proizvod 2 unatoč različitim pristupima sušenja i pranja, nije pronađena potpuno odgovarajuća metoda koja bi uklonila sve zaostatke proizvoda. Ovaj problem sugerira, da su možda neka od specifičnih svojstava samo proizvoda poput kemijskog sastava ili interakcije s površinom uzorkovale poteškoće u čišćenju. Daljnja istraživanja na proizvodu 2 i optimizacija procesa čišćenja nužni su kako bi se osigurali adekvatni higijenski standardi. Dodatna istraživanja trebala bi se fokusirati na nova sredstva za čišćenje ili modifikaciju postojećih metoda.

Rezultati validacije čišćenja pružaju u uvid učinkovitost postojeće metode čišćenja farmaceutske opreme. Koristeći metode TOC-a i HPLC-a dobivamo uvid postoje li ostaci aktivnog farmaceutskog sastojka ili deterdženta na opremi nakon čišćenja iste. Rezultati ovih metoda potvrđuju da je proces čišćenja proveden na adekvatan i uspješan način, s minimalnim tragovima benzoil peroksida koji su bili uočeni samo u uzorku brisa. Detektirana količina benzoil peroksida je bila unutar postavljenih granica. Ovo otvara pitanje može li se korišteni postupak čišćenja dodatno optimizirati kako bi se eliminirali i ti minimalni zaostaci. Rezultati validacije čišćenja doprinose ispunjavanju strogih regulativnih zahtjeva u farmaceutskoj industriji te se na taj način sprječava unakrsna kontaminacija koja nadalje osigurava kvalitetu i sigurnost lijekova koje se koriste u svakodnevnom životu.

## 7.LITERATURA

1. Prabu SL. Cleaning Validation and its Importance in Pharmaceutical Industry [Internet]. Vol. 42, Pharma Times. 2010. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/281742872>
2. FDA. Validation of Cleaning Processes, GUIDE TO INSPECTIONS VALIDATION OF CLEANING PROCESSES [Internet]. 2014 [cited 2024 Apr 22]. Available from: <https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/inspection-guides/validation-cleaning-processes-793>
3. Parental Drug Association (PDA). Points to Consider for Cleaning Validation. 2012;
4. Active Pharmaceutical Ingredient Committee (APIC). Cleaning Validation in Active pharmaceutical Ingredient manufacturing plants. 1999.
5. Narayana Murthy D, Chitra K. A REVIEW ARTICLE ON CLEANING VALIDATION. Int J Pharm Sci Res [Internet]. 2013;4(9):3317. Available from: <http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.4>
6. Manu C, Vishal Gupta N. Review on cleaning validation in pharmaceutical industry. Vol. 9, International Journal of PharmTech Research. Sphinx Knowledge House; 2016. p. 415–21.
7. Fugate T. Hold Time Studies: A Lost Parameter for Cleaning Validation. 2006.
8. ISPE Guide. Cleaning Validation Lifecycle - Application, Methods, and Controls. 2020.
9. Eulambius Mathias. Pharmaceutical product cross-contamination: industrial and clinical pharmacy practice. Dar Es Salaam Medical Students' Journal. 2013 May 22;19(2):17–9.

10. Yadav H, Pawar HA. PRACTICAL APPROACH IN CLEANING VALIDATION: A SYSTEMATIC REVIEW [Internet]. 2022. Available from: <http://www.aphinfo.com/ijmpbs>
11. Prabu SL, Suriya Prakash TNK, Thirumurugan R. Cleaning Validation and Its Regulatory Aspects in the Pharmaceutical Industry. In: *Developments in Surface Contamination and Cleaning*. Elsevier; 2015. p. 129–86.
12. Shard AG, Schofield RC, Minelli C. Ultraviolet-visible spectrophotometry. In: *Characterization of Nanoparticles: Measurement Processes for Nanoparticles*. Elsevier; 2019. p. 185–96.
13. Zaheer Z, Ahmed RZ. Analytical Methods for Cleaning Validation [Internet]. 2011. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/233341579>
14. Hryniewicz T. Concept of microsmoothing in the electropolishing process. Vol. 64, *Surface and Coatings Technology*. 1994.
15. Lamei Ramandi S, Asgharian R. Evaluation of swab and rinse sampling procedures and recovery rate determination in cleaning validation considering various surfaces, amount and nature of the residues and contaminants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2020;19(3):383–90.

# 8. ŽIVOTOPIS



## LUCIJA AŽIĆ

**Kućna :** TOMETIĆI, 40, 51215, Kastav, Hrvatska

**E-adresa:** [lucija.azic05@gmail.com](mailto:lucija.azic05@gmail.com) **Telefonski broj:** (+385) 995053154

**Spol:** Žensko **Datum rođenja:** 05/05/2000 **Državljanstvo:** hrvatsko

### OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

[ 2022 – Trenutačno ]

#### Diplomski studij "Istraživanje i razvoj lijekova"

*Fakultet za biotehnologiju i razvoj lijekova, Sveučilište u Rijeci*

**Mjesto:** Rijeka

**Zemlja:** Hrvatska

[ 2019 – 2022 ]

#### Sveučilišna prvostupnica inženjerka prehrambene tehnologije (univ. bacc. ing. techn. aliment.)

*Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek*

**Mjesto:** Osijek

**Zemlja:** Hrvatska

Završni rad: "Prehrana i starenje" (mentor: prof. dr. sc. Daniela Čačić Kenjerić)

[ 2015 – 2019 ]

#### Tehničar nutricionist

*Medicinska škola Rijeka*

**Mjesto:** Rijeka

**Zemlja:** Hrvatska

### RADNO ISKUSTVO

[ 15/07/2022 – 04/08/2022 ]

#### Stručna praksa

*JGL d.d.*

**Mjesto:** Svilno, Pulac

**Zemlja:** Hrvatska

Odjel: Istraživanje i razvoj lijekova (mentor: Renata Simčić)

Upoznata sam sa procesom razvoja novog lijeka, načinom na koji se odvijaju sastanci i planiranjem troškova.

### KOMUNIKACIJSKE I MEĐULJUDSKE VJEŠTINE

#### Komunikacijske vještine

- komunikativnost i odgovornost
- spremnost na timski rad i suradnju

#### Poslovne vještine

- dobra vremenska organizacija
- dobra snalažljivost u laboratoriju
- sklonost učenju i usavršavanju



**Ostale vještine**

- Položen kolegij "Kontrola i osiguranje kontrole kvalitete lijekova u praksi".
- Upoznata sa principima GMP-a, obvezama zaposlenika i Europskom farmakopejom.

**Dodatno radno iskustvo**

- Rad u proizvodnji ekoloških proizvoda za čišćenje (Hortiriviera d.o.o. (Pero proizvodi))

**VOZAČKA DOZVOLA**

---

Automobili: B

**DIGITALNE VJEŠTINE**

---

Bioinformatika | MS Office (Word Excel PowerPoint) | Pretraživanje literature

---