

DIPLOMADOLGOZAT

**Sipkai Elza
2024.**



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
Élelmiszerkémia és Analitika Tanszék

**UHPLC-UV módszer validálása UXYZ kódú állatgyógyászati
hatóanyag analitikai meghatározására**

Belső konzulens: Marczika Andrásné dr. Sörös Csilla
egyetemi docens

MATE, Budai Campus, Élelmiszertudományi és
Technológiai Intézet, Élelmiszerkémia és Analitika Tanszék

Külső konzulens: Benesóczki Dóra
Minőségellenőrzési Osztályvezető
Lavet Gyógyszeripari Kft.

Készítette: Sipkai Elza

Budapest

2024.

1. TARTALOMJEGYZÉK

1. TARTALOMJEGYZÉK.....	1
2. BEVEZETÉS	4
3. CÉLKITŰZÉS	5
4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
4.1. Állategészségügy	6
4.2. Állattartási adatok Magyarországon.....	9
4.3. Analitikai módszerválidálásról általánosan	9
4.4. Validálás során alkalmazott teljesítményjellemzők	11
4.5. HPLC-UV technika	13
4.6. Kolonna típusok.....	15
4.7. Minőség a gyógyszeriparban	18
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	20
5.1. Felhasznált anyagok és eszközök	20
5.2. Eluensek, standard- és mintaoldatok előkészítése	21
5.3. Műszeres analitikai mérés technika leírása	22
5.4. A módszer validálása.....	27
6. EREDMÉNYEK.....	34
6.1. Validálási minőségjellemzők vizsgálata.....	34
7. ÖSSZEFOGLALÁS	43
8. MELLÉKLETEK.....	45
9. IRODALOMJEGYZÉK	51
9.1. Internetes hivatkozások	53
10. ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE	55

Jelölések, rövidítések:

EMA: Európai Gyógyszerügynökség (European Medicines Agency)

EUR: Euró

EU: Európai Unió (European Union)

GMP: Helyes gyártási gyakorlat (Good Manufacturing Practice)

H₂O₂: Hidrogén-peroxid

HCl: Sósav

IC: Ionkromatográfia (Ion Chromatography)

KSH: Központi Statisztikai Hivatal

LAV-MEL: Lavet Gyógyszergyártó Kft. szabványműveleti előírás

LC: Folyadékkromatográfia (Liquid Chromatography)

LOD/LD: Detektálási határ (Limit of Detection/Detection Limit)

LOQ/QL: Meghatározási határ (Limit of Quantitation/Quantitation Limit)

M: mol/dm³

NaOH: Nátrium-hidroxid

NP: Normál fázis (Normal Phase)

NSAID: Nem-szteroid gyulladásgátlók (Non-steroidal anti-inflammatory drugs)

Ph.Eur.: Európai gyógyszerkönyv (European Pharmacopoeia)

QC: Minőség-ellenőrzés (Quality Control)

RP: Fordított fázis (Reverse Phase)

RSD: Relatív szórás, relatív standard deviáció (Relative Standard Deviation)

SEC: Méretkizárásos kromatográfia (Size Exclusion Chromatography)

SST: Teljes eltérés-négyzetösszeg (Sum of Squared Total)

(U)HPLC: (Ultra)nagy-hatékonyságú folyadékkromatográfia [(Ultra) High Performance Liquid Chromatography]

USA: Amerikai Egyesült Államok

USD: Amerikai dollár (United States Dollar)

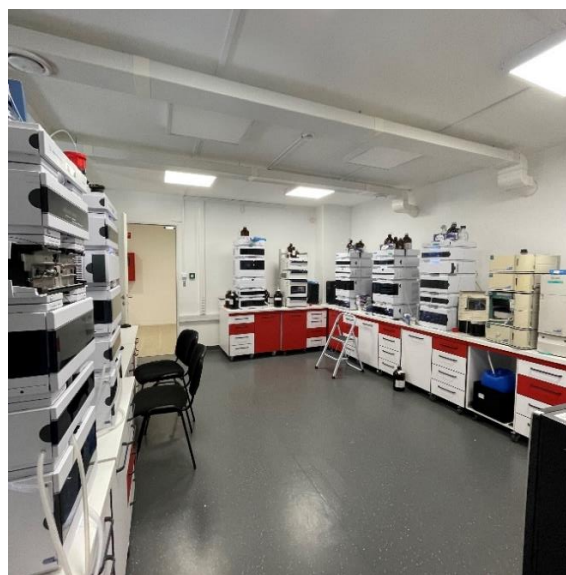
USFDA: Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (United States Food and Drug Administration)

UV-Vis: Ultraibolya-látható spektrofotometria (Ultraviolet–Visible spectroscopy)

(V)ICH: Harmonizációs nemzetközi (állategészségügyi) bizottság [(Veterinary) International Committee on Harmonization]

2. BEVEZETÉS

A Lavet Gyógyszeripari Kft.-t 1991-ben magyar befektetők alapították, jelenleg családi vállalkozásként működik. A vállalat állatgyógyászati termékeket gyárt a hazai és a nemzetközi piacra. Körülbelül 50 különböző terméket gyártottak az elmúlt 30 évben, de folyamatos a fejlesztés és az innováció. Az egyik fő termék egy kutyáknak gyártott kardiovaszkuláris gyógyszer, de emellett egyéb házi-, illetve haszonállatoknak is készül állatgyógyászati termék, például gyulladáscsökkentő, antibiotikum, féreghajtó. A cég Kistarcsán helyezkedik el, egyre bővülő területen és körülbelül 250 főt foglalkoztat. A vállalat más cégeknek is gyárt gyógyszerkészítményeket, de van saját márkás gyógyszere, illetve vitaminjai is. 2021 óta a cég alkalmazásában dolgozom, minőségellenőrzési analitikusként. Munkám során lehetőségem van a mindennapi rutin mérések mellett, a módszervalidálás folyamatában is részt venni. Jelenleg a cég még csak Európában forgalmazza a termékeit, de cél a 2024-es évre, hogy kijusson az amerikai piacra.



1. ábra: Lavet Gyógyszeripari Kft. főépület (balra) és Minőségellenőrzési HPLC labor (jobbra)

3. CÉLKITŰZÉS

Ahogy az emberek számára gyártott gyógyszerek hatóanyagtartalmát és tisztaságát meg kell határozni a forgalomba hozatal előtt, úgy az állatok számára gyártott készítményeket is analizálni kell különböző szempontok alapján. A gyártás közben alkalmazott rutinmérések módszerét a módszer validálása előzi meg. Munkám során célom az UXYZ kódú hatóanyagtartalmú állatgyógyászati köztitermék hatóanyagtartalmának UHPLC-UV készüléken való meghatározása, illetve a mérési módszer validálásának kidolgozása. Kutatásomat az analitikai módszer validálására vonatkozó gyógyszerkönyvi és nemzetközi harmonizációs irányelvekkel összhangban végeztem. A mérések során figyelembe vettem a validáláshoz szükséges teljesítményjelzőket (szelektivitás, pontosság, robusztusság).

4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

4.1. Állategészségügy

Az állategészségügy az emberek által megalkotott összetett szabályozó rendszer, amely több szempontból fontos szerepet tölt be az emberek életében, így például célkitűzéseként szerepel többek között az emberek és állatok egészségének védelme, járványmegelőzés, gazdasági szempontok. A dolgozat következő részében ezen pontokat fejtem ki [Internet 1],[1].

A 2005. évi CLXXVI. törvény egyik legfontosabb célkitűzése az emberi (és állati) egészség védelme, mivel az állatok által terjesztett betegségek veszélyt jelenthetnek az emberek (és állatok) egészségére is. Az elmúlt években több nagyobb járvány volt jelen (pl. madárinfluenza[2], kergemarhakór[3], afrikai sertéspestis[4]). A szabályozás nemzetközi szinten is fontos tényező, mivel a járványok országok között is áterjedhetnek. Az intézkedések segítenek megakadályozni a járványok továbbterjedését emberre, így garantálja az emberek biztonságát és egészségét. Emellett azonban az állati jólét megőrzése is fontos, mivel ez hozzájárul az állatok szenvedésének csökkentéséhez, egészségük fenntartásához. Továbbá jelentős szerepe van gazdasági szempontból is, mivel a rendelkezéseknek köszönhetően jelentős mezőgazdasági és élelmiszeripari veszteségek kerülhetők el, illetve nagyobb hozam érhető el ezekben az ágazatokban [Internet 1].

Az állategészségügyhöz kapcsolódik az állatgyógyszerek előállítása, minőségbiztosítás, minőség-ellenőrzés, forgalomba hozatali engedélyek szabályozása is. Ezekre a dolgozatom későbbi részében térek ki.

Az állatgyógyászati készítmény (gyógyszer) definíciója a következő: *„Bármely anyag vagy anyagok keveréke, amelyet állatok betegségeinek kezelésére vagy megelőzésére készítenek, továbbá bármely anyag vagy anyagok keveréke, amely farmakológiai, immunológiai vagy metabolikus hatások kiváltása révén az állatok valamely élettani funkciójának helyreállítása, javítása vagy módosítása, illetve orvosi diagnózis felállítása érdekében alkalmazható”*. Továbbá állatgyógyászati terméknek nevezzük a következőket: *„Állatgyógyászati készítmény, állatgyógyászati készítmény hatóanyaga, állat-egészségügyi biocid termék, állatgyógyászatban használatos gyógyhatású készítmény, ápolószer, segédanyag”* [Internet 1].

Az állatgyógyászati készítmények hatósági engedélyeztetése szigorú és hosszadalmas folyamat, amely területenként eltérő lehet, így például az USA-ban és Európában különböző jóváhagyási eljárás szerint zajlik. Az eljárás egyes elemeinek különbségét/egyezőségét a következő **1.táblázat** foglalja össze. Az engedélyeztetési eljárás biztosítja az új gyógyszerek minőségét és biztonságosságát az emberek, illetve állatok számára is, amelyek fontos szerepet játszanak az élelmiszerláncban. Ahogy látható, a két területen különböző hatóság felel az új gyógyszer engedélyeztetéséért, az engedélyeztetési idő is eltérő, az USA-ban 180, míg Európában 120 nap a kérelem benyújtásától a jóváhagyásig számított idő. A forgalomba hozatali engedély költsége Európában min. 143.700 EUR, az USA-ban 449.348 USD. A stabilitási és bioekvivalencia-vizsgálatokat a VICH (Veterinary International Committee on Harmonization) alapján kell elvégezni [Internet 2]. A VICH-t 1996-ban hozták létre és feladata a részt vevő hatóságok által igényelt információk harmonizálása, tagjai: Európai Unió, USA, Japán[5].

1. táblázat: Gyógyszerengedélyeztetés összehasonlítása USA és Európa között [5]

Kritérium	Amerikai Egyesült Államok (USA)	Európa
Szabályozó hatóság	Az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (USFDA)	Európai Gyógyszerügynökség (EMA)
Benyújtási forma	elektronikus	elektronikus
Idő	180 nap	120 nap
Költség	449.348 USD-től	143.700 EUR-tól
Stabilitási és bioekvivalencia vizsgálatok	VICH alapján	VICH alapján
Szabvány	GMP	GMP

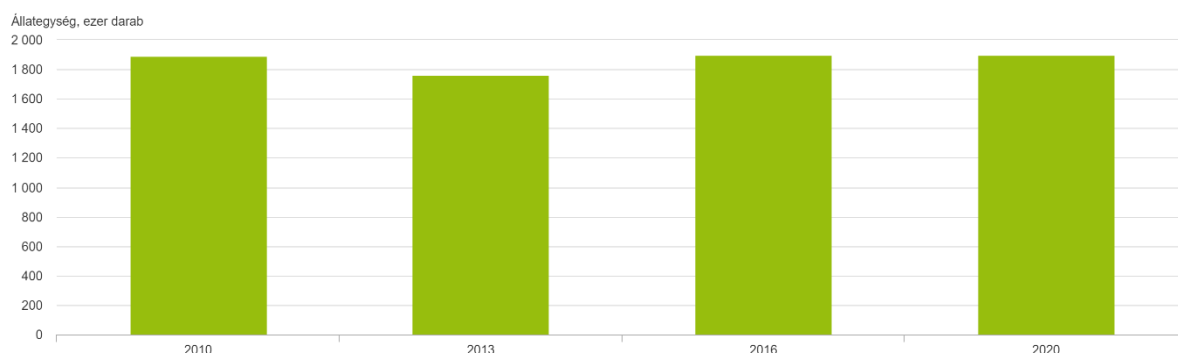
A **2.táblázat**ban néhány állatgyógyászati készítményeknél alkalmazott hatóanyagok láthatóak, amely tartalmazza az adott hatóanyag alkalmazási területét, készítmény lehetséges formáját, példákat márkanevekre, illetve, hogy az Európai Unióban milyen állatokra van engedélyezve. Továbbá a táblázat utolsó oszlopában irodalmi hivatkozások találhatók, amelyek az adott hatóanyag minősítéséhez készített módszervalidálást tartalmazza. Ezekben a hivatkozásokban szerepel a hatóanyag, illetve a hatóanyag gyártásánál képződő szennyezők elválasztásához szükséges mérési paraméterek, amellyel meghatározható a hatóanyag tartalma.

2. táblázat: Állatgyógyászatban alkalmazott hatóanyagok és jellemzői [saját munka]

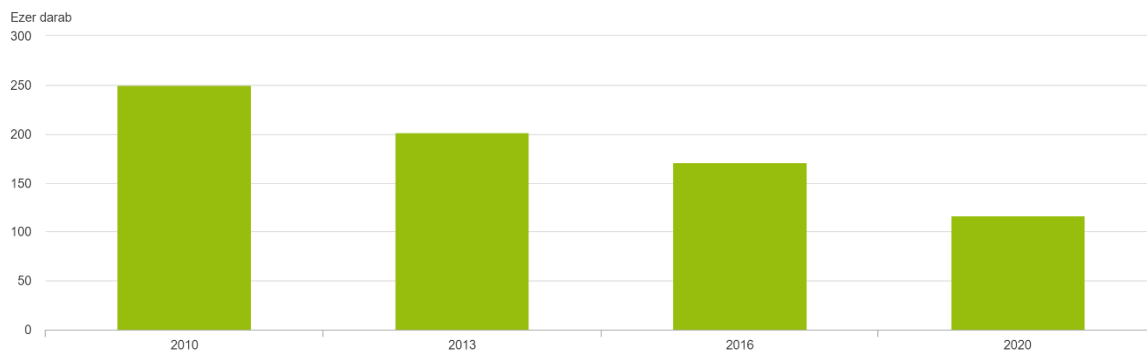
#	Hatóanyag neve	Készítmény márkaneve	Hatás/Alkalmazás	Engedélyezve (EU-ban) [Internet 3]	Készítmény forma	LC-módszervalidálás példa
1.	Ivermectin	Heartgard®, Ivomec®, Ivermectin Sheep Drench®	antiparazitikum (külső és belső) bolha, kullancs, f férgek, atka, szívféreg ellen	szarvasmarha, juh, sertés, kecske, ló, kutya, macska,	pl. tabletta, oldatos injekció, belsőleg por/paszta,	[6]–[8]
2.	Amoxicillin	Amoxi-Tabs®, Amoxi- Drop®, Novamoxin®	antibiotikum, bakteriális fertőzések kezelésére alkalmazzák	kutya, macska, szarvasmarha, sertés, baromfi, nyúl, egyéb kistestű állatok	pl. tabletta, por (ivóvízhez keverve), szuszpenziós injekció	[9]–[11]
3.	Meloxicam	Metacam® Loxicom®, OroCAM®	nem szteroid gyulladásgátlók (NSAID), fájdalomcsillapítóként és gyulladáscsökkentőként alkalmazzák	kutya, macska, ló, sertés, szarvasmarha, tengerimalac	pl. belsőleg szuszpenzió, oldatos injekció, tabletta	[12]–[14]
4.	Dexametazon	Azium®, Dexasone®, Dexameth-a-Vet®, Dex- a-vet®,	szintetikus kortikoszteroid, allergiaellenes és gyulladáscsökkentő	kutya, macska, ló(féle), kecske, madárfélék, sertés, szarvasmarha	pl. tabletta, injekció (oldat, szuszpenzió), fülcsepp,	[15]–[18]

4.2. Állattartási adatok Magyarországon

A KSH (Központi Statisztikai Hivatal) 2020. évi adatai alapján a magyarországi állatállomány 2010-2020-as év között nem változott jelentős mértékben (**2.ábra**), ezzel szemben az állattartó gazdaságok száma csaknem a felére csökkent (**3.ábra**) a fent jelzett időpontban hazánkban. Ez a tendencia (az EU-val megegyezően) folytatódott, a szarvasmarha-, a sertés-, illetve a baromfiállományban is kismértékű csökkenés figyelhető meg az utóbbi pár évben. Az állatállomány alakulására negatív hatással volt a nagymértékben megnövekedett energia-és takarmányárak és a csökkenő gabonatermelés [Internet 4,5].



2. ábra: Magyarországi állattartomány alakulása 2010-2020 között [Internet 5]



3. ábra: Magyarországi állattartó gazdaságok alakulása 2010-2020 között [Internet 5]

4.3. Analitikai módszerválidálásról általánosan

A validálás célja, hogy az alkalmazott eljárás a kitűzött céloknak megfeleljen, ehhez teljesítményjellemzők általi kritériumoknak kell megfelelni. A teljesítményjellemzők az analitikai eljárástól és technológiától, illetve a tervezett céltól függően változhatnak, ezeket a **3. táblázat** foglalja össze. A táblázat tartalmazza a mért minőségi jellemzőket és a kapcsolódó validálási vizsgálatokat [19].

A tartalom meghatározása során a gyógyszer hatóanyagtartalmát vizsgáljuk. Hatóanyagnak számít minden olyan összetevő, amely az adott betegség kezeléséhez vagy megelőzéséhez szükséges. Egy gyógyszerkészítmény több hatóanyagot is tartalmazhat [20]. A szennyezők a gyógyszerekben kritikus minőségi jellemzők, mivel potenciálisan befolyásolják a termék biztonságát és hatékonyságát. A gyógyszerkészítményekben azonosított, illetve azonosítatlan szennyezők is lehetnek, ezeknek pontos meghatározása minőség-ellenőrzés során elengedhetetlen [Internet 6].

3. táblázat: A mért minőségi jellemzők tipikus teljesítményjellemzői és a kapcsolódó validációs vizsgálatok [19]

Mért minőségi jellemzők Analitikai eljárás kapcsolódó teljesítmény-jellemzők (B)	Azonosság vizsgálat	Szennyező vizsgálat egyéb kvantitatív mérések (A)		Tartalom meghatározás egyéb kvantitatív mérések (A)
		Kvantitatív meghatározás	Limit-teszt	
Specifikusság (C) Specifikussági vizsgálat	+	+	+	+
Tartomány Eredmény (Kalibrációs modell)	-	+	-	+
Alsó határ	-	QL*	DL	-
Torzítatlanság (D) Torzítatlanság vizsgálat	-	+	-	+
Pontosság (D) Ismételhetőség vizsgálat	-	+(E)	-	+(E)
Közbenső pontosság vizsgálat	-	+	-	+

- azt jelenti, hogy ezt a vizsgálatot általában nem végzik el

+ azt jelenti, hogy ezt a vizsgálatot általában elvégzik

* egyes esetekben a DL is értékelhető, QL: mennyiségi határérték, DL: kimutatási határérték

A: ha a tartományhatár közel van a DL/QL-hez, akkor a szennyezők meghatározására egyéb mennyiségi mérések szükségesek lehetnek, hatóanyagtartalom meghatározására egyéb mennyiségi vizsgálatok szükségesek lehetnek, ha a tartomány határ nincs közel DL/QL-hez

B: egyes teljesítményjellemzők helyettesíthetők a technológiában a fizikai-kémiai tulajdonságokra vonatkozó analitikai eljárások esetében

C: specifikusság vizsgálatának hiányát egy vagy több más támogató analitikai eljárással kell kompenzálni, kivéve, ha ez megfelelően indokolt

D: alternatívaként kombinált megközelítés is alkalmazható torzítatlanság és pontosság értékelésére

E: amennyiben a reprodukálhatóságot elvégezték és a reprodukálhatósági adatsorból levezethető a közbenső pontosság, nem szükséges független vizsgálatot végezni a közbenső pontosságra vonatkozóan

A validálási vizsgálatot dokumentálni kell, a vizsgálatot megelőzően egy validálási protokollt kell készíteni, amely tartalmazza az analitikai eljárás tervezett célját, a validáláskor alkalmazott teljesítményjellemzőket és az ezekhez kapcsolódó kritériumokat. Az eredményeket a validálási riportban kell dokumentálni, amely tartalmazza a készítmény nevét, a vizsgálati módszer típusát, a teljesítményjellemzők követelményét. Ezen felül tartalmaznia kell a vizsgálatok során kapott nyers adatokat és az ezekből számolt eredményeket, amelyek szemléltetésére készített ábrákat és táblázatokat is be kell mutatni. Célszerű a követelmények alapján az eredményeket értékelni. A validálás dokumentált igazolása annak, hogy a meghatározott paraméterek szerint működő módszer torzítatlan és ismételhető eredményeket szolgáltat [19],[21].

4.4. Validálás során alkalmazott teljesítményjellemzők

Specifikusnak nevezzük azt a módszert, amely a meghatározandó komponens vagy komponensek egy csoportjára tökéletesen szelektív. A zavaró anyagok lehetnek egyéb hatóanyagok, segédanyagok vagy bomlástermékek. *Szelektivitásnál* igazolni kell, hogy a módszer alkalmas a vizsgált anyag koncentrációjának meghatározására, szelektíven, más anyagok jelenlétében. Validálás során vizsgáljuk a módszer *linearitását*, amelyben a vizsgált anyag koncentrációja egyenesen arányos a mért jellel. A linearitás tartománya: 70-130%. A meghatározott pontokra a legkisebb négyzetek elve alapján illesztjük az egyenest. A *módszerpontossággal* valamely anyag független bemérésekből kapott eredményeinek közelségét fejezzük ki. A módszerpontosság a mérési eredmények relatív tapasztalati szórásával és az átlagérték megbízhatósági intervallumával jellemezhető. A módszer pontosságát három szórás jellegű paraméterrel jellemezhetjük:

Módszer ismételhetősége: Valamely módszer ismételhetőségén értjük azt a tulajdonságát, hogy ugyanazon homogén mintát rövid időintervallumon belül azonos körülmények között

(azonos labor, azonos analitikus, azonos műszer stb.) megfelelő számú ismétléssel vizsgálva – beleértve a mintaelőkészítést is – az eredmények mennyire térnek el egymástól.

Közbenső pontosság: Valamely módszer közbenső pontosságán értjük azt a tulajdonságát, hogy ugyanazon mintát más körülmények (pl. más analitikus, más műszer, eltérő eredetű vegyszer) között, de ugyanazon laboratóriumban vizsgálva az eredmények mennyire szórnak.

Reprodukálhatóság: Valamely módszer reprodukálhatóságán értjük azt a tulajdonságát, hogy ugyanazon homogén mintát más-más laboratóriumban analizálva, az eredmények mennyire szórnak [22].

A *torzítatlanság* megmutatja, hogy a mért vagy számított érték mennyire közelíti meg a valódi vagy legalábbis elvileg lehetséges értéket. Felvilágosítást ad a módszer, illetve a rendszer szisztematikus hibáiról. A *detektálási határ* (Limit of Detection, LOD/LD) a mintában lévő analizálandó anyag azon legkisebb koncentrációja, ami még értékelhető jelet ad az adott vizsgálati körülmények között. A jel/zaj viszonyának legalább háromnak kell lennie, ennek kiszámítása az **1. egyenlet**tel lehetséges.

$$\frac{S}{N} = \frac{2H}{h} \geq 3 \quad \text{1. egyenlet}$$

Ahol:

S: a jel értéke (detektor mértékegységében kifejezve)

N: a zaj értéke (detektor mértékegységében kifejezve)

H: a komponens csúcsmagassága (detektor mértékegységében kifejezve)

h: a háttérzaj sávszélessége (detektor mértékegységében kifejezve)

A *mérési határ*, a mennyiségi meghatározás határa (Limit of Quantitation LOQ), amely a mintában a mérendő anyag legkisebb koncentrációja, ami megfelelő pontossággal és torzítatlansággal határozható meg. A jel/zaj viszonyának legalább tíznek kell lennie. A *mátrixhatás* felvilágosítást ad arról, hogy a készítményben lévő segédanyagok és adalékanyagok mennyire befolyásolják, zavarják a hatóanyag vagy szennyezőinek meghatározását. Külön méréseket nem igényel, a pontosság, a linearitás, a torzítatlanság, a

specifikusság vizsgálatok eredményeiből következtetni lehet a mátrixhatásra. A módszerben használt oldatok (minták, standardek, oldószerek, eluensek) felhasználhatósági idejének vizsgálatát *oldatstabilitási* vizsgálatnak nevezzük. A *robosztusság* vizsgálata során a kromatográfiás rendszer paramétereinek megbízhatósági tartományát vizsgáljuk a mérési paraméterek szándékos megváltoztatásával. A *tartomány* a vizsgált anyag koncentrációjának azon két szintje közötti intervallum, melyeken belül az adott anyag a validálás eredményei által dokumentált pontossággal, torzítatlansággal és linearitással kerül megállapításra. A módszer tartományát a linearitás, pontosság és torzítatlanság adatok ismeretében kell megadni [22]–[24].

4.5. HPLC-UV technika

A nagy-hatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) az analitikai kémiában alkalmazott technika, amelyet a komponensek elválasztására, azonosítására és mennyiségi meghatározásra használnak. A meghatározni kívánt komponenseket tartalmazó minta származhat élelmiszeriparból (színezékek, vegyszermaradványok vizsgálata), mezőgazdaságból (növényvédőszer-maradványok) vagy gyógyszeriparból (bomlástermékek nyomon követése) [25].

Éppen ezért, mert sokféle analitikai minta komponenseinek elválasztására alkalmazható technika, napjainkban a legáltalánosabban alkalmazott módszer mind a kutatásban, mind a rutin vizsgálatokban. Az elválasztás alapja, hogy a komponensekre két különböző erő hat. Egyrészt a mozgófázis (eluens) hajtóereje, másrészt az állófázis visszatartó ereje. Ennek a két erőnek az eredője hat a komponensekre. Azok a komponensek, amelyek kevésbé kötődnek az állófázishoz, kisebb az affinitásuk, gyorsabban, míg a nagyobb affinitású komponensek lassabban haladnak. Az eltelt idő alatt megtett út távolsága alapján, vagyis a retenciós idő alapján tudjuk elválasztani a komponenseket [20],[26].

A HPLC-s technika használata számos előnnyel jár, mint például az egyidejű elemzés, nagy felbontás, nagy érzékenység, jó ismételhetőség, kis mintaméret [27].

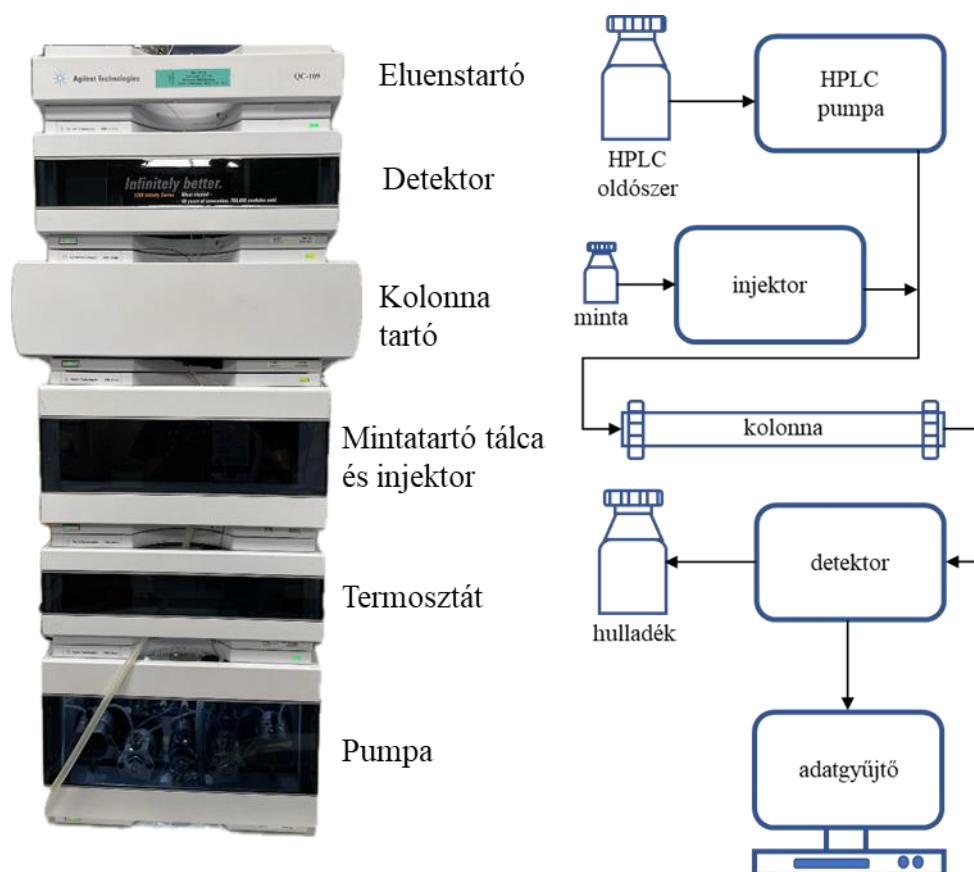
Az állófázis és mozgófázis minősége szerint csoportosíthatjuk a HPLC módszereket, például:

1. fordított fázisú kromatográfia (RP-Reverse Phase), ezt alkalmazzák a leggyakrabban. Ez esetben az állófázis apolárisabb, mint a mozgófázis.
2. normál fázisú kromatográfia esetén (NP-Normal Phase), az állófázis poláris és a mozgófázis apoláris.

Nem csak adszorpción alapuló elválasztás lehetséges. Az elválasztás alapulhat például a molekulák közötti egyéb fizikai-kémiai különbségeken, mint például a méret.

3. Méretkizárásos kromatográfia (SEC-Size Exclusion Chromatography), ennél a módszernél az állófázis nagy pórusátmérővel rendelkező töltet, a mozgófázis víz vagy szerves oldószer is lehet.

Beszélhetünk még ionkromatográfiáról (IC-Ion Chromatography), ezen belül ionpár kromatográfiát, ioncserés kromatográfiát és ionkizárásos kromatográfiát különböztetünk meg [Internet 7],[27].



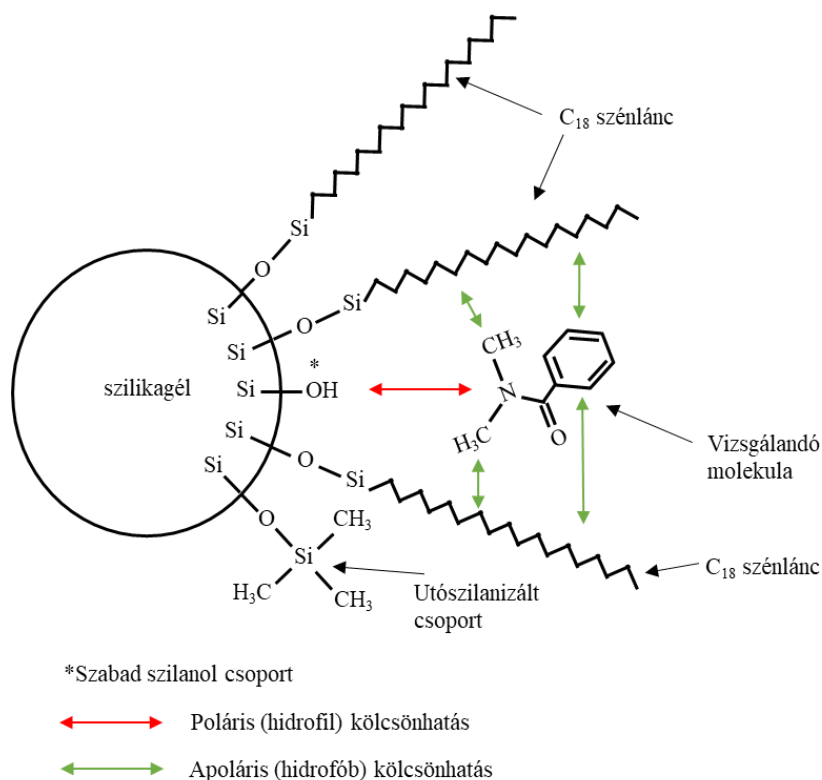
4. ábra: HPLC készülék főbb részei és működésének sematikus ábrázolása [saját munka]

A modern HPLC készülék nagy nyomást alkalmaz (max. 400 bar; UHPLC esetén akár 1500 bar), hogy az analitot a mozgó fázissal együtt egy zárt, mikroszemcsékkel töltött oszlopon keresztül áramoltassa (állófázis). A berendezés a következő főbb egységekből áll: oldószeradagoló rendszer (pumpa), injektor, amely a mintát az oszlopra juttatja, valamint a rendszert összekötő csövek és szerelvények. Az oszlopon történő elválasztás/tisztítás után a

detektor és az adatgyűjtés következik. A **4. ábra** egy általános nagy-teljesítményű kromatográfiás rendszer sematikus ábráját mutatja [28]. Az eluensek többnyire a készülék tetején helyezkednek el. A gázmentesítő segítségével a mozgó fázisban lévő oldott levegő buborékok eltávoznak a rendszerből, így megy tovább az eluens a nagynyomású szivattyúba. Fontos, hogy az áramlás folytonos és pulzálás-mentes legyen. A mintatartó tér általában termosztálható, ez főleg a bomlástermékek kialakulása és az oldatstabilitás miatt fontos. A minták a mintatartó tálcában megjelölt, számozott helyen helyezkednek el, amelyet a mérés indítása előtt a szekvenciában beírunk, így biztosítva, hogy a megfelelő helyről és a megfelelő mintából történjen az injektálás. HPLC készülék esetén 5-200 μl , UHPLC készüléknél pedig 0.1-5 μl a jellemzően injektált térfogat. Injektálás után a minta a kolonnára kerül. A kolonna egyenletes termosztálása a magas nyomás miatt fontos, illetve bizonyos mértékig a hőmérséklet emelésével csökkenthető az analízis ideje. A kolonnán a minta komponensei szétválnak és így különböző időben érkeznek a detektorba, amely egy számítógépes szoftver segítségével jellé alakítva kiértékelhető [29].

4.6. Kolonna típusok

A HPLC mérések során leggyakrabban fordított fázisú kromatográfiát alkalmaznak, ezekben az esetekben a szilikagél alapú állófázisok a jellemzőek. A RP-HPLC technikáknál az állófázis apolárosabb, mint a mozgófázis, ezért a szilikagél felületét módosítják, amivel mechanikailag stabilabb, jó pórusszerkezetű, energetikailag homogén és kis szemcseátmérő-eloszlású kolonnákat készítenek. A módosítás során általában alkil-csoportokat visznek fel a szilikagél felületére, amelyek közül a leggyakoribbak a C_{18} -as kolonnák (**5.ábra**) [29],[30].



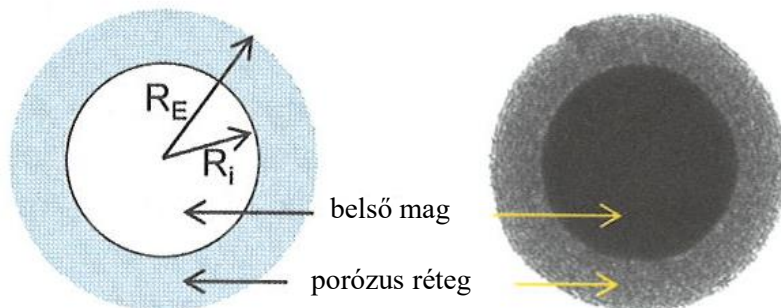
5. ábra: C₁₈-as kolonna felépítése és az elválasztás során fellépő kölcsönhatások [saját munka]

A szilikagél előnye, hogy széles nyomás- és hőmérséklettartományban használható, viszont érzékeny a pH-ra, általában pH=2-7 közötti tartományban használható megfelelően. Erősen savas, illetve lúgos közeg az állófázis hidrolízisét okozza [31],[32].

A héjszerkezetű töltetek az utóbbi években terjedtek el, ezzel a szerkezettel csökkenthető a zónaszélesedés, amelyet többek között az örvény-és hosszirányú diffúzió okoz. Ha a kolonna töltése inhomogén, illetve a szemcseátmérő nem teljesen egyforma, akkor eltérő áramlási hosszak alakulhatnak ki, így a mintában lévő molekulák tartózkodási ideje eltérő lehet a mozgó fázisban, ami örvénydiffúziót (eddy) okoz. A mintamolekulák saját diffúziójuk révén oda-vissza irányú mozgásra képesek az elválasztás során, amely hosszirányú (longitudinal) diffúziót okoz. Ez a tényező általában nem jelent problémát, mivel csak akkor jelentkezik, ha a kromatográfiás elválasztás túl lassú [33],[34].

A héjszerkezetű töltetek jó örvény- és hosszdiffúziós tulajdonságokkal rendelkeznek a fent említett jellemzők miatt. Emellett jobb a szemcseméret eloszlása ezeknek a típusú kolonnáknak, mint a teljesen porózus kolonnáknak. Ahogy az a **6.ábrán** is látható, egy

héjszerkezetű töltet egyesíti a porózus, illetve a nem-porózus töltet kedvező tulajdonságait, mivel a belső mag körül porózus réteg helyezkedik el [29].



6. ábra: Héjszerkezetű kolonna (R_i : belső mag sugara, R_E : szemcse sugara) [29]

A Lambert-Beer törvény (**2. egyenlet**) alapján az elnyelt fény intenzitásából, kalibrációs egyenes segítségével számolható a mért minta koncentrációja. A kalibrációs egyenes a vizsgálandó minta koncentrációját és a beeső fény és áthaladó fény intenzitásának hányadosát tartalmazza. A koncentrációt az eluálódó csúcs alatti területből kapjuk. A Lambert-Beer törvénnyel a detektálás alapján mennyiségi meghatározás lehetséges [29].

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon * l * c \quad \text{2. egyenlet}$$

Ahol:

A: abszorbancia

I_0 : bemenő fény intenzitása

I: a vizsgált közegen áthaladt fény intenzitása

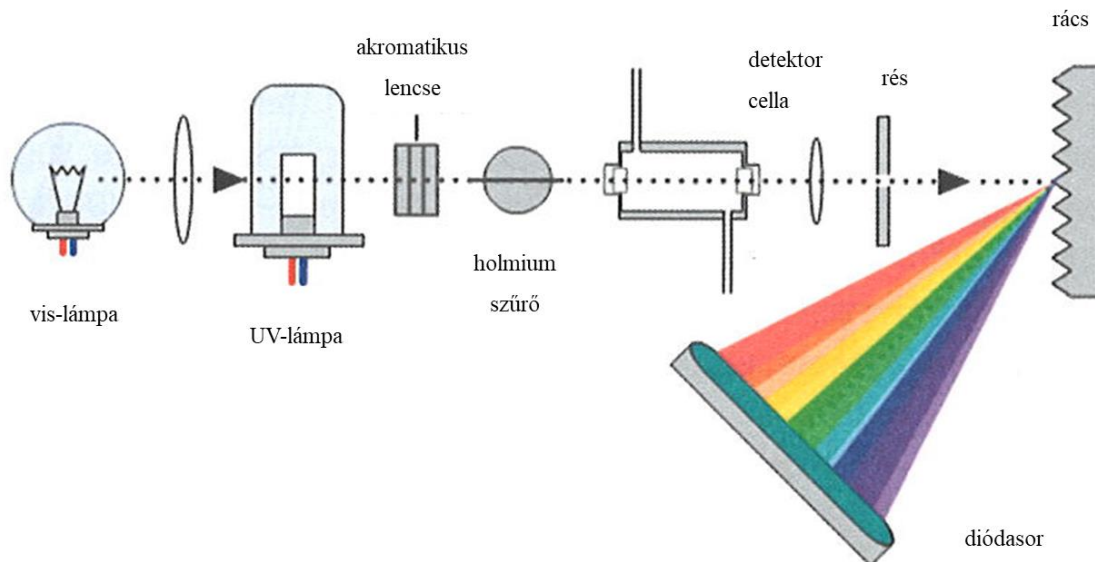
ε : az elnyelő közeg moláris abszorpciós együtthatója

l: fényút hossza [cm]

c: koncentráció [mol/dm³]

Az UV-Vis (Ultraviolet–Visible Spectroscopy) detektorokra nagy érzékenység, széles lineáris tartomány és kis cellatérfogat jellemző. Egyszerűen kezelhetők, gradiens módszerrel is használhatóak és megbízhatóak. Kedvező tulajdonságuk, hogy a hullámhosszuk változtatható (190-800 nm), illetve bizonyos típusaik egyszerre több hullámhosszon mért adatokat is tudnak

rögzíteni. A rögzített hullámhosszágú detektorok manapság már nem jellemzőek, a többcsatornás és a diódasoros detektorok (7.ábra) kerültek előtérbe [29],[35].



7. ábra: Diódasoros detektor sematikus ábrája [35]

A többcsatornás detektorok egy időben, több hullámhosszon, több kromatogramot tudnak rögzíteni. Egy részük csúcestisztaság vizsgálatra is alkalmas. Maximum nyolc hullámhosszon lehet egy időben mérni. A diódasoros detektor alatt azokat a többcsatornás detektorokat értjük, amelyek az adott beállítási paraméterek mellett idő, intenzitás, hullámhossz adategyütteseket gyűjtenek. Az adatfeldolgozást a szoftver végzi. Itt akár mérés után is ki lehet választani, hogy milyen hullámhosszúságon értékeljük ki az adott mintákat, mivel teljes spektrumot rögzít a detektor [29],[35].

4.7. Minőség a gyógyszeriparban

A gyógyszeriparban a minőség jelentőségének tudatosítása egyre növekszik. Ezt a tudatosságot az is bizonyítja, hogy számos definíció határozza meg, milyennek kell lennie a termék minőségének. Ahogy az élelmiszeriparban, úgy a gyógyszeriparban is a minőség célja a fogyasztók védelmének és biztonságának biztosítása. Ezt az is mutatja, hogy a gyógyszerek gyártása vagy behozatala engedélyekhez kötött. Gyártás során kötelező betartani a helyes gyártási gyakorlat (GMP) elveit, illetve iránymutatásait. Ennek célja, hogy segítse a különböző ágazatokban lévő vállalkozásoknak a biztonságos termék előállításához szükséges előírások megfelelését [32]. A GMP előírásrendszere tartalmazza a szükséges eljárásokat,

berendezéseket, ezek üzemi elhelyezését és meghatározza a szükséges laboratóriumi vizsgálatokat. Ezekkel biztosítva a megfelelő termékminőséget, az irányelvek tartalmazzák az ezekhez szükséges szakmai, technológiai, műszaki és szervezési, gyakorlati követelményeket [36]. Az állatgyógyszerek esetében a vonatkozó jogi követelményeket a 91/412/EGK irányelve dokumentumban foglalják össze, amely kitér a GMP gyártás során alkalmazott általános rendelkezésekre, a minőségirányításra, a dokumentációra stb. [37],[38].

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Felhasznált anyagok és eszközök

A méréseim során a munkahelyemen lévő készülékeket, eszközöket és vegyszereket használtam. A minták és vegyi anyagok pontos kiméréséhez Mettler Toledo analitikai mérlegeket használtam, attól függően, hogy mekkora mérési tartományban kellett bemérnem. A mérlegeket, minden reggel be kell kalibrálni, így biztosítjuk, hogy az egész napos mérésünk megfelelő legyen. Minden mérleg egy LabX nevű szoftverrel van összekapcsolva, tehát a bemérések nem csak a kinyomtatott riporton, hanem online módon is elérhetőek. A pontos előkészítéshez szükségem volt még „A” pontosságú lombikokra és pipettákra. A puffer esetén fontos a pH beállítása, ezt egy Mettler Toledo márkájú pH mérő készülék segítségével végeztem el. A standard és mintaoldatok előkészítéséhez szükségem volt még ultrahang generátoros fürdőre, (Brandson márkájú), Vortexre, mágneses keverőre, Hamilton fecskendőre, 0,2 µm nylon membrán és 0,2 µm nylon fecskendőszűrőre. Az elkészült mintákat HPLC készülékhez használható mintatartó üvegcsekbe szűrtem. A minta hatóanyag tartalmának meghatározásához Agilent 1290 Infinity és Agilent 1290 Infinity II UHPLC készüléket használtam diódasoros UV detektorral, a mérésem során a legfontosabb különbség, hogy az egyik biner, míg a másik kvaterner pumpával felszerelt készülék. Az elválasztáshoz Waters és Kinetex gyártású kromatográfiás oszlopot használtam, melyek C₁₈-as, 50 mm x 3,0 mm és 1,7 µm paraméterű kolonnák.

Munkám során felhasználtam még acetonitrilt és metanolt, mindkettő HPLC gradiens tisztaságú és Merck típusúak. Emellett szükségem volt még MilliQ vízre, ezt a laborban állítjuk elő egy Merck márkájú készülék segítségével. További felhasznált vegyszerek még a vízmentes kálium-dihidrogén-foszfát és foszforsav, mindkettő analitikai minőségű (Molar). A módszerválidálás során szükségem volt az UXYZ kódú munkastandardre, ezt az UXYZ kódú alapanyagból állítjuk be gyártói standard segítségével és ezt egy évig használhatjuk fel. A validálás során használt munkastandard tisztasága 100%-os, belső azonosítója L06929. A rendszeralkalmasság ellenőrzésére még gyártói UXYZ kódú hatóanyagra is szükségem volt, ez az úgynevezett referencia standard. Különböző validálási minőségi paramétereknél a placebo is kellett vizsgálnom, ez a hatóanyagon kívül minden segédanyagot (például: Macrogol 6000, Sztearoil-makrogliceridek és májaroma) tartalmaz, ami a kész tablettában is van. Ennek az

összetétel aránya ismert, viszont a kutatás-fejlesztés adta át nekem a validálás során a megfelelő összetételben.

Felhasznált anyagom a már sokszor megemlített UXYZ kódú hatóanyag, melynek összegképlete: $C_{19}H_{18}N_4O_2$. A molekula több részből áll, tartalmaz benzimidazol-, benzil-, továbbá egy dihidro-piridazin-gyűrűt, ezért is alkalmas UV detektálásra. Titkosítási okokból a pontos szerkezetet a dolgozatomban nem ismertethetem. Ezt a hatóanyagot szívbetegség esetén alkalmazzák kutyáknál és tablettá formában van forgalomban. Validálás során ennek a tablettának a közti termékét vizsgáltam, amely amorf szilárd diszperzió.

5.2. Eluensek, standard- és mintaoldatok előkészítése

Mérésem során különböző oldatokat használtam fel. 0,022 M-os foszfát puffert készítettem, a későbbiekben ezt nevezem Eluens-A-nak. Az Eluens-A elkészítéséhez 3,0 g vízmentes kálium-dihidrogén-foszfátot kimértem analitikai mérlegen és feloldottam kb. 950 ml MilliQ vízben. A puffer pH-ját 85%-os foszforsavval $2,5 \pm 0,05$ értékre állítottam, majd 1000 ml-es mérőlombikba átmostam. MilliQ vízzel jelre állítottam és homogenizáltam. A puffert leszűrtem 0,2 μ m nylon membránszűrőn. Eluens-B-ként gáztalanított acetonnitrilt használtam. A standard- és mintaoldatok előkészítéséhez is metanolt használtam, mint oldószer. A standard oldat elkészítéséhez 10 mg UXYZ kódú munkastandardet bemértem egy 100 ml-es mérőlombikba. A bemért mennyiség jele: W_{SA-1} . A mérőlombikot kb. félig töltöttem oldószerrel, majd 10 percig ultrahang generátoros fürdő segítségével oldottam. Visszahűtöttem szobahőmérsékletre és oldószerrel jelre állítottam. Ennek a 0,1 mg/ml koncentrációjú oldatnak a jele SA-1. Mivel a rendszeralkalmasság ellenőrzéséhez szükség van egy ellenőrző standard oldatra is, ezért a folyamatot a beméréstől, melynek jele W_{SA-2} , előlről kezdtem, ennek az oldatnak a neve már SA-2. A placebo oldatot ugyanúgy készítettem el, mint a standard oldatot, csak a placebo porkeverékből készítettem a bemérést, melynek jele $W_{placebo}$, az oldat neve pedig placebo. A mintaoldat elkészítéséhez egy 100 ml-es mérőlombikba 100 mg UXYZ kódú hatóanyagú por mintát mértem be analitikai pontossággal. A bemért mennyiség: W_{T-1} . A mérőlombikot kb. $\frac{3}{4}$ részig töltöttem oldószerrel, a mintát 15 percig oldottam ultrahang generátoros fürdő segítségével, majd visszahűtöttem szobahőmérsékletre. Oldószerrel jelre állítottam és homogenizáltam. Az oldat egy részét 10 ml-es fecskendőszűrőbe töltöttem, amelynek a végére előzőleg 0,2 μ m nylon fecskendőszűrőt helyeztem. Az oldatból az első 4-5 ml-t eldobtam, majd átlátszó mintatartó üvegcsébe szűrtem, amit csavaros, vágott kupakkal zártam. A minta oldat

jele A-sarzs szám-1. Mivel a hatóanyag tartalmat két párhuzamos minta oldat átlagából számolom ki, ezért a beméréstől kezdve, mely mennyisége jele W_{T-2} , megismételtem a folyamatot, az így elkészített mintám jele A-sarzs szám-2.

5.3. Műszeres analitikai mérés technika leírása

Az elkészült mintákat a már említett UHPLC készüléken mértem le a már említett kolonnán. A hatóanyag tartalom méréséhez használt módszer minden validálási minőségjellemző mérésekor ugyanaz volt. Az UHPLC mérés során izokratikus elúciót alkalmaztam, a futási idő alatt ugyanolyan arányban használtam az Eluens-A és Eluens-B oldatokat. A kolonnátér hőmérséklete 45°C -ra, a mintatér hőmérsékletét 20°C -ra és az áramlási sebességet $0,4\text{ ml/perc}$ -re állítottam be. Az injektált térfogat $1,0\text{ }\mu\text{l}$, a futási idő 6 perc. Két egymást követő minta injektálása közben a módszerbe egy tūmosást is beletettem, ez azért fontos, hogy a hatóanyag tartalom vagy bármilyen szennyeződés ne mosódjon át egyik mintából a másikba. Ehhez metanol: MilliQ víz elegyét használtam, fele-fele arányban. A detektálási hullámhosszt 290 nm -re állítottam. Ezeknek az adatoknak az alapja a Ph.Eur. UXYZ kódú hatóanyagra vonatkozó leiratából származik, a leirattól való eltérést a kutatás-fejlesztés csoport munkatársai végezték. A kromatográfiás rendszer adatait a **4. táblázat**ban foglaltam össze.

4. táblázat: Kromatográfias módszer adatai UXYZ kódú hatóanyag meghatározásához

Készülék	UHPLC-UV detektor
Eluens	izokratikus elúció 75 V/V% Eluens-A, 25 V/V% Eluens-B
Kolonna	Waters Acquity UPLC® BEH C ₁₈ 50 mm x 3,0 mm, 1,7 µm (Part No.: 186004660) Phenomenex Kinetex 1,7 µm, C ₁₈ , 100A, 50 mm x 3,0 mm (Part No.: 00B-4475-Y0)
Kolonnatér hőmérséklete	45°C
Detektálás	UV, 290 nm
Detektálási tartomány	220-350 nm
Áramlási sebesség	0,4 ml/perc
Injektált térfogat	1,0 µl
Futási idő	6,0 perc
Tümosó	80% metanol: 20% MilliQ víz 50 másodperc
Minta bemosási faktor	10-szeres injektálási térfogat
Mintatér hőmérséklete	20°C

Mivel GMP körülmények között végeztem a méréseimet, ezért nekem mindig előre meg kellett írnom a szekvenciát. A szekvencia elnevezése általánosan: QC-készülék azonosítószáma-ÉÉHHNN¹-mérés sorszáma.indítás száma (pl: QC-109-240422-1.001). Ezeket kijelölt mappába mentettem és a mérés indítása előtt egy analitikus kollegámmal ellenőriztettem. Munkám során az Agilent OpenLab szoftvert használtam, amelynek a sematikus szekvencia felépítését a **5. táblázat**ban foglaltam össze.

¹ ÉÉHHNN: évszám utolsó két betűje, hónap, nap

5. táblázat: Szekvencia sematikus felépítése

Mintatartó üvegse száma	Minta neve	Injektálások száma	Minta tömege [mg]	Szorzófaktorok		Osztófaktorok
				Hígítási faktor	Százalék*	Standard tisztaság
1.	Oldószer	1	1	1	1	1
2.	Eluens-B	1	1	1	1	1
3.	Eluens-A	1	1	1	1	1
4. ^a	SA-1	5	W_{SA-1}	100	1	P/100
5.	SA-2	1	W_{SA-2}	100	100	P/100
6.	A-sarzs szám-1	1	W_{T1}	100	100	1
7.	A-sarzs szám-2	1	W_{T2}	100	100	1

^a A továbbiakban maximum minden 20. analitikai minta, illetve minden 8 óra után, valamint a szekvencia végén kalibráló-ellenőrző oldatot mértem

P – standard hatóanyagtartalom értéke

* Erre a szorzófaktorra azért van szükség, hogy a végeredményt százalékos értékben kapjam meg

Az **5. táblázat**ból látható, hogy fontos megadni a minta nevét, ezeket a mintatartó üvegcsére is ráírtam, emellett az is nagyon fontos, hogy az üvegse a mintatartó tálca melyik pozíciójában található meg. Az első standard oldatból ötször injektáltam, a szoftvernek meg kell adni, hogy erre az öt párhuzamosra kalibráljon, ehhez a koncentrációt külön beírtam, és erre néztem a rendszeralkalmasságot. Be kellett még írnom a standard és mintaoldatok tömegét, hígítási faktorát és mivel százalékos formában szerettem volna megkapni a végső eredményt ezért beírtam egy 100-as szorzófaktort is. Az osztófaktorokhoz azokat az értékeket írtam be, amivel a szoftvernek számolás során osztania kellett az értéket, ilyen például a standard tisztasága vagy az elméleti tabletta tömege. A szekvencia írásakor még fontos, hogy a megfelelő módszert hivatkozzuk be.

A szekvencia szerint a mérés során injektáltam az oldószert és azonosítottam az oldószer csúcsait. Injektáltam az Eluens-B-t és azonosítottam az acetonitril csúcsait. Vizsgáltam még az Eluens-A-t is és azonosítottam a puffer csúcsait. Fontos, hogy a vizsgálandó komponens helyén ne legyen sem az oldószerből, sem az acetonitrilből, sem a pufferből származó zavaró csúcs. Ezután injektáltam az SA-1 oldatot és ellenőriztem a rendszeralkalmassági követelményeket, ezeket az értékeket szintén a Ph.Eur. alapján a **6. táblázat**ban foglaltam össze. Az SA-1 oldatot egymás után ötször mértem, kiszámoltam a csúcsterületek relatív szórását és ellenőriztem a rendszerpontosságot, RSD_{SA-1} . Injektáltam az SA-2 oldatot egyszer és ellenőriztem a kalibráció pontosságát. Majd vizsgáltam a mintaoldatokat is.

6. táblázat: Rendszeralkalmassági követelmény UXYZ kódú hatóanyagra nézve

Retenció idő SA-1	0,8-2,0 perc
Tányérszám SA-1	≥ 800
Tailing faktor SA-1	0,8 – 1,8
RSD_{SA-1}	$< 1,0\%$
Delta	$< 5,0\%$
Korreláció SA-1 és SA-2	$< 2,0\%$

Ezeket a követelményeket (**6.táblázat**) a szoftverbe előre beírtam, így a riporton kaptam visszajelzést, hogy a rendszeralkalmasság megfelelt vagy nem felelt meg. A követelmények közé tartozik a retenció idő, ami szerint 0,8 és 2,0 perc közé kell esnie az UXYZ kódú hatóanyagú csúcshoz, a csúcs tailing faktora (aszimmetriája) 0,8 és 1,8 között kell lennie, az elméleti tányérszámnak pedig nagyobbnak vagy egyenlőnek kell lennie 800-zal. A relatív szórásnak 1,0%-nál, míg a korrelációnak 2,0%-nál kell kisebb értéket adnia. A delta értéke pedig nem lehet nagyobb mint 5,0%. Ezeket az értékeket a következőképpen kell kiszámolni.

A relatív szórást Excel segítségével számoltam ki, ahol az SA-1 öt párhuzamos injektálás csúcsterületeinek szórását osztottam az SA-1 öt párhuzamos csúcsterületének átlagával, majd szoroztam százzal, lásd **3. egyenlet**.

$$RSD [\%] = \frac{\text{Szórás } (A_{SA-1,1}, A_{SA-1,2}, A_{SA-1,3}, A_{SA-1,4}, A_{SA-1,5})}{\text{Átlag } (A_{SA-1,1}, A_{SA-1,2}, A_{SA-1,3}, A_{SA-1,4}, A_{SA-1,5})} * 100 \quad \text{3. egyenlet}$$

Ahol:

$A_{SA-1,x}$: az SA-1 oldat párhuzamosainak csúcsterülete

A relatív szórás kiszámolásával ellenőriztem a rendszerpontosságot, mivel itt ugyanabból a mintatartó üvegcséből injektál a készülék ötször, így a géphibát ezzel tudtam kiszűrni.

Az SA-1 és SA-2 oldatok csúcsterületének összehasonlításával ellenőriztem a kalibráció pontosságát, hiszen egy másik bemérésű, de ugyanolyan hígítású standard oldatnak az SA-1 oldat mérési pontjaira kellett esnie, maximum 2,0%-os eltéréssel, az SA-2 oldatnak is. Ehhez először a normalizált területeket kellett kiszámolnom (**4. egyenlet**).

$$Normalizált\ terület = \frac{A_{SA}}{W_{SA}} \quad \text{4. egyenlet}$$

Ahol:

A_{SA} : referencia oldat csúcsterülete [mAU]

W_{SA} : bemért standard tömege [mg]

Majd a kapott értékekből tudtam kiszámolni a korrelációt az **5. egyenlet** segítségével.

$$Korreláció\ [\%] = \left(\frac{NT_{SA-2} - NT_{SA-1}}{NT_{SA-1}} \right) * 100 \quad \text{5. egyenlet}$$

Ahol:

NT_{SA-1} : SA-1 oldatra számolt normalizált terület

NT_{SA-2} : SA-2 oldatra számolt normalizált terület

A delta értéket (**6. egyenlet**) egy sarzs mintájából készült két párhuzamos oldatára számoltam. Ezzel főleg a mintaelőkészítési hibát tudtam kiszűrni.

$$Delta\ [\%] = abs(Asarzs\ szám1 - Asarzs\ szám2) * 100 \quad \text{6. egyenlet}$$

Ahol:

A sarzs\ szám1: %-ban kifejtett hatóanyagtartalom az 1. párhuzamos mérésnek

A sarzs\ szám2: %-ban kifejtett hatóanyagtartalom az 2. párhuzamos mérésnek

A delta kiszámolásához szükség volt még a hatóanyagtartalom kiszámolásához is, amelyet a **7. egyenlet** segítségével tudtam meghatározni, hogy az adott mintában hány százalék az UXYZ kódú hatóanyag.

$$Tartalom [\%] = \frac{A_T * D_T * W_S * \frac{P}{100}}{A_S * D_S * W_T} * 100 \quad \text{7. egyenlet}$$

Ahol:

A_T : Minta oldatban a hatóanyag csúcsterülete [mAU]

A_S : Referencia oldat (SA-1) csúcsterületeinek átlaga [mAU]

W_T : Bemért minta tömege [mg]

W_S : Bemért standard tömege [mg]

D_T : Minta oldat hígítási faktor

D_S : Referencia oldat hígítási faktor

P : Standard tisztasága [%]

Ezen értékek kiszámolását a szoftver maga is elvégzi, de ellenőrzésképpen egy Excelbe táblába is beírtam.

5.4. A módszer validálása

Mivel a rendszeralkalmassági követelmények teljesültek, elkezdtem a validáláshoz szükséges minőségi jellemzőket meghatározni. Ebben segítségemre volt a LAV-MEL-062, ami a cégen belül egy jóváhagyott, a HPLC-s analitikai vizsgálatok validálásáról szóló szabványműveleti előírás, amiben össze vannak foglalva, hogy mely paraméterek segítségével kell egy módszert validálni.

A *szelektivitás és specifikusság* vizsgálat célja annak bizonyítása, hogy az UXYZ kódú hatóanyag elválasztható az ismert szennyezőktől. A szelektivitás bizonyításához szükséges volt vizsgálni az oldószert és az ismert szennyezőket tartalmazó mintaoldatokat. A módszer specifikusságát különböző bontási kísérleteken keresztül bizonyítottam. Az UXYZ kódú hatóanyagot a következő stressz körülményeknek vetettem alá: hő, fény, savas hidrolízis, lúgos hidrolízis és oxidáció (hidrogén-peroxid). A specifikusságot olyan bomlásokon keresztül

igazoltam, ahol a bomlás legfeljebb 20%. A vizsgálat során keletkezett oldatokat UV detektoros UHPLC készüléken vizsgáltam a hatanyagtartalom meghatározásának módszerével és bizonyítottam az UXYZ kódú hatóanyag csúcstisztaságát. A specifikusság vizsgálatot standarden, placebon és UXYZ kódú hatóanyagot tartalmazó mintán vizsgáltam. Mielőtt a stressz kezeléseket elkezdtem volna az eredeti mintából is szűrtem mintatartó üvegcsébe, hogy a kezelt mintákat össze tudjam majd hasonlítani az eredetivel. Elkészítettem a 2%-os NaOH oldatot, 2 g NaOH-t analitikai mérlegen kimértem és MilliQ vízzel 1000 ml-re kiegészítettem. A 2%-os HCl oldathoz 6 ml cc. HCl-t 100 ml-re hígítottam MilliQ vízzel. Majd elkészítettem a 2%-os H₂O₂ oldatot, amely során 3 ml cc. H₂O₂-t 100 ml-re hígítottam MilliQ vízzel. Ezekből a 2%-os oldatokból a standardre, a placebora és a mintára is 2-2 ml-t pipettáztam. Hővel való kezeléshez a vizsgálni kívánt oldatokat 70°C-os vízfürdőbe helyeztem, a fénnel való stresszeléshez a mintaoldatokat elől hagytam a munkaasztalon. Így összesen az eredeti három mintából 15 kezelés alatt álló minta lett. Stressz körülmények között három órát hagytam állni a standard-, placebo- és mintaoldataimat.

A mérés során követelményeknek kellett megfelelni, miszerint a szennyező csúcsok váljanak el az UXYZ kódú hatóanyag csúcsától, a bomlásvizsgálatok során az UXYZ kódú hatóanyag csúcs tiszta maradjon. Továbbá a csúcstisztaságnak nagyobb vagy egyenlőnek kellett lennie, mint 0,95 és a stressz körülményeknek alávetett mintáknak 95% vagy annál nagyobb mértékben kellett, hogy azonosak legyenek az UXYZ kódú hatóanyag nem stresszkezelt mintájának spektrumával. A csúcstisztaságot az Agilent OpenLab szoftver segítségével vizsgáltam. A szoftver a hatóanyagcsúcs és az esetleges szennyezők területének arányából számolja azt. Az eredményt nullától egyig adja meg a szoftver, ahol egy a tiszta csúcsot jelzi.

A következő minőségjellemző, amit vizsgáltam az a *linearitás* volt. A vizsgálat célja, hogy bizonyítsam, a mintaoldat koncentráció 70-130%-os tartományban az UYXZ hatóanyag koncentráció lineárisan változik a mért csúcsterülettel. A mérési koncentráció 70-130%-os tartományában öt különböző összehasonlítható oldatot készítettem két különböző törzsoldatból való hígítással. Az oldatokat a hatanyagtartalom módszer leírásában megadott körülmények között mértem, minden oldatból egy-egy injektálást végeztem. Ábrázoltam a mért csúcsterület értékeit a koncentráció függvényében, kiszámoltam az egyenes egyenletét, a korrelációs koefficiens négyzetes értékét (R^2), a tengelymetszetet és megadtam a tengelymetszet és a

100%-os koncentrációhoz tartozó csúcsterület-értékek hányadosának százszoros értékét (Z érték), lásd **8. egyenlet**.

$$Z = \frac{100 * a}{b} \quad \text{8. egyenlet}$$

Ahol:

a: y tengelymetszet

b: csúcsterület a 100%-os koncentrációhoz

A linearitáshoz szükséges 1. törzsoldat minta előkészítéséhez egy 100 ml-es mérőlombikba kimértem 20 mg UXYZ kódú munkastandardot, oldószerben oldottam, jelre töltöttem és homogenizáltam. Következő lépésben elkészítettem a 2. törzsoldatot, amihez egy 100 ml-es mérőlombikba 40 mg UXYZ kódú munkastandardot bemértem, oldószerben oldottam, jelre töltöttem és homogenizáltam.

A két oldatból hígítási sorozatot készítettem, ahol a hígítást oldószerrel végeztem. Az öttagú linearitási soromat LA1-től LA5-nek neveztem el. Az 1. törzsoldatból 3,5 ml oldatot pipettáztam ki egy 10 ml-es mérőlombikba, majd jelig töltöttem. Így kaptam LA1 mintaoldatra 0,07 mg/ml-es koncentrációt. Ugyanebből a törzsoldatból készítettem az LA3 és LA5 oldatokat, míg a 2. törzsoldatból készítettem az LA2 és LA4 oldatokat. A **7. táblázat**ban foglaltam össze a linearitáshoz készített hígítási sor elkészítését, ahol látható, hogy melyik törzsoldatból készítettem el a hígításokat. A táblázatban látható, hogy minden esetben 10 ml-es mérőlombikot használtam (végtérfogat), továbbá a táblázat tartalmazza mintaoldatok végső koncentrációját.

7. táblázat: Linearitás vizsgálathoz készített hígítási sor

Minta neve	Célkoncentráció [%]	Törzsoldat koncentráció [mg/ml]	Törzsoldat térfogata [ml]	Végtérfogat [ml]	Végső koncentráció [mg/ml]
LA1	70	0,20	3,5	10	0,07
LA2	80	0,40	2,0	10	0,08
LA3	100	0,20	5,0	10	0,10
LA4	120	0,40	3,0	10	0,12
LA5	130	0,20	6,5	10	0,13

A linearitás teljesüléséhez követelmény, hogy a pontokra illesztett egyenes korrelációs együtthatójának négyzete (R^2) nem lehet kisebb, mint 0,998. A Z értéke (csúcsterület-értékek hányadosának százszoros értéke) legfeljebb 3,0% legyen. A normalizált területek százalékban kifejezett relatív szórása legfeljebb 2,0% legyen.

A *pontosság* is a validáláshoz szükséges minőségjellemző. Ennek a vizsgálatnak a célja, hogy bebizonyítsa, a módszer ismételhetősége ugyanabból a mintából, ugyanabban a laborban, ugyanazon a készüléken megfelelő. Ehhez a méréshez hat párhuzamos mintaelőkészítést végeztem a módszerben megadottak szerint (lásd mintaoldat előkészítése). Minden oldatot egyszer mértem, majd vizsgáltam a mért hatóanyag tartalmának relatív szórását. Követelmény, hogy a mért hatóanyag tartalmak relatív szórása nem lehet nagyobb, mint 2,0%.

A pontossághoz szorosan kapcsolódik a *közbenső pontosság*, mely vizsgálat célja annak bizonyítása, hogy a módszer ismételhetősége ugyanabból a mintából, egy másik készüléken, másik analitikus által és másik napon vizsgálva is megfelelő. A módszer ismételhetőségénél leírt mintát vizsgáljuk, de a közbenső pontosságnál másik analitikus, másik készüléken, másik napon végzi a módszer ismételhetőségénél leírt méréseket az eluens a standard és a mintaoldat előkészítésével együtt. A két méréssorozat átlagértékeinek relatív eltérését vizsgáltam, melyet az **9. egyenlet**tel számoltam ki:

$$\text{Relatív eltérés [\%]} = \left| \frac{T_2 - T_1}{T_2} \right| * 100 \quad \text{9. egyenlet}$$

Ahol:

T_2 : hatóanyag tartalom átlaga a vizsgált időpontban [mg/100mg]

T_1 : hatóanyag tartalom a kezdeti időpontban [mg/100mg]

Követelmény ennél a minőségi paraméternél, hogy a mért hatóanyag tartalmak átlagának relatív eltérése nem lehet nagyobb, mint 3,0%.

A *torzítatlanság* a következő vizsgálat, amit elvégeztem a módszer validálása során. A vizsgálat célja annak bizonyítása, hogy a tartalom meghatározás a mintaoldat koncentráció 70-130%-os tartományban torzítatlan, az UXYZ kódú hatóanyag tartalom meghatározására nincs hatása a segédanyagoknak. A mintaoldat koncentrációhoz viszonyítva 70%, 100%, 130%-os szinten mértem rá a hatóanyagot a placebo. Minden szinten 3-3 mintaelőkészítést végeztem az

alábbiak szerint. Minden oldatnak egyszer mértem a hatóanyag tartalmát (%) és a hatóanyag tartalom relatív szórását. Minden koncentrációnál, minden pontban visszanyerést kell számolni a **10. egyenlet** segítségével.

$$Visszanyerés[\%] = \frac{T_{mért}}{T_{számított}} * 100 \quad \text{10. egyenlet}$$

Ahol:

$T_{mért}$: az UXYZ kódú hatóanyag tartalom meghatározásra használt kromatográfiás módszerrel mért tartalom eredménye [mg/ml]

$T_{számított}$: a bemért alapanyag mennyiségéből számított érték [mg/ml]

Az oldatok elkészítéséhez a kutatás-fejlesztéstől kaptam 7%, 10% és 13%-os UXYZ kódú hatóanyagot. A három különböző hatáserősségből három mintaoldatot készítettem. Mindhárom esetben egy 10 ml-es mérőlombikba mértem be 100 mg megfelelő hatáserősségű UXYZ kódú hatóanyagot, majd oldószerrel jelre állítottam és homogenizáltam. Az így kapott oldatok jelölése: ACC-70%, ACC-100% és ACC 130%.

A mérés során a követelmény, hogy az egyes koncentrációsinten számított visszanyerések relatív szórása legfeljebb 2,0%, míg átlaga 98,0%-102,0% között legyen. A visszanyerés és relatív szórás egyenletét a korábbiakban már bemutattam.

A validálás során fontos meghatározni az *oldatstabilitást*, ezzel a vizsgálattal bizonyítottam, hogy a felhasznált oldatok (standard és mintaoldat, oldószer, eluens) milyen körülmények között meddig tárolhatók. A stabilitás vizsgálat a válaszjelek (csúcsterületek) összehasonlításán keresztül történt, a frissen készített standard és mintaoldathoz hasonlítottam a tárolt oldatok válaszjelét. Mivel a mérés nem folyamatos, ezért mindig friss standard oldatra kalibrálva mértem a tárolt standard és mintaoldat tartalmát, és az egyes időpontokban mért tartalmakra számoltam ki a relatív eltérést (**11. egyenlet**).

$$Relatív\ eltérés = \left| \frac{T_2 - T_1}{T_2} \right| * 100 \quad \text{11. egyenlet}$$

Ahol:

T₂: hatóanyag tartalom a vizsgált időpontban [%]

T₁: hatóanyag tartalom a kezdeti időpontban [%]

Az eluens eltarthatóságát különböző időpontokban a rendszer alkalmasságát ellenőrző oldat futtatásán keresztül vizsgáltam, miközben ugyanazt az eluenst használtam.

A mérés sikeres, ha a standard és mintaoldatok esetén a 0. napon készített oldathoz viszonyított relatív eltérés nem nagyobb mint 2,0%, illetve az eluens addig az időpontig tekinthető stabilnak, amíg az oldatból fizikai szennyeződés kiválása nem tapasztalható, és a rendszeralkalmassági feltételek teljesülnek. Az adatok alapján megállapítottam az oldatok tárolási körülményeit és a felhasználhatósági idejét.

Az utolsó validálási minőségi jellemző, amit vizsgáltam az a *robosztusság* volt, célja a módszer érzékenységeinek vizsgálata különböző kromatográfiás körülményekre. Ehhez az áramlási sebességet, a puffer pH-ját és a szerves oldószer arányát változtattam. A változás mértéke minden esetben, az eredeti paraméterekhez viszonyítva, maximum 20%.

8. táblázat: Robosztusság vizsgálatánál a módszerekben lévő változtatások

Módszer neve	Áramlási sebesség [ml/perc]	Eluens-A pH-ja	Szerves oldószer aránya	
			Eluens-A [%]	Eluens-B [%]
UXYZ-ROB-0	0,40	2,50	75	25
UXYZ-ROB-1	0,35	2,50	75	25
UXYZ-ROB-2	0,45	2,50	75	25
UXYZ-ROB-3	0,40	2,40	75	25
UXYZ-ROB-4	0,40	2,60	75	25
UXYZ-ROB-5	0,40	2,50	73	27
UXYZ-ROB-6	0,40	2,50	77	23

Mindhárom paramétert az eredetihez képest kétféleképpen változtattam meg és minden változtatott metódban csak egy paramétert változtattam. A **8. táblázatban** látható, hogy az UXYZ-ROB-0 a módszer leirat szerinti kromatográfiás körülményeknek megfelelő. Továbbá tartalmazza, hogy az UXYZ-ROB-1 és UXYZ-ROB-2 elnevezésű módosított módszerben az

áramlási sebességet, a UXYZ-ROB-3 és UXYZ-ROB-4 esetében az Eluens-A pH-ját változtattam meg, míg a UXYZ-ROB-5 és UXYZ-ROB-6 esetében szoftveresen állítottam át az eluensek keverési arányát. Minden esetben robusztusnak tekinthető a módszer, ha a rendszeralkalmassági követelmények teljesülnek, amit a **6. táblázat**ban összefoglaltam. Mivel robusztusság vizsgálatánál csak oldószert és SA-1-et injektáltam, ezért a rendszeralkalmasság vizsgálatakor, csak a retenció időt, a tányérszámot és tailing faktort vettem figyelembe.

6. EREDMÉNYEK

6.1. Validálási minőségjellemzők vizsgálata

Az első validálási minőségjellemző, amit vizsgáltam az a *szelektivitás és specifikusság* volt. A vizsgálat során az volt a célom, hogy bizonyítsam az UXYZ kódú hatóanyag elválasztható az ismert szennyezőktől. A szelektivitás vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy az UXYZ hatóanyag csúcs retenciós idejénél nem voltak sem az eluensből, sem az oldószerből, sem a pufferből, sem az SST-ből, sem a placeboból származó zavaró csúcsok. Szelektivitás teljesült, hiszen az UXYZ kódú hatóanyag csúcsnak a bomlási folyamatok során tiszta maradt (csúcstisztaság $\geq 0,95$), továbbá azonosság (spektrum hasonlóság, $\geq 0,95$) is megfelelt a mérés során. A főcsúcsnál az interferáló csúcs nem haladta meg a standard oldat csúcsának 0,5%-át. Az eredmények összefoglalása a **9. táblázat**ban látható, amelyben feltüntettem a standard, minta és a placebo oldat előkészítéskor bemért tömeget, az UHPLC mérés során kapott területet, emellett a zavaró jelet és a retenciós idejét az UXYZ kódú hatóanyagnak, amely a **6. táblázat**ban leírt rendszeralkalmassági követelménynek megfelelt. A mérés során kapott kromatogramok az **1. melléklet**ben megtalálhatóak. A specifikusság eredményeit a **10. táblázat**ban foglaltam össze, ahol feltüntettem az eredeti és a stressz körülményeknek alávetett minták eredményeit.

Tehát a módszer specifikussága és szelektivitása is megfelelő, mert a spektrum hasonló az eredetihez, a vizsgálat során nem észleltem bomlást, továbbá mert az UXYZ kódú hatóanyag retenciós idejénél nincs interferencia az oldószer, az eluens és a placebo bármelyik csúcsával.

9. táblázat: Szelektivitás eredményei

	Bemérés [mg]	Terület	UXYZ kódú hatóanyag retenciós ideje [perc]	Zavaró jel < 0.5
SA	10,336	80083222	1,11	-
Minta	100,4	77214639	1,11	-
Blank - MeOH	0	ND	N/A	N/A
Blank - Eluens-B	0	ND	N/A	N/A
Blank - Eluens-A	0	ND	N/A	N/A
SST	0	ND	N/A	N/A
Placebo	500,3	ND	N/A	N/A

10. táblázat: Specifikusság eredményei

	Bemérés [mg]	Terület [mAU]	Csúcstisztaság	Azonosság	UXYZ kódú hatóanyag [%]
Placebo	500,30	ND	ND	ND	N/A
Placebo - 2% HCl	500,30	ND	ND	ND	N/A
Placebo – 2% H ₂ O ₂	500,30	ND	ND	ND	N/A
Placebo – 2% NaOH	500,30	ND	ND	ND	N/A
Placebo - 70°C	500,30	ND	ND	ND	N/A
Placebo - fény	500,30	ND	ND	ND	N/A
Standard	50,52	391831128	1,00	0,995	99,436
Standard - 2% HCl	50,52	299986010	1,00	0,999	76,128
Standard - 2% H ₂ O ₂	50,52	352124482	1,00	0,998	89,360
Standard - 2% NaOH	50,52	311222289	1,00	0,999	78,980
Standard - 70°C	50,52	220956204	1,00	1,000	56,073
Standard - fény	50,52	399137958	1,00	0,995	101,290
A-minta	500,30	381286227	1,00	0,996	9,771
A-minta - 2% HCl	500,30	290789642	1,00	1,000	7,452
A-minta 2% - H ₂ O ₂	500,30	341141859	1,00	0,998	8,742
A-minta 2% - NaOH	500,30	314556906	1,00	0,999	8,061
A-minta - 70°C	500,30	361888755	1,00	0,997	9,274
A-minta- fény	500,30	435514197	1,00	0,994	11,160

A táblázatokban szereplő ND a nem detektálhatóság rövidítése.

A *linearitás* vizsgálatának célja annak bizonyítása, hogy a mintaoldat koncentrációja 70-130%-os tartományban az UXYZ hatóanyag koncentráció lineárisan változott a mért csúcsterülettel.

A vizsgálat során bebizonyosodott, hogy a koncentráció és a csúcsterület között lineáris korreláció van a vizsgált tartományban. Öt oldatot vizsgáltam a koncentráció 70-130%-os tartományában két törzsoldat hígításával. Minden oldatot egyszer injektáltam. A csúcsterületet a koncentráció függvényében ábrázoltam (**8. ábra**), és az eredmények lineáris regresszió elemzéssel értékeltem ki, ehhez kiszámoltam az egyenes egyenletét, az egyenes korrelációs együtthatóját, 100%-os koncentrációhoz tartozó csúcsterület-értékek hányadosának százszoros értékét és a normalizált területeket relatív szórását.

A **11. táblázatban** foglaltam össze a mintakészítést, tehát, hogy mennyi UXYZ kódú hatóanyagú mintát mértem be a két törzsoldathoz (1. törzsoldat bemérése: 20,16mg, a 2.

törzsoldat bemérése: 40,08mg). A linearitás vizsgálatához felhasznált hígítási sor elkészítését az anyagok és módszerek részben részleteztem. Emellett a **11. táblázat** tartalmazza mérési eredményeimet, hogy az adott hígításból (LA1-LA5) milyen csúcsterületeket kaptam, mennyi lett a mért koncentráció és a normalizált területeket is.

11. táblázat: Linearitás eredményei

Minta neve	Bemérés [mg]	Célkoncentráció [%]	Elméleti koncentráció [mg/ml]	Mért Koncentráció [mg/ml]	Terület [mAU]	Normalizált terület
LA1	20,16	70	0.071	0,0723	56611168	802312472
LA2	40,08	90	0.080	0,0809	63349877	790292877
LA3	20,16	100	0.101	0,1033	80892048	802500476
LA4	40,08	110	0.120	0,1231	96419596	801892848
LA5	20,16	130	0.131	0,1345	105339020	803869200

Excel segítségével meghatároztam az egyenes egyenletét:

$$y = 811765100,034 x - 1108756,69$$

a korrelációs együtthatót:

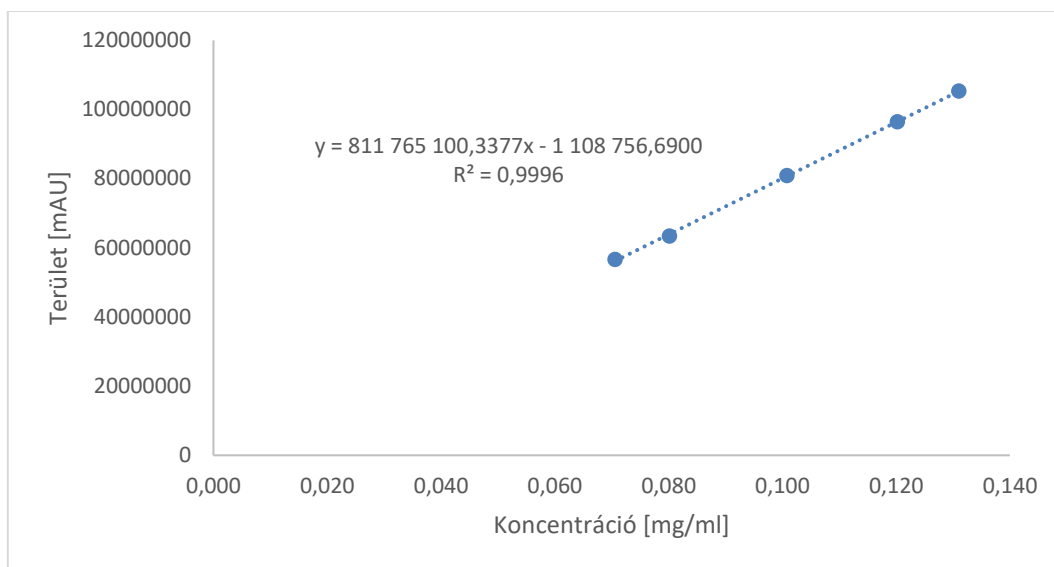
$$R^2 = 0,9996$$

a Z értéket:

$$Z = 1,4 \%$$

és a relatív szórást:

$$RSD\% = 0,6\%$$



8. ábra. UXYZ kódú hatóanyag linearitása

A követelmények a linearitás vizsgálatnál teljesültek, miszerint a korrelációs együttható legalább 0,998, a Z érték maximum 3% és a normalizált csúcsterületek relatív szórása kisebb, mint 2,0%.

Ebből azt a következtetést vontam le, hogy az UXYZ kódú hatóanyag meghatározási módszere lineáris a megadott tartományban.

A *pontosság* vizsgálat célja annak bizonyítása, hogy a módszer ismételhetősége ugyanabból a mintából, ugyanabban a laborban, ugyanazon a készüléken megfelelő. A vizsgálat során bebizonyosodott, hogy a módszer ismételhető. Hat mintaoldatot készítettem, az anyagok és módszerek részről leírt mintaoldat készítés szerint, és mindegyiket egyszer injektáltam. A mért hatóanyagtartalom relatív szórását a **12. táblázat**ban foglaltam össze. A táblázatban látható, hogy melyik sarzsot vizsgáltam (K020023), és a hat párhuzamos mérés hatóanyagtartalma, a hat mintának az átlagát és relatív szórását is feltüntettem.

12. táblázat: Pontosság eredményei

Vizsgált sarzs száma	Mért UXYZ kódú hatóanyag tartalma [mg/100mg]						Átlag	RSD%
	1.	2.	3.	4.	5.	6.		
K020023	9,88	9,87	9,96	9,85	9,83	9,79	9.85	0,80

A hat párhuzamos minta között a relatív szórás nem lett nagyobb kettőnél. Ezáltal teljesült a pontosságnál elvárt követelmény, így a módszerünk pontosnak tekinthető.

A következő minőségi paraméter, amit a módszer validálás során vizsgáltam az a *közbenső pontosság*. Ezzel a vizsgálattal a célom annak bizonyítása, hogy a módszer ismételhetősége ugyanabból a mintából, egy másik készüléken, másik analitikus által és másik napon vizsgálva is megfelelő. Az általam mért eredményeket, amiket a pontosság mérés során is felhasználtam, hasonlítottam össze T2 analitikus által mért eredményeivel. A **13. táblázatban** látható, hogy a két különböző mérési sorozat relatív különbsége megfelel a követelménynek, mivel RSD% kisebb mint 3,0%.

13. táblázat: Közbenső pontosság eredményei

Vizsgált sarzs száma	Mért UXYZ kódú hatóanyag tartalma [mg/100mg]						Átlag [mg/100mg]	RSD% [%]	Relatív különbség [%]
	1.	2.	3.	4.	5.	6.			
K020023 T1	9,88	9,87	9,96	9,85	9,83	9,79	9.85	0,80	1,79
K020023 T2	9,95	9,95	10,16	9,99	10,10	10,01	10,03	0,08	

A *torzítatlanság* vizsgálat célja annak bizonyítása, hogy a tartalom meghatározása a mintaoldatkonzentráció 70-130%-os tartományban torzítatlan, az UXYZ kódú hatóanyagtartalom meghatározására nincs hatása a segédanyagoknak. A torzítatlanságot bizonyító oldatokat egyszer injektáltam az oszlopra és az eredményeket az azonos koncentrációhoz tartozó egyes oldatok visszanyerési %-a, az azonos koncentrációhoz tartozó visszanyerések átlaga és RSD% kiszámításával értékeltem.

A vizsgálathoz a három különböző erősségű hatóanyagból 3-3 bemérést végeztem és ezekből készítettem el a mintaoldatokat. A torzítatlanságot bizonyító oldatokat egyszer injektáltam és az eredményeket az azonos koncentrációhoz tartozó egyes oldatok visszanyerési %-a, az azonos koncentrációhoz tartozó visszanyerések átlaga és RSD% kiszámításával értékeltem. Az eredményeket a **14. táblázatban** foglaltam össze. A táblázatban feltüntettem mindegyik mintához a hozzátartozó koncentrációt, a folyadékkromatográfiás mérésből származó csúcsterületet és a hatóanyagtartalmat. A számított koncentráció és az elméleti koncentráció

hányadosából számított visszanyerés és különböző koncentrációszintekhez tartozó három mintaoldat visszanyerés átlagát és relatív szórását.

Az eredményekből arra következtettem, hogy a módszer a vizsgált tartományban pontos és nincs mátrixhatás, illetve szisztematikus hiba. Az egyes koncentrációszinteken a számított visszanyerés 98,0% és 102,0% közé esik és a számított visszanyerések relatív szórása nem nagyobb 2,0%-nál.

14. táblázat: Torzítatlanság eredményei

Koncentráció szint [%]	Elméleti		Mérési eredmény		Visszanyerés [%]	Átlag visszanyerés [%]	Visszanyerés RSD-je [%]
	Konc. [mg/ml]	Konc. [%]	Terület	Hatóanyagtart. [%]			
ACC-70	0,0701	70,07	54094529	69,07	98,58	99,1	0,6
	0,0704	70,35	54987975	70,21	99,81		
	0,0703	70,28	54442804	69,52	98,92		
ACC-100	0,1002	100,2	77772783	99,31	99,11	100,0	1,4
	0,1012	101,2	78681854	100,47	99,28		
	0,1011	101,1	80519626	102,82	101,70		
ACC-130	0,1304	130,39	102184967	130,48	100,07	99,9	0,3
	0,1305	130,52	101772188	129,95	99,57		
	0,1303	130,26	101931583	130,16	99,92		

Az *oldatstabilitás* vizsgálat során azt vizsgáltam, hogy mennyi az elkészített oldatok eltarthatósági ideje, továbbá adott tárolási körülmények között hogyan változik. Ugyanazokat a standard és mintaoldatokat többször elemeztem több időpontban (168 órán keresztül). Normál laboratóriumi tárolási körülmények között, UHPLC mintatartó hőmérsékleten (20°C) és hűtőszekrényben (5±3°C) tárolt oldatokkal szemben, frissen készített standard oldatokat hasonlítottam össze. Az eluens tárolási időtartamát a rendszeralkalmassági eredményekkel és szemmel látható elváltozással ellenőriztem, miközben a vizsgálat során végig ugyanazt az eluenst használtam.

A standardre vonatkozó eredményeket a **15. táblázatban**, míg a mintákra vonatkozó eredményeket a **16. táblázatban** foglaltam össze. Mindkét táblázatban látható, hogy a nulladik napon a rendszeralkalmasság teljesülése után SA-1 és SA-2, valamint minta-1 és minta-2 oldatokat injektáltam, a következő napokban ezekhez az értékekhez viszonyítottam a kapott eredményeket. Az UHPLC-ben tárolt minták mintatartó üvegcsében voltak a készülékben, a hűtőben, illetve szobahőmérsékleten lévő mintáknál a törzsoldatot lombikban tároltam és az

adott napon szűrtem mintatartó üvegcskébe. A táblázatokban feltüntettem a napokat, amikor a vizsgálatot végeztem és a különböző tárolási körülményeknél kapott eredményeket, amelyekből relatív különbségeket számoltam ki.

15. táblázat: Standard oldatstabilitás eredményei

Nap	Mért UXYZ kódú hatóanyagtartalom [%]				Vizsgálatok relatív különbsége [%]			
	Tárolási körülmények				Tárolási körülmények			
	UHPLC-ben tárolt standard-1	UHPLC-ben tárolt standard-2	Hűtőben tárolt standard-1	Szobahm-en tárolt standard-2.	UHPLC-ben tárolt standard-1	UHPLC-ben tárolt standard-2	Hűtőben tárolt standard-1	Szobahm-en tárolt standard-2.
0. nap	100,15	100,31	-	-	-	-	-	-
2. nap	100,57	99,97	98,82	97,94	0,42	-0,35	-1,33	-2,37
3. nap	101,32	101,51	99,89	100,40	1,17	1,20	-0,26	0,08
6. nap	102,04	101,96	98,96	99,64	1,89	1,64	-1,19	-0,67
7. nap	103,16	102,02	100,60	101,78	3,00	1,70	0,45	1,46

16. táblázat. Minta oldatstabilitás eredményei

Nap	Mért UXYZ kódú hatóanyagtartalom [%]				Vizsgálatok relatív különbsége [%]			
	Tárolási körülmények				Tárolási körülmények			
	UHPLC-ben tárolt minta-1	UHPLC-ben tárolt minta-2	Hűtőben tárolt minta-1	Szobahm-en tárolt minta-2.	UHPLC-ben tárolt minta-1	UHPLC-ben tárolt minta-2	Hűtőben tárolt minta-1	Szobahm-en tárolt minta-2.
0. nap	9,86	9,91	-	-	-	-	-	-
2. nap	9,89	9,75	9,84	9,68	0,27	-1,66	-0,18	-2,35
3. nap	10,09	10,02	9,88	9,93	2,34	1,10	0,19	0,19
6. nap	9,87	9,93	9,83	9,82	0,13	0,18	-0,30	-0,90
7. nap	10,34	10,08	10,11	10,05	4,89	1,65	2,51	1,41

A standard oldatok vizsgálatánál a hűtőben és szobahőmérsékleten tárolt minták a 7. napon mért eredményei is megfeleltek a követelménynek, miszerint a relatív eltérés nem lehet nagyobb, mint 2,0% a 0.napon készített oldatokhoz képest. Ez a követelmény az UHPLC-ben tárolt minták esetében csak a 6. napig teljesültek. A mintaoldatok vizsgálata legalább 6 napig változatlanok maradtak a fent említett tárolási körülmények között. Az eluensben a vizsgálat ideje alatt nem tapasztaltam csapadékképződést vagy egyéb vizuális elváltozást az oldat megjelenésében.

Az utolsó minőségjellemző, amit a validáláshoz vizsgáltam, az a robusztusság volt, melynek célja a módszer érzékenységeinek meghatározása. A különböző paraméterekkel megváltoztatott

mérési módszerek eredményeit a **17. táblázat**ban foglaltam össze, ahol kvaterner pumpás UHPLC készüléken mértem, illetve a biner pumpás UHPLC készüléken történő mérések eredményei a **18. táblázat**ban láthatók. Az UXYZ-ROB-0 a kiindulási, kromatográfiás feltételeknek megfelelő módszer és ehhez képest változtattam vagy az áramlási sebességen, vagy az Eluens-A pH értékén vagy az Eluens-B arányán.

17. táblázat: Kvaterner pumpás készülékkel mért robusztusság eredményei

<i>Az áramlási sebesség változtatásának hatása:</i>				
Módszer kódja	Áramlási sebesség [ml/perc]	Retenciós idő [perc]	Elméleti tányérszám	Aszimmetria
UXYZ-ROB-1	0,35	1,08	4682	1,53
UXYZ-ROB-0	0,40	0,94	4229	1,59
UXYZ-ROB-2	0,45	0,84	4137	1,58
<i>Eluens-A pH érték változtatásának hatása:</i>				
Módszer kódja	Eluens-A pH-ja	Retenciós idő [perc]	Elméleti tányérszám	Aszimmetria
UXYZ-ROB-3	2,40	0,91	4177	1,55
UXYZ-ROB-0	2,50	0,94	4229	1,59
UXYZ-ROB-4	2,60	0,99	4814	1,47
<i>Eluens-B arányának megváltoztatásának hatása</i>				
Módszer kódja	Eluens-B arány [%]	Retenciós idő [perc]	Elméleti tányérszám	Aszimmetria
UXYZ-ROB-5	73	0,83	4047	1,56
UXYZ-ROB-0	75	0,94	4229	1,59
UXYZ-ROB-6	77	1,12	4824	1,57

18. táblázat: Biner pumpás készülékkel mért robusztusság eredményei

<i>Az áramlási sebesség változtatásának hatása:</i>				
Módszer kódja	Áramlási sebesség [ml/perc]	Retenciós idő [perc]	Elméleti tányérszám	Aszimmetria
UXYZ-ROB-1	0,35	1,26	4618	1,17
UXYZ-ROB-0	0,40	1,10	4644	1,17
UXYZ-ROB-2	0,45	0,99	4517	1,17
<i>Eluens-A pH érték változtatásának hatása:</i>				
Módszer kódja	Eluens-A pH-ja	Retenciós idő [perc]	Elméleti tányérszám	Aszimmetria
UXYZ-ROB-3	2,40	1,06	4437	1,18
UXYZ-ROB-0	2,50	1,10	4644	1,17
UXYZ-ROB-4	2,60	1,13	4804	1,16
<i>Eluens-B arányának megváltoztatásának hatása</i>				
Módszer kódja	Eluens-B arány [%]	Retenciós idő [perc]	Elméleti tányérszám	Aszimmetria
UXYZ-ROB-5	73	0,98	4271	1,17
UXYZ-ROB-0	75	1,10	4644	1,17
UXYZ-ROB-6	77	1,29	4958	1,13

A módszer robusztus az áramlási sebesség, a puffer pH értékének és a szerves összetevők mennyiségének változtatására. Emellett az is megállapítható, hogy nincsen különbség biner, illetve kvaterner pumpával felszerelt készülék mérési eredményei között, hiszen a rendszeralkalmassághoz szükséges paramétereket vizsgálva (retenciós idő, elméleti tányérszám és aszimmetria) a feltételek teljesültek mindegyik mérés során.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A HPLC-UV módszer validálása UXYZ kódú állatgyógyászati hatóanyag esetén sikeres volt, hiszen a validálási minőségjellemzők mérése során az eredmények megfelelnek a követelményeknek. A validálás során nem akadtam előre nem látható problémákba, sokat segített, hogy előre átgondoltam, hogyan szeretném megvalósítani a méréseket és milyen eredményeket várok. Az UXYZ kódú hatóanyagtartalom az általam használt termékből minden esetben a várt kihozatazt hozta és a rendszeralkalmassági követelményeknek is megfelelt.

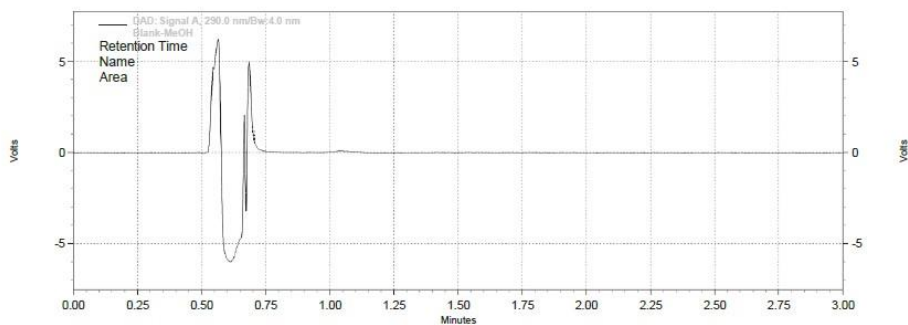
Validálás során vizsgáltam a szelektivitást, amely vizsgálat során a szennyezők elváltak az UXYZ kódú hatóanyagtól és vizsgáltam a specifikusságot is, amely során különböző körülmények között kezeltem a standard, minta és placebo oldatokat. A vizsgálat során a hatóanyagtartalom mennyiségében látható változás, de a csúcstisztaság és azonosság mindegyik esetben a követelménynek megfelel. Linearitás során a 70-130%-os koncentráció tartományban mért csúcsterületek lineárisan változnak a koncentrációval, az egyenes egyenletéből számított R^2 , a Z értéke és az RSD% is megfelel a követelményeknek. A pontosság mérésekor ugyanabból a sarzsból készített hat párhuzamos mintának az RSD%-át, míg a közbenső pontosságnál a pontossághoz hasonlítottam másik analitikus által elkészített hat párhuzamos mérést. A pontosságnál az RSD%-ot vizsgáltam, amely megfelel a követelménynek, a közbenső pontosságnál a 12 párhuzamos minta hatóanyag átlag relatív eltérését vizsgáltam, amely szintén megfelelt a követelménynek. A torzítatlanság vizsgálatánál a hatóanyagot 70%-os, 100%-os és 130%-os szinten vizsgáltunk és a vizsgálat során kapott RSD% és visszanyerés értéke is megfelel a követelményeknek. Validáció során néztem még az oldatstabilitást, vizsgáltam a standard és mintaoldatokat is különböző hőmérsékleten. A relatív eltérés a standard esetén hét napig felel meg a követelményeknek szoba-, illetve hűtő (2-8°C) hőmérsékleten, az UHPLC készülékben hat napig felel meg az elvárt RSD%. A mintaoldat hat napig felel meg a követelményeknek mindhárom körülményen. Emellett vizsgáltam még az eluensek stabilitását, mivel minden mérés során teljesült a rendszeralkalmassági követelmény és a vizuális vizsgálat során sem tapasztaltam eltérést az eluenseket tartalmazó üvegekben, ezért ezeknek a stabilitása a vizsgálat során végig megfelelő volt, vagyis hét napig. Végül vizsgáltam a módszer robusztusságát, ahol különböző paramétereket maximum 20%-ban változtattam meg az eredetihez képest. A rendszeralkalmassági követelmények itt is minden esetben teljesültek. Ezeket az eredményeket a **2. melléklet**ben számszerűen is összefoglaltam.

Úgy gondolom, hogy a validálásommal segítettem a későbbi rutinméréseket, egyszerű és gyors módszert validáltam, amelyet több UHPLC készüléken is lehet mérni megfelelő pontossággal. A mintaelőkészítés nem bonyolult, ahogy maga a hatóanyagtartalom mérése sem. Továbbá ami nagyon fontos a mindennapi munkám során, hogy az eredményeket dokumentálni kell, tehát az UHPLC méréseket ki is kell értékelni, azonban ez is egyszerűen és gyorsan megvalósítható.

8. MELLÉKLETEK

LAVET

Sample ID: Blank-MeOH
 Sample Amt: 0 mg
 Volume: 1 ml
 Dilution: 1 ml to 1 ml



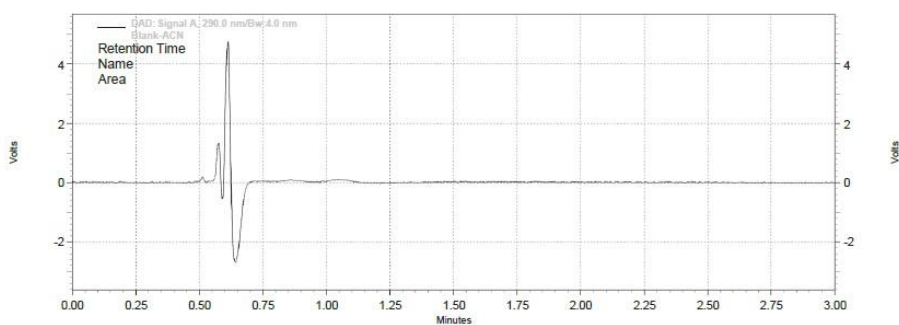
DAD: Signal
 A, 290.0
 nm/Bw:4.0
 nm Results

Name	Time	Area	Theoretical plates (EMG)	Asymmetry	Similarity	Assay (%)
UXYZ hatóanyag						0.000 BDL
Totals						

1/A melléklet: Szelektivitás mérés – Oldószer (metanol) kromatogramja

LAVET

Sample ID: Blank-ACN
 Sample Amt: 0 mg
 Volume: 1 ml
 Dilution: 1 ml to 1 ml



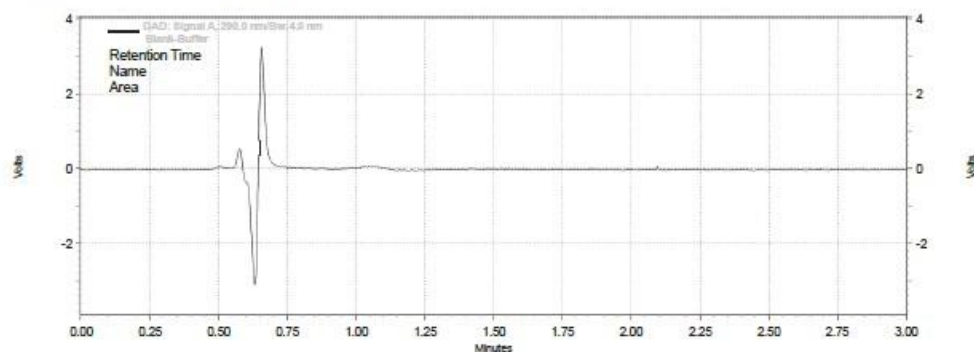
DAD: Signal
 A, 290.0
 nm/Bw:4.0
 nm Results

Name	Time	Area	Theoretical plates (EMG)	Asymmetry	Similarity	Assay (%)
UXYZ hatóanyag						0.000 BDL
Totals						

1/B melléklet: Szelektivitás mérés – Eluens-B (acetonitril) kromatogramja

LAVET

Sample ID: Blank-Buffer
 Sample Amt: 0 mg
 Volume: 1 ml
 Dilution: 1 ml to 1 ml



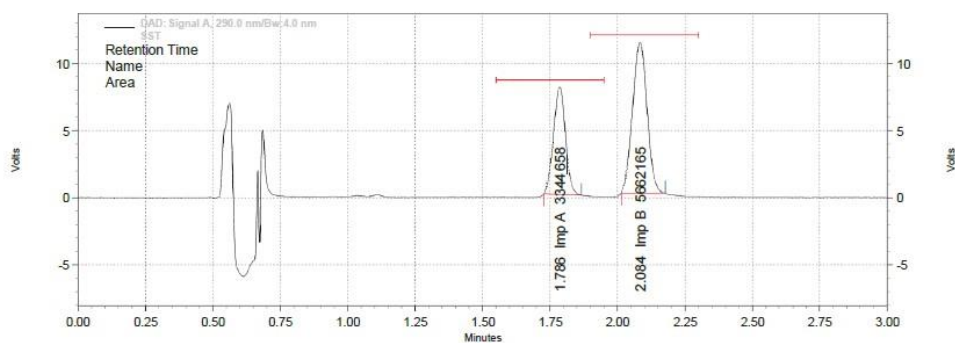
DAD: Signal
 A, 290.0
 nm/Bw:4.0
 nm Results

Name	Time	Area	Theoretical plates (EMG)	Asymmetry	Similarity	Assay (%)
WXYZ hatóanyag						0.000 BDL
Totals						

1/C melléklet: Szelektivitás mérés – Eluens-A (puffer) kromatogramja

LAVET

Sample ID: SST
 Sample Amt: 0 mg
 Volume: 1 ml
 Dilution: 1 ml to 1 ml



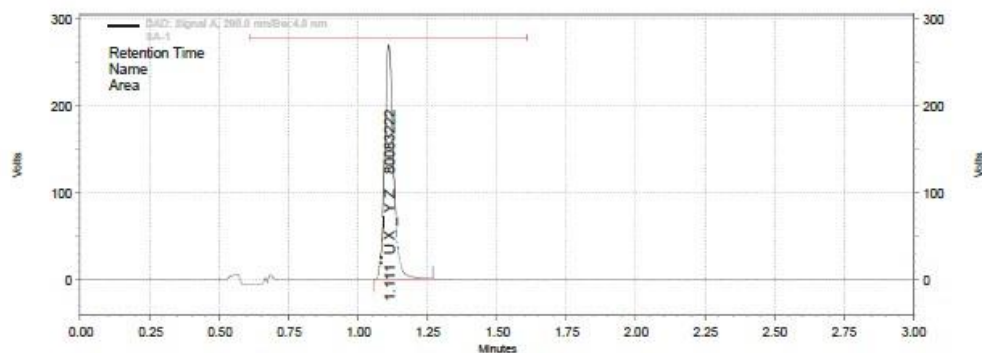
DAD: Signal
 A, 290.0
 nm/Bw:4.0
 nm Results

Name	Time	Area	Theoretical plates (EMG)	Asymmetry	Similarity	Assay (%)
WXYZ hatóanyag						0.000 BDL
Imp A	1.79	3344658	7328	1.01	0.000	0.000
Imp B	2.08	5662165	6966	1.01	0.000	0.000
Totals		9006823				0.000

1/D melléklet: Szelektivitás mérés – rendszeralkalmassági teszt (SST) kromatogramja

LAVET

Sample ID: SA-1
 Sample Amt: 10.336 mg
 Volume: 100 ml
 Dilution: 1 ml to 1 ml



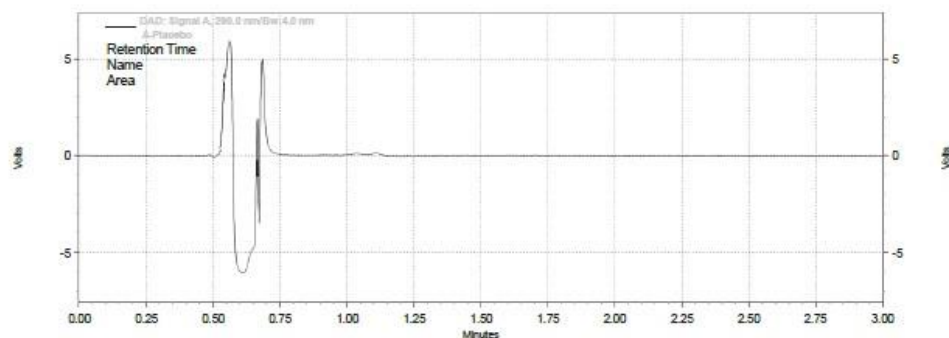
DAD: Signal
 A, 290.0
 nm/Bw:4.0
 nm Results
 Name

	Time	Area	Theoretical plates (EMG)	Asymmetry	Similarity	Assay (%)
WXYZ hatóanyag	1.11	80083222	4741	1.19	1.000	0.103 CAL
Totals		80083222				0.103 CAL

1/E melléklet: Szelektivitás mérés – Standard (SA-1) kromatogramja

LAVET

Sample ID: A-Placebo
 Sample Amt: 500.3 mg
 Volume: 100 ml
 Dilution: 1 ml to 1 ml



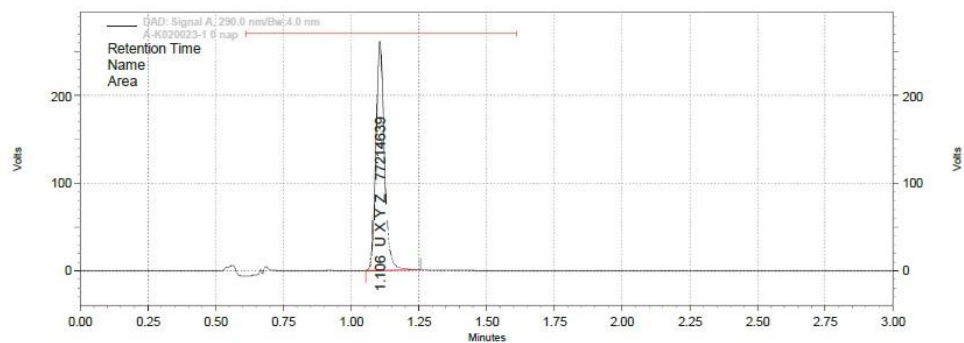
DAD:
 Signal A,
 290.0
 nm/Bw:4.0
 nm Results
 Name

	Time	Area	Theoretical plates (EMG)	Asymmetry	Similarity	Assay (%)	Peak purity
WXYZ hatóanyag						0.000 BDL	
Totals							

1/F melléklet: Szelektivitás mérés – Placebo kromatogramja

LAVET

Sample ID: A-K020023-1 0 nap
Sample Amt: 100.4 mg
Volume: 100 ml
Dilution: 1 ml to 1 ml



DAD: Signal
A, 290.0
nm/Bw:4.0
nm Results

Name	Time	Area	Theoretical plates (EMG)	Asymmetry	Similarity	Assay (%)
UXYZ hatóanyag	1.11	77214639	4744	1.19	1.000	9.860
Totals		77214639				9.860

1/G melléklet: Szelektivitás mérés –minta kromatogramja

Teljesítményjellemző	Követelmény	Eredmény
<i>Szelektivitás</i> <i>Specifikusság</i>	▪ Szennyezőcsúcsok elválaszthatóak az UXYZ kódú hatóanyagtól ▪ Csúcs tisztaság $\geq 0,95$ ▪ Azonosság $\geq 0,095$	A szennyezőcsúcsok elválaszthatóak (zavarójel $< 0,5$) Csúcs tisztaság $\geq 0,95$ Azonosság $\geq 0,095$
<i>Linearitás</i>	▪ $R^2 \geq 0,998$ ▪ $Z \leq 3,0\%$ ▪ $RSD\% \leq 2,0\%$	$R^2 = 0,9996$ $Z = 1,4\%$ $RSD\% = 0,6\%$
<i>Pontosság</i>	▪ $RSD\% \leq 2,0\%$	$RSD\% = 0,8\%$
<i>Közbenső pontosság</i>	▪ Hatóanyag-átlag relatív eltérése $\leq 3,0\%$	Hatóanyag-átlag relatív eltérése = 1,79%
<i>Torzítatlanság</i>	▪ $RSD\% \leq 2,0\%$ ▪ Koncentrációból számított visszanyerés 98,0%-102% közé esik	$RSD_{ACC70} = 0,6\%$ $RSD_{ACC100} = 1,4\%$ $RSD_{ACC130} = 0,3\%$ Visszanyerés: $ACC70 = 99,1\%$ $ACC100 = 100,0\%$ $ACC130 = 99,9\%$
<i>Oldatstabilitás</i>	▪ Relatív eltérés 0. naphoz viszonyítva $\leq 2,0\%$ ▪ Eluens fizikai szennyeződéstől mentes	Standard relatív eltérése a 7. napon Szoba hőmérsékleten = 1,5% Hűtő hőmérsékleten = 0,45% Standard relatív eltérése a 6. napon UHPLC készülékben minta-1 = 1,9% minta-2 = 1,6% Minta relatív eltérése a 6. napon Szoba hőmérsékleten = 0,9% Hűtő hőmérsékleten = 0,3% UHPLC készülékben minta-1 = 0,13% minta-2 = 0,18% Vizuális vizsgálattal 7. napon is megfelel
<i>Robusztusság</i>	UXYZ kódú hatóanyag esetén ▪ Retenciós idő = 1,0 - 2,5 perc ▪ Aszimmetria = 0,8 – 1,8 ▪ Elméleti tányérszám ≥ 800	Eredmények megfelelnek

2. melléklet. Validálás során kapott eredmények összefoglalása

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni hálámat mindazok felé, akik segítették a munkámat tanácsaikkal, véleményükkel és lehetővé tették diplomamunkám elkészítését.

Köszönetet szeretnék mondani Marczika Andrásné Dr. Sörös Csillának segítségéért és iránymutatásáért.

Köszönöm a Lavet Gyógyszeripari Kft.-nek, hogy lehetőséget biztosítottak a tanulmányaimhoz, külön szeretném megköszönni Benesóczki Dórának, Csizmadia Norbertnek és Luthár Veronikának támogatásukat és segítségüket.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Wang, B.; Xie, K.; Lee, K. (2021): Veterinary Drug Residues in Animal-Derived Foods: Sample Preparation and Analytical Methods. *Foods* 10 (3), 1–32. <https://doi.org/10.3390/foods10030555>.
- [2] Mittal, N.; Medhi, B. (2007): The Bird Flu: A New Emerging Pandemic Threat and Its Pharmacological Intervention. *Int. J. Health Sci. (Qassim)*. 1 (2), 277–283.
- [3] Adams, C. J. (1997): “Mad Cow” Disease and the Animal Industrial Complex: An Ecofeminist Analysis. *Organ. Environ.* 10 (1), 26–51. <https://doi.org/10.1177/0921810697101007>.
- [4] Li, Z.; Chen, W.; Qiu, Z.; Li, Y.; Fan, J.; Wu, K.; Li, X.; Zhao, M.; Ding, H.; Fan, S.; Chen, J. (2022): African Swine Fever Virus: A Review. *Life* 12 (8), 1–41. <https://doi.org/10.3390/life12081255>.
- [5] Bharath, B. C.; Balamuralidhara, V.; Venkatesh, M. P. (2019): Veterinary Medicine: Drug Approval Process in Europe and USA. *J. Pharm. Sci. Res.* 11 (7), 2694–2702.
- [6] Padivitage, N.; Tian, J.; Wang, L.; Zhuang, J.; Mcadoo, A.; Zhao, D.; Rustum, A. M. (2023): Development and Validation of a Stability-Indicating Reversed-Phase HPLC Method for Assay and Estimation of Related Substances of Ivermectin in an Oral Paste. *J. Chromatogr. Sci.* 61 (2), 119–129. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmab144>.
- [7] Kim, Y. (2022): From Veterinary Drug Products. 45 (3), 243–248.
- [8] Pietruk, K.; Jedziniak, P. (2013): Determination of Ivermectin in Medicated Feeds by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Sci. World J.* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/362453>.
- [9] Unutkan, T.; Bakirdere, S.; Keyf, S. (2018): Development of an Analytical Method for the Determination of Amoxicillin in Commercial Drugs and Wastewater Samples, and Assessing Its Stability in Simulated Gastric Digestion. *J. Chromatogr. Sci.* 56 (1), 36–40. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmx078>.
- [10] Raju, C. B. V. N.; Sharma, H. K.; Rao, S. C.; Rao, G. (2009): RP-HPLC Method for Analysis of Related Substances in Amoxicillin Drug Substance. *Acta Chromatogr.* 21 (1), 57–70. <https://doi.org/10.1556/AChrom.21.2009.1.5>.
- [11] Sharma, S.; Goyal, S.; Chauhan, K. (2018): A Review on Analytical Method Development and Validation. *Int. J. Appl. Pharm.* 10 (6), 8–15. <https://doi.org/10.22159/ijap.2018v10i6.28279>.
- [12] Brezovska, M.; Jampilek, J.; Opatrilova, R. (2013): A Review of HPLC Methods Used for Determining the Presence of Meloxicam. *Curr. Pharm. Anal.* 9 (1), 69–76. <https://doi.org/10.2174/157341213804806179>.
- [13] Ahmad, S.; Deepika, S.; Amol, P.; Kapil, W.; Md.Usman, M. R. (2017): Novel RP-HPLC Method Development and Validation of Meloxicam Suppository. *Indian J. Pharm. Educ. Res.* 51 (4), 644–649. <https://doi.org/10.5530/ijper.51.4.95>.

- [14] Emirham, N.; Sayin, F.; Nursabah E., B.; Sedef, K. (2007): A Validated HPLC Method for the Determination of Meloxicam in Pharmaceutical Preparations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (1), 107–118. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00267-3](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00267-3).
- [15] Gnana Babu, J. C.; G, S. H.; Gnana Babu, J. (2023): Validated Hplc Method for Estimation of Dexamethazone in Bulk and Tablet Dosage Form. *Akshatha al. World J. Pharm. Res.* 9 (February), 1843. <https://doi.org/10.20959/wjpr20207-17861>.
- [16] Urban, M. C. C.; Mainardes, R. M.; Gremião, M. P. D. (2009): Development and Validation of HPLC Method for Analysis of Dexamethasone Acetate in Microemulsions. *Brazilian J. Pharm. Sci.* 45 (1), 87–92. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502009000100010>.
- [17] Kulkarni, P. N.; Jadhav, C. K.; Nipate, A. S.; Dodake-Supekar, A. M.; Gill, C. H. (2020): Stability Indicating RP-HPLC Method Development and Validation for Dexamethasone. *Asian J. Chem.* 32 (3), 587–591. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2020.22462>.
- [18] Amjad, M.; Hussain, S. (2020): CODEN (USA): PCJHBA Development and Validation of HPLC Method for the Simultaneous Determination of Dexamethasone Sodium Phosphate and Prednisolone Acetate in Injectable Veterinary ... The Pharmaceutical and Chemical Journal , 2020 , 7 (5): 48-65 Deve. *Pharm. Chem. J.* 7(5) (October), 48–65. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.16751.25766>.
- [19] Stefanini-Oresic, L. (1994): Validation of Analytical Procedures. *Farm. Glas.* 50 (4), 97–105. <https://doi.org/10.3109/9781420081275-11>.
- [20] Paál, T. (2004): Magyar Gyógyszerkönyv. 761–766.
- [21] ICH Steering Committee. (2022): ICH Q2 (R2) Validation of Analytical Procedures: Method. *Eur. agency Eval. Med. Prod. Int. Comm. Harmon.* 2 (December 2023).
- [22] Benesóczki, D. (2020): HPLC-s Analitikai Vizsgálatok Validálása. *LAV-MEL* 062 1–33.
- [23] Plants, M.; Anti, W.; Activity, C. (2013): International Journal of Universal. 2 (June), 285–297.
- [24] Union, I.; Pure, O. F.; Chemistry, A.; Divisions, P. C.; Working, I.; For, P.; Of, H.; Assurance, Q.; For, S.; Laboratories, A.; Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R. (2002): Harmonized Guidelines for Single- Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). *Chem. Int.* 24 (5), 26–26. <https://doi.org/10.1515/ci.2002.24.5.26a>.
- [25] Kazakevich, Y.; LoBrutto, R. (2007): Hplc for Pharmaceutical. 8–9.
- [26] Szepeszy, L. (2007): A Kromatográfia És Rokon Elválasztási Módszerek Története És Fejlesztése Magyarországon. 18–52.
- [27] Sabir, A. M.; Moloy, M.; Bhasin, P. S. (2016): Hplc Method Development and Validation: A Review. *Int. Res. J. Pharm.* 4 (4), 39–46. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.04407>.
- [28] LaCourse, M. E.; LaCourse, W. R. (2017): General Instrumentation in HPLC. *Liq.*

- Chromatogr. Fundam. Instrum. Second Ed. 1*, 417–429. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805393-5.00017-8>.
- [29] Kormány, R.; Fekete, J.; Fekete, S. (2017): Modern Folyadékkromatográfia. 520.
- [30] Moldoveanu, S. C.; David, V. (2017): RP-HPLC Analytical Columns. *Sel. HPLC Method Chem. Anal.* 279–328. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803684-6.00007-x>.
- [31] Brown, A. K.; Wong, C. S. (2015): Current Trends in Environmental Analysis of Human Metabolite Conjugates of Pharmaceuticals. *Trends Environ. Anal. Chem.* 5, 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2015.01.002>.
- [32] Németh Tamás. Elválasztástechnikai Módszerek Alkalmazásának Gyakorlati Kérdései Gyógyszeranyagok És -Készítmények Minőségellenőrzésében.
- [33] Meyer, V. R. (2005): Chromatography | Principles. *Encycl. Anal. Sci. (Second Ed.* 105–112. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00089-3>.
- [34] Edge, T. (2003): Chapter 4 Turbulent Flow Chromatography in Bioanalysis. *Handb. Anal. Sep.* 4, 91–128. [https://doi.org/10.1016/S1567-7192\(03\)80005-0](https://doi.org/10.1016/S1567-7192(03)80005-0).
- [35] György, P.; Róbert E, G.; András, S.; László, B.; György, H.; Viola, H. (2011): Analitikai Kémia. 87–398.
- [36] Sebők, Á. (2001): Élelmiszerbiztonság, Minőségbiztosítás. *BME Vegyészmérnöki Kar Jegyz.* 85–190.
- [37] Haleem, R. M.; Salem, M. Y.; Fatahallah, F. A.; Abdelfattah, L. E. (2015): Quality in the Pharmaceutical Industry - A Literature Review. *Saudi Pharm. J.* 23 (5), 463–469. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.11.004>.
- [38] Eur, A. Z.; Parlament, P. A. I.; Uni, P. A. I.; Eur, A.; Lapban, H. (1999): Az Európai Községek Hivatalos Lapja. 102–105.

9.1. Internetes hivatkozások

Internet 1. <https://mkogy.jogtar.hu/jogszabaly?docid=a0500176.TV> (Hozzáférés időpontja: 2024.04.20.)

Internet 2 <https://www.vichsec.org/en/> (Hozzáférés időpontja: 2024.04.20.)

Internet 3 <https://medicines.health.europa.eu/veterinary/hu/> (Hozzáférés időpontja: 2024.04.20.)

Internet 4 <https://www.ksh.hu/s/kiadvanyok/allatallomany-2022-december-1/index.html> (Hozzáférés időpontja: 2024.04.20.)

Internet 5. https://www.ksh.hu/docs/hun/xftp/ac2020/foldthasznalet_allatallomany/index.html
(Hozzáférés időpontja: 2024.04.20.)

Internet 6 https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/usp-nf-notices/c1086_m99805_PF436.pdf (Hozzáférés időpontja: 2024.04.20.)

Internet 7 [http://oktatas.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/anal/MSc_Analitikai%20Kemia-II\(BIO\)-es-Gyogyszeranalitika\(GyVe\)/HPLC_I-II%20Kormany%20Robert%202018.pdf](http://oktatas.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/anal/MSc_Analitikai%20Kemia-II(BIO)-es-Gyogyszeranalitika(GyVe)/HPLC_I-II%20Kormany%20Robert%202018.pdf) (Hozzáférés időpontja: 2024.04.20.)

10. ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

1. ábra: Lavet Gyógyszeripari Kft. főépület (balra) és Minőségellenőrzési HPLC labor (jobbra)	4
2. ábra: Magyarországi állattartomány alakulása 2010-2020 között [Internet 5]	9
3. ábra: Magyarországi állattartó gazdaságok alakulása 2010-2020 között [Internet 5]	9
4. ábra: HPLC készülék főbb részei és működésének sematikus ábrázolása [saját munka]...	14
5. ábra: C ₁₈ -as kolonna felépítése és az elválasztás során fellépő kölcsönhatások [saját munka]	16
6. ábra: Héjszerkezetű kolonna (R _i : belső mag sugara, R _E : szemcse sugara) [29]	17
7. ábra: Diódasoros detektor sematikus ábrája [35]	18
8. ábra: UXYZ kódú hatóanyag linearitása	37
1. táblázat: Gyógyszerengedélyeztetés összehasonlítása USA és Európa között [5]	7
2. táblázat: Állatgyógyászatban alkalmazott hatóanyagok és jellemzői [saját munka]	8
3. táblázat: A mért minőségi jellemzők tipikus teljesítményjellemzői és a kapcsolódó validációs vizsgálatok [19]	10
4. táblázat: Kromatográfias módszer adatai UXYZ kódú hatóanyag meghatározásához	23
5. táblázat: Szekvencia sematikus felépítése	24
6. táblázat: Rendszeralkalmassági követelmény UXYZ kódú hatóanyagra nézve	25
7. táblázat: Linearitás vizsgálatához készített hígítási sor	29
8. táblázat: Robusztusság vizsgálatánál a módszerekben lévő változtatások	32
9. táblázat: Szelektivitás eredményei	34
10. táblázat: Specifikusság eredményei	35
11. táblázat: Linearitás eredményei	36
12. táblázat: Pontosság eredményei	37
13. táblázat: Közbenső pontosság eredményei	38
14. táblázat: Torzítatlanság eredményei	39
15. táblázat: Standard oldatstabilitás eredményei	40
16. táblázat: Minta oldatstabilitás eredményei	40
17. táblázat: Kvaterner pumpás készülékkel mért robusztusság eredményei	41
18. táblázat: Biner pumpás készülékkel mért robusztusság eredményei	42

NYILATKOZAT

a diplomadolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve:	Sipkai Elza
A Hallgató Neptun kódja:	IP8QG0
A dolgozat címe:	UHPLC-UV módszer validálása UXYZ kódú állatgyógyászati hatóanyag analitikai meghatározására
A megjelenés éve:	2024.
A konzulens intézetének neve:	Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
A konzulens tanszékének a neve:	Élelmiszerkémia és Analitika Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott diplomadolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítotam, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkori szellemi tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelte után nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem könyvtári repozitori rendszerében.

Kelt: Budapest, 2024. év 04. hó 19. nap


Hallgató aláírása

NYILATKOZAT

Sipkai Elza (IP8QG0) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A diplomadolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom¹.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem^{*2}

Kelt: Budapest, 2024. év 04. hó 19. nap


belső konzulens

¹ A megfelelő aláhúzendő.

² A megfelelő aláhúzendő.