

Pharmahemp d.o.o., Koprška ulica 106C, SI-1000 Ljubljana, Slovenija		PharmaHemp®
NAVODILO ZA DELO S SISTEMOM ZA TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC) INFINITY II AGILENT		
Datum objave	Datum veljavnosti	Šifra: NZD-LAB-002
		Verzija: 03
		Priloge: 4
Izdelal: Marko Dragan	Pregledal: Dr. Boštjan Jančar	Odobril: Tine Lavrič

POVZETEK SPREMEMB

Verzija	Opis
01	Prva izdaja
02	Sprememba oznake dokumenta. Označene strani v obrazcih OBR1 in OBR2.
03	Posodobljene odgovornosti osebja zaradi novega delovnega mesta JLM.

RAZLAGA KRATIC IN POJMOV

HPLC	High performance liquid chromatography (Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti)
NZD	Navodila za delo
PC	Osebni računalnik
SOP	Standard Operating Procedure (Standardni operativni postopek)

KAZALO

1.	NAMEN IN PODROČJE UPORABE	2
2.	ODGOVORNOSTI	2
3.	MATERIALI IN OPREMA	2
3.1	Oprema.....	2
3.2	Materiali.....	2
4.	ZASNOVA IN FUNKCIJE NAPRAVE	3
5.	KARAKTERISTIKA HPLC SISTEMA	3
5.1	Razplinjevalnik mobilne faze - degazer, črpalka.....	3
5.2	Avtomatski vzorčevalnik, injektor.....	3
5.3	Grelec za kolono.....	4
5.4	Hladilnik.....	4
5.5	Detektor.....	4
5.5.1	Merilna pretočna celica.....	4
6.	ROKOVANJE S HPLC SISTEMOM	4
6.1	Vklop HPLC sistema.....	4
6.2	Upravljanje s HPLC sistemom in priprava sistema na analizo.....	4
7.	VZDRŽEVANJE	4
7.1	Spiranje batnih tesnil črpalke (seal wash).....	4
7.2	Spiranje ležišča igle (needle wash).....	5
7.3	Dovoljeni servisni posegi.....	5
7.4	Reševanje težav.....	5
8.	REFERENCE	6

**NAVODILO ZA DELO S SISTEMOM ZA TEKOCIŠKO
KROMATOGRAFIJO VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)
INFINITY II AGILENT**



Šifra: **NZD-LAB-002**

Verzija: **03**

9. PRILOGE 6

1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Namen tega navodila za delo (NZD) je opisati osnovno uporabo HPLC sistema Agilent Infinity II ali podobnim. Uporablja se kot dodatek specifičnim analitskim postopkom, le za sistem Agilent Infinity II. Navodila za upravljanje sistema preko programske opreme OpenLAB je opisano v NZD-LAB-008 - Navodilo za delo s programsko opremo OpenLAB CDS.

2. ODGOVORNOSTI

Seznamitev in odgovornosti osebja so povzete v tabeli 1.

Tabela 1: Odgovornosti osebja za obseg zmogljivosti organizacijske enote Analitski laboratoriji (LAB).

ODGOVORNOST	ALT	JLM	MAN/LAB	CDO/LAB
Seznanjenje in upoštevanje navodil za ravnanje z opremo	Z	Z	Z	I
Vpis dogodkov na opremi	Z	Z	S	
Redno mesečno preverjanje vpisov rednih preverjanj in dogodkov na opremi	S	S	Z	

ODGOVORNE FUNKCIJE	OZNAKA
Analytical Laboratory Technician	ALT
Junior Laboratory Manager	JLM
Analytical Laboratory Manager	MAN/LAB
Chief Department Officer/LAB	CDO/LAB

OBSEG	OZNAKA
Zadolžen	Z
Sodeluje	S
Informiran	I

Funkcije posameznega osebja v LAB so podrobneje opredeljene v SOP-LAB-009 - Delovne naloge, odgovornosti in pooblastila.

3. MATERIALI IN OPREMA

3.1 Oprema

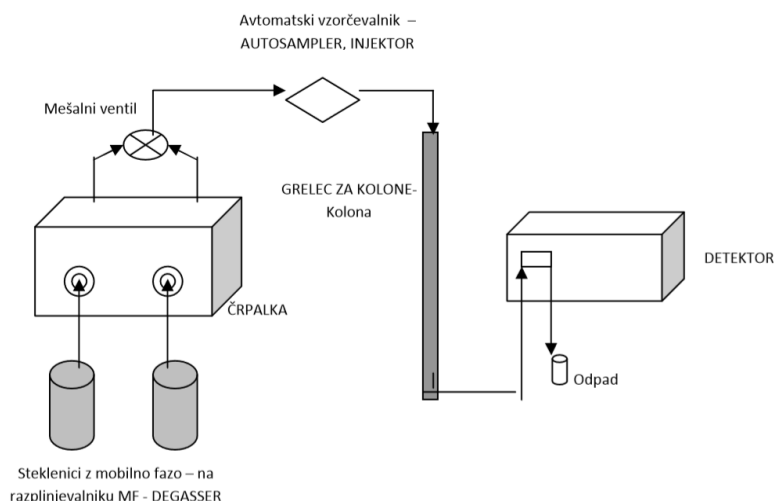
- QC-03, Sistem za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) Infinity II, Agilent

3.2 Materiali

- SP-0005, Suhe krpe za brisanje Dastex
- SP-0001, 70% etanol
- OP-0023, Kapilare
- OP-0023, Peristaltična črpalka
- OP-0023, Frita za ventil

**NAVODILO ZA DELO S SISTEMOM ZA TEKOČINSKO
KROMATOGRAFIJO VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)
INFINITY II AGILENT**

4. ZASNOVA IN FUNKCIJE NAPRAVE



Slika 1: Shematski pregled sistema HPLC

5. KARAKTERISTIKA HPLC SISTEMA

HPLC sistemi Agilent Infinity II omogočajo delovanje pri tlakih do 600 barov. Sestavljeni so iz naslednjih modulov:

- razplinjevalnik mobilne faze - degazer,
- črpalka,
- avtomatski vzorčevalnik - autosampler z injektorjem,
- grelec za kolono,
- hladilnik,
- detektor.

5.1 Razplinjevalnik mobilne faze - degazer, črpalka

Voda in topila z nižjo molekulsko maso vsebujejo relativno veliko količino raztopljenega zraka, zato je potrebno mobilne faze razpliniti. Zrak v mobilni fazi lahko povzroči zračne mehurčke v črpalki ali v celici detektorja. Slednje lahko povzroča nihanja retencijskih časov kromatografskih vrhov ali večji šum na bazni liniji.

Razplinjenje z vakuumom poteka sočasno (on-line) s črpanjem mobilne faze skozi razplinjevalnik, pri čemer topilo teče po polprepustni cevi, ki se nahaja v prostoru z vakuumom. Dodatno zaščito pred zračnimi mehurčki nudijo stekleni filtri, ki so nameščeni na koncu cevk v mobilni fazi.

Črpalka mora zagotavljati natančen in konstanten pretok, natančno sestavo mobilne faze v primeru gradienta ter zadostno moč, s katero potiska mobilno fazo skozi kolono.

5.2 Avtomatski vzorčevalnik, injektor

Od sistema za injiciranje je zahtevano, da privede vzorec na začetek kolone, ne da bi se pri tem ustavilo ali motilo pretok mobilne faze proti koloni. Injektor mora biti natančen pri injiciranju in hkrati mora zagotoviti ponovljivost injiciranja.

Injektor deluje po principu injektorske zanke. V času polnjenja injektorske zanke z vzorcem teče mobilna faza mimo injektorske zanke. Ko se ventil obrne, pa mobilna faza spere vzorec v zanko na kolono.

**NAVODILO ZA DELO S SISTEMOM ZA TEKOČINSKO
KROMATOGRAFIJO VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)
INFINITY II AGILENT**



Šifra: **NZD-LAB-002**

Verzija: **03**

5.3 Grelec za kolono

Stabilnost temperature je pomemben parameter za ustreznost analize. Stabilno temperaturo zagotavlja grelec za kolono, pri tem pa je pomembno, da je pokrov grelca v času izvajanja analiz zaprt.

5.4 Hladilnik

Hladilnik zagotavlja ustrezno temperaturo vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku. Vzorci morajo biti na ustrezni temperaturi pred in tudi po analizi, dokler jih ne shranimo ustrezno za daljše časovno obdobje.

5.5 Detektor

Detektor je odgovoren za zaznavo substance, ločene na koloni. Vsi detektorji merijo spremembo neke fizikalne količine, ki jo povzroči prehod substance skozi merilno pretočno celico detektorja. Ločimo tri osnovne vrste detektorja (DAD, MWD in VWD), ki se med seboj razlikujejo glede na število valovnih dolžin zajema podatkov.

Detektor je potrebno vsaj 1 x tedensko ugasniti in ponovno vklopiti. Pri vklopu detektorja se izvede avto kalibracija detektorja - verifikacija štirih valovnih dolžin.

5.5.1 Merilna pretočna celica

Merilne pretočne celice se razlikujejo po dolžini optične poti, pri trenutni konfiguraciji sistema HPLC1 uporabljamo 60 mm pretočno celico.

6. ROKOVANJE S HPLC SISTEMOM

6.1 Vklop HPLC sistema

Ko je sistem ugasnjen, ga je potrebno vklopiti v naslednjem vrstnem redu:

- osebni računalnik - PC,
- posamezne module HPLC sistema (tipke power on/off),
- zagon programa za obdelavo kromatografskih podatkov.

Sistem je potrebno redno izklapljeti in vklapljati (resetirati), saj s tem zagotovimo redno avtomatsko kalibracijo komponent. Sistem izklopimo v obratnem vrstnem redu, kot ga vklopimo, med izklopom in ponovnim vklopom pa mora preteči vsaj 15 min. Sistem resetiramo vsaj 1 x tedensko.

6.2 Upravljanje s HPLC sistemom in priprava sistema na analizo

S sistemom upravljamo preko programskega paketa Agilent OpenLAB Chromatography Data System EZChrom Edition. Upravljanje in priprava HPLC sistema za analizo je natančno opisano v NZD-LAB-008.

7. VZDRŽEVANJE

7.1 Spiranje batnih tesnil črpalke (seal wash)

HPLC sistem je opremljen s sistemom za spiranje batnih tesnil (active seal wash option), ki podaljša življenjsko dobo batnih tesnil in batov. Agilent priporoča, da se za spiranje batnih tesnil uporablja raztopina voda:izopropanol=9:1 (v:v). Peristaltična črpalka v določenem časovnem intervalu potisne svežo raztopino skozi »seal wash« sistem in spere morebitne ostanke mobilne faze v odpad. Priporočen režim spiranja je 0,3 min delovanja vsakih 60 min. V primeru puščanja moramo zamenjati peristaltično črpalco. V primeru okvare ali napake pa je potrebno poklicati pooblaščen servis.

**NAVODILO ZA DELO S SISTEMOM ZA TEKOČINSKO
KROMATOGRAFIJO VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)
INFINITY II AGILENT**



Šifra: **NZD-LAB-002**

Verzija: **03**

7.2 Spiranje ležišča igle (needle wash)

Avtomatski vzorčevalnik sistema HPLC je opremljen s sistemom za spiranje ležišča igle, ki zmanjšuje carry over med vzorci. Po priporočilih Agilenta se za spiranje ležišča igle uporablja organsko topilo z MQ vodo (50 - 100 %). Peristaltična črpalka po vsakem injiciranju potisne svežo raztopino skozi ležišče igle in spere morebitne ostanke analita ter na ta način zmanjšuje pojav carry over-ja. V primeru puščanja moramo zamenjati peristaltično črpalko.

7.3 Dovoljeni servisni posegi

Usposobljeno osebje v laboratoriju lahko nekatere enostavne servisne posege izvaja samo, med temi spadajo:

- zamenjava frite na »purge« ventilu,
- zamenjava peristaltične črpalke,
- zamenjava kapilare.

Za sistem HPLC vodimo dnevnik uporabe, kjer so zajeti podatki, navedeni v obrazcu OBR1-NZD-LAB-002 v prilogi 1 tega navodila za delo.

Poleg rednih dogodkov na opremi je potrebno voditi tudi dnevnik izrednih dogodkov, kot so servisni posegi, kvalifikacije in ostali izredni dogodki. Podatke vpisujemo, kot je navedeno v obrazcu OBR2-NZD-LAB-002.

7.4 Reševanje težav

V spodnji tabeli so zbrane najpogostejše težave z neustreznim delovanjem HPLC sistema.

Preglednica 1: Najpogostejše težave na HPLC sistemu

Vzrok/Sprememba	Verjetni problem /napaka	Reševanje težav
Visok tlak	Neprehodna frita na purge ventilu	Zamenjati frite na purge ventilu.
	Zamašitev kapilare Zamašen injektor	Sprati tako sistem kot iglo (z injiciranjem) in če ne pride do izboljšave zamenjati kapilare.
	Zamašena pretočna igla	Iglo ali ležišče igle lahko zamenja le pooblaščen servis.
Nizek tlak	Puščanje (Leak)	Ponovno namestiti oziroma dobro priviti kapilare ali kolono.
Nestabilen tlak	Zrak na sistemu	Odzračiti sistem.
	Okvara ene od črpalk	Poklicati servis.
Šum bazne linije DAD detektorja	Pregorela DAD žarnica	Poklicati servis.
Ravna bazna linija (DAD)	Neustrezno vstavljena pretočna celica (DAD)	Ponovno namestiti pretočno celico.

**NAVODILO ZA DELO S SISTEMOM ZA TEKOČINSKO
KROMATOGRAFIJO VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)
INFINITY II AGILENT**

8. REFERENCE

- ISO 9001:2015 - Sistemi vodenja kakovosti - Zahteve
- ISO/IEC 17025:2017 - Splošne zahteve za usposobljenost preskuševalnih in kalibracijskih laboratorijev
- ISO 22000:2018 - Sistemi vodenja varnosti živil - Zahteve za vsako organizacijo v prehranski verigi
- ISO 22716:2007 - Kozmetika - Dobra proizvodna praksa (GMP) - Smernice za dobro proizvodno prakso
- Priročnik za uporabo Agilent Infinity II 1260
- Smernice z dne 19. marca 2015 o načelih dobre distribucijske prakse za zdravilne učinkovine za zdravila za uporabo v humani medicini (2015/C 95/01) (GDP)
- NZD-LAB-008 - Navodilo za delo s programsko opremo OpenLAB CDS
- SOP-LAB-009 - Delovne naloge, odgovornosti in pooblastil

9. PRILOGE

- Priloga 1: Dnevnik uporabe
- Priloga 2: Dnevnik izrednih dogodkov
- Priloga 3: List usposabljanja/seznanjenosti
- Priloga 4: Zgodovina dokumenta

**NAVODILO ZA DELO S SISTEMOM ZA TEKOČINSKO
KROMATOGRAFIJO VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)
INFINITY II AGILENT**

Pharma  Hemp®

Šifra: **OBR1-NZD-LAB-002**

Verzija: **03**

PRILOGA 1: Dnevnik uporabe

Stran __ od __

Datum	ID / Ime analize	Kolona (oznaka kolone ali LOT)	Metoda	Spiranje sistema	Uporabnik	Pregled in podpis

**NAVODILO ZA DELO S SISTEMOM ZA TEKOČINSKO
KROMATOGRAFIJO VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)
INFINITY II AGILENT**



Šifra: **OBR2-NZD-LAB-002**

Verzija: **03**

PRILOGA 2: Dnevnik izrednih dogodkov

Stran __ od __

Datum	Poseg na opremi (servisni posegi, kvalifikacija, izredni dogodki)	Podpis	Mesečno preverjanje dogodkov na opremi

**NAVODILO ZA DELO S SISTEMOM ZA TEKOČINSKO
KROMATOGRAFIJO VIŠOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)
INFINITY II AGILENT**



Šifra: **NZD-LAB-002**

Verzija: **03**

PRILOGA 3: List usposabljanja/seznanjenosti

Obseg usposabljanja	
Obseg seznanjenosti	LAB

Ime in priimek	Org. enota	Delovno mesto	U - Usposabljanje S - Seznanjenost	Datum	Podpis
Janez Gerdenc	LAB	JLM	☐ U ☐ S		
Karmen Korbar	LAB	ALT	☐ U ☐ S		
Aleksander Jefim	LAB	ALT	☐ U ☐ S		
			☐ U ☐ S		
			☐ U ☐ S		
			☐ U ☐ S		
			☐ U ☐ S		
			☐ U ☐ S		
			☐ U ☐ S		
			☐ U ☐ S		
			☐ U ☐ S		
			☐ U ☐ S		
			☐ U ☐ S		
			☐ U ☐ S		
			☐ U ☐ S		

NAVODILO ZA DELO S SISTEMOM ZA TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC) INFINITY II AGILENT PRILOGA 4: Zgodovina dokumenta	Pharma  Hemp®
	Šifra: NZD-LAB-002
	Verzija: 03

Verzija	Razlog za spremembo	Veljavno od	Zamenjano z novo verzijo (datum, podpis)
01	Prva izdaja	19. 08. 2019	10. 08. 2020
02	Spremenjena oznaka dokumenta iz NZD-KAK-002 v NZD-LAB-002. Dopolnjene odgovornosti s kraticami posameznih delovnih mest. Dodane strani v obrazcih OBR1 in OBR2.	10. 08. 2020	
03	Posodobljena obravnava odgovornosti osebja v poglavju 2. Odprava slovničnih napak.		