



Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας

Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση

Διπλωματική Εργασία

Επικύρωση Αναλυτικής Μεθόδου HPLC σε Φαρμακευτικό Σκεύασμα
με Αξιολόγηση Χρωματογραφικών Συνθηκών

Δανάη Παχίδα

Επιβλέπων καθηγητής: Αναστάσιος Καμπόλης

Πάτρα, Ιούνιος 2026

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του/της φοιτητή/φοιτήτριας («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν με οποιονδήποτε τρόπο στην εκπόνησή της.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνω στον επιβλέποντα καθηγητή μου για την καθοδήγηση, την επιστημονική υποστήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω το προσωπικό του εργαστηρίου και τους συνεργάτες που συνέβαλαν στην πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους, παρέχοντας την απαραίτητη τεχνική υποστήριξη και πολύτιμη βοήθεια.

Τέλος, εκφράζω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη στην οικογένειά μου και στους ανθρώπους που με στήριξαν ηθικά κατά τη διάρκεια των σπουδών μου, για την υπομονή, την κατανόηση και την αμέριστη συμπαράστασή τους.

Η συμβολή όλων υπήρξε καθοριστική για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Περίληψη

Η επικύρωση και η επαλήθευση αναλυτικών μεθόδων αποτελούν θεμελιώδεις διαδικασίες για τη διασφάλιση της ποιότητας, της αξιοπιστίας και της ακρίβειας των αποτελεσμάτων που παράγονται κατά τον ποιοτικό έλεγχο φαρμακευτικών προϊόντων. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) αποτελεί μία από τις πλέον διαδεδομένες αναλυτικές τεχνικές στη φαρμακευτική βιομηχανία, λόγω της υψηλής εκλεκτικότητας, ευαισθησίας και επαναληψιμότητας που παρουσιάζει.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η επαλήθευση της αναλυτικής μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης (Alfuzosin HCl) σε δισκία παρατεταμένης αποδέσμευσης 10 mg, σύμφωνα με τις απαιτήσεις της κατευθυντήριας οδηγίας PA/PH/OMCL (13) 82 R5 για φαρμακευτικά προϊόντα δεύτερου κατόχου άδειας κυκλοφορίας. Η επαλήθευση της μεθόδου περιλάμβανε την αξιολόγηση των παραμέτρων ειδικότητας, γραμμικότητας, ακρίβειας και επαναληψιμότητας, ενώ παράλληλα, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση των χρωματογραφικών συνθηκών και των παραμέτρων που επηρεάζουν την απόδοση της μεθόδου HPLC.

Λέξεις-κλειδιά: Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), υδροχλωρική αλφουζοσίνη, επικύρωση αναλυτικής μεθόδου, επαλήθευση αναλυτικής μεθόδου, φαρμακευτικά προϊόντα, ποιοτικός έλεγχος.

Abstract

Validation and verification of analytical methods are essential procedures for ensuring the quality, reliability, and accuracy of results generated during the quality control of pharmaceutical products. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) is one of the most widely used analytical techniques in the pharmaceutical industry due to its high selectivity, sensitivity, and reproducibility.

The aim of the present study was to verify the analytical assay method for the determination of Alfuzosin Hydrochloride (Alfuzosin HCl) in 10 mg prolonged-release tablets according to the requirements of the PA/PH/OMCL (13) 82 R5 guideline for second Marketing Authorization Holder (2nd MAH) medicinal products.

Method verification included the evaluation of specificity, linearity, accuracy, and repeatability. In addition, the chromatographic conditions and the critical parameters affecting method performance were evaluated.

Keywords: High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Alfuzosin Hydrochloride, analytical method validation, analytical method verification, pharmaceutical analysis, quality control.

Συντομεύσεις και Ακρωνύμια

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
RP-HPLC	Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography
API	Active Pharmaceutical Ingredient
UV	Ultraviolet
RSD	Relative Standard Deviation
SST	System Suitability Test
USP	United States Pharmacopoeia
EP	European Pharmacopoeia
ICH	International Council for Harmonisation
OMCL	Official Medicines Control Laboratories
AQbD	Analytical Quality by Design
CMP	Critical Method Parameter
MODR	Method Operable Design Region
MAH	Marketing Authorization Holder
HCl	Hydrochloride
ppm	Parts Per Million
µg/mL	Micrograms per millilitre
Rs	Resolution
N	Number of Theoretical Plates
tR	Retention Time
k'	Retention Factor

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φαρμακευτική ανάλυση και ποιοτικός έλεγχος φαρμακευτικών προϊόντων	13
1.2 Αναλυτικές μέθοδοι στη φαρμακευτική βιομηχανία	14
1.3 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ως εργαλείο ποιοτικού ελέγχου	15
1.4 Επικύρωση αναλυτικών μεθόδων και κανονιστικό πλαίσιο	16

2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

2.1 Χρωματογραφία: γενικές αρχές και εφαρμογές	18
2.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης	19
2.3 Βασικά μέρη ενός συστήματος HPLC	19
2.4 Στατική και κινητή φάση	20
2.5 Χρωματογραφικές παράμετροι αξιολόγησης	21

3. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΤΗΣ HPLC

3.1 Ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων στη φαρμακευτική βιομηχανία	22
3.2 Επιλογή Χρωματογραφικής Στήλης	24
3.2.1 Ο ρόλος της χρωματογραφικής στήλης στον διαχωρισμό	24
3.2.2 Δομή και χαρακτηριστικά των χρωματογραφικών στηλών	25
3.2.3 Στήλες αντίστροφης φάσης (Reverse Phase Columns)	26
3.2.4 Στήλες C18 (Octadecylsilane Columns).....	26
3.2.5 Στήλες C8	27
3.2.6 Στήλες Phenyl	28
3.2.7 Στήλες Cyano	28
3.2.8 Επίδραση του μεγέθους σωματιδίων.....	29
3.2.9 Διαστάσεις στήλης και επίδραση στην απόδοση	29
3.2.10 Κριτήρια επιλογής στήλης κατά την ανάπτυξη μεθόδου	30
3.3 Επιλογή Κινητής Φάσης.....	31
3.3.1 Ο ρόλος της κινητής φάσης στη χρωματογραφία HPLC	31
3.3.2 Υδατικό συστατικό της κινητής φάσης	31
3.3.3 Ρυθμιστικά διαλύματα (Buffers)	32
3.3.4 Οργανικοί διαλύτες	33
3.3.5 Ισοκρατική και βαθμιδωτή έκλυση	34

3.3.6 Επίδραση της σύστασης της κινητής φάσης	34
3.3.7 Επιλογή κινητής φάσης κατά την ανάπτυξη της μεθόδου	35
3.4 Επίδραση του pH στη Χρωματογραφική Συμπεριφορά των αναλυτών	
3.4.1 Εισαγωγή	35
3.4.2 Έννοια του pKa και βαθμός ιονισμού.....	36
3.4.3 Επίδραση του ιονισμού στην κατακράτηση	37
3.4.4 Συμπεριφορά όξινων ενώσεων	37
3.4.5 Συμπεριφορά βασικών ενώσεων	38
3.4.6 Επίδραση του pH στη συμμετρία των κορυφών	38
3.4.7 Περιορισμοί pH και σταθερότητα της στήλης	39
3.4.8 Ρόλος του pH στη βελτιστοποίηση της μεθόδου	39
3.5 Βελτιστοποίηση των Χρωματογραφικών Συνθηκών	
3.5.1 Εισαγωγή	39
3.5.2 Βελτιστοποίηση του ρυθμού ροής (Flow Rate)	40
3.5.3 Βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας της στήλης	41
3.5.4 Βελτιστοποίηση της αναλογίας οργανικού διαλύτη	41
3.5.5 Βελτιστοποίηση του όγκου έγχυσης	42
3.5.6 Βελτιστοποίηση του χρόνου ανάλυσης	42
3.5.7 Παράμετροι αξιολόγησης της βελτιστοποίησης	43
3.5.8 Σύγχρονες προσεγγίσεις βελτιστοποίησης	43
3.5.9 Συμπεράσματα	44
4. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	
4.1 Έννοια και σημασία της επικύρωσης αναλυτικών μεθόδων	44
4.2 Κανονιστικό πλαίσιο επικύρωσης αναλυτικών μεθόδων	46
4.2.1 Ο ρόλος του International Council for Harmonisation (ICH)	47
4.2.2 ICH Q2(R2): Validation of Analytical Procedures	47
4.2.3 ICH Q14: Analytical Procedure Development	48
4.2.4 United States Pharmacopoeia (USP)	49
4.2.5 Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία	50
4.2.6 FDA Guidance for Industry	50

4.3 Ειδικότητα (Specificity).....	50
4.3.1 Ορισμός και σημασία της ειδικότητας	50
4.3.2 Ειδικότητα σε μεθόδους HPLC προσδιορισμού δραστικής ουσίας	51
4.3.3 Παρεμβολές από έκδοχα και προσμίξεις	52
4.3.4 Forced Degradation Studies και Stability-Indicating Methods	53
4.3.5 Αξιολόγηση της ειδικότητας μέσω PDA ανιχνευτών	53
4.3.6 Κριτήρια αποδοχής για την ειδικότητα	54
4.4 Γραμμικότητα (Linearity) και Εύρος (Range)	54
4.4.1 Έννοια της γραμμικότητας	55
4.4.2 Θεωρητική βάση της γραμμικής παλινδρόμησης	55
4.4.3 Κατασκευή καμπύλης αναφοράς	56
4.4.4 Συντελεστής συσχέτισης και περιορισμοί του	57
4.4.5 Εύρος (Range)	57
4.4.6 Κριτήρια αποδοχής	58
4.4.7 Στατιστική αξιολόγηση του μοντέλου βαθμονόμησης	59
4.4.7.1 Περιορισμοί του συντελεστή συσχέτισης	59
4.4.7.2 Ανάλυση καταλοίπων (Residual Analysis)	59
4.4.7.3 Weighted Regression	60
4.4.7.4 Back-Calculated Concentrations	61
4.4.7.5 Ανάλυση Διακύμανσης (ANOVA)	61
4.5 Ακρίβεια (Accuracy)	62
4.5.1 Ορισμός και σημασία της ακρίβειας	62
4.5.2 Θεωρητική προσέγγιση της ακρίβειας	63
4.5.3 Αξιολόγηση της ακρίβειας σε μεθόδους HPLC	64
4.5.4 Recovery Studies	64
4.5.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την ακρίβεια	65
4.5.6 Κριτήρια αποδοχής	65
4.5.7 Σημασία της ακρίβειας στο πλαίσιο της επικύρωσης	66
4.6 Πιστότητα (Precision)	66
4.6.1 Ορισμός και σημασία της πιστότητας	66
4.6.2 Στατιστική έκφραση της πιστότητας	67

4.6.3 Επαναληψιμότητα (Repeatability)	68
4.6.4 Ενδιάμεση πιστότητα (Intermediate Precision)	69
4.6.5 Αναπαραγωγιμότητα (Reproducibility)	69
4.6.6 Παράγοντες που επηρεάζουν την πιστότητα	70
4.6.7 Κριτήρια αποδοχής	71
4.7 Όριο Ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και Όριο Ποσοτικοποίησης (Limit of Quantitation, LOQ)	71
4.7.1 Εισαγωγή	71
4.7.2 Όριο Ανίχνευσης (LOD)	72
4.7.3 Όριο Ποσοτικοποίησης (LOQ)	72
4.7.4 Προσδιορισμός LOD και LOQ	73
4.7.5 Λόγος σήματος προς θόρυβο (Signal-to-Noise Ratio)	74
4.7.6 Σημασία των LOD και LOQ στις μεθόδους HPLC Assay	74
4.7.7 Συμπεράσματα	75
4.8 Ανθεκτικότητα (Robustness)	75
4.8.1 Έννοια και σημασία της ανθεκτικότητας	75
4.8.2 Ανθεκτικότητα και κύκλος ζωής αναλυτικής διαδικασίας	76
4.8.3 Παράγοντες που αξιολογούνται σε μεθόδους HPLC	76
4.8.4 Επίδραση του pH της κινητής φάσης	77
4.8.5 Επίδραση της σύστασης της κινητής φάσης	78
4.8.6 Επίδραση του ρυθμού ροής	78
4.8.7 Επίδραση της θερμοκρασίας στήλης	79
4.8.8 Αξιολόγηση αποτελεσμάτων ανθεκτικότητας	79
4.8.9 Σημασία της ανθεκτικότητας για την αξιολόγηση των Χρωματογραφικών Συνθηκών	80
4.9 Έλεγχος Καταλληλότητας Συστήματος (System Suitability Testing)	80
4.9.1 Εισαγωγή	80
4.9.2 Στόχοι του System Suitability Testing	81
4.9.3 Χρωματογραφικές παράμετροι αξιολόγησης	82
4.9.4 Χρόνος κατακράτησης (Retention Time)	83
4.9.5 Αριθμός θεωρητικών πλακών (Number of Theoretical Plates)	83
4.9.6 Διακριτική ικανότητα (Resolution)	83

4.9.7 Παράγοντας Συμμετρίας (Tailing Factor)	84
4.9.8 Πιστότητα του συστήματος (%RSD)	85
4.9.9 Σχέση SST και επικύρωσης της μεθόδου	86
5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
5.1 Σκοπός της μελέτης	86
5.2 Πεδίο εφαρμογής	86
5.3 Αναλυτική μέθοδος	87
5.4 Όργανα και αντιδραστήρια	88
5.5 Χρωματογραφικές συνθήκες	88
5.6 Παρασκευή κινητής φάσης	88
5.7 Παρασκευή πρότυπου διαλύματος	89
5.8 Παρασκευή διαλύματος δείγματος	89
5.9 Έλεγχος καταλληλότητας συστήματος	90
5.10 Διαδικασία ανάλυσης	90
5.11 Υπολογισμός περιεκτικότητας	90
5.12 Προδιαγραφές αποδοχής	91
5.13 Αξιολόγηση ειδικότητας (Specificity)	91
5.13.1 Αποτελέσματα Ελέγχου Καταλληλότητας Συστήματος.....	92
5.13.2 Αποτελέσματα Ειδικότητας	92
5.14 Αξιολόγηση γραμμικότητας (Linearity)	94
5.14.1 Προετοιμασία Διαλυμάτων Γραμμικότητας	94
5.14.2 Έλεγχος καταλληλότητας συστήματος	95
5.14.3 Αποτελέσματα Γραμμικότητας	95
5.14.4 Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων	98
5.15 Αξιολόγηση ακρίβειας (Accuracy)	99
5.16 Αξιολόγηση επαναληψιμότητας (Repeatability)	100
5.17 Αξιολόγηση ανθεκτικότητας (Robustness)	103
5.17.1 Επίδραση μεταβολής του ρυθμού ροής	103
5.17.2 Επίδραση μεταβολής του μήκους κύματος	104
5.17.3 Επίδραση θερμοκρασίας	104
5.17.4 Επίδραση μεταβολής pH	104

5.17.5 Επίδραση αλλαγής στήλης	105
5.17.6 Σταθερότητα Διαλυμάτων	105
5.17.7 Συμπεράσματα Ανθεκτικότητας	105
5.17.8 Αξιολόγηση Ανθεκτικότητας	105
5.18 Συνολική αξιολόγηση της επαλήθευσης της μεθόδου	110
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	113

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φαρμακευτική ανάλυση και ποιοτικός έλεγχος φαρμακευτικών προϊόντων

Η φαρμακευτική ανάλυση αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους τομείς των φαρμακευτικών επιστημών, καθώς διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στον έλεγχο και τη διασφάλιση της ποιότητας των φαρμακευτικών προϊόντων. Μέσω εξειδικευμένων αναλυτικών μεθόδων είναι δυνατή η ταυτοποίηση και η ποσοτική εκτίμηση των δραστικών ουσιών, των εκδόχων, καθώς και των πιθανών προσμίξεων ή προϊόντων αποδόμησης που μπορεί να περιέχονται σε ένα φαρμακευτικό σκεύασμα. Οι διαδικασίες αυτές είναι απαραίτητες για την επιβεβαίωση της ασφάλειας, της αποτελεσματικότητας και της συμμόρφωσης των προϊόντων με τις ισχύουσες κανονιστικές απαιτήσεις (Snyder et al., 2010).

Η ανάγκη για αξιόπιστο αναλυτικό έλεγχο προκύπτει από το γεγονός ότι ακόμη και μικρές αποκλίσεις στη σύσταση ενός φαρμάκου μπορεί να επηρεάσουν τη θεραπευτική του δράση ή να οδηγήσουν στην εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών. Για τον λόγο αυτό, η ποιότητα των φαρμακευτικών προϊόντων ελέγχεται σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, από την παραλαβή των πρώτων υλών μέχρι την τελική αποδέσμευση του προϊόντος στην αγορά (ICH, 2023a).

Στο πλαίσιο της σύγχρονης φαρμακοβιομηχανίας, η ποιότητα δεν θεωρείται χαρακτηριστικό που ελέγχεται αποκλειστικά στο τελικό προϊόν, αλλά αποτέλεσμα ενός ολοκληρωμένου συστήματος σχεδιασμού, ανάπτυξης και ελέγχου. Οι αναλυτικές μέθοδοι αποτελούν βασικό εργαλείο αυτού του συστήματος, καθώς παρέχουν αντικειμενικά δεδομένα για την αξιολόγηση της συμμόρφωσης ενός προϊόντος με προκαθορισμένες προδιαγραφές ποιότητας (USP, 2024).

Οι διεθνείς ρυθμιστικές αρχές έχουν αναγνωρίσει την κρισιμότητα των αναλυτικών διαδικασιών και απαιτούν την εφαρμογή κατάλληλα αναπτυγμένων και επικυρωμένων

μεθόδων πριν από την κυκλοφορία ενός φαρμακευτικού προϊόντος στην αγορά (FDA, 2015).

1.2 Αναλυτικές μέθοδοι στη φαρμακευτική βιομηχανία

Οι αναλυτικές μέθοδοι διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο σε όλα τα στάδια του κύκλου ζωής ενός φαρμακευτικού προϊόντος, από τη φάση της έρευνας και ανάπτυξης έως την παραγωγή, τον ποιοτικό έλεγχο και τις μελέτες σταθερότητας. Κατά τη διάρκεια της φαρμακευτικής ανάπτυξης, οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό της δραστικής ουσίας, την αξιολόγηση των φυσικοχημικών της ιδιοτήτων, τη διερεύνηση της σταθερότητάς της και την ανίχνευση ή ποσοτικοποίηση πιθανών προϊόντων αποδόμησης. Η συμβολή τους είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς παρέχουν τα απαραίτητα δεδομένα για τη διασφάλιση της ποιότητας και της ασφάλειας του τελικού φαρμακευτικού προϊόντος (ICH, 2023b).

Η αυξανόμενη πολυπλοκότητα των σύγχρονων φαρμακευτικών μορφών έχει οδηγήσει στην ανάγκη ανάπτυξης ιδιαίτερα ευαίσθητων και εκλεκτικών αναλυτικών τεχνικών. Οι τεχνικές αυτές πρέπει να είναι ικανές να ανιχνεύουν ουσίες σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, να διαχωρίζουν αποτελεσματικά ενώσεις με παρόμοια χημική δομή και να παρέχουν αποτελέσματα με υψηλή ακρίβεια και επαναληψιμότητα (Kazakevich & Lobrutto, 2007).

Παράλληλα, οι αναλυτικές μέθοδοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εφαρμογή της φιλοσοφίας Quality by Design (QbD), η οποία προωθεί τη συστηματική κατανόηση των διεργασιών και τον έλεγχο των κρίσιμων παραμέτρων ποιότητας μέσω επιστημονικής τεκμηρίωσης και διαχείρισης κινδύνου (ICH, 2023b).

1.3 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) ως εργαλείο ποιοτικού ελέγχου

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες αναλυτικές τεχνικές στη φαρμακευτική βιομηχανία. Η ευρεία εφαρμογή της οφείλεται στην ικανότητά της να διαχωρίζει, να

ταυτοποιεί και να ποσοτικοποιεί χημικές ενώσεις ακόμη και σε πολύπλοκα μίγματα με υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία (Dong, 2019).

Η αρχή λειτουργίας της HPLC βασίζεται στη διαφορετική αλληλεπίδραση των συστατικών ενός δείγματος με τη στατική και την κινητή φάση. Οι διαφορές αυτές οδηγούν σε διαφορετικούς χρόνους κατακράτησης, επιτρέποντας τον αποτελεσματικό διαχωρισμό των αναλυτών (Snyder et al., 2010).

Η HPLC χρησιμοποιείται εκτενώς για τον προσδιορισμό δραστικών ουσιών σε φαρμακευτικά σκευάσματα, για τη μελέτη προσμίξεων και προϊόντων αποδόμησης, καθώς και για τον έλεγχο σταθερότητας φαρμακευτικών προϊόντων. Η σημασία της τεχνικής αυτής αντικατοπτρίζεται και στις μονογραφίες της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας, όπου η HPLC αποτελεί τη συχνότερα χρησιμοποιούμενη αναλυτική μέθοδο για τον ποσοτικό προσδιορισμό δραστικών ουσιών (European Pharmacopoeia, 2023).

Η απόδοση μιας χρωματογραφικής μεθόδου εξαρτάται από παραμέτρους όπως η επιλογή της στήλης, η σύσταση της κινητής φάσης, το pH, η θερμοκρασία της στήλης και ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης. Η βελτιστοποίηση των παραμέτρων αυτών αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την επίτευξη κατάλληλου διαχωρισμού και αξιόπιστων αναλυτικών αποτελεσμάτων (USP, 2024).

1.4 Επικύρωση αναλυτικών μεθόδων και κανονιστικό πλαίσιο

Η επικύρωση αναλυτικής μεθόδου ορίζεται ως η διαδικασία μέσω της οποίας τεκμηριώνεται ότι μια αναλυτική διαδικασία είναι κατάλληλη για τον σκοπό για τον οποίο προορίζεται (ICH, 2023a). Η διαδικασία αυτή αποτελεί θεμελιώδη απαίτηση των διεθνών ρυθμιστικών αρχών και εφαρμόζεται τόσο κατά την ανάπτυξη νέων μεθόδων όσο και κατά την τροποποίηση υφιστάμενων διαδικασιών.

Σύμφωνα με την κατευθυντήρια οδηγία ICH Q2(R2), η επικύρωση περιλαμβάνει την αξιολόγηση συγκεκριμένων χαρακτηριστικών απόδοσης, όπως η ειδικότητα, η γραμμικότητα, η ακρίβεια, η πιστότητα, το όριο ανίχνευσης, το όριο ποσοτικοποίησης και

η ανθεκτικότητα (ICH, 2023a). Η εφαρμογή της επικύρωσης είναι απαραίτητη, καθώς κάθε αναλυτική μέθοδος επηρεάζεται από παράγοντες όπως ο εξοπλισμός, ο χειριστής, τα αντιδραστήρια και οι περιβαλλοντικές συνθήκες. Η αξιολόγηση αυτών των παραγόντων επιτρέπει την εκτίμηση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων και συμβάλλει στη μείωση της αναλυτικής αβεβαιότητας (USP, 2024).

Τα τελευταία χρόνια, η προσέγγιση της επικύρωσης έχει επεκταθεί μέσω της οδηγίας ICH Q14, η οποία εισάγει την έννοια του κύκλου ζωής της αναλυτικής διαδικασίας και προωθεί την ενσωμάτωση εργαλείων διαχείρισης κινδύνου και επιστημονικής γνώσης κατά την ανάπτυξη και εφαρμογή αναλυτικών μεθόδων (ICH, 2023b).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

2.1 Χρωματογραφία: γενικές αρχές και εφαρμογές

Η χρωματογραφία αποτελεί μία από τις σημαντικότερες και πλέον διαδεδομένες τεχνικές διαχωρισμού στην αναλυτική χημεία. Η βασική αρχή της μεθόδου στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ δύο φάσεων, της κινητής και της στατικής φάσης. Καθώς το δείγμα μεταφέρεται μέσω της κινητής φάσης, τα επιμέρους συστατικά αλληλεπιδρούν σε διαφορετικό βαθμό με τη στατική φάση, με αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες και τελικά να διαχωρίζονται (Snyder et al., 2010).

Η χρωματογραφία εφαρμόζεται σε μεγάλο εύρος επιστημονικών πεδίων, όπως η φαρμακευτική ανάλυση, η βιοχημεία, η τοξικολογία, η περιβαλλοντική χημεία και η ανάλυση τροφίμων. Στη φαρμακευτική βιομηχανία χρησιμοποιείται εκτενώς για τον προσδιορισμό δραστικών ουσιών, τον έλεγχο προσμίξεων, τη μελέτη προϊόντων αποδόμησης και την παρακολούθηση της σταθερότητας των φαρμακευτικών προϊόντων (Kazakevich & Lobrutto, 2007).

Η ανάπτυξη των χρωματογραφικών τεχνικών κατά τον 20ό αιώνα οδήγησε στη δημιουργία πολλών διαφορετικών μορφών χρωματογραφίας, όπως η αέρια χρωματογραφία (GC), η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής και (HPLC). Μεταξύ αυτών, η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) έχει επικρατήσει ως η πλέον σημαντική τεχνική στον ποιοτικό έλεγχο φαρμάκων λόγω της υψηλής ακρίβειας, ευαισθησίας και επαναληψιμότητας που προσφέρει (Dong, 2019).

Η αποτελεσματικότητα ενός χρωματογραφικού διαχωρισμού εξαρτάται από την ισορροπία που αναπτύσσεται μεταξύ κινητής και στατικής φάσης. Όσο μεγαλύτερη είναι η αλληλεπίδραση ενός συστατικού με τη στατική φάση, τόσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος που απαιτείται για την έκλουσή του από τη στήλη. Η αρχή αυτή αποτελεί τη βάση όλων των χρωματογραφικών διαχωρισμών και καθορίζει τις παραμέτρους που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της χρωματογραφικής απόδοσης (European Pharmacopoeia, 2023).

2.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) αποτελεί εξελιγμένη μορφή υγρής χρωματογραφίας, στην οποία η κινητή φάση προωθείται μέσω της στήλης με τη χρήση αντλιών υψηλής πίεσης. Η εφαρμογή υψηλών πιέσεων επιτρέπει τη χρήση υλικών πληρώσεως μικρού μεγέθους σωματιδίων, γεγονός που αυξάνει σημαντικά την αποδοτικότητα του διαχωρισμού και βελτιώνει την ανάλυση σύνθετων μιγμάτων (Dong, 2019).

Η HPLC αναπτύχθηκε κατά τη δεκαετία του 1960 ως απάντηση στην ανάγκη για ταχύτερους και αποτελεσματικότερους διαχωρισμούς σε σύγκριση με την κλασική υγρή χρωματογραφία. Έκτοτε εξελίχθηκε σε βασικό εργαλείο της φαρμακευτικής βιομηχανίας και χρησιμοποιείται τόσο κατά την ανάπτυξη όσο και κατά τον ποιοτικό έλεγχο φαρμακευτικών προϊόντων (Snyder et al., 2010).

Η ευρεία αποδοχή της HPLC οφείλεται στην ικανότητά της να αναλύει ενώσεις με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων πολικών, μη πολικών, θερμοευαίσθητων και υψηλού μοριακού βάρους μορίων. Επιπλέον, η τεχνική χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία, δυνατότητα αυτοματοποίησης και εξαιρετική επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων, στοιχεία που την καθιστούν ιδανική για εφαρμογές ποιοτικού ελέγχου (USP, 2024). Η δυνατότητα συνδυασμού της με διαφορετικούς τύπους ανιχνευτών επιτρέπει την εφαρμογή της σε ένα ευρύ φάσμα αναλυτικών προβλημάτων (European Pharmacopoeia, 2023).

2.3 Βασικά μέρη ενός συστήματος HPLC

Ένα σύστημα HPLC αποτελείται από μία σειρά επιμέρους εξαρτημάτων που συνεργάζονται ώστε να επιτευχθεί ο διαχωρισμός και η ανίχνευση των αναλυτών. Τα κύρια μέρη του συστήματος περιλαμβάνουν τη δεξαμενή της κινητής φάσης, την αντλία υψηλής πίεσης, τον δειγματολήπτη, τη χρωματογραφική στήλη, τον ανιχνευτή και το σύστημα επεξεργασίας δεδομένων (Meyer, 2010).

Η αντλία θεωρείται ένα από τα σημαντικότερα τμήματα του συστήματος, καθώς είναι υπεύθυνη για την παροχή της κινητής φάσης με σταθερό ρυθμό ροής και υψηλή ακρίβεια. Μικρές αποκλίσεις στον ρυθμό ροής μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τους χρόνους κατακράτησης και κατ' επέκταση την αξιοπιστία της ανάλυσης (Kazakevich & Lobrutto, 2007).

Ο αυτόματος δειγματολήπτης επιτρέπει την εισαγωγή επαναλαμβανόμενων όγκων δείγματος με υψηλή ακρίβεια, συμβάλλοντας στη βελτίωση της επαναληψιμότητας της μεθόδου. Η χρήση αυτοματοποιημένων συστημάτων έχει περιορίσει σημαντικά τα σφάλματα που συνδέονται με τη χειροκίνητη έγχυση δειγμάτων (Dong, 2019).

Η χρωματογραφική στήλη αποτελεί το κεντρικό στοιχείο του συστήματος HPLC, καθώς εντός αυτής πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος. Η επιλογή της κατάλληλης στήλης επηρεάζει άμεσα την εκλεκτικότητα, την ανάλυση και τη συνολική απόδοση της μεθόδου (USP, 2024).

Τέλος, ο ανιχνευτής μετατρέπει τη συγκέντρωση του αναλύτη σε ηλεκτρικό σήμα, το οποίο καταγράφεται από το λογισμικό και παρουσιάζεται με τη μορφή χρωματογραφήματος. Οι ανιχνευτές υπεριώδους απορρόφησης (UV) και συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA) αποτελούν τους συχνότερα χρησιμοποιούμενους ανιχνευτές στη φαρμακευτική ανάλυση λόγω της υψηλής ευαισθησίας και της ευκολίας χρήσης τους (Snyder et al., 2010).

2.4 Στατική και κινητή φάση

Η αρχή λειτουργίας της HPLC βασίζεται στην αλληλεπίδραση των αναλυτών με δύο διακριτές φάσεις, την κινητή και τη στατική φάση, οι οποίες καθορίζουν τον μηχανισμό και την αποτελεσματικότητα του χρωματογραφικού διαχωρισμού. Η κινητή φάση αποτελείται συνήθως από κατάλληλο συνδυασμό υδατικών και οργανικών διαλυτών, οι οποίοι μεταφέρουν τα συστατικά του δείγματος μέσω της χρωματογραφικής στήλης. Αντίστοιχα, η στατική φάση αποτελείται από υλικά που είναι προσροφημένα ή χημικά δεσμευμένα στην επιφάνεια των σωματιδίων πλήρωσης της στήλης. Οι διαφορετικές αλληλεπιδράσεις των αναλυτών με τις δύο αυτές φάσεις οδηγούν σε διαφοροποίηση των χρόνων κατακράτησης και, κατά συνέπεια, στον διαχωρισμό των επιμέρους συστατικών του δείγματος (Carr, Stoll and Wang, 2020).

Η επιλογή της κινητής φάσης επηρεάζει άμεσα τη διαλυτότητα των αναλυτών, την εκλεκτικότητα του διαχωρισμού και τους χρόνους κατακράτησης. Παράγοντες όπως το pH, η ιοντική ισχύς και το ποσοστό οργανικού διαλύτη μπορούν να μεταβάλλουν σημαντικά τη χρωματογραφική συμπεριφορά των αναλυόμενων ουσιών (European Pharmacopoeia, 2023).

Η πλέον διαδεδομένη μορφή HPLC είναι η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (Reverse Phase HPLC), στην οποία χρησιμοποιούνται μη πολικές στάσιμες φάσεις, όπως οι στήλες C18, και σχετικά πολικές κινητές φάσεις αποτελούμενες από νερό, μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται στη συντριπτική πλειονότητα των φαρμακευτικών αναλύσεων λόγω της υψηλής ευελιξίας και αποτελεσματικότητάς της (USP, 2024).

2.5 Χρωματογραφικές παράμετροι αξιολόγησης

Η αξιολόγηση της απόδοσης μιας χρωματογραφικής μεθόδου βασίζεται σε συγκεκριμένες παραμέτρους οι οποίες περιγράφουν την ποιότητα του διαχωρισμού. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται ο χρόνος κατακράτησης (retention time), ο αριθμός θεωρητικών πλακών (N), ο παράγοντας συμμετρίας (tailing factor), η διακριτική ικανότητα (resolution) και ο συντελεστής χωρητικότητας (capacity factor) (European Pharmacopoeia, 2023).

Ο χρόνος κατακράτησης αντιπροσωπεύει τον χρόνο που απαιτείται για να μετακινηθεί μία ένωση από το σημείο έγχυσης έως τον ανιχνευτή. Αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό ταυτοποίησης μιας ουσίας υπό συγκεκριμένες χρωματογραφικές συνθήκες (USP, 2024). Η διακριτική ικανότητα (R_s) εκφράζει τον βαθμό διαχωρισμού δύο γειτονικών κορυφών. Τιμές μεγαλύτερες από 1,5 θεωρούνται γενικά επαρκείς για πλήρη διαχωρισμό, ενώ χαμηλότερες τιμές υποδηλώνουν πιθανή αλληλεπικάλυψη των κορυφών και μειωμένη αξιοπιστία ποσοτικοποίησης (European Pharmacopoeia, 2023).

Ο αριθμός θεωρητικών πλακών αποτελεί μέτρο της αποδοτικότητας της στήλης και σχετίζεται με την ευκρίνεια των κορυφών. Υψηλότερες τιμές υποδηλώνουν καλύτερη χρωματογραφική απόδοση και αποτελεσματικότερο διαχωρισμό (Snyder et al., 2010). Αυτές οι παράμετροι χρησιμοποιούνται συστηματικά κατά τον έλεγχο καταλληλότητας συστήματος (system suitability testing) και αποτελούν βασικά κριτήρια αποδοχής στο πλαίσιο της επικύρωσης αναλυτικών μεθόδων (USP, 2024).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Ανάπτυξη και Βελτιστοποίηση Αναλυτικής Μεθόδου HPLC

3.1 Ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων στη φαρμακευτική βιομηχανία

Η ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων (Analytical Method Development) αποτελεί θεμελιώδες στάδιο της φαρμακευτικής ανάπτυξης και προηγείται της διαδικασίας επικύρωσης. Στόχος της είναι ο σχεδιασμός μιας αναλυτικής διαδικασίας η οποία να είναι ικανή να παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα για τον επιδιωκόμενο σκοπό χρήσης της. Η επιτυχής ανάπτυξη

μιας μεθόδου προϋποθέτει την κατανόηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του αναλύτη, των χαρακτηριστικών της φαρμακευτικής μορφής και των απαιτήσεων της ανάλυσης που πρόκειται να πραγματοποιηθεί (ICH, 2023a).

Στη φαρμακευτική βιομηχανία, οι αναλυτικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται σε όλα τα στάδια του κύκλου ζωής ενός προϊόντος, από την έρευνα και ανάπτυξη έως τον ποιοτικό έλεγχο και τη μετακυκλοφοριακή παρακολούθηση. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη μιας μεθόδου δεν περιορίζεται στην επίτευξη ικανοποιητικού διαχωρισμού, αλλά αποσκοπεί στη δημιουργία μιας διαδικασίας που να είναι επιστημονικά τεκμηριωμένη, ανθεκτική και κατάλληλη για μακροχρόνια εφαρμογή (USP, 2024).

Η σύγχρονη προσέγγιση στην ανάπτυξη αναλυτικών διαδικασιών βασίζεται στη φιλοσοφία του κύκλου ζωής της αναλυτικής διαδικασίας (Analytical Procedure Lifecycle), η οποία εισήχθη μέσω της οδηγίας ICH Q14. Σύμφωνα με τη φιλοσοφία αυτή, η ανάπτυξη, η επικύρωση και η συνεχής παρακολούθηση της απόδοσης μιας μεθόδου αποτελούν αλληλένδετα στάδια μιας ενιαίας στρατηγικής ποιότητας. Κεντρική έννοια της προσέγγισης αυτής είναι ο καθορισμός του Analytical Target Profile (ATP), δηλαδή ενός συνόλου προκαθορισμένων απαιτήσεων που περιγράφουν τα χαρακτηριστικά απόδοσης που πρέπει να διαθέτει η μέθοδος. Το ATP λειτουργεί ως σημείο αναφοράς κατά τον σχεδιασμό, τη βελτιστοποίηση και την επικύρωση της αναλυτικής διαδικασίας και διασφαλίζει ότι η μέθοδος ανταποκρίνεται στις ανάγκες για τις οποίες αναπτύχθηκε (Ermer and Miller, 2005).

Η ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου HPLC περιλαμβάνει σειρά διαδοχικών βημάτων που αποσκοπούν στην επιλογή και βελτιστοποίηση των κατάλληλων χρωματογραφικών συνθηκών. Τα βήματα αυτά περιλαμβάνουν την επιλογή της χρωματογραφικής στήλης, τη σύνθεση της κινητής φάσης, τη ρύθμιση του pH, την επιλογή του ανιχνευτή και τη βελτιστοποίηση λειτουργικών παραμέτρων όπως ο ρυθμός ροής και η θερμοκρασία της στήλης (Ahuja and Dong, 2005).

Η επιτυχία της διαδικασίας ανάπτυξης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την κατανόηση των μηχανισμών διαχωρισμού που διέπουν τη χρωματογραφική συμπεριφορά του

αναλύτη. Η γνώση αυτή επιτρέπει τον εντοπισμό των παραμέτρων που επηρεάζουν σημαντικά την απόδοση της μεθόδου και διευκολύνει την επιλογή των κατάλληλων συνθηκών για την επίτευξη αποτελεσματικού διαχωρισμού και αξιόπιστης ποσοτικοποίησης (Snyder et al., 2010).

Πέραν της επίτευξης ικανοποιητικής χρωματογραφικής απόδοσης, η ανάπτυξη της μεθόδου πρέπει να λαμβάνει υπόψη πρακτικούς παράγοντες όπως η διάρκεια της ανάλυσης, η κατανάλωση διαλυτών, η σταθερότητα των διαλυμάτων και το κόστος λειτουργίας. Η βελτιστοποίηση των παραμέτρων αυτών συμβάλλει στη δημιουργία μιας μεθόδου που μπορεί να εφαρμοστεί αποτελεσματικά σε περιβάλλοντα ποιοτικού ελέγχου υψηλού φόρτου εργασίας (Kazakevich & Lobrutto, 2007).

Η εφαρμογή συστηματικών προσεγγίσεων ανάπτυξης μεθόδων έχει αποκτήσει ιδιαίτερη σημασία τα τελευταία χρόνια. Η χρήση εργαλείων διαχείρισης κινδύνου, στατιστικών σχεδιασμών πειραμάτων και μεθοδολογιών Quality by Design επιτρέπει τη βαθύτερη κατανόηση των παραγόντων που επηρεάζουν τη μέθοδο και οδηγεί σε πιο ανθεκτικές και αξιόπιστες αναλυτικές διαδικασίες (ICH, 2023a).

Τέλος, η ανάπτυξη της αναλυτικής μεθόδου δεν θεωρείται ολοκληρωμένη με την επίτευξη των επιθυμητών χρωματογραφικών χαρακτηριστικών. Αντίθετα, αποτελεί τη βάση πάνω στην οποία θα πραγματοποιηθεί η επικύρωση της διαδικασίας. Οι γνώσεις που αποκτώνται κατά τη φάση της ανάπτυξης χρησιμοποιούνται για τον σχεδιασμό των μελετών επικύρωσης και για την τεκμηρίωση της καταλληλότητας της μεθόδου για τον επιδιωκόμενο σκοπό χρήσης της (USP, 2024).

3.2 Επιλογή Χρωματογραφικής Στήλης

3.2.1 Ο ρόλος της χρωματογραφικής στήλης στον διαχωρισμό

Η χρωματογραφική στήλη αποτελεί το σημαντικότερο στοιχείο ενός συστήματος HPLC, καθώς εντός αυτής πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος. Η αποτελεσματικότητα μιας αναλυτικής μεθόδου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα χαρακτηριστικά της στήλης, αφού αυτά καθορίζουν τον μηχανισμό αλληλεπίδρασης

μεταξύ των αναλυτών και της στατικής φάσης, επηρεάζοντας άμεσα τον χρόνο κατακράτησης, την επιλεκτικότητα και την αποδοτικότητα του διαχωρισμού (Snyder et al., 2010).

Η επιλογή της κατάλληλης στήλης αποτελεί ένα από τα πρώτα βήματα κατά την ανάπτυξη μιας μεθόδου HPLC. Μία ακατάλληλη επιλογή μπορεί να οδηγήσει σε ανεπαρκή διαχωρισμό, κακή συμμετρία κορυφών ή υπερβολικά μεγάλους χρόνους ανάλυσης, ακόμη και όταν όλες οι υπόλοιπες χρωματογραφικές συνθήκες έχουν βελτιστοποιηθεί (Dong, 2019).

Στη φαρμακευτική ανάλυση, η επιλογή της στήλης βασίζεται κυρίως στις φυσικοχημικές ιδιότητες της δραστικής ουσίας και των πιθανών προσμίξεων, όπως η πολικότητα, η υδροφοβικότητα, η παρουσία αρωματικών δακτυλίων και ο βαθμός ιονισμού. Η κατανόηση των χαρακτηριστικών αυτών επιτρέπει την επιλογή μιας στατικής φάσης που μπορεί να επιτύχει αποτελεσματικό διαχωρισμό με ικανοποιητική διάρκεια ανάλυσης (Kazakevich & Lobrutto, 2007).

Η σημασία της επιλογής της στήλης αναγνωρίζεται και από τη σύγχρονη προσέγγιση της ICH Q14, σύμφωνα με την οποία η στατική φάση θεωρείται κρίσιμη παράμετρος ανάπτυξης της μεθόδου (Critical Method Parameter), καθώς μπορεί να επηρεάσει ουσιαστικά την απόδοση και την ανθεκτικότητα της αναλυτικής διαδικασίας (ICH, 2023a).

3.2.2 Δομή και χαρακτηριστικά των χρωματογραφικών στηλών

Οι στήλες HPLC αποτελούνται συνήθως από ανοξείδωτο χάλυβα και είναι γεμισμένες με πορώδη σωματίδια πυριτίας (silica particles), στην επιφάνεια των οποίων έχουν προσδεθεί οργανικές ομάδες που σχηματίζουν τη στατική φάση. Η φύση των ομάδων αυτών καθορίζει τον μηχανισμό αλληλεπίδρασης με τους αναλύτες και συνεπώς την εκλεκτικότητα του διαχωρισμού (Snyder et al., 2010).

Η απόδοση μιας χρωματογραφικής στήλης καθορίζεται από μια σειρά δομικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών, τα οποία επηρεάζουν άμεσα την αποτελεσματικότητα του

διαχωρισμού. Τα σημαντικότερα από αυτά είναι το είδος της στατικής φάσης, το μήκος και η εσωτερική διάμετρος της στήλης, καθώς και το μέγεθος των σωματιδίων πλήρωσης και των πόρων τους. Η επιλογή των χαρακτηριστικών αυτών επηρεάζει ουσιαστικά βασικές χρωματογραφικές παραμέτρους, όπως η διακριτική ικανότητα, ο χρόνος κατακράτησης, η αποδοτικότητα της στήλης και η απαιτούμενη πίεση λειτουργίας του συστήματος. Επιπλέον, οι παράμετροι αυτές συμβάλλουν στον καθορισμό της συνολικής διάρκειας της ανάλυσης και της ποιότητας του επιτυγχανόμενου διαχωρισμού, γεγονός που καθιστά την επιλογή της κατάλληλης στήλης ιδιαίτερα σημαντική κατά την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μιας αναλυτικής μεθόδου HPLC (Snyder, Kirkland and Dolan, 2010).

3.2.3 Στήλες αντίστροφης φάσης (Reverse Phase Columns)

Η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (Reverse Phase HPLC, RP-HPLC) αποτελεί τη συνηθέστερη μορφή HPLC στη φαρμακευτική ανάλυση. Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιείται μη πολική στατική φάση και σχετικά πολική κινητή φάση. Ο διαχωρισμός βασίζεται κυρίως σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αναλυτών και της στατικής φάσης (USP, 2024).

Οι περισσότεροι ποσοτικοί προσδιορισμοί δραστικών ουσιών σε φαρμακευτικά προϊόντα πραγματοποιούνται με RP-HPLC λόγω της υψηλής επαναληψιμότητας, της ευελιξίας και της δυνατότητας ανάλυσης μεγάλου εύρους χημικών ενώσεων (Kazakevich & Lobrutto, 2007).

3.2.4 Στήλες C18 (Octadecylsilane Columns)

Οι στήλες C18 αποτελούν τη συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη κατηγορία στηλών στη φαρμακευτική χρωματογραφία. Η στατική φάση περιέχει αλκυλικές αλυσίδες δεκαοκτώ ατόμων άνθρακα συνδεδεμένες στην επιφάνεια της πυριτίας, δημιουργώντας ένα ιδιαίτερα υδρόφοβο περιβάλλον (Snyder et al., 2010).

Η υψηλή υδροφοβικότητα των στηλών C18 οδηγεί συνήθως σε μεγαλύτερους χρόνους κατακράτησης για μη πολικές ενώσεις και προσφέρει εξαιρετική ικανότητα διαχωρισμού

για μεγάλο εύρος φαρμακευτικών ουσιών. Για τον λόγο αυτό, οι περισσότερες φαρμακοποιιακές μέθοδοι και οι μέθοδοι ποιοτικού ελέγχου βασίζονται σε στήλες αυτού του τύπου (USP, 2024).

Οι στήλες C18 αποτελούν την πλέον διαδεδομένη επιλογή στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RP-HPLC), λόγω των σημαντικών πλεονεκτημάτων που προσφέρουν. Χαρακτηρίζονται από υψηλή αποδοτικότητα διαχωρισμού, επιτρέποντας την αποτελεσματική ανάλυση ενός ευρέος φάσματος φαρμακευτικών και χημικών ενώσεων. Επιπλέον, παρουσιάζουν μεγάλη διαθεσιμότητα στην αγορά, γεγονός που διευκολύνει την εφαρμογή και την αναπαραγωγή των αναλυτικών μεθόδων μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων. Ένα ακόμη σημαντικό πλεονέκτημα είναι η ευρεία αποδοχή τους από τις φαρμακοποιίες και τις κανονιστικές αρχές, καθώς χρησιμοποιούνται σε μεγάλο αριθμό επίσημων μονογραφιών και αναλυτικών διαδικασιών. Τέλος, οι στήλες C18 παρέχουν υψηλό βαθμό αναπαραγωγιμότητας, εξασφαλίζοντας σταθερά και αξιόπιστα αποτελέσματα κατά την εφαρμογή τους σε εργασίες ποιοτικού ελέγχου και φαρμακευτικής ανάλυσης. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις ιδιαίτερα υδρόφοβων ουσιών μπορεί να προκύψουν υπερβολικά μεγάλοι χρόνοι κατακράτησης, γεγονός που οδηγεί στην αναζήτηση εναλλακτικών στασίμων φάσεων (Dong, 2019).

3.2.5 Στήλες C8

Οι στήλες C8 περιέχουν αλκυλικές αλυσίδες οκτώ ατόμων άνθρακα και εμφανίζουν μικρότερη υδροφοβικότητα σε σχέση με τις C18. Ως αποτέλεσμα, οι αναλύτες κατακρατούνται λιγότερο έντονα και οι χρόνοι ανάλυσης είναι συνήθως μικρότεροι (Snyder et al., 2010).

Οι στήλες με μικρότερη υδροφοβικότητα, όπως οι C8, προτιμώνται σε περιπτώσεις όπου οι χρόνοι κατακράτησης που επιτυγχάνονται με στήλες C18 είναι ιδιαίτερα μεγάλοι, γεγονός που αυξάνει τη συνολική διάρκεια της ανάλυσης. Η χρήση τους συμβάλλει στη μείωση των χρόνων έκλουσης και επιτρέπει την πραγματοποίηση ταχύτερων αναλύσεων χωρίς σημαντική απώλεια της χρωματογραφικής απόδοσης. Επιπλέον, οι στήλες αυτές

είναι ιδιαίτερα κατάλληλες για τον διαχωρισμό έντονα λιπόφιлов ενώσεων, οι οποίες εμφανίζουν πολύ ισχυρή κατακράτηση στις στήλες C18 (Skoog et al., 2018).

Ως εκ τούτου, αποτελούν μια αποτελεσματική εναλλακτική επιλογή όταν απαιτείται συντομότερος χρόνος ανάλυσης ή όταν η φύση των αναλυτών καθιστά δυσχερή τον διαχωρισμό σε περισσότερο υδρόφοβες στατικές φάσεις. Παρά τη μικρότερη κατακράτηση, οι στήλες C8 μπορούν να προσφέρουν εξαιρετικό διαχωρισμό σε πολλές φαρμακευτικές εφαρμογές και συχνά αποτελούν εναλλακτική επιλογή κατά τη βελτιστοποίηση μιας μεθόδου (Dong, 2019).

3.2.6 Στήλες Phenyl

Οι στήλες Phenyl διαθέτουν αρωματικές φαινυλικές ομάδες στη στατική φάση και επιτρέπουν την ανάπτυξη αλληλεπιδράσεων π-π μεταξύ της στήλης και αρωματικών ενώσεων του δείγματος. Ο μηχανισμός αυτός προσφέρει διαφορετική εκλεκτικότητα σε σχέση με τις συμβατικές αλκυλικές φάσεις και μπορεί να οδηγήσει σε βελτιωμένο διαχωρισμό συγκεκριμένων ενώσεων (Snyder et al., 2010).

Οι στήλες Phenyl αποτελούν εξειδικευμένη κατηγορία στατικών φάσεων και χρησιμοποιούνται κυρίως για τον διαχωρισμό ενώσεων που περιέχουν αρωματικούς δακτυλίους στη χημική τους δομή. Η παρουσία φαινυλικών ομάδων στη στατική φάση επιτρέπει την ανάπτυξη αλληλεπιδράσεων π-π (π-π interactions) μεταξύ της στήλης και των αναλυτών, προσφέροντας διαφορετική εκλεκτικότητα σε σχέση με τις συμβατικές στήλες C18. Για τον λόγο αυτό, οι στήλες Phenyl αξιοποιούνται συχνά όταν απαιτείται ο αποτελεσματικός διαχωρισμός δομικά παρόμοιων προσμίξεων ή συγγενών ουσιών που δεν διαχωρίζονται ικανοποιητικά σε στήλες C18 (Carr et al., 2020).

Ως εκ τούτου, αποτελούν πολύτιμη εναλλακτική επιλογή κατά την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση χρωματογραφικών μεθόδων, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου απαιτείται αυξημένη εκλεκτικότητα και βελτιωμένος διαχωρισμός αρωματικών ενώσεων. Η διαφορετική χημεία της στατικής φάσης μπορεί να αποδειχθεί καθοριστική σε περιπτώσεις

όπου μικρές διαφοροποιήσεις στην εκλεκτικότητα οδηγούν σε σημαντική βελτίωση της διακριτικής ικανότητας (Swartz and Murphy, 2012).

3.2.7 Στήλες Cyano

Οι στήλες Cyano περιέχουν κυανοπροπυλικές ομάδες και εμφανίζουν μέτρια πολικότητα. Η ιδιαίτερη αυτή χημεία επιτρέπει τη χρήση τους τόσο σε συνθήκες αντίστροφης όσο και κανονικής φάσης, προσφέροντας αυξημένη ευελιξία κατά την ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων (Kazakevich & Lobrutto, 2007).

Οι στήλες Cyano χρησιμοποιούνται συχνά όταν απαιτείται διαφοροποίηση της εκλεκτικότητας ή όταν οι συμβατικές αλκυλικές φάσεις αποτυγχάνουν να επιτύχουν επαρκή διαχωρισμό. Παρά το γεγονός ότι χρησιμοποιούνται λιγότερο συχνά από τις C18 και C8, αποτελούν χρήσιμο εργαλείο κατά τη διαδικασία βελτιστοποίησης της μεθόδου.

3.2.8 Επίδραση του μεγέθους σωματιδίων

Το μέγεθος των σωματιδίων πλήρωσης επηρεάζει σημαντικά την αποδοτικότητα της χρωματογραφικής στήλης. Μικρότερα σωματίδια προσφέρουν μεγαλύτερη επιφάνεια αλληλεπίδρασης και συνεπώς υψηλότερη αποδοτικότητα διαχωρισμού. Παράλληλα όμως προκαλούν αυξημένη αντίσταση στη ροή της κινητής φάσης και συνεπώς υψηλότερες πιέσεις λειτουργίας (Snyder et al., 2010).

Το μέγεθος των σωματιδίων πλήρωσης της χρωματογραφικής στήλης αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την αποδοτικότητα του διαχωρισμού, την πίεση λειτουργίας του συστήματος και τον συνολικό χρόνο ανάλυσης. Οι συμβατικές μέθοδοι HPLC χρησιμοποιούν συνήθως σωματίδια μεγέθους 5 μm , τα οποία προσφέρουν ικανοποιητική ισορροπία μεταξύ απόδοσης και λειτουργικού κόστους. Η χρήση μικρότερων σωματιδίων, της τάξης των 3–3,5 μm , οδηγεί σε βελτιωμένη αποδοτικότητα και υψηλότερη διακριτική ικανότητα, γι' αυτό και εφαρμόζεται συχνά σε συστήματα υψηλής απόδοσης (Swartz & Murphy, 2012).

Αντίθετα, σωματίδια μεγέθους μικρότερου των 2 μm χρησιμοποιούνται κυρίως στην υπερυψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (UHPLC), επιτρέποντας ταχύτερους και αποδοτικότερους διαχωρισμούς, αλλά απαιτώντας ταυτόχρονα τη λειτουργία του συστήματος σε σημαντικά υψηλότερες πιέσεις. Η επιλογή του κατάλληλου μεγέθους εξαρτάται από τις απαιτήσεις της μεθόδου και τις δυνατότητες του διαθέσιμου εξοπλισμού (Dong, 2019).

3.2.9 Διαστάσεις στήλης και επίδραση στην απόδοση

Το μήκος και η εσωτερική διάμετρος της στήλης επηρεάζουν τόσο την αποδοτικότητα όσο και τη διάρκεια της ανάλυσης. Μεγαλύτερες στήλες παρέχουν υψηλότερη διακριτική ικανότητα αλλά οδηγούν σε αυξημένους χρόνους ανάλυσης και μεγαλύτερη κατανάλωση διαλυτών (USP, 2024).

Στη φαρμακευτική ανάλυση χρησιμοποιούνται ευρέως χρωματογραφικές στήλες με διαστάσεις 150 $\times$ 4,6 mm, 250 $\times$ 4,6 mm και 100 $\times$ 4,6 mm, καθώς προσφέρουν διαφορετικά πλεονεκτήματα ως προς την αποδοτικότητα του διαχωρισμού και τον χρόνο ανάλυσης. Οι μεγαλύτερες στήλες, όπως οι 250 $\times$ 4,6 mm, παρέχουν αυξημένη διακριτική ικανότητα και χρησιμοποιούνται συνήθως για πολύπλοκα δείγματα ή για διαχωρισμούς που απαιτούν υψηλή εκλεκτικότητα (Ahuja, S., & Dong, M. W., 2005).

Αντίθετα, οι μικρότερες στήλες, όπως οι 100 $\times$ 4,6 mm, επιτρέπουν ταχύτερες αναλύσεις και μειωμένη κατανάλωση διαλυτών. Οι στήλες διαστάσεων 150 $\times$ 4,6 mm αποτελούν συχνά έναν συμβιβασμό μεταξύ χρόνου ανάλυσης και χρωματογραφικής απόδοσης και για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται ευρέως στις εργασίες ποιοτικού ελέγχου φαρμακευτικών προϊόντων. Η επιλογή των κατάλληλων διαστάσεων εξαρτάται από τη φύση του δείγματος, την πολυπλοκότητα της μήτρας και τις απαιτήσεις του επιδιωκόμενου διαχωρισμού (Dong, 2019).

3.2.10 Κριτήρια επιλογής στήλης κατά την ανάπτυξη μεθόδου

Η επιλογή της κατάλληλης χρωματογραφικής στήλης αποτελεί κρίσιμο στάδιο της ανάπτυξης μιας αναλυτικής διαδικασίας. Η απόφαση βασίζεται στη χημική δομή του αναλύτη, στις απαιτήσεις του διαχωρισμού και στα επιθυμητά χαρακτηριστικά απόδοσης της μεθόδου. Στόχος είναι η επίτευξη επαρκούς διακριτικής ικανότητας, καλής συμμετρίας κορυφών, αποδεκτού χρόνου ανάλυσης και υψηλής επαναληψιμότητας (ICH, 2023a).

Η συστηματική αξιολόγηση διαφορετικών στασίμων φάσεων και γεωμετρικών χαρακτηριστικών της στήλης συμβάλλει σημαντικά στη βελτιστοποίηση της μεθόδου και αποτελεί βασικό στοιχείο της σύγχρονης προσέγγισης ανάπτυξης αναλυτικών διαδικασιών σύμφωνα με την ICH Q14 (ICH, 2023a).

3.3 Επιλογή Κινητής Φάσης

3.3.1 Ο ρόλος της κινητής φάσης στη χρωματογραφία HPLC

Η κινητή φάση αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα στοιχεία ενός συστήματος HPLC, καθώς λειτουργεί ως μέσο μεταφοράς των αναλυτών μέσω της χρωματογραφικής στήλης και συμμετέχει ενεργά στον μηχανισμό του διαχωρισμού. Η σύσταση της κινητής φάσης επηρεάζει άμεσα την κατακράτηση, την εκλεκτικότητα, την αποδοτικότητα και τη συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών, καθιστώντας την επιλογή της κρίσιμο στάδιο κατά την ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου (Snyder et al., 2010).

Στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RP-HPLC), η κινητή φάση αποτελείται συνήθως από μίγμα υδατικού διαλύματος και οργανικού διαλύτη. Η μεταβολή της αναλογίας των συστατικών αυτών μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τη χρωματογραφική συμπεριφορά των αναλυτών και να μεταβάλει τόσο τους χρόνους κατακράτησης όσο και τον βαθμό διαχωρισμού μεταξύ γειτονικών κορυφών (Dong, 2019).

Η επιλογή της κινητής φάσης πραγματοποιείται λαμβάνοντας υπόψη τις φυσικοχημικές ιδιότητες της δραστικής ουσίας, τη χημική δομή των πιθανών προσμίξεων, τα χαρακτηριστικά της στατικής φάσης και τον τύπο του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται. Η

διαδικασία αυτή αποτελεί βασικό τμήμα της ανάπτυξης μιας αναλυτικής μεθόδου και επηρεάζει καθοριστικά τη συνολική της απόδοση (Kazakevich & Lobrutto, 2007).

3.3.2 Υδατικό συστατικό της κινητής φάσης

Το υδατικό τμήμα της κινητής φάσης αποτελεί συνήθως τη βάση πάνω στην οποία διαμορφώνεται η τελική σύσταση του εκλουστικού συστήματος. Η χρήση νερού υψηλής καθαρότητας είναι απαραίτητη για την αποφυγή παρεμβολών και τη διασφάλιση σταθερής χρωματογραφικής συμπεριφοράς (USP, 2024).

Στην πράξη, το καθαρό νερό χρησιμοποιείται σχετικά σπάνια ως μοναδικό υδατικό συστατικό, καθώς οι περισσότερες φαρμακευτικές αναλύσεις απαιτούν καλύτερο έλεγχο του pH και της ιοντικής ισχύος. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται συχνά ρυθμιστικά διαλύματα (buffers), τα οποία συμβάλλουν στη σταθεροποίηση των συνθηκών διαχωρισμού και βελτιώνουν την αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου (Dong, 2019).

Η ποιότητα του υδατικού συστατικού είναι ιδιαίτερα σημαντική σε αναλύσεις χαμηλών συγκεντρώσεων, καθώς η παρουσία ιχνοποσοτήτων οργανικών ή ανόργανων προσμίξεων μπορεί να επηρεάσει τη γραμμή βάσης και να αυξήσει τον θόρυβο του συστήματος (Dong, 2019).

3.3.3 Ρυθμιστικά διαλύματα (Buffers)

Τα ρυθμιστικά διαλύματα χρησιμοποιούνται ευρέως στις φαρμακευτικές αναλύσεις HPLC προκειμένου να διατηρείται σταθερό το pH της κινητής φάσης κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Η σταθερότητα του pH είναι ιδιαίτερα σημαντική όταν οι αναλύτες περιέχουν ιονιζόμενες λειτουργικές ομάδες, καθώς μικρές μεταβολές μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την κατακράτηση και την εκλεκτικότητα του διαχωρισμού (Snyder et al., 2010).

Τα ρυθμιστικά διαλύματα αποτελούν βασικό συστατικό της κινητής φάσης στην υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RP-HPLC), καθώς συμβάλλουν στη διατήρηση σταθερού pH κατά τη διάρκεια της ανάλυσης και επηρεάζουν σημαντικά την ιοντική

κατάσταση των αναλυτών. Η επιλογή του κατάλληλου ρυθμιστικού συστήματος είναι ιδιαίτερα σημαντική για την επίτευξη επαναλήψιμων χρόνων κατακράτησης, βελτιωμένης συμμετρίας κορυφών και ικανοποιητικής εκλεκτικότητας. Στα συνηθέστερα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται στις φαρμακευτικές εφαρμογές περιλαμβάνονται τα φωσφορικά ρυθμιστικά διαλύματα (phosphate buffers), το οξικό αμμώνιο (ammonium acetate), το μυρμηκικό αμμώνιο (ammonium formate), καθώς και ασθενή οργανικά οξέα όπως το οξικό οξύ (acetic acid) και το μυρμηκικό οξύ (formic acid). Η επιλογή του κατάλληλου ρυθμιστικού εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του αναλύτη, το επιθυμητό εύρος pH και τον τύπο του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται (Ahuja & Dong, 2005).

Τα φωσφορικά ρυθμιστικά διαλύματα παρουσιάζουν υψηλή ρυθμιστική ικανότητα και χρησιμοποιούνται ευρέως σε αναλύσεις με UV ανίχνευση. Ωστόσο, δεν είναι κατάλληλα για εφαρμογές που συνδυάζονται με φασματομετρία μάζας λόγω της χαμηλής πτητικότητάς τους (Dong, 2019).

Αντίθετα, τα πτητικά ρυθμιστικά διαλύματα όπως το οξικό και το μυρμηκικό αμμώνιο προτιμώνται σε συστήματα LC-MS επειδή δεν προκαλούν επιμόλυνση της πηγής ιονισμού (Kazakevich & Lobrutto, 2007).

3.3.4 Οργανικοί διαλύτες

Το οργανικό συστατικό της κινητής φάσης επηρεάζει σημαντικά την ισχύ έκλουσης (elution strength) και κατά συνέπεια τους χρόνους κατακράτησης των αναλυτών. Οι συνηθέστεροι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται στη φαρμακευτική χρωματογραφία είναι η μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο (Snyder et al., 2010).

Μεθανόλη (Methanol)

Η μεθανόλη αποτελεί έναν από τους παλαιότερους οργανικούς διαλύτες που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία HPLC. Παρουσιάζει σχετικά υψηλό ιξώδες, γεγονός που οδηγεί σε αυξημένη πίεση λειτουργίας του συστήματος. Παράλληλα,

προσφέρει διαφορετική εκλεκτικότητα σε σχέση με το ακετονιτρίλιο και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να βελτιώσει σημαντικά τον διαχωρισμό συγκεκριμένων ενώσεων (Dong, 2019).

Ακετονιτρίλιο (Acetonitrile)

Το ακετονιτρίλιο χαρακτηρίζεται από χαμηλότερο ιξώδες και υψηλότερη ισχύ έκλουσης σε σύγκριση με τη μεθανόλη. Ως αποτέλεσμα, επιτρέπει συντομότερους χρόνους ανάλυσης και χαμηλότερες πιέσεις λειτουργίας. Επιπλέον, παρουσιάζει χαμηλή απορρόφηση στην περιοχή UV, γεγονός που το καθιστά ιδιαίτερα κατάλληλο για φαρμακευτικές αναλύσεις με UV ή PDA ανιχνευτές. Η τελική επιλογή μεταξύ των δύο διαλυτών εξαρτάται από τις απαιτήσεις του διαχωρισμού και τα χαρακτηριστικά των αναλυόμενων ενώσεων (Dong, 2019).

3.3.5 Ισοκρατική και βαθμιδωτή έκλυση

Η επιλογή της στρατηγικής έκλουσης αποτελεί σημαντικό μέρος της ανάπτυξης της μεθόδου. Στην ισοκρατική έκλυση (isocratic elution), η σύσταση της κινητής φάσης παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της ανάλυσης. Η προσέγγιση αυτή χαρακτηρίζεται από απλότητα και υψηλή επαναληψιμότητα και χρησιμοποιείται ευρέως σε assay methods όπου ο αριθμός των αναλυτών είναι περιορισμένος (USP, 2024).

Αντίθετα, στη βαθμιδωτή έκλυση (gradient elution) η αναλογία οργανικού διαλύτη μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται όταν απαιτείται ο διαχωρισμός ουσιών με μεγάλο εύρος πολικοτήτων ή όταν συνυπάρχουν πολλές προσμίξεις και προϊόντα αποδόμησης (Snyder et al., 2010).

Η βαθμιδωτή έκλυση προσφέρει καλύτερη ευελιξία και συχνά οδηγεί σε συντομότερους συνολικούς χρόνους ανάλυσης, αν και συνοδεύεται από αυξημένη πολυπλοκότητα κατά την ανάπτυξη και επικύρωση της μεθόδου (Dong, 2019).

3.3.6 Επίδραση της σύστασης της κινητής φάσης

Η αναλογία μεταξύ του οργανικού και του υδατικού συστατικού επηρεάζει άμεσα την κατακράτηση των αναλυτών. Αύξηση της περιεκτικότητας σε οργανικό διαλύτη οδηγεί συνήθως σε μείωση των χρόνων κατακράτησης στις αναλύσεις αντίστροφης φάσης, ενώ μείωση του οργανικού ποσοστού έχει το αντίθετο αποτέλεσμα (Snyder et al., 2010).

Η σύσταση της κινητής φάσης αποτελεί μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους που επηρεάζουν την απόδοση μιας χρωματογραφικής μεθόδου. Ακόμη και μικρές μεταβολές στην αναλογία των συστατικών της μπορούν να προκαλέσουν σημαντικές αλλαγές στη χρωματογραφική συμπεριφορά των αναλυτών. Συγκεκριμένα, η μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης είναι δυνατόν να επηρεάσει τη διακριτική ικανότητα του συστήματος, τη συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών, την εκλεκτικότητα του διαχωρισμού, καθώς και την ευαισθησία της μεθόδου. Για τον λόγο αυτό, η επιλογή και η βελτιστοποίηση της κινητής φάσης αποτελούν κρίσιμα στάδια κατά την ανάπτυξη και επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου HPLC, ιδιαίτερα όταν απαιτείται αξιόπιστος διαχωρισμός δραστικών ουσιών και προσμίξεων (Meyer, 2010).

Για τον λόγο αυτό, η βελτιστοποίηση της σύστασης της κινητής φάσης αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα στάδια της ανάπτυξης μιας χρωματογραφικής μεθόδου (Kazakevich & Lobrutto, 2007).

3.3.7 Επιλογή κινητής φάσης κατά την ανάπτυξη της μεθόδου

Η τελική επιλογή της κινητής φάσης πραγματοποιείται έπειτα από συστηματική αξιολόγηση διαφορετικών συνδυασμών διαλυτών, ρυθμιστικών διαλυμάτων και τιμών pH. Στόχος είναι η επίτευξη βέλτιστης ισορροπίας μεταξύ διαχωριστικής ικανότητας, χρόνου ανάλυσης, συμμετρίας κορυφών και ανθεκτικότητας της μεθόδου (ICH, 2023).

Σύμφωνα με τη φιλοσοφία της ICH Q14, η επιλογή της κινητής φάσης δεν βασίζεται αποκλειστικά σε εμπειρικές δοκιμές αλλά πρέπει να στηρίζεται σε επιστημονική κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν τη χρωματογραφική συμπεριφορά του αναλύτη. Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει τη δημιουργία πιο ανθεκτικών και αξιόπιστων αναλυτικών

διαδικασιών, οι οποίες διατηρούν την απόδοσή τους κατά τη διάρκεια ολόκληρου του κύκλου ζωής τους (ICH, 2023).

3.4 Επίδραση του pH στη χρωματογραφική συμπεριφορά των αναλυτών

3.4.1 Εισαγωγή

Το pH της κινητής φάσης αποτελεί μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους κατά την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδων υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Η επίδρασή του είναι ιδιαίτερα σημαντική σε ενώσεις που περιέχουν όξινες ή βασικές λειτουργικές ομάδες και μπορούν να ιονιστούν εντός του εύρους pH που χρησιμοποιείται στις χρωματογραφικές αναλύσεις (Snyder et al., 2010).

Η μεταβολή του pH μπορεί να επηρεάσει δραστικά τη χρωματογραφική συμπεριφορά ενός αναλύτη, καθώς μεταβάλλει τον βαθμό ιονισμού του και συνεπώς τις αλληλεπιδράσεις του με τη στατική φάση. Ως αποτέλεσμα, παρατηρούνται αλλαγές στον χρόνο κατακράτησης, στη συμμετρία των κορυφών, στη διακριτική ικανότητα και συνολικά στην απόδοση της μεθόδου (Dong, 2019).

Στη φαρμακευτική ανάλυση, η επιλογή του κατάλληλου pH είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς η πλειονότητα των δραστικών φαρμακευτικών ουσιών περιέχει ιονιζόμενες λειτουργικές ομάδες όπως καρβοξυλικά οξέα, αμίνες, φαινόλες ή ετεροκυκλικές ενώσεις. Η σωστή ρύθμιση του pH αποτελεί επομένως βασικό εργαλείο για τη βελτιστοποίηση του διαχωρισμού και την επίτευξη αξιόπιστων αποτελεσμάτων (Kazakevich & Lobrutto, 2007).

3.4.2 Έννοια του pKa και βαθμός ιονισμού

Η κατανόηση της επίδρασης του pH στη χρωματογραφική συμπεριφορά απαιτεί τη γνώση της έννοιας του pKa, το οποίο εκφράζει τη σταθερά διάστασης μιας όξινης ή βασικής ένωσης. Το pKa αντιστοιχεί στην τιμή pH στην οποία το 50% των μορίων βρίσκεται σε ιονισμένη μορφή και το υπόλοιπο 50% σε μη ιονισμένη μορφή (Skoog et al., 2018).

Η σχέση μεταξύ pH και βαθμού ιονισμού περιγράφεται από την εξίσωση Henderson–Hasselbalch:

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Για ασθενή οξέα, αύξηση του pH οδηγεί σε αύξηση του βαθμού ιονισμού. Αντίθετα, για ασθενείς βάσεις, αύξηση του pH οδηγεί σε μείωση του βαθμού ιονισμού και αύξηση της μη φορτισμένης μορφής του μορίου (Snyder et al., 2010).

Η γνώση της σχέσης μεταξύ pH και pKa επιτρέπει την πρόβλεψη της χρωματογραφικής συμπεριφοράς μιας ουσίας και αποτελεί βασικό εργαλείο κατά την ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων.

3.4.3 Επίδραση του ιονισμού στην κατακράτηση

Στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, η κατακράτηση των αναλυτών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την υδροφοβικότητά τους. Οι μη ιονισμένες μορφές των μορίων είναι συνήθως περισσότερο υδρόφοβες και εμφανίζουν ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις με τη μη πολική στατική φάση. Ως αποτέλεσμα, παρουσιάζουν μεγαλύτερους χρόνους κατακράτησης (Snyder et al., 2010).

Αντίθετα, οι ιονισμένες μορφές είναι περισσότερο πολικές και εμφανίζουν αυξημένη συγγένεια προς την κινητή φάση. Η αύξηση του βαθμού ιονισμού οδηγεί συνήθως σε μείωση της κατακράτησης και σε μικρότερους χρόνους παραμονής στη στήλη (Kazakevich and Lobrutto, 2007).

Η σχέση αυτή αποτελεί ένα από τα βασικά εργαλεία βελτιστοποίησης των χρωματογραφικών διαχωρισμών. Μέσω της κατάλληλης επιλογής του pH είναι δυνατόν να μεταβληθεί σημαντικά η συμπεριφορά ενός αναλύτη και να επιτευχθεί αποτελεσματικότερος διαχωρισμός από προσμίξεις ή άλλες ενώσεις που συνυπάρχουν στο δείγμα.

3.4.4 Συμπεριφορά όξινων ενώσεων

Οι όξινες ενώσεις περιέχουν συνήθως λειτουργικές ομάδες όπως καρβοξυλικά οξέα ή φαινόλες. Σε pH χαμηλότερο από το pKa τους, οι ενώσεις αυτές βρίσκονται κυρίως στη μη ιονισμένη μορφή τους και παρουσιάζουν αυξημένη κατακράτηση στη χρωματογραφική στήλη (Kazakevich & Lobrutto, 2007).

Καθώς το pH αυξάνεται και υπερβαίνει το pKa, αυξάνεται το ποσοστό των ιονισμένων μορφών, γεγονός που οδηγεί σε σημαντική μείωση του χρόνου κατακράτησης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ακόμη και μεταβολή του pH κατά μία μονάδα μπορεί να προκαλέσει δραματική μεταβολή της χρωματογραφικής συμπεριφοράς (Dong, 2019).

Για τον λόγο αυτό, κατά την ανάπτυξη μεθόδων για όξινες δραστικές ουσίες επιλέγεται συχνά pH αρκετά χαμηλότερο από το pKa ώστε να εξασφαλίζεται σταθερή και προβλέψιμη κατακράτηση.

3.4.5 Συμπεριφορά βασικών ενώσεων

Οι βασικές ενώσεις περιέχουν συνήθως αμινομάδες ή άλλες αζωτούχες λειτουργικές ομάδες που μπορούν να πρωτονιωθούν σε όξινο περιβάλλον. Σε χαμηλό pH, οι ενώσεις αυτές εμφανίζονται κυρίως σε φορτισμένη μορφή και παρουσιάζουν περιορισμένη κατακράτηση στη στήλη αντίστροφης φάσης (Snyder et al., 2010).

Καθώς το pH αυξάνεται, μειώνεται ο βαθμός πρωτονίωσης και αυξάνεται το ποσοστό της μη ιονισμένης μορφής. Η μεταβολή αυτή οδηγεί σε ισχυρότερη αλληλεπίδραση με τη στατική φάση και συνεπώς σε μεγαλύτερους χρόνους κατακράτησης (Dong, 2019).

Η συμπεριφορά αυτή αξιοποιείται συχνά κατά τη βελτιστοποίηση μεθόδων για βασικά φάρμακα, ιδιαίτερα όταν απαιτείται βελτίωση του διαχωρισμού από δομικά συγγενείς προσμίξεις.

3.4.6 Επίδραση του pH στη συμμετρία των κορυφών

Εκτός από την κατακράτηση, το pH επηρεάζει σημαντικά και το σχήμα των χρωματογραφικών κορυφών. Σε πολλές περιπτώσεις, ιδιαίτερα κατά την ανάλυση βασικών ενώσεων, παρατηρείται ασυμμετρία κορυφών λόγω αλληλεπιδράσεων μεταξύ φορτισμένων αναλυτών και υπολειμματικών σιλανολικών ομάδων στην επιφάνεια της πυριτίας (Dong, 2019).

Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μπορούν να οδηγήσουν σε έντονο peak tailing και να επηρεάσουν αρνητικά τόσο την ποσοτικοποίηση όσο και τον διαχωρισμό των ενώσεων. Η επιλογή κατάλληλου pH ή η χρήση ειδικά τροποποιημένων στηλών μπορεί να μειώσει σημαντικά τα προβλήματα αυτά και να βελτιώσει τη συμμετρία των κορυφών (Snyder et al., 2010).

3.4.7 Περιορισμοί pH και σταθερότητα της στήλης

Η επιλογή του pH δεν καθορίζεται μόνο από τις ανάγκες του διαχωρισμού αλλά και από τα όρια σταθερότητας της χρωματογραφικής στήλης. Οι περισσότερες συμβατικές στήλες πυριτίας παρουσιάζουν βέλτιστη σταθερότητα σε εύρος περίπου pH 2–8. Εκτός αυτού του εύρους μπορεί να προκληθεί υδρόλυση της στατικής φάσης ή διάβρωση του υποστρώματος πυριτίας (USP, 2024).

Σε υψηλές τιμές pH παρατηρείται σταδιακή διάλυση της πυριτίας, ενώ σε εξαιρετικά χαμηλές τιμές pH μπορεί να προκληθεί αποσύνδεση των οργανικών ομάδων της στατικής φάσης. Για τον λόγο αυτό, κατά την ανάπτυξη της μεθόδου επιδιώκεται η επιλογή pH που εξασφαλίζει τόσο αποτελεσματικό διαχωρισμό όσο και μακροχρόνια σταθερότητα της στήλης (Dong, 2019).

3.4.8 Ρόλος του pH στη βελτιστοποίηση της μεθόδου

Η συστηματική μελέτη της επίδρασης του pH αποτελεί βασικό στάδιο κατά την ανάπτυξη μιας μεθόδου HPLC. Η αξιολόγηση διαφορετικών τιμών pH επιτρέπει τον εντοπισμό συνθηκών που προσφέρουν βέλτιστη ισορροπία μεταξύ κατακράτησης, εκλεκτικότητας, συμμετρίας κορυφών και διάρκειας ανάλυσης (ICH, 2023).

Στο πλαίσιο της σύγχρονης προσέγγισης που προτείνει η ICH Q14, το pH θεωρείται κρίσιμη παράμετρος ανάπτυξης της μεθόδου (Critical Method Parameter). Η κατανόηση της επίδρασής του συμβάλλει στη δημιουργία πιο ανθεκτικών αναλυτικών διαδικασιών και διευκολύνει τον καθορισμό των αποδεκτών ορίων λειτουργίας της μεθόδου κατά τη φάση της επικύρωσης (ICH, 2023).

3.5 Βελτιστοποίηση των Χρωματογραφικών Συνθηκών

3.5.1 Εισαγωγή

Η ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου HPLC δεν ολοκληρώνεται με την επιλογή της χρωματογραφικής στήλης και της κινητής φάσης. Απαιτείται επιπλέον η συστηματική βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών, ώστε να επιτευχθεί ο βέλτιστος συνδυασμός διακριτικής ικανότητας, συμμετρίας κορυφών, διάρκειας ανάλυσης και αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων. Η διαδικασία αυτή αποτελεί βασικό στάδιο του method development και συμβάλλει καθοριστικά στη δημιουργία μιας αναλυτικής διαδικασίας κατάλληλης για εφαρμογή σε περιβάλλον ποιοτικού ελέγχου (ICH, 2023a).

Κατά τη βελτιστοποίηση αξιολογούνται παράμετροι που επηρεάζουν άμεσα τη χρωματογραφική συμπεριφορά των αναλυτών, όπως ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης, η θερμοκρασία της στήλης, η σύσταση του εκλουστικού συστήματος, ο όγκος έγχυσης και η συνολική διάρκεια της ανάλυσης. Η συστηματική διερεύνηση των παραμέτρων αυτών επιτρέπει τον εντοπισμό συνθηκών που παρέχουν σταθερό και αναπαραγώγιμο διαχωρισμό (Kazakevich and Lobrutto, 2007).

Σύμφωνα με τη φιλοσοφία της ICH Q14, η βελτιστοποίηση των συνθηκών δεν θα πρέπει να βασίζεται αποκλειστικά σε εμπειρικές δοκιμές αλλά σε επιστημονική κατανόηση των μηχανισμών που επηρεάζουν την απόδοση της μεθόδου. Η προσέγγιση αυτή οδηγεί σε πιο ανθεκτικές και προβλέψιμες αναλυτικές διαδικασίες (ICH, 2023a).

3.5.2 Βελτιστοποίηση του ρυθμού ροής (Flow Rate)

Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης αποτελεί μία από τις σημαντικότερες λειτουργικές παραμέτρους της χρωματογραφίας HPLC. Η μεταβολή του επηρεάζει άμεσα τον χρόνο

παραμονής των αναλυτών εντός της στήλης και συνεπώς τόσο τη διάρκεια της ανάλυσης όσο και την αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού (Snyder et al., 2010).

Η αύξηση του ρυθμού ροής οδηγεί συνήθως σε μείωση των χρόνων κατακράτησης και συνεπώς σε συντομότερες αναλύσεις. Ωστόσο, όταν η αύξηση είναι υπερβολική, μπορεί να μειωθεί η αποδοτικότητα της στήλης λόγω ανεπαρκούς χρόνου αλληλεπίδρασης των αναλυτών με τη στατική φάση. Αντίθετα, η υπερβολική μείωση του ρυθμού ροής μπορεί να βελτιώσει τον διαχωρισμό αλλά να οδηγήσει σε ιδιαίτερα μεγάλους χρόνους ανάλυσης (Dong, 2019).

Η σχέση μεταξύ ταχύτητας ροής και αποδοτικότητας περιγράφεται από την εξίσωση Van Deemter:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

όπου:

- H = ύψος θεωρητικής πλάκας,
- u = γραμμική ταχύτητα κινητής φάσης,
- A , B και C = όροι που σχετίζονται με διαφορετικούς μηχανισμούς διασποράς.

Η εξίσωση αυτή δείχνει ότι υπάρχει μία βέλτιστη ταχύτητα ροής στην οποία επιτυγχάνεται η μέγιστη αποδοτικότητα της στήλης (Snyder et al., 2010).

3.5.3 Βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας της στήλης

Η θερμοκρασία αποτελεί σημαντική παράμετρο που επηρεάζει τη χρωματογραφική συμπεριφορά των αναλυτών. Η αύξηση της θερμοκρασίας μειώνει το ιξώδες της κινητής φάσης, βελτιώνει τη μεταφορά μάζας και συνήθως οδηγεί σε μικρότερους χρόνους κατακράτησης (Dong, 2019).

Παράλληλα, η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει την εκλεκτικότητα του διαχωρισμού. Σε ορισμένες περιπτώσεις μικρές μεταβολές λίγων βαθμών Κελσίου είναι δυνατόν να μεταβάλουν σημαντικά τη διακριτική ικανότητα μεταξύ γειτονικών κορυφών. Για τον λόγο

αυτό, η θερμοκρασία εξετάζεται συστηματικά κατά τη φάση της ανάπτυξης της μεθόδου (Kazakevich & Lobrutto, 2007).

Η χρήση θερμοστατούμενου θαλάμου στήλης συμβάλλει σημαντικά στη βελτίωση της επαναληψιμότητας των αναλύσεων και στη μείωση της επίδρασης περιβαλλοντικών μεταβολών.

3.5.4 Βελτιστοποίηση της αναλογίας οργανικού διαλύτη

Η περιεκτικότητα της κινητής φάσης σε οργανικό διαλύτη αποτελεί βασικό εργαλείο ελέγχου της κατακράτησης των αναλυτών. Στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, η αύξηση της περιεκτικότητας σε οργανικό διαλύτη μειώνει συνήθως τον χρόνο κατακράτησης των ενώσεων, ενώ η μείωση της οδηγεί σε ισχυρότερη κατακράτηση (Snyder et al., 2010).

Η παράμετρος αυτή επηρεάζει επίσης τη διακριτική ικανότητα και την εκλεκτικότητα της μεθόδου. Σε πολλές περιπτώσεις, μικρές μεταβολές της τάξης του 2–5% στην περιεκτικότητα του οργανικού διαλύτη μπορούν να προκαλέσουν σημαντικές αλλαγές στον βαθμό διαχωρισμού των κορυφών (Dong, 2019).

Η βελτιστοποίηση της σύστασης της κινητής φάσης πραγματοποιείται συνήθως μέσω διαδοχικών πειραματικών δοκιμών ή μέσω στατιστικών σχεδιασμών πειραμάτων, με στόχο την επίτευξη επαρκούς διαχωρισμού σε αποδεκτό χρόνο ανάλυσης.

3.5.5 Βελτιστοποίηση του όγκου έγχυσης

Ο όγκος έγχυσης επηρεάζει τόσο την ευαισθησία της μεθόδου όσο και το σχήμα των χρωματογραφικών κορυφών. Η αύξηση του όγκου έγχυσης οδηγεί συνήθως σε ισχυρότερο αναλυτικό σήμα, γεγονός που μπορεί να βελτιώσει την ανιχνευσιμότητα χαμηλών συγκεντρώσεων (Dong, 2019).

Ωστόσο, υπερβολικά μεγάλοι όγκοι έγχυσης μπορεί να προκαλέσουν υπερφόρτωση της στήλης και να οδηγήσουν σε διεύρυνση ή ασυμμετρία των κορυφών. Το φαινόμενο αυτό επηρεάζει αρνητικά την ποσοτικοποίηση και ενδέχεται να μειώσει τη διακριτική ικανότητα της μεθόδου (Snyder et al., 2010).

Κατά τη φάση ανάπτυξης, επιλέγεται όγκος έγχυσης που παρέχει επαρκή ευαισθησία χωρίς να επηρεάζει αρνητικά τη χρωματογραφική απόδοση.

3.5.6 Βελτιστοποίηση του χρόνου ανάλυσης

Η διάρκεια της ανάλυσης αποτελεί σημαντικό παράγοντα ιδιαίτερα σε περιβάλλοντα ποιοτικού ελέγχου όπου πραγματοποιείται μεγάλος αριθμός αναλύσεων καθημερινά. Η μείωση του χρόνου ανάλυσης συμβάλλει στην αύξηση της παραγωγικότητας και στη μείωση της κατανάλωσης διαλυτών (Kazakevich & Lobrutto, 2007).

Παρόλα αυτά, η επιδίωξη εξαιρετικά σύντομων αναλύσεων δεν πρέπει να γίνεται εις βάρος της διακριτικής ικανότητας ή της αξιοπιστίας της μεθόδου. Η βέλτιστη μέθοδος είναι εκείνη που επιτυγχάνει ισορροπία μεταξύ ταχύτητας και ποιότητας διαχωρισμού (ICH, 2023a).

Η αξιολόγηση του συνολικού χρόνου ανάλυσης περιλαμβάνει όχι μόνο τον χρόνο έκλουσης της δραστικής ουσίας αλλά και τον χρόνο επαναφοράς του συστήματος στις αρχικές συνθήκες λειτουργίας, ιδιαίτερα στις εφαρμογές βαθμιδωτής έκλουσης.

3.5.7 Παράμετροι αξιολόγησης της βελτιστοποίησης

Η βελτιστοποίηση μιας χρωματογραφικής μεθόδου δεν βασίζεται αποκλειστικά στην επίτευξη διαχωρισμού των αναλυτών, αλλά και στην αξιολόγηση συγκεκριμένων παραμέτρων που χαρακτηρίζουν την ποιότητα και την αποδοτικότητα του διαχωρισμού. Οι παράμετροι αυτές παρέχουν αντικειμενικά κριτήρια για την εκτίμηση της απόδοσης της μεθόδου και χρησιμοποιούνται ευρέως τόσο κατά την ανάπτυξη όσο και κατά την επικύρωση χρωματογραφικών διαδικασιών. Μεταξύ των σημαντικότερων χρωματογραφικών παραμέτρων συγκαταλέγονται ο χρόνος κατακράτησης (Retention Time, tR), η διακριτική ικανότητα (Resolution, Rs), ο αριθμός θεωρητικών πλακών (N), ο παράγοντας ουράς ή συμμετρίας της κορυφής (Tailing/Symmetry Factor), καθώς και ο συνολικός χρόνος ολοκλήρωσης της ανάλυσης. Η συνδυαστική αξιολόγηση των παραμέτρων αυτών επιτρέπει την επιλογή των βέλτιστων χρωματογραφικών συνθηκών, εξασφαλίζοντας αποτελεσματικό διαχωρισμό, επαρκή αποδοτικότητα και αξιόπιστα αναλυτικά αποτελέσματα (USP, 2024).

3.5.8 Σύγχρονες προσεγγίσεις βελτιστοποίησης

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται σταδιακή μετάβαση από την παραδοσιακή προσέγγιση «δοκιμής και σφάλματος» (trial-and-error) σε περισσότερο συστηματικές μεθόδους βελτιστοποίησης. Η χρήση εργαλείων Design of Experiments (DoE) επιτρέπει τη διερεύνηση πολλαπλών παραγόντων ταυτόχρονα και την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους (ICH, 2023a).

Η προσέγγιση αυτή αποτελεί βασικό στοιχείο του Analytical Quality by Design (AQbD), το οποίο προωθείται μέσω της ICH Q14. Μέσω του AQbD είναι δυνατόν να καθοριστούν οι κρίσιμες παράμετροι της μεθόδου και να οριστεί ένα εύρος λειτουργίας εντός του οποίου η μέθοδος παραμένει αξιόπιστη και ανθεκτική (USP, 2024).

3.5.9 Συμπεράσματα

Η βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών αποτελεί καθοριστικό στάδιο της ανάπτυξης μιας αναλυτικής μεθόδου HPLC. Η συστηματική αξιολόγηση παραμέτρων όπως ο ρυθμός ροής, η θερμοκρασία, η σύσταση της κινητής φάσης και ο όγκος έγχυσης επιτρέπει την επίτευξη αποτελεσματικού διαχωρισμού και αξιόπιστης ποσοτικοποίησης της δραστικής ουσίας. Η διαδικασία αυτή συμβάλλει ουσιαστικά στην ανάπτυξη ανθεκτικών και αναπαραγωγίμων μεθόδων, οι οποίες μπορούν να εφαρμοστούν με επιτυχία σε περιβάλλοντα ποιοτικού ελέγχου και να υποστηρίξουν τη μετέπειτα διαδικασία επικύρωσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

4.1 Έννοια και σημασία της επικύρωσης αναλυτικών μεθόδων

Η αξιοπιστία των αναλυτικών αποτελεσμάτων αποτελεί θεμελιώδη προϋπόθεση για τη διασφάλιση της ποιότητας των φαρμακευτικών προϊόντων. Οι αποφάσεις που λαμβάνονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, της παραγωγής και του ποιοτικού ελέγχου ενός φαρμάκου βασίζονται σε μεγάλο βαθμό στα δεδομένα που παράγονται από τις αναλυτικές διαδικασίες. Επομένως, η τεκμηρίωση της καταλληλότητας μιας αναλυτικής

μεθόδου για τον σκοπό για τον οποίο προορίζεται αποτελεί κρίσιμο στοιχείο του συστήματος διασφάλισης ποιότητας (ICH, 2023a).

Η επικύρωση αναλυτικής μεθόδου (analytical method validation) αποτελεί μία συστηματική και τεκμηριωμένη διαδικασία μέσω της οποίας αποδεικνύεται ότι μια αναλυτική διαδικασία είναι ικανή να παρέχει αποτελέσματα τα οποία είναι κατάλληλα για τη συγκεκριμένη εφαρμογή για την οποία σχεδιάστηκε. Μέσω της επικύρωσης αξιολογούνται τα χαρακτηριστικά απόδοσης της μεθόδου και επιβεβαιώνεται ότι οι μετρήσεις που παράγονται χαρακτηρίζονται από επαρκή ακρίβεια, επαναληψιμότητα και αξιοπιστία υπό προκαθορισμένες συνθήκες λειτουργίας (USP, 2024).

Η ανάγκη για επικύρωση προκύπτει από το γεγονός ότι κάθε αναλυτική διαδικασία επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων, όπως η απόδοση του εξοπλισμού, τα χαρακτηριστικά των χρησιμοποιούμενων αντιδραστηρίων, οι περιβαλλοντικές συνθήκες και η ανθρώπινη παρέμβαση. Οι παράγοντες αυτοί είναι δυνατόν να εισάγουν μεταβλητότητα στα αποτελέσματα και να επηρεάσουν τη δυνατότητα εξαγωγής ασφαλών συμπερασμάτων σχετικά με την ποιότητα ενός φαρμακευτικού προϊόντος. Η επικύρωση αποσκοπεί στον ποσοτικό προσδιορισμό αυτής της μεταβλητότητας και στην απόδειξη ότι η μέθοδος παραμένει αξιόπιστη εντός προκαθορισμένων ορίων λειτουργίας (FDA, 2015).

Στο σύγχρονο κανονιστικό περιβάλλον, η επικύρωση δεν αντιμετωπίζεται ως μία μεμονωμένη ενέργεια που πραγματοποιείται πριν από την εφαρμογή μιας μεθόδου, αλλά ως μέρος ενός ευρύτερου κύκλου ζωής της αναλυτικής διαδικασίας. Η προσέγγιση αυτή ενσωματώνεται στις σύγχρονες κατευθυντήριες οδηγίες του ICH, σύμφωνα με τις οποίες η ανάπτυξη, η επικύρωση και η συνεχής παρακολούθηση της απόδοσης μιας αναλυτικής μεθόδου αποτελούν αλληλένδετα στάδια μιας ολοκληρωμένης στρατηγικής διασφάλισης ποιότητας (ICH, 2023b).

Η σημασία της επικύρωσης γίνεται ιδιαίτερα εμφανής στη φαρμακευτική βιομηχανία, όπου τα αναλυτικά δεδομένα χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση κρίσιμων χαρακτηριστικών ποιότητας, όπως η περιεκτικότητα της δραστικής ουσίας, η παρουσία προσμίξεων, η ομοιομορφία των παρτίδων και η σταθερότητα των προϊόντων. Η

αξιοπιστία αυτών των δεδομένων επηρεάζει άμεσα τόσο τη συμμόρφωση με τις κανονιστικές απαιτήσεις όσο και την προστασία της δημόσιας υγείας (Rozet et al., 2007).

Πέραν της κανονιστικής συμμόρφωσης, η εφαρμογή κατάλληλων διαδικασιών επικύρωσης συμβάλλει στη μείωση των αναλυτικών σφαλμάτων, στη βελτιστοποίηση της εργαστηριακής λειτουργίας και στην αύξηση της εμπιστοσύνης στα παραγόμενα αποτελέσματα. Παράλληλα, διευκολύνει τη μεταφορά αναλυτικών μεθόδων μεταξύ εργαστηρίων και παραγωγικών εγκαταστάσεων, διασφαλίζοντας ότι η απόδοση της μεθόδου παραμένει σταθερή ανεξαρτήτως τύπου εφαρμογής (USP, 2024).

Σύμφωνα με τις σύγχρονες κατευθυντήριες οδηγίες, η έκταση της επικύρωσης καθορίζεται από τον σκοπό χρήσης της αναλυτικής διαδικασίας. Διαφορετικές απαιτήσεις εφαρμόζονται για μεθόδους προσδιορισμού περιεκτικότητας (assay), για μεθόδους προσδιορισμού προσμίξεων, για δοκιμές ταυτοποίησης ή για ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών σε πολύ χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης. Ωστόσο, σε όλες τις περιπτώσεις ο βασικός στόχος παραμένει ο ίδιος: η παροχή επιστημονικά τεκμηριωμένων αποδείξεων ότι η μέθοδος είναι κατάλληλη για την προβλεπόμενη χρήση της (Reid et al., 2013).

4.2 Κανονιστικό πλαίσιο επικύρωσης αναλυτικών μεθόδων

Η επικύρωση αναλυτικών διαδικασιών αποτελεί σήμερα αναπόσπαστο τμήμα των συστημάτων διασφάλισης ποιότητας που εφαρμόζονται στη φαρμακευτική βιομηχανία. Η ανάγκη για αξιόπιστα και επιστημονικά τεκμηριωμένα αναλυτικά αποτελέσματα οδήγησε στη δημιουργία διεθνών κατευθυντήριων οδηγιών και κανονιστικών απαιτήσεων, οι οποίες καθορίζουν τις αρχές ανάπτυξης, αξιολόγησης και εφαρμογής των αναλυτικών μεθόδων. Η εναρμόνιση των απαιτήσεων αυτών είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς επιτρέπει την αποδοχή των αναλυτικών δεδομένων από διαφορετικές ρυθμιστικές αρχές και διευκολύνει τη διεθνή κυκλοφορία φαρμακευτικών προϊόντων (ICH, 2023a).

Κατά τις τελευταίες δεκαετίες, η συνεχής πρόοδος των αναλυτικών τεχνικών και η αυξανόμενη πολυπλοκότητα των φαρμακευτικών προϊόντων ανέδειξαν την ανάγκη ύπαρξης κοινών επιστημονικών προτύπων για την αξιολόγηση της καταλληλότητας των

αναλυτικών διαδικασιών. Ως αποτέλεσμα, αναπτύχθηκαν διεθνή κανονιστικά πλαίσια τα οποία καθορίζουν τόσο τα χαρακτηριστικά απόδοσης που πρέπει να εξετάζονται κατά την επικύρωση όσο και τη φιλοσοφία που διέπει την ανάπτυξη και τη διαχείριση των αναλυτικών μεθόδων καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους (ICH, 2023b).

Σήμερα, οι σημαντικότερες κανονιστικές αναφορές για την επικύρωση αναλυτικών μεθόδων είναι οι οδηγίες του International Council for Harmonisation (ICH), τα γενικά κεφάλαια της United States Pharmacopoeia (USP), οι απαιτήσεις της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας (European Pharmacopoeia) και οι κατευθυντήριες οδηγίες της Food and Drug Administration (FDA). Τα κείμενα αυτά λειτουργούν συμπληρωματικά και παρέχουν ένα ολοκληρωμένο πλαίσιο για την ανάπτυξη, την επικύρωση και τη συνεχή παρακολούθηση της απόδοσης των αναλυτικών διαδικασιών (USP, 2024).

4.2.1 Ο ρόλος του International Council for Harmonisation (ICH)

Το International Council for Harmonisation ιδρύθηκε με σκοπό την εναρμόνιση των τεχνικών και επιστημονικών απαιτήσεων που διέπουν την ανάπτυξη και την αδειοδότηση φαρμακευτικών προϊόντων στις κυριότερες αγορές του κόσμου. Η ανάγκη δημιουργίας του οργανισμού προέκυψε από τις σημαντικές διαφορές που υπήρχαν μεταξύ των κανονιστικών απαιτήσεων της Ευρώπης, των Ηνωμένων Πολιτειών και της Ιαπωνίας, γεγονός που συχνά οδηγούσε σε επανάληψη μελετών και αυξημένο κόστος ανάπτυξης φαρμάκων (ICH, 2023a).

Στον τομέα της φαρμακευτικής ανάλυσης, το ICH έχει διαδραματίσει καθοριστικό ρόλο μέσω της ανάπτυξης κατευθυντήριων οδηγιών που αφορούν τόσο την ανάπτυξη όσο και την επικύρωση αναλυτικών διαδικασιών. Οι οδηγίες αυτές αποτελούν σήμερα το βασικό σημείο αναφοράς για τη φαρμακοβιομηχανία και τις ρυθμιστικές αρχές παγκοσμίως.

Η σύγχρονη προσέγγιση του ICH βασίζεται στη λογική της επιστημονικής τεκμηρίωσης, της κατανόησης της αναλυτικής διαδικασίας και της διαχείρισης κινδύνου. Σύμφωνα με τη φιλοσοφία αυτή, η αξιοπιστία μιας αναλυτικής μεθόδου δεν αποδεικνύεται μόνο μέσω

της τελικής επικύρωσης, αλλά προκύπτει από τη συνολική γνώση που αποκτάται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και εφαρμογής της μεθόδου (ICH, 2023b).

4.2.2 ICH Q2(R2): Validation of Analytical Procedures

Η οδηγία ICH Q2(R2) αποτελεί σήμερα το βασικό διεθνές πρότυπο για την επικύρωση αναλυτικών διαδικασιών. Η οδηγία δημοσιεύθηκε στο πλαίσιο της αναθεώρησης της παλαιότερης ICH Q2(R1), με στόχο την προσαρμογή των απαιτήσεων στις σύγχρονες αναλυτικές τεχνολογίες και στις αρχές του κύκλου ζωής των αναλυτικών διαδικασιών (ICH, 2023a).

Η Q2(R2) εισάγει ένα δομημένο πλαίσιο αξιολόγησης των χαρακτηριστικών απόδοσης μιας αναλυτικής μεθόδου και περιγράφει τις βασικές παραμέτρους που πρέπει να εξετάζονται κατά την επικύρωση. Οι παράμετροι αυτές περιλαμβάνουν την ειδικότητα (specificity), τη γραμμικότητα (linearity), το εύρος (range), την ακρίβεια (accuracy), την πιστότητα (precision), το όριο ανίχνευσης (limit of detection), το όριο ποσοτικοποίησης (limit of quantitation) και την ανθεκτικότητα (robustness) (ICH, 2023a).

Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά της αναθεωρημένης οδηγίας είναι η έμφαση που δίνεται στη σύνδεση των χαρακτηριστικών απόδοσης με τον σκοπό χρήσης της μεθόδου. Σύμφωνα με την προσέγγιση αυτή, οι απαιτήσεις επικύρωσης διαφοροποιούνται ανάλογα με το αν η μέθοδος χρησιμοποιείται για ταυτοποίηση, ποσοτικό προσδιορισμό δραστικής ουσίας ή ανίχνευση προσμίξεων (ICH, 2023a).

Επιπλέον, η οδηγία ενσωματώνει σύγχρονες στατιστικές προσεγγίσεις για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και προωθεί τη χρήση επιστημονικά τεκμηριωμένων κριτηρίων αποδοχής, ενισχύοντας την αντικειμενικότητα της διαδικασίας επικύρωσης.

4.2.3 ICH Q14: Analytical Procedure Development

Η οδηγία ICH Q14 εκδόθηκε με σκοπό να συμπληρώσει την ICH Q2(R2), παρέχοντας ένα εναρμονισμένο πλαίσιο για την ανάπτυξη αναλυτικών διαδικασιών. Σε αντίθεση με την Q2(R2), η οποία επικεντρώνεται κυρίως στην αξιολόγηση των χαρακτηριστικών

απόδοσης, η Q14 εστιάζει στη διαδικασία σχεδιασμού και βελτιστοποίησης των αναλυτικών μεθόδων (ICH, 2023b).

Κεντρική έννοια της οδηγίας αποτελεί το Analytical Procedure Lifecycle, σύμφωνα με το οποίο η ανάπτυξη, η επικύρωση και η συνεχής παρακολούθηση της απόδοσης μιας αναλυτικής διαδικασίας θεωρούνται αλληλένδετα στάδια μιας ενιαίας στρατηγικής ποιότητας. Η προσέγγιση αυτή βασίζεται στις αρχές του Quality by Design (QbD), δίνοντας έμφαση στην κατανόηση των κρίσιμων παραμέτρων που επηρεάζουν την απόδοση της μεθόδου (ICH, 2023b).

Η εφαρμογή της Q14 έχει ιδιαίτερη σημασία στις χρωματογραφικές τεχνικές, όπου μικρές μεταβολές σε παραμέτρους όπως το pH, η σύσταση της κινητής φάσης ή η θερμοκρασία της στήλης μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά τον διαχωρισμό και την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

4.2.4 United States Pharmacopoeia (USP)

Η United States Pharmacopoeial Convention παρέχει ένα εκτεταμένο σύνολο γενικών κεφαλαίων που αφορούν την ανάπτυξη, επικύρωση και εφαρμογή αναλυτικών μεθόδων. Ιδιαίτερη σημασία για τη φαρμακευτική ανάλυση έχουν τα κεφάλαια USP <621>, USP <1220>, USP <1225> και USP <1226> (USP, 2024).

Το κεφάλαιο USP <621> περιγράφει τις γενικές αρχές της χρωματογραφίας και καθορίζει απαιτήσεις σχετικά με την αξιολόγηση των χρωματογραφικών συστημάτων, συμπεριλαμβανομένων παραμέτρων όπως η διακριτική ικανότητα, ο αριθμός θεωρητικών πλακών και ο παράγοντας ασυμμετρίας κορυφών (USP, 2024).

Το USP <1225> αναφέρεται ειδικά στην επικύρωση αναλυτικών διαδικασιών και παρουσιάζει τις βασικές παραμέτρους που πρέπει να εξετάζονται για διαφορετικούς τύπους αναλύσεων. Το USP <1220> εισάγει την έννοια του κύκλου ζωής των αναλυτικών διαδικασιών, η οποία παρουσιάζει σημαντικές ομοιότητες με τη φιλοσοφία της ICH Q14. Τέλος, το USP <1226> αφορά την επαλήθευση (verification) ήδη επικυρωμένων

φαρμακοποιικών μεθόδων πριν από την εφαρμογή τους σε ένα συγκεκριμένο εργαστήριο (USP, 2024).

4.2.5 Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία

Η European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare μέσω της European Pharmacopoeia παρέχει τις βασικές απαιτήσεις που εφαρμόζονται στον ποιοτικό έλεγχο φαρμακευτικών προϊόντων στην Ευρώπη. Ιδιαίτερη σημασία για τις χρωματογραφικές αναλύσεις έχει το γενικό κεφάλαιο 2.2.46 «Chromatographic Separation Techniques», το οποίο περιγράφει τις θεωρητικές αρχές και τις παραμέτρους αξιολόγησης της χρωματογραφικής απόδοσης (EDQM, 2023).

Το κεφάλαιο αυτό καθορίζει τον τρόπο υπολογισμού και αξιολόγησης παραμέτρων όπως ο χρόνος κατακράτησης, η διακριτική ικανότητα, ο παράγοντας ουράς και ο αριθμός θεωρητικών πλακών. Οι παράμετροι αυτές χρησιμοποιούνται ευρέως κατά την αξιολόγηση της καταλληλότητας συστήματος και αποτελούν βασικό τμήμα της επικύρωσης χρωματογραφικών μεθόδων (EDQM, 2023).

4.2.6 FDA Guidance for Industry

Η Food and Drug Administration έχει εκδώσει κατευθυντήριες οδηγίες σχετικά με την ανάπτυξη και επικύρωση αναλυτικών διαδικασιών για φαρμακευτικά και βιολογικά προϊόντα. Το έγγραφο *Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics* παρέχει πρακτικές οδηγίες για την τεκμηρίωση των χαρακτηριστικών απόδοσης και τον τρόπο παρουσίασης των αποτελεσμάτων στους φακέλους αδειοδότησης (FDA, 2015).

Οι οδηγίες της FDA ευθυγραμμίζονται σε μεγάλο βαθμό με τις απαιτήσεις του ICH και χρησιμοποιούνται συχνά ως συμπληρωματική πηγή για την ερμηνεία και εφαρμογή των αρχών επικύρωσης.

4.3 Ειδικότητα (Specificity)

4.3.1 Ορισμός και σημασία της ειδικότητας

Η ειδικότητα (specificity) αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά απόδοσης μιας αναλυτικής μεθόδου και αναφέρεται στην ικανότητά της να προσδιορίζει με σαφήνεια και αξιοπιστία τον αναλύτη παρουσία άλλων συστατικών που ενδέχεται να συνυπάρχουν στο δείγμα. Τα συστατικά αυτά μπορεί να περιλαμβάνουν προσμίξεις, προϊόντα αποδόμησης, έκδοχα, υπολείμματα αντιδραστηρίων ή άλλες ουσίες που σχετίζονται με τη διαδικασία παραγωγής και αποθήκευσης του φαρμακευτικού προϊόντος (ICH, 2023).

Στο πλαίσιο της φαρμακευτικής ανάλυσης, η ειδικότητα διασφαλίζει ότι το αναλυτικό σήμα που αποδίδεται στη δραστική ουσία δεν επηρεάζεται από την παρουσία άλλων ενώσεων. Η απαίτηση αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική σε χρωματογραφικές τεχνικές όπως η HPLC, όπου η συνύπαρξη πολλών συστατικών σε ένα πολύπλοκο μίγμα μπορεί να οδηγήσει σε αλληλεπικαλύψεις κορυφών και συνεπώς σε σφάλματα ποσοτικοποίησης (USP, 2024).

Η σημασία της ειδικότητας είναι ακόμη μεγαλύτερη στις μελέτες σταθερότητας, καθώς κατά την αποθήκευση ενός φαρμακευτικού προϊόντος ενδέχεται να σχηματιστούν προϊόντα αποδόμησης με χημικές ιδιότητες παρόμοιες με αυτές της δραστικής ουσίας. Σε τέτοιες περιπτώσεις, η μέθοδος πρέπει να είναι ικανή να διαχωρίζει αποτελεσματικά τις ενώσεις αυτές ώστε να αποφεύγονται λανθασμένες εκτιμήσεις της περιεκτικότητας ή της καθαρότητας του προϊόντος (FDA, 2015).

Η ICH Q2(R2) επισημαίνει ότι η αξιολόγηση της ειδικότητας πρέπει να πραγματοποιείται λαμβάνοντας υπόψη τον επιδιωκόμενο σκοπό χρήσης της μεθόδου. Για παράδειγμα, οι απαιτήσεις ειδικότητας μιας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού δραστικής ουσίας διαφέρουν από εκείνες μιας μεθόδου προσδιορισμού προσμίξεων ή μιας δοκιμής ταυτοποίησης (ICH, 2023).

4.3.2 Ειδικότητα σε μεθόδους HPLC προσδιορισμού δραστικής ουσίας

Στις μεθόδους HPLC που χρησιμοποιούνται για τον ποσοτικό προσδιορισμό δραστικών ουσιών σε φαρμακευτικά σκευάσματα, η ειδικότητα συνδέεται άμεσα με την ικανότητα της μεθόδου να παράγει μία σαφώς διαχωρισμένη χρωματογραφική κορυφή η οποία αντιστοιχεί αποκλειστικά στον αναλύτη ενδιαφέροντος. Η αξιολόγηση της ειδικότητας πραγματοποιείται συνήθως μέσω σύγκρισης χρωματογραφημάτων διαφορετικών τύπων δειγμάτων, όπως διαλύματα αναφοράς, placebo, δείγματα προϊόντων αποδόμησης και πραγματικά δείγματα φαρμακευτικών σκευασμάτων (EDQM, 2023).

Η παρουσία εκδόχων αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που εξετάζονται κατά την αξιολόγηση της ειδικότητας. Τα έκδοχα μπορεί να περιλαμβάνουν πληρωτικά, συνδετικά, αποσαθρωτικά, λιπαντικά και άλλες βοηθητικές ουσίες, οι οποίες, αν και φαρμακολογικά ανενεργές, είναι δυνατόν να επηρεάσουν το χρωματογραφικό προφίλ του δείγματος. Για τον λόγο αυτό απαιτείται η ανάλυση placebo διαλυμάτων που περιέχουν όλα τα έκδοχα αλλά όχι τη δραστική ουσία, ώστε να επιβεβαιωθεί η απουσία παρεμβολών στον χρόνο κατακράτησης του αναλύτη (USP, 2024).

Επιπλέον, σε περιπτώσεις όπου είναι γνωστή η παρουσία σχετικών ουσιών ή προσμίξεων, η μέθοδος πρέπει να αποδεικνύει ότι επιτυγχάνει επαρκή διαχωρισμό μεταξύ των κορυφών. Ο βαθμός διαχωρισμού αξιολογείται συνήθως μέσω της παραμέτρου resolution (R_s), με τιμές μεγαλύτερες από 1,5 να θεωρούνται γενικά αποδεκτές για πλήρη διαχωρισμό των ενώσεων (EDQM, 2023).

4.3.3 Παρεμβολές από έκδοχα και προσμίξεις

Κατά την ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου HPLC, ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στην πιθανότητα παρεμβολών από ουσίες που περιέχονται στο τελικό φαρμακευτικό προϊόν. Οι παρεμβολές αυτές μπορούν να οδηγήσουν σε υπερεκτίμηση ή υποεκτίμηση της συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας και να επηρεάσουν την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων (Kazakevich & Lobrutto, 2007).

Οι προσμίξεις μπορεί να προέρχονται από τις πρώτες ύλες, τη συνθετική διαδικασία, την παραγωγική διαδικασία ή την αποδόμηση του προϊόντος κατά την αποθήκευση. Ανάλογα

με τη χημική τους δομή, οι προσμίξεις ενδέχεται να εμφανίζουν παρόμοια χρωματογραφική συμπεριφορά με τη δραστική ουσία, γεγονός που αυξάνει τη δυσκολία του διαχωρισμού τους (Snyder et al., 2010).

Για την αντιμετώπιση των προβλημάτων αυτών, πραγματοποιούνται δοκιμές κατά τις οποίες το δείγμα εμπλουτίζεται με γνωστές προσμίξεις (spiked samples). Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει την αξιολόγηση της ικανότητας της μεθόδου να διαχωρίζει τις ουσίες και να προσδιορίζει με ακρίβεια τη δραστική ουσία παρουσία δυνητικών παρεμβολών (ICH, 2023).

4.3.4 Forced Degradation Studies και Stability-Indicating Methods

Στη σύγχρονη φαρμακευτική ανάλυση, η αξιολόγηση της ειδικότητας συνδέεται στενά με τις μελέτες εξαναγκασμένης αποδόμησης (forced degradation studies). Οι μελέτες αυτές σχεδιάζονται ώστε να προκαλέσουν ελεγχόμενη αποδόμηση της δραστικής ουσίας μέσω έκθεσης σε ακραίες συνθήκες, όπως όξινο ή αλκαλικό περιβάλλον, οξείδωση, αυξημένη θερμοκρασία και έκθεση σε φως (FDA, 2015).

Στόχος των μελετών αυτών δεν είναι η πλήρης καταστροφή του αναλύτη, αλλά η δημιουργία προϊόντων αποδόμησης σε επαρκείς ποσότητες ώστε να αξιολογηθεί η ικανότητα της μεθόδου να τα διαχωρίζει από τη δραστική ουσία. Η προσέγγιση αυτή αποτελεί βασική απαίτηση για τις λεγόμενες stability-indicating methods, δηλαδή τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται στις μελέτες σταθερότητας φαρμακευτικών προϊόντων (ICH, 2023).

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της FDA, μια μέθοδος θεωρείται stability-indicating όταν μπορεί να προσδιορίζει με αξιοπιστία τη δραστική ουσία χωρίς παρεμβολές από προϊόντα αποδόμησης, προσμίξεις ή έκδοχα. Η επιτυχής ολοκλήρωση μελετών forced degradation αποτελεί επομένως ισχυρή απόδειξη της ειδικότητας της μεθόδου (FDA, 2015).

4.3.5 Αξιολόγηση της ειδικότητας μέσω PDA ανιχνευτών

Η χρήση ανιχνευτών φωτοδιόδων (Photodiode Array Detectors – PDA) έχει βελτιώσει σημαντικά τη δυνατότητα αξιολόγησης της ειδικότητας στις χρωματογραφικές αναλύσεις. Σε αντίθεση με τους συμβατικούς UV ανιχνευτές, οι PDA καταγράφουν ολόκληρο το φάσμα απορρόφησης κάθε κορυφής, επιτρέποντας την εκτίμηση της καθαρότητας κορυφής (peak purity) (Dong, 2019).

Η αξιολόγηση της καθαρότητας κορυφής βασίζεται στη σύγκριση των φασμάτων απορρόφησης σε διαφορετικά σημεία της κορυφής. Εάν τα φάσματα παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ομοιότητας, τεκμηριώνεται ότι η κορυφή αντιστοιχεί σε μία μόνο χημική ένωση. Αντίθετα, διαφοροποιήσεις στο φάσμα ενδέχεται να υποδηλώνουν συγχρωματογράφιση περισσοτέρων ενώσεων (Dong, 2019).

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ευρέως κατά την ανάπτυξη και επικύρωση stability-indicating HPLC μεθόδων, καθώς παρέχει επιπλέον αποδεικτικά στοιχεία σχετικά με την ειδικότητα της αναλυτικής διαδικασίας.

4.3.6 Κριτήρια αποδοχής για την ειδικότητα

Η αξιολόγηση της ειδικότητας δεν βασίζεται σε ένα μοναδικό αριθμητικό κριτήριο αλλά σε ένα σύνολο αποδεικτικών στοιχείων που τεκμηριώνουν την απουσία παρεμβολών. Η ειδικότητα μιας αναλυτικής μεθόδου θεωρείται επαρκής όταν αποδεικνύεται ότι ο αναλύτης μπορεί να προσδιοριστεί αξιόπιστα παρουσία όλων των πιθανών παρεμβαλλόμενων συστατικών της μήτρας. Στην πράξη, η αξιολόγηση της ειδικότητας βασίζεται στην απουσία κορυφών από το placebo ή άλλες ουσίες στον χρόνο κατακράτησης της δραστικής ουσίας, καθώς και στην επίτευξη ικανοποιητικού διαχωρισμού μεταξύ της δραστικής ουσίας, των προσμίξεων και των πιθανών προϊόντων αποδόμησης. Επιπλέον, η καθαρότητα της χρωματογραφικής κορυφής θα πρέπει να επιβεβαιώνεται μέσω κατάλληλων τεχνικών, όπως η ανίχνευση με φωτοδιωδική διάταξη (Photodiode Array Detector, PDA), προκειμένου να τεκμηριώνεται η απουσία συνεκλουόμενων ενώσεων. Σημαντικό στοιχείο για την αξιολόγηση της ειδικότητας αποτελεί επίσης η διενέργεια μελετών εξαναγκασμένης αποδόμησης (forced degradation studies), οι οποίες αποδεικνύουν ότι η μέθοδος είναι ικανή να διαχωρίζει τη δραστική ουσία από τα

προϊόντα αποδόμησης της και συνεπώς μπορεί να χαρακτηριστεί ως μέθοδος ένδειξης σταθερότητας (stability-indicating method) (ICH, 2023).

Η τεκμηρίωση των παραπάνω παραμέτρων παρέχει ισχυρές αποδείξεις ότι η μέθοδος είναι κατάλληλη για τον αξιόπιστο προσδιορισμό της δραστικής ουσίας στο εξεταζόμενο φαρμακευτικό σκεύασμα.

4.4 Γραμμικότητα (Linearity) και Εύρος (Range)

4.4.1 Έννοια της γραμμικότητας

Η γραμμικότητα αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό απόδοσης μιας αναλυτικής διαδικασίας και περιγράφει την ικανότητα της μεθόδου να παρέχει αποτελέσματα τα οποία μεταβάλλονται αναλογικά με τη συγκέντρωση του αναλύτη εντός προκαθορισμένου εύρους τιμών. Με άλλα λόγια, η γραμμικότητα εκφράζει τον βαθμό στον οποίο η αναλυτική απόκριση του συστήματος μπορεί να συσχετισθεί μαθηματικά με τη συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας (ICH, 2023).

Στις μεθόδους HPLC, η αναλυτική απόκριση εκφράζεται συνήθως μέσω του εμβαδού της χρωματογραφικής κορυφής (peak area) ή, σε ορισμένες περιπτώσεις, μέσω του ύψους της κορυφής (peak height). Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας, αναμένεται αντίστοιχη αύξηση του καταγραφόμενου σήματος. Η ύπαρξη προβλέψιμης σχέσης μεταξύ συγκέντρωσης και απόκρισης επιτρέπει την αξιόπιστη ποσοτικοποίηση αγνώστων δειγμάτων μέσω καμπυλών αναφοράς (Snyder et al., 2010).

Η αξιολόγηση της γραμμικότητας είναι ιδιαίτερα σημαντική για μεθόδους ποσοτικού προσδιορισμού δραστικών ουσιών, καθώς η ακρίβεια των υπολογισμών συγκέντρωσης εξαρτάται άμεσα από την ποιότητα του μαθηματικού μοντέλου που χρησιμοποιείται για τη βαθμονόμηση του συστήματος. Ελλιπής γραμμικότητα μπορεί να οδηγήσει σε συστηματικά σφάλματα και συνεπώς σε λανθασμένη εκτίμηση της περιεκτικότητας του φαρμακευτικού προϊόντος (USP, 2024).

4.4.2 Θεωρητική βάση της γραμμικής παλινδρόμησης

Η αξιολόγηση της γραμμικότητας πραγματοποιείται συνήθως μέσω γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression), κατά την οποία η αναλυτική απόκριση συσχετίζεται με τη συγκέντρωση του αναλύτη μέσω μιας εξίσωσης της μορφής:

$$y = ax + b$$

$$a$$
$$b$$

όπου:

- y = αναλυτική απόκριση (peak area ή peak height),
- x = συγκέντρωση του αναλύτη,
- a = κλίση της ευθείας (slope),
- b = τεταγμένη επί την αρχή (intercept).

Η κλίση της ευθείας αντιπροσωπεύει τη μεταβολή της απόκρισης ανά μονάδα συγκέντρωσης και συνδέεται άμεσα με την ευαισθησία της μεθόδου. Όσο μεγαλύτερη είναι η κλίση, τόσο μεγαλύτερη είναι η μεταβολή του σήματος για μια δεδομένη μεταβολή της συγκέντρωσης (Dong, 2019).

Η τεταγμένη επί την αρχή εκφράζει τη θεωρητική απόκριση του συστήματος όταν η συγκέντρωση του αναλύτη είναι μηδενική. Ιδανικά, η τιμή αυτή θα πρέπει να προσεγγίζει το μηδέν, αν και στην πράξη συχνά παρατηρούνται μικρές αποκλίσεις λόγω θορύβου του συστήματος ή άλλων πειραματικών παραγόντων (Kazakevich & Lobrutto, 2007).

4.4.3 Κατασκευή καμπύλης αναφοράς

Η αξιολόγηση της γραμμικότητας πραγματοποιείται μέσω της ανάλυσης πρότυπων διαλυμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων που καλύπτουν το προβλεπόμενο εύρος λειτουργίας της μεθόδου. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της ICH, συνιστάται η χρήση τουλάχιστον πέντε επιπέδων συγκέντρωσης, ενώ σε πολλές φαρμακευτικές εφαρμογές χρησιμοποιούνται έξι ή περισσότερα επίπεδα για τη βελτίωση της στατιστικής αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων (ICH, 2023).

Για μεθόδους προσδιορισμού περιεκτικότητας (assay methods), συνηθίζεται η διερεύνηση συγκεντρώσεων που αντιστοιχούν περίπου στο 80–120% της ονομαστικής συγκέντρωσης του αναλύτη. Σε ορισμένες περιπτώσεις εφαρμόζονται ευρύτερα εύρη, όπως 70–130% ή 50–150%, όταν απαιτείται μεγαλύτερη ευελιξία της μεθόδου (USP, 2024).

Μετά την ανάλυση των προτύπων διαλυμάτων, κατασκευάζεται διάγραμμα στο οποίο απεικονίζεται η συγκέντρωση στον οριζόντιο άξονα και η αναλυτική απόκριση στον κατακόρυφο άξονα. Η εφαρμογή γραμμικής παλινδρόμησης επιτρέπει τον υπολογισμό της εξίσωσης βαθμονόμησης και των σχετικών στατιστικών παραμέτρων (Snyder et al., 2010).

4.4.4 Συντελεστής συσχέτισης και περιορισμοί του

Παραδοσιακά, η γραμμικότητα αξιολογούνταν κυρίως μέσω του συντελεστή συσχέτισης (correlation coefficient, r) ή του συντελεστή προσδιορισμού (R^2). Τιμές μεγαλύτερες από 0,999 θεωρούνται συνήθως ενδεικτικές εξαιρετικής γραμμικής σχέσης σε φαρμακευτικές εφαρμογές (USP, 2024).

Ωστόσο, η σύγχρονη στατιστική προσέγγιση επισημαίνει ότι η αποκλειστική χρήση του R^2 μπορεί να είναι παραπλανητική. Ακόμη και σε περιπτώσεις όπου υπάρχουν αποκλίσεις από τη γραμμικότητα, είναι δυνατόν να προκύψουν πολύ υψηλές τιμές συντελεστή συσχέτισης. Για τον λόγο αυτό, η ICH Q2(R2) προτείνει την αξιολόγηση πρόσθετων στοιχείων, όπως η ανάλυση των καταλοίπων (residuals), η οπτική επιθεώρηση της καμπύλης και η στατιστική αξιολόγηση της παλινδρόμησης (ICH, 2023).

Η σύγχρονη πρακτική δίνει ιδιαίτερη έμφαση στην επάρκεια του calibration model και στην ικανότητά του να προβλέπει αξιόπιστα τις συγκεντρώσεις των αγνώστων δειγμάτων εντός του προκαθορισμένου εύρους λειτουργίας.

4.4.5 Εύρος (Range)

Το εύρος (range) ορίζεται ως το διάστημα συγκεντρώσεων εντός του οποίου η αναλυτική διαδικασία έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζει αποδεκτά επίπεδα γραμμικότητας, ακρίβειας και πιστότητας. Η έννοια του εύρους συνδέεται άμεσα με τον επιδιωκόμενο σκοπό χρήσης

της μεθόδου και καθορίζει τα όρια εντός των οποίων τα αποτελέσματα μπορούν να θεωρηθούν αξιόπιστα (ICH, 2023).

Για μεθόδους ποσοτικού προσδιορισμού δραστικών ουσιών, η ICH αναφέρει ότι το εύρος πρέπει συνήθως να καλύπτει το 80–120% της αναμενόμενης συγκέντρωσης δοκιμής. Αντίστοιχα, για μεθόδους προσδιορισμού προσμίξεων, το εύρος πρέπει να εκτείνεται από το όριο ποσοτικοποίησης έως το ανώτατο επίπεδο προσμίξεων που αναμένεται να ανιχνευθεί στο δείγμα (ICH, 2023).

Η ορθή επιλογή του εύρους είναι κρίσιμη, καθώς ένα υπερβολικά περιορισμένο εύρος μπορεί να μην καλύπτει τις πραγματικές συνθήκες εφαρμογής της μεθόδου, ενώ ένα υπερβολικά ευρύ εύρος μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια γραμμικότητας και μείωση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων (USP, 2024).

4.4.6 Κριτήρια αποδοχής

Τα κριτήρια αποδοχής για τη γραμμικότητα καθορίζονται συνήθως κατά την ανάπτυξη της μεθόδου και εξαρτώνται από τον τύπο της ανάλυσης. Στις περισσότερες φαρμακευτικές εφαρμογές θεωρούνται αποδεκτά τα ακόλουθα:

- Συντελεστής συσχέτισης (r) $\geq 0,999$.
- Οπτική απουσία συστηματικών αποκλίσεων από τη γραμμικότητα.
- Τυχαία κατανομή των residuals γύρω από τη γραμμή παλινδρόμησης.
- Αποδεκτή ακρίβεια και πιστότητα σε όλα τα επίπεδα συγκέντρωσης του εξεταζόμενου εύρους.
- Στατιστικά τεκμηριωμένη καταλληλότητα του μοντέλου βαθμονόμησης (ICH, 2023; USP, 2024).

Η τεκμηρίωση των παραπάνω στοιχείων παρέχει ισχυρές αποδείξεις ότι η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια για τον ποσοτικό προσδιορισμό της δραστικής ουσίας εντός του καθορισμένου εύρους συγκεντρώσεων.

4.4.7 Στατιστική αξιολόγηση του μοντέλου βαθμονόμησης

4.4.7.1 Περιορισμοί του συντελεστή συσχέτισης

Παραδοσιακά, η αξιολόγηση της γραμμικότητας βασιζόταν κυρίως στον συντελεστή συσχέτισης (r) ή στον συντελεστή προσδιορισμού (R^2). Παρότι οι παράμετροι αυτοί παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τη σχέση μεταξύ συγκεντρώσεως και αναλυτικής απόκρισης, δεν επαρκούν από μόνοι τους για την πλήρη αξιολόγηση της καταλληλότητας ενός μοντέλου βαθμονόμησης (Miller & Miller, 2018).

Σε πολλές περιπτώσεις είναι δυνατόν να προκύψουν πολύ υψηλές τιμές R^2 ακόμη και όταν υπάρχουν συστηματικές αποκλίσεις από τη γραμμικότητα. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιείται μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων ή όταν οι αποκλίσεις εντοπίζονται μόνο στα χαμηλότερα επίπεδα της καμπύλης βαθμονόμησης. Συνεπώς, η αποκλειστική αξιολόγηση του R^2 μπορεί να οδηγήσει σε υπερεκτίμηση της ποιότητας του μοντέλου παλινδρόμησης (ICH, 2023).

Για τον λόγο αυτό, οι σύγχρονες κατευθυντήριες οδηγίες προτείνουν τη συμπληρωματική χρήση πρόσθετων στατιστικών εργαλείων που επιτρέπουν πληρέστερη αξιολόγηση της απόδοσης του μοντέλου βαθμονόμησης (USP, 2024).

4.4.7.2 Ανάλυση καταλοίπων (Residual Analysis)

Η ανάλυση των καταλοίπων/σφαλμάτων αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία για την αξιολόγηση της επάρκειας ενός μοντέλου παλινδρόμησης. Ως κατάλοιπο (residual) ορίζεται η διαφορά μεταξύ της πειραματικά παρατηρούμενης τιμής και της τιμής που προβλέπεται από την εξίσωση βαθμονόμησης (Miller & Miller, 2018).

Μαθηματικά:

$$e_i = y_i - \hat{y}_i$$

όπου:

- e_i = κατάλοιπο
- y_i = πειραματική τιμή
- $\hat{y}_i$ = προβλεπόμενη τιμή

Σε ένα κατάλληλο γραμμικό μοντέλο, τα κατάλοιπα αναμένεται να κατανέμονται τυχαία γύρω από το μηδέν χωρίς εμφανές μοτίβο. Αντίθετα, η εμφάνιση συστηματικών τάσεων μπορεί να υποδηλώνει ότι η σχέση μεταξύ συγκέντρωσης και απόκρισης δεν είναι πραγματικά γραμμική (Miller & Miller, 2018).

Η οπτική αξιολόγηση των residual plots χρησιμοποιείται ευρέως στη φαρμακευτική βιομηχανία για την επιβεβαίωση της καταλληλότητας της γραμμικής παλινδρόμησης κατά την επικύρωση αναλυτικών μεθόδων (Dong, 2019).

4.4.7.3 Weighted Regression

Σε πολλές αναλυτικές μεθόδους HPLC παρατηρείται ότι η διακύμανση των μετρήσεων αυξάνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του αναλύτη. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως ετεροσκεδαστικότητα (heteroscedasticity) και μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ακρίβεια της παλινδρόμησης (Almeida et al., 2002).

Όταν εφαρμόζεται απλή γραμμική παλινδρόμηση, τα σημεία υψηλής συγκέντρωσης τείνουν να επηρεάζουν δυσανάλογα την εξίσωση βαθμονόμησης. Ως αποτέλεσμα, η προσαρμογή του μοντέλου στα χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης ενδέχεται να είναι ανεπαρκής, οδηγώντας σε αυξημένα σφάλματα ποσοτικοποίησης.

Για την αντιμετώπιση του προβλήματος χρησιμοποιείται η σταθμισμένη παλινδρόμηση (weighted regression), κατά την οποία κάθε σημείο της καμπύλης λαμβάνει διαφορετικό συντελεστή βαρύτητας. Οι συνηθέστερες σταθμίσεις είναι:

- $1/x$
- $1/x^2$
- $1/y$
- $1/y^2$

όπου x αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση και y την απόκριση του συστήματος (ICH, 2023; Dong, 2019).

Η χρήση σταθμισμένων μοντέλων είναι ιδιαίτερα συχνή σε φαρμακοκινητικές και βιοαναλυτικές εφαρμογές, αλλά εφαρμόζεται ολοένα και περισσότερο και σε φαρμακευτικές αναλύσεις όταν το εύρος συγκεντρώσεων είναι μεγάλο.

4.4.7.4 Back-Calculated Concentrations

Μία ακόμη πρακτική προσέγγιση για την αξιολόγηση της καταλληλότητας μιας καμπύλης βαθμονόμησης είναι ο υπολογισμός των back-calculated concentrations. Στην προσέγγιση αυτή, η εξίσωση παλινδρόμησης χρησιμοποιείται για τον επανυπολογισμό των συγκεντρώσεων των προτύπων διαλυμάτων από τα οποία κατασκευάστηκε η καμπύλη (FDA, 2018).

Η ποσοστιαία απόκλιση υπολογίζεται ως:

$$\%RE = \frac{C_{calc} - C_{nom}}{C_{nom}} \times 100$$

όπου:

- C_{calc} = υπολογιζόμενη συγκέντρωση
- C_{nom} = ονομαστική συγκέντρωση

Μικρές αποκλίσεις μεταξύ υπολογιζόμενων και ονομαστικών συγκεντρώσεων αποτελούν ένδειξη ότι το μοντέλο βαθμονόμησης περιγράφει επαρκώς τα πειραματικά δεδομένα (FDA, 2018).

4.4.7.5 Ανάλυση Διακύμανσης (ANOVA)

Η ανάλυση διακύμανσης (Analysis of Variance – ANOVA) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας της παλινδρόμησης. Μέσω της μεθόδου αυτής εξετάζεται κατά πόσο η μεταβολή της αναλυτικής απόκρισης εξηγείται ουσιαστικά από τη μεταβολή της συγκέντρωσης και όχι από τυχαία πειραματική μεταβλητότητα (Miller & Miller, 2018).

Η στατιστική αξιολόγηση της γραμμικότητας μπορεί να ενισχυθεί μέσω της ανάλυσης διακύμανσης (Analysis of Variance, ANOVA), η οποία αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για την εκτίμηση της καταλληλότητας του μοντέλου παλινδρόμησης. Μέσω της ANOVA είναι

δυνατή η αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας της κλίσης της ευθείας παλινδρόμησης, η εκτίμηση του σφάλματος παλινδρόμησης και η διερεύνηση της επάρκειας του γραμμικού μοντέλου. Επιπλέον, η μέθοδος επιτρέπει τον έλεγχο πιθανής έλλειψης προσαρμογής (lack-of-fit), συμβάλλοντας στην επιβεβαίωση ότι τα πειραματικά δεδομένα περιγράφονται ικανοποιητικά από τη γραμμική σχέση μεταξύ συγκέντρωσης και αναλυτικής απόκρισης (Miller & Miller, 2018).

Η προσέγγιση αυτή χρησιμοποιείται κυρίως σε αναλύσεις που απαιτούν υψηλό επίπεδο στατιστικής τεκμηρίωσης ή σε περιπτώσεις ανάπτυξης νέων αναλυτικών διαδικασιών (ICH, 2023).

4.5 Ακρίβεια (Accuracy)

4.5.1 Ορισμός και σημασία της ακρίβειας

Η ακρίβεια (accuracy) αποτελεί ένα από τα βασικότερα χαρακτηριστικά απόδοσης μιας αναλυτικής διαδικασίας και εκφράζει τον βαθμό συμφωνίας μεταξύ της τιμής που προσδιορίζεται πειραματικά και της πραγματικής ή αποδεκτής τιμής αναφοράς του αναλύτη. Με άλλα λόγια, η ακρίβεια περιγράφει κατά πόσο η αναλυτική μέθοδος είναι ικανή να αποδίδει αποτελέσματα που αντανακλούν την πραγματική περιεκτικότητα της ουσίας που εξετάζεται (ICH, 2023).

Η έννοια της ακρίβειας διαφέρει από την έννοια της πιστότητας (precision). Μία μέθοδος μπορεί να παράγει επαναλαμβανόμενα παρόμοια αποτελέσματα και συνεπώς να εμφανίζει υψηλή πιστότητα, χωρίς όμως τα αποτελέσματα αυτά να προσεγγίζουν την πραγματική τιμή. Στην περίπτωση αυτή η μέθοδος χαρακτηρίζεται από χαμηλή ακρίβεια λόγω της παρουσίας συστηματικού σφάλματος (systematic error) (Miller & Miller, 2018).

Στο πλαίσιο της φαρμακευτικής ανάλυσης, η ακρίβεια είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς οι αποφάσεις σχετικά με την αποδοχή ή απόρριψη μιας παρτίδας βασίζονται στην εκτιμώμενη περιεκτικότητα της δραστικής ουσίας. Ένα συστηματικό σφάλμα κατά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη αξιολόγηση της

ποιότητας του προϊόντος και να επηρεάσει τόσο την κανονιστική συμμόρφωση όσο και την ασφάλεια των ασθενών (USP, 2024).

Για τον λόγο αυτό, η ICH Q2(R2) θεωρεί την ακρίβεια βασικό χαρακτηριστικό επικύρωσης για τις μεθόδους ποσοτικού προσδιορισμού δραστικών ουσιών και προσμίξεων, ενώ απαιτεί την πειραματική τεκμηρίωσή της μέσω κατάλληλων μελετών ανάκτησης ή άλλων επιστημονικά αποδεκτών προσεγγίσεων (ICH, 2023).

4.5.2 Θεωρητική προσέγγιση της ακρίβειας

Η ακρίβεια συνδέεται άμεσα με την έννοια του συστηματικού σφάλματος (bias). Το bias εκφράζει τη σταθερή απόκλιση των πειραματικών αποτελεσμάτων από την πραγματική τιμή και αποτελεί βασικό παράγοντα που επηρεάζει την αξιοπιστία μιας αναλυτικής διαδικασίας (EURACHEM, 2022).

Η ποσοτική εκτίμηση της ακρίβειας πραγματοποιείται συνήθως μέσω του ποσοστού ανάκτησης (% recovery), το οποίο εκφράζει το ποσοστό της γνωστής ποσότητας αναλύτη που ανακτάται μετά την εφαρμογή της αναλυτικής διαδικασίας.

Ο υπολογισμός πραγματοποιείται σύμφωνα με τη σχέση:

$$\%Recovery = \frac{Amount\ Found}{Amount\ Added} \times 100$$

όπου:

- Amount Found = ποσότητα που προσδιορίστηκε πειραματικά,
- Amount Added = θεωρητική ποσότητα που προστέθηκε στο δείγμα.

Ιδανικά, το ποσοστό ανάκτησης θα πρέπει να ισούται με 100%. Ωστόσο, στην πράξη μικρές αποκλίσεις θεωρούνται αναμενόμενες λόγω αναλυτικής μεταβλητότητας και πειραματικών σφαλμάτων (Miller & Miller, 2018).

4.5.3 Αξιολόγηση της ακρίβειας σε μεθόδους HPLC

Στις χρωματογραφικές μεθόδους προσδιορισμού δραστικών ουσιών, η αξιολόγηση της ακρίβειας πραγματοποιείται συνήθως μέσω μελετών ανάκτησης στις οποίες γνωστές ποσότητες της δραστικής ουσίας προστίθενται σε μήτρα που προσομοιάζει το πραγματικό δείγμα (ICH, 2023).

Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει την αξιολόγηση της επίδρασης των εκδόχων και άλλων συστατικών του σκευάσματος στον ποσοτικό προσδιορισμό της δραστικής ουσίας. Η χρήση placebo matrix θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική στις φαρμακευτικές αναλύσεις, καθώς προσομοιώνει με ρεαλιστικό τρόπο τις συνθήκες εφαρμογής της μεθόδου (USP, 2024).

Κατά την ανάπτυξη μιας HPLC μεθόδου, η ακρίβεια αξιολογείται συνήθως σε πολλαπλά επίπεδα συγκέντρωσης που καλύπτουν το εύρος λειτουργίας της μεθόδου. Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει τη διερεύνηση πιθανών διαφοροποιήσεων στην απόδοση της μεθόδου σε χαμηλές και υψηλές συγκεντρώσεις του αναλύτη (ICH, 2023).

4.5.4 Recovery Studies

Οι μελέτες ανάκτησης αποτελούν την πλέον διαδεδομένη προσέγγιση για την αξιολόγηση της ακρίβειας στις μεθόδους ποσοτικού προσδιορισμού δραστικών ουσιών. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της ICH, η αξιολόγηση πραγματοποιείται συνήθως σε τουλάχιστον τρία επίπεδα συγκέντρωσης που καλύπτουν το εύρος λειτουργίας της μεθόδου (ICH, 2023).

Στην πράξη, τα επίπεδα συγκέντρωσης που χρησιμοποιούνται για τις μελέτες ανάκτησης επιλέγονται ανάλογα με τον σκοπό της ανάλυσης και το εύρος λειτουργίας της μεθόδου. Συχνά χρησιμοποιούνται επίπεδα 80%, 100% και 120% της ονομαστικής συγκέντρωσης, ενώ σε άλλες περιπτώσεις μπορεί να αξιολογηθούν ευρύτερα εύρη, όπως 50%, 100% και 150%, προκειμένου να τεκμηριωθεί η ακρίβεια της μεθόδου σε μεγαλύτερο φάσμα συγκεντρώσεων (ICH, 2023; USP <1225>, 2024). Σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης παρασκευάζονται συνήθως τρία ανεξάρτητα δείγματα, οδηγώντας συνολικά σε εννέα

προσδιορισμούς. Η προσέγγιση αυτή παρέχει επαρκή στατιστική αξιοπιστία για την εκτίμηση της ακρίβειας της μεθόδου (USP, 2024).

Μετά την ανάλυση των δειγμάτων υπολογίζεται το ποσοστό ανάκτησης για κάθε προσδιορισμό, καθώς και η μέση τιμή ανάκτησης για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης.

4.5.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την ακρίβεια

Η ακρίβεια μιας μεθόδου HPLC μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες που σχετίζονται τόσο με το χρωματογραφικό σύστημα όσο και με τη διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων. Μεταξύ των σημαντικότερων παραγόντων περιλαμβάνονται η καθαρότητα των προτύπων ουσιών, η ακρίβεια των ογκομετρικών μετρήσεων, η σταθερότητα των διαλυμάτων και η απόδοση της διαδικασίας εκχύλισης του αναλύτη από τη φαρμακευτική μορφή (Kazakevich & Lobrutto, 2007).

Ιδιαίτερη σημασία παρουσιάζει η επίδραση της μήτρας του δείγματος (matrix effect). Τα έκδοχα ενός φαρμακευτικού σκευάσματος ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση της μεθόδου μέσω αλληλεπιδράσεων με τη δραστική ουσία ή με τη χρωματογραφική διαδικασία. Για τον λόγο αυτό, η αξιολόγηση της ακρίβειας σε placebo matrix θεωρείται περισσότερο αντιπροσωπευτική από τη χρήση απλών πρότυπων διαλυμάτων (USP, 2024).

Επιπλέον, η ακρίβεια μπορεί να επηρεαστεί από μικρές μεταβολές στις χρωματογραφικές συνθήκες, όπως αλλαγές στο pH της κινητής φάσης ή στη θερμοκρασία της στήλης, γεγονός που αναδεικνύει τη στενή σχέση μεταξύ ακρίβειας και ανθεκτικότητας της μεθόδου (Dong, 2019).

4.5.6 Κριτήρια αποδοχής

Τα αποδεκτά όρια ανάκτησης εξαρτώνται από τον σκοπό χρήσης της μεθόδου και από τη συγκέντρωση του αναλύτη. Στις περισσότερες μεθόδους HPLC για προσδιορισμό δραστικής ουσίας σε φαρμακευτικά προϊόντα, μέσες τιμές ανάκτησης μεταξύ 98,0% και 102,0% θεωρούνται γενικά αποδεκτές (USP, 2024).

Σε ορισμένες περιπτώσεις, ιδιαίτερα όταν η ανάλυση αφορά πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις ή πολύπλοκες μήτρες, μπορούν να γίνουν αποδεκτά ευρύτερα όρια, εφόσον αυτά τεκμηριώνονται επιστημονικά κατά την ανάπτυξη της μεθόδου (ICH, 2023).

Πέρα από τη μέση ανάκτηση, αξιολογείται και η μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων μεταξύ των επαναλήψεων. Η χαμηλή διακύμανση των ποσοστών ανάκτησης υποδηλώνει ότι η μέθοδος είναι όχι μόνο ακριβής αλλά και σταθερή σε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης.

4.5.7 Σημασία της ακρίβειας στο πλαίσιο της επικύρωσης

Η ακρίβεια αποτελεί βασικό στοιχείο της συνολικής αξιολόγησης μιας αναλυτικής διαδικασίας, καθώς παρέχει άμεσες αποδείξεις ότι η μέθοδος μπορεί να προσδιορίζει ορθά την περιεκτικότητα της δραστικής ουσίας στο εξεταζόμενο προϊόν. Η τεκμηρίωση της ακρίβειας αποκτά ιδιαίτερη σημασία στις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο ποιότητας τελικών φαρμακευτικών προϊόντων, όπου μικρές αποκλίσεις από την πραγματική περιεκτικότητα ενδέχεται να έχουν σημαντικές κλινικές και κανονιστικές συνέπειες (ICH, 2023; FDA, 2015).

Η συνδυασμένη αξιολόγηση της ακρίβειας με τις υπόλοιπες παραμέτρους επικύρωσης συμβάλλει στην ολοκληρωμένη τεκμηρίωση της αξιοπιστίας της μεθόδου και υποστηρίζει την καταλληλότητά της για εφαρμογή στον ποιοτικό έλεγχο φαρμακευτικών σκευασμάτων.

4.6 Πιστότητα (Precision)

4.6.1 Ορισμός και σημασία της πιστότητας

Η πιστότητα (precision) εκφράζει τον βαθμό συμφωνίας μεταξύ ανεξάρτητων αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από επαναλαμβανόμενες μετρήσεις του ίδιου ομοιογενούς δείγματος υπό καθορισμένες συνθήκες ανάλυσης. Η παράμετρος αυτή περιγράφει τη διασπορά των αποτελεσμάτων και αντικατοπτρίζει τον βαθμό τυχαίας μεταβλητότητας που χαρακτηρίζει μία αναλυτική διαδικασία (ICH, 2023).

Σε αντίθεση με την ακρίβεια, η οποία αξιολογεί τη συμφωνία με την πραγματική τιμή, η πιστότητα εξετάζει αποκλειστικά τη συμφωνία μεταξύ επαναλαμβανόμενων μετρήσεων. Μία μέθοδος μπορεί να είναι ιδιαίτερα ακριβής αλλά να παρουσιάζει χαμηλή πιστότητα ή, αντίστροφα, να εμφανίζει εξαιρετική επαναληψιμότητα χωρίς να παρέχει αποτελέσματα κοντά στην πραγματική τιμή. Για τον λόγο αυτό, οι δύο παράμετροι αξιολογούνται ανεξάρτητα κατά την επικύρωση (Miller & Miller, 2018).

Στη φαρμακευτική ανάλυση, η πιστότητα είναι καθοριστικής σημασίας, καθώς η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων εξαρτάται από τη δυνατότητα της μεθόδου να παρέχει παρόμοια αποτελέσματα όταν η ίδια ανάλυση επαναλαμβάνεται πολλαπλές φορές. Η υψηλή πιστότητα μειώνει την αβεβαιότητα των μετρήσεων και ενισχύει την εμπιστοσύνη στα αποτελέσματα του ποιοτικού ελέγχου (USP, 2024).

Η ICH Q2(R2) διακρίνει την πιστότητα σε διαφορετικά επίπεδα αξιολόγησης, ανάλογα με τις συνθήκες υπό τις οποίες πραγματοποιούνται οι μετρήσεις. Οι κυριότερες κατηγορίες είναι η επαναληψιμότητα (repeatability), η ενδιάμεση πιστότητα (intermediate precision) και η αναπαραγωγιμότητα (reproducibility) (ICH, 2023).

4.6.2 Στατιστική έκφραση της πιστότητας

Η πιστότητα αξιολογείται μέσω στατιστικών παραμέτρων που περιγράφουν τη διασπορά των αποτελεσμάτων γύρω από τη μέση τιμή. Οι συνηθέστερες παράμετροι είναι η τυπική απόκλιση (standard deviation, SD), η διακύμανση (variance) και η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) (Miller & Miller, 2018).

Η τυπική απόκλιση υπολογίζεται σύμφωνα με τη σχέση:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

όπου:

- x_i = κάθε επιμέρους μέτρηση,

- $\bar{x}$ = μέση τιμή,
- n = αριθμός μετρήσεων.

Η παράμετρος που χρησιμοποιείται συχνότερα στα validation studies είναι η σχετική τυπική απόκλιση:

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

Η %RSD επιτρέπει τη σύγκριση της μεταβλητότητας μεταξύ διαφορετικών επιπέδων συγκέντρωσης και διαφορετικών αναλυτικών διαδικασιών. Χαμηλές τιμές %RSD υποδηλώνουν υψηλή πιστότητα και μικρή τυχαία διακύμανση των αποτελεσμάτων (USP, 2024).

4.6.3 Επαναληψιμότητα (Repeatability)

Η επαναληψιμότητα αποτελεί το πρώτο επίπεδο αξιολόγησης της πιστότητας και αναφέρεται στη συμφωνία μεταξύ αποτελεσμάτων που λαμβάνονται υπό τις ίδιες συνθήκες λειτουργίας μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Οι συνθήκες αυτές περιλαμβάνουν τον ίδιο αναλυτή, τον ίδιο εξοπλισμό, τα ίδια αντιδραστήρια και το ίδιο εργαστήριο (ICH, 2023).

Στις μεθόδους HPLC προσδιορισμού δραστικής ουσίας, η repeatability αξιολογείται συνήθως μέσω της ανάλυσης έξι ανεξάρτητα παρασκευασμένων δειγμάτων στην ονομαστική συγκέντρωση της μεθόδου. Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει την εκτίμηση της μεταβλητότητας που προκύπτει από την προετοιμασία των δειγμάτων, την έγχυση και τη χρωματογραφική διαδικασία (USP, 2024).

Η επαναληψιμότητα θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική επειδή προσομοιώνει τις συνθήκες καθημερινής λειτουργίας ενός εργαστηρίου ποιοτικού ελέγχου. Η χαμηλή διακύμανση μεταξύ των επαναλήψεων αποτελεί ένδειξη ότι η μέθοδος είναι σταθερή και αξιόπιστη για την προβλεπόμενη χρήση της (Dong, 2019).

Για assay methods, τιμές %RSD μικρότερες από 2,0% θεωρούνται γενικά αποδεκτές, αν και τα ακριβή κριτήρια εξαρτώνται από τη φύση της ανάλυσης και τις απαιτήσεις του οργανισμού ή του εργαστηρίου (USP, 2024).

4.6.4 Ενδιάμεση πιστότητα (Intermediate Precision)

Η ενδιάμεση πιστότητα αξιολογεί την επίδραση φυσιολογικών μεταβολών που μπορεί να προκύψουν κατά τη συνήθη λειτουργία ενός εργαστηρίου. Σε αντίθεση με την repeatability, η intermediate precision εξετάζει τη συμπεριφορά της μεθόδου όταν μεταβάλλονται συγκεκριμένοι παράγοντες, όπως ο αναλυτής, η ημέρα εκτέλεσης της ανάλυσης ή το χρησιμοποιούμενο όργανο (ICH, 2023).

Σκοπός της αξιολόγησης αυτής είναι να εκτιμηθεί κατά πόσο η μέθοδος παραμένει αξιόπιστη υπό ρεαλιστικές συνθήκες εργασίας. Η παράμετρος αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική σε περιβάλλοντα όπου πολλοί αναλυτές χρησιμοποιούν την ίδια μέθοδο ή όπου οι αναλύσεις εκτελούνται σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (USP, 2024).

Συνήθως, η intermediate precision αξιολογείται μέσω πειραματικού σχεδιασμού που περιλαμβάνει διαφορετικούς αναλυτές και διαφορετικές ημέρες. Τα αποτελέσματα συγκεντρώνονται και υπολογίζεται η συνολική %RSD, η οποία περιλαμβάνει τόσο τη μεταβλητότητα της repeatability όσο και τη μεταβλητότητα που εισάγεται από τις αλλαγές στις συνθήκες ανάλυσης (Miller & Miller, 2018).

Η επιτυχής αξιολόγηση της intermediate precision παρέχει ισχυρές αποδείξεις ότι η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί αξιόπιστα σε πραγματικές συνθήκες εργαστηρίου χωρίς να επηρεάζεται σημαντικά από συνήθεις λειτουργικές διαφοροποιήσεις.

4.6.5 Αναπαραγωγιμότητα (Reproducibility)

Η αναπαραγωγιμότητα αποτελεί το υψηλότερο επίπεδο αξιολόγησης της πιστότητας και εξετάζει τη συμφωνία μεταξύ αποτελεσμάτων που λαμβάνονται σε διαφορετικά εργαστήρια. Η παράμετρος αυτή χρησιμοποιείται κυρίως σε δια-εργαστηριακές μελέτες

και στην επικύρωση μεθόδων που πρόκειται να εφαρμοστούν σε πολλαπλές εγκαταστάσεις ή οργανισμούς (ICH, 2023).

Σε ένα πρόγραμμα αξιολόγησης αναπαραγωγιμότητας, το ίδιο δείγμα αναλύεται από διαφορετικά εργαστήρια χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων επιτρέπει την εκτίμηση της συνολικής μεταβλητότητας που εισάγεται από παράγοντες όπως ο εξοπλισμός, οι αναλυτές, οι περιβαλλοντικές συνθήκες και οι εργαστηριακές πρακτικές (USP, 2024).

Παρότι η αναπαραγωγιμότητα δεν απαιτείται πάντοτε για την επικύρωση μεθόδων εσωτερικού ποιοτικού ελέγχου, αποτελεί σημαντική παράμετρο σε συνεργατικές μελέτες και στη διαδικασία μεταφοράς αναλυτικών μεθόδων μεταξύ εγκαταστάσεων (FDA, 2015).

4.6.6 Παράγοντες που επηρεάζουν την πιστότητα

Η πιστότητα μιας HPLC μεθόδου επηρεάζεται από πλήθος παραγόντων που σχετίζονται με τον εξοπλισμό, τα αντιδραστήρια και τη διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων. Μεταβολές στον όγκο έγχυσης, στη σταθερότητα των διαλυμάτων, στην απόδοση της αντλίας ή στη λειτουργία του ανιχνευτή μπορούν να αυξήσουν τη διασπορά των αποτελεσμάτων (Dong, 2019).

Επιπλέον, η ανθρώπινη παρέμβαση αποτελεί σημαντική πηγή μεταβλητότητας. Διαφορές στον τρόπο ζύγισης, αραιώσης ή προετοιμασίας των δειγμάτων είναι δυνατόν να επηρεάσουν σημαντικά την repeatability και την intermediate precision της μεθόδου (Kazakevich & Lobrutto, 2007).

Η συστηματική εκπαίδευση του προσωπικού, η χρήση τυποποιημένων διαδικασιών και η τακτική συντήρηση του εξοπλισμού συμβάλλουν ουσιαστικά στη διατήρηση υψηλού επιπέδου πιστότητας των αναλυτικών διαδικασιών.

4.6.7 Κριτήρια αποδοχής

Τα αποδεκτά όρια για την πιστότητα εξαρτώνται από τη φύση της αναλυτικής διαδικασίας και τη συγκέντρωση του αναλύτη. Στις περισσότερες HPLC μεθόδους προσδιορισμού δραστικής ουσίας, τιμές %RSD μικρότερες από 2,0% θεωρούνται γενικά αποδεκτές για την repeatability (USP, 2024).

Για την intermediate precision, τα όρια ενδέχεται να είναι ελαφρώς υψηλότερα λόγω της πρόσθετης μεταβλητότητας που εισάγεται από διαφορετικούς αναλυτές ή ημέρες ανάλυσης. Ωστόσο, η συνολική μεταβλητότητα πρέπει να παραμένει εντός προκαθορισμένων ορίων που τεκμηριώνουν την αξιοπιστία της μεθόδου (ICH, 2023).

Η αξιολόγηση της πιστότητας ολοκληρώνεται μέσω της στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων και της επιβεβαίωσης ότι η παρατηρούμενη διασπορά είναι συμβατή με τις απαιτήσεις της προβλεπόμενης χρήσης της μεθόδου.

4.7 Όριο Ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και Όριο Ποσοτικοποίησης (Limit of Quantitation, LOQ)

4.7.1 Εισαγωγή

Κατά την επικύρωση μιας αναλυτικής διαδικασίας αξιολογείται συχνά η ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει ή να ποσοτικοποιεί πολύ μικρές ποσότητες αναλύτη. Οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται για την περιγραφή αυτής της ικανότητας είναι το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Quantitation, LOQ) (ICH, 2023).

Οι παράμετροι αυτές αποκτούν ιδιαίτερη σημασία σε αναλυτικές διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό προσμίξεων, προϊόντων αποδόμησης ή ουσιών που υπάρχουν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Αντίθετα, σε μεθόδους ποσοτικού προσδιορισμού δραστικής ουσίας (assay methods), όπου οι συγκεντρώσεις είναι συνήθως αρκετά υψηλές, η πρακτική σημασία των LOD και LOQ είναι συχνά περιορισμένη (USP, 2024).

Παρόλα αυτά, η κατανόηση των εννοιών αυτών είναι απαραίτητη για την ολοκληρωμένη αξιολόγηση των χαρακτηριστικών απόδοσης μιας αναλυτικής διαδικασίας και για τη σωστή επιλογή των παραμέτρων επικύρωσης ανάλογα με τον σκοπό χρήσης της μεθόδου (ICH, 2023).

4.7.2 Όριο Ανίχνευσης (LOD)

Το όριο ανίχνευσης ορίζεται ως η μικρότερη ποσότητα αναλύτη που μπορεί να ανιχνευθεί από την αναλυτική διαδικασία, χωρίς όμως να είναι απαραίτητα δυνατός ο αξιόπιστος ποσοτικός προσδιορισμός της. Με άλλα λόγια, στο επίπεδο του LOD η παρουσία της ουσίας μπορεί να επιβεβαιωθεί, αλλά η συγκέντρωσή της δεν μπορεί να προσδιοριστεί με αποδεκτή ακρίβεια και πιστότητα (ICH, 2023).

Η έννοια του LOD συνδέεται άμεσα με τη διακριτική ικανότητα του αναλυτικού συστήματος έναντι του θορύβου υποβάθρου. Όσο χαμηλότερο είναι το επίπεδο θορύβου και όσο μεγαλύτερη η ευαισθησία του ανιχνευτή, τόσο μικρότερη ποσότητα αναλύτη μπορεί να ανιχνευθεί (Dong, 2019).

Στις χρωματογραφικές αναλύσεις, το LOD χρησιμοποιείται κυρίως για την αξιολόγηση μεθόδων προσδιορισμού προσμίξεων και προϊόντων αποδόμησης, όπου απαιτείται η ανίχνευση ουσιών σε επίπεδα σημαντικά χαμηλότερα από τη συγκέντρωση της κύριας δραστικής ουσίας (USP, 2024).

4.7.3 Όριο Ποσοτικοποίησης (LOQ)

Το όριο ποσοτικοποίησης αντιπροσωπεύει τη μικρότερη ποσότητα αναλύτη που μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με αποδεκτή ακρίβεια και πιστότητα. Σε αντίθεση με το LOD, το οποίο αφορά αποκλειστικά την ανίχνευση της παρουσίας μιας ουσίας, το LOQ σχετίζεται με την αξιόπιστη μέτρηση της συγκέντρωσής της (ICH, 2023).

Η παράμετρος αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική για τις μεθόδους ελέγχου προσμίξεων, καθώς καθορίζει το χαμηλότερο επίπεδο στο οποίο μπορεί να πραγματοποιηθεί έγκυρος ποσοτικός προσδιορισμός. Το LOQ χρησιμοποιείται επίσης σε μελέτες σταθερότητας και

σε αναλύσεις όπου απαιτείται η μέτρηση ουσιών σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (FDA, 2015).

Στη φαρμακευτική βιομηχανία, το LOQ συχνά συνδέεται με τα όρια αναφοράς που καθορίζονται από τις κανονιστικές αρχές για την αποδοχή ή απόρριψη προσμίξεων και προϊόντων αποδόμησης (ICH, 2023).

4.7.4 Προσδιορισμός LOD και LOQ

Η ICH Q2(R2) περιγράφει διάφορες προσεγγίσεις για τον υπολογισμό των LOD και LOQ. Μία από τις συνηθέστερες βασίζεται στη σχέση μεταξύ της τυπικής απόκλισης της απόκρισης (σ) και της κλίσης της καμπύλης βαθμονόμησης (S) (ICH, 2023).

Για τον υπολογισμό του LOD χρησιμοποιείται η σχέση:

$$LOD = \frac{3.3\sigma}{S}$$

ενώ για τον υπολογισμό του LOQ:

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S}$$

όπου:

- σ = τυπική απόκλιση της απόκρισης,
- S = κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης.

Οι εξισώσεις αυτές χρησιμοποιούνται ευρέως σε μεθόδους HPLC και αποτελούν την πλέον διαδεδομένη προσέγγιση για την εκτίμηση των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης (ICH, 2023).

4.7.5 Λόγος σήματος προς θόρυβο (Signal-to-Noise Ratio)

Μία εναλλακτική προσέγγιση για τον προσδιορισμό των LOD και LOQ βασίζεται στον λόγο σήματος προς θόρυβο (signal-to-noise ratio, S/N), ο οποίος χρησιμοποιείται ιδιαίτερα συχνά στις χρωματογραφικές αναλύσεις (USP, 2024).

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή:

- για το LOD αντιστοιχεί συνήθως λόγος $S/N \approx 3:1$,
- για το LOQ αντιστοιχεί συνήθως λόγος $S/N \approx 10:1$.

Η προσέγγιση αυτή θεωρείται ιδιαίτερα χρήσιμη όταν χρησιμοποιούνται χρωματογραφικά συστήματα με δυνατότητα άμεσης εκτίμησης του θορύβου της γραμμής βάσης (Dong, 2019).

4.7.6 Σημασία των LOD και LOQ στις μεθόδους HPLC Assay

Παρότι τα LOD και LOQ περιλαμβάνονται στα χαρακτηριστικά απόδοσης που περιγράφονται στην ICH Q2(R2), η σημασία τους εξαρτάται από τον σκοπό χρήσης της μεθόδου. Στις μεθόδους ποσοτικού προσδιορισμού δραστικής ουσίας σε τελικά φαρμακευτικά προϊόντα, οι συγκεντρώσεις του αναλύτη είναι συνήθως αρκετά υψηλές και επομένως η δυνατότητα ανίχνευσης πολύ χαμηλών ποσοτήτων δεν αποτελεί κρίσιμο παράγοντα αξιολόγησης (ICH, 2023).

Για τον λόγο αυτό, σε πολλές assay methods τα LOD και LOQ είτε δεν προσδιορίζονται είτε αναφέρονται συνοπτικά χωρίς να αποτελούν βασικό κριτήριο αποδοχής της μεθόδου. Αντίθετα, οι παράμετροι αυτές είναι απαραίτητες για τις μεθόδους προσδιορισμού προσμίξεων, όπου απαιτείται η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ουσιών σε επίπεδα της τάξης των ppm ή ακόμη χαμηλότερα (USP, 2024).

Η διάκριση αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική κατά την επιλογή των κατάλληλων χαρακτηριστικών επικύρωσης και αντανakλά τη φιλοσοφία της ICH, σύμφωνα με την οποία οι απαιτήσεις επικύρωσης πρέπει να συνδέονται άμεσα με τον επιδιωκόμενο σκοπό χρήσης της αναλυτικής διαδικασίας (ICH, 2023).

4.7.7 Συμπεράσματα

Τα LOD και LOQ αποτελούν σημαντικά χαρακτηριστικά απόδοσης για αναλυτικές διαδικασίες που στοχεύουν στην ανίχνευση ή ποσοτικοποίηση ουσιών σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Ωστόσο, η σημασία τους διαφοροποιείται ανάλογα με τον σκοπό χρήσης της μεθόδου. Στις μεθόδους HPLC προσδιορισμού δραστικής ουσίας σε φαρμακευτικά σκευάσματα, οι παράμετροι αυτές έχουν συνήθως μικρότερη βαρύτητα σε σχέση με χαρακτηριστικά όπως η ειδικότητα, η ακρίβεια, η πιστότητα και η ανθεκτικότητα. Παρ' όλα αυτά, η αξιολόγησή τους συμβάλλει στην πληρέστερη κατανόηση των δυνατοτήτων και των περιορισμών της αναλυτικής διαδικασίας.

4.8 Ανθεκτικότητα (Robustness)

4.8.1 Έννοια και σημασία της ανθεκτικότητας

Η ανθεκτικότητα (robustness) αποτελεί ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά απόδοσης που αξιολογούνται κατά την επικύρωση μιας αναλυτικής διαδικασίας και περιγράφει την ικανότητα της μεθόδου να παραμένει ανεπηρέαστη από μικρές αλλά εσκεμμένες μεταβολές των πειραματικών συνθηκών. Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας παρέχει ενδείξεις σχετικά με την αξιοπιστία της μεθόδου κατά τη συνήθη εργαστηριακή εφαρμογή και συμβάλλει στην αναγνώριση των κρίσιμων παραμέτρων που επηρεάζουν την απόδοσή της (ICH, 2023).

Σε αντίθεση με τις παραμέτρους της ακρίβειας και της πιστότητας, οι οποίες εξετάζουν την ποιότητα των αποτελεσμάτων υπό συγκεκριμένες συνθήκες λειτουργίας, η ανθεκτικότητα αξιολογεί τη συμπεριφορά της μεθόδου όταν οι συνθήκες αυτές μεταβάλλονται ελαφρώς εντός ρεαλιστικών ορίων. Με τον τρόπο αυτό προσομοιώνονται οι φυσιολογικές αποκλίσεις που είναι δυνατόν να εμφανιστούν κατά τη διάρκεια της καθημερινής εργαστηριακής πρακτικής (USP, 2024).

Η σημασία της ανθεκτικότητας είναι ιδιαίτερα αυξημένη στις χρωματογραφικές τεχνικές, καθώς ακόμη και μικρές μεταβολές σε παραμέτρους όπως το pH της κινητής φάσης, ο

ρυθμός ροής ή η θερμοκρασία της στήλης μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τον χρόνο κατακράτησης, τον διαχωρισμό των κορυφών και τη συνολική απόδοση της μεθόδου (Dong, 2019).

Στο πλαίσιο της σύγχρονης φαρμακευτικής ανάπτυξης, η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας συνδέεται στενά με τη φιλοσοφία του Quality by Design (QbD), σύμφωνα με την οποία η κατανόηση των παραγόντων που επηρεάζουν μια αναλυτική διαδικασία αποτελεί θεμελιώδη προϋπόθεση για τη διασφάλιση της ποιότητας των αποτελεσμάτων (ICH, 2023b).

4.8.2 Ανθεκτικότητα και κύκλος ζωής αναλυτικής διαδικασίας

Η σύγχρονη προσέγγιση που εισάγεται μέσω της ICH Q14 αντιμετωπίζει την ανθεκτικότητα όχι ως μία απλή δοκιμή επικύρωσης αλλά ως στοιχείο βαθύτερης κατανόησης της αναλυτικής διαδικασίας. Η αξιολόγηση των παραγόντων που επηρεάζουν τη μέθοδο συμβάλλει στον προσδιορισμό των κρίσιμων παραμέτρων λειτουργίας (Critical Method Parameters – CMPs) και στη δημιουργία ενός χώρου λειτουργίας εντός του οποίου η μέθοδος παραμένει αξιόπιστη (ICH, 2023b).

Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει την καλύτερη διαχείριση κινδύνου κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής της μεθόδου και διευκολύνει τη μεταφορά της μεταξύ εργαστηρίων ή παραγωγικών εγκαταστάσεων. Παράλληλα, μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης αποκλίσεων κατά τη ρουτίνα εφαρμογή της μεθόδου και ενισχύει τη συνολική αξιοπιστία των αναλυτικών αποτελεσμάτων (USP, 2024).

4.8.3 Παράγοντες που αξιολογούνται σε μεθόδους HPLC

Στις μεθόδους HPLC, η ανθεκτικότητα αξιολογείται συνήθως μέσω μικρών και εσκεμμένων μεταβολών συγκεκριμένων χρωματογραφικών παραμέτρων. Οι παράμετροι αυτές επιλέγονται με βάση τη γνώση που έχει αποκτηθεί κατά την ανάπτυξη της μεθόδου και θεωρούνται πιθανές πηγές μεταβλητότητας κατά τη συνήθη εργαστηριακή εφαρμογή (ICH, 2023).

Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας μιας αναλυτικής μεθόδου βασίζεται στη διερεύνηση της επίδρασης μικρών, σκόπιμων μεταβολών σε κρίσιμες παραμέτρους της αναλυτικής διαδικασίας. Σκοπός της προσέγγισης αυτής είναι να διαπιστωθεί κατά πόσο η μέθοδος παραμένει αξιόπιστη και ικανή να παρέχει αποδεκτά αποτελέσματα υπό συνήθεις εργαστηριακές διακυμάνσεις. Οι συχνότερα εξεταζόμενοι παράγοντες περιλαμβάνουν το pH της κινητής φάσης, το ποσοστό του οργανικού διαλύτη, τον ρυθμό ροής (flow rate), τη θερμοκρασία της χρωματογραφικής στήλης, το μήκος κύματος ανίχνευσης, τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος, καθώς και τον τύπο ή την παρτίδα της χρωματογραφικής στήλης. Η αξιολόγηση των παραμέτρων αυτών επιτρέπει τον εντοπισμό πιθανών ευαίσθητων σημείων της μεθόδου και συμβάλλει στη διασφάλιση της σταθερής απόδοσής της κατά την εφαρμογή της σε συνθήκες εργαστηριακής ρουτίνας (Swartz, M. E., & Krull, I. S., 2018).

Η επιλογή των παραγόντων αυτών βασίζεται στην πιθανότητα να επηρεάσουν τον μηχανισμό διαχωρισμού και συνεπώς την αξιοπιστία της μεθόδου (Kazakevich & Lobrutto, 2007).

4.8.4 Επίδραση του pH της κινητής φάσης

Το pH της κινητής φάσης αποτελεί μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους στις αναλύσεις αντίστροφης φάσης (RP-HPLC), ιδιαίτερα όταν οι αναλυόμενες ενώσεις περιέχουν ιονιζόμενες λειτουργικές ομάδες. Ακόμη και μικρές μεταβολές του pH μπορούν να επηρεάσουν τον βαθμό ιονισμού του αναλύτη και κατά συνέπεια την αλληλεπίδρασή του με τη στατική φάση (Snyder et al., 2010).

Το pH της κινητής φάσης αποτελεί μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους που επηρεάζουν τη χρωματογραφική συμπεριφορά των ιονιζόμενων ενώσεων. Ακόμη και μικρές μεταβολές στην τιμή του μπορούν να τροποποιήσουν τον βαθμό ιονισμού των αναλυτών, επηρεάζοντας τις αλληλεπιδράσεις τους με τη στατική φάση. Ως αποτέλεσμα, ενδέχεται να παρατηρηθούν μεταβολές στον χρόνο κατακράτησης, στη συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών, στη διακριτική ικανότητα του συστήματος και στην εκλεκτικότητα του διαχωρισμού. Για τον λόγο αυτό, κατά την αξιολόγηση της

ανθεκτικότητας μιας μεθόδου εξετάζονται συνήθως μικρές σκόπιμες μεταβολές του pH, της τάξης των $\pm 0,2$ μονάδων γύρω από την ονομαστική τιμή λειτουργίας, προκειμένου να διαπιστωθεί η ευαισθησία της μεθόδου στις συνήθεις εργαστηριακές διακυμάνσεις και να επιβεβαιωθεί η αξιοπιστία της υπό πραγματικές συνθήκες εφαρμογής (Dong, 2019).

4.8.5 Επίδραση της σύστασης της κινητής φάσης

Η αναλογία οργανικού διαλύτη προς υδατικό διάλυμα αποτελεί κρίσιμο παράγοντα που επηρεάζει τη χρωματογραφική συμπεριφορά των αναλυτών. Μικρές μεταβολές στη σύσταση της κινητής φάσης μπορούν να οδηγήσουν σε σημαντικές αλλαγές στους χρόνους κατακράτησης και στον βαθμό διαχωρισμού των κορυφών (Dong, 2019).

Κατά την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας, συνηθίζεται η μεταβολή της περιεκτικότητας σε οργανικό διαλύτη κατά $\pm 2\%$ ή $\pm 5\%$, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της μεθόδου. Η αξιολόγηση αυτή επιτρέπει την εκτίμηση της ευαισθησίας της μεθόδου σε μικρές αποκλίσεις κατά την προετοιμασία της κινητής φάσης (ICH, 2023).

4.8.6 Επίδραση του ρυθμού ροής

Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης επηρεάζει άμεσα τον χρόνο παραμονής των αναλυτών εντός της χρωματογραφικής στήλης. Μεταβολές στον ρυθμό ροής μπορούν να οδηγήσουν σε αλλαγές τόσο στους χρόνους κατακράτησης όσο και στην αποδοτικότητα του διαχωρισμού (Snyder et al., 2010).

Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας πραγματοποιείται συνήθως με μεταβολές της τάξης του $\pm 10\%$ γύρω από την ονομαστική τιμή της μεθόδου. Για παράδειγμα, σε μέθοδο με flow rate 1,0 mL/min εξετάζονται συνήθως τιμές 0,9 και 1,1 mL/min.

Η παράμετρος αυτή έχει ιδιαίτερη σημασία διότι μικρές αποκλίσεις στη βαθμονόμηση της αντλίας ή στη λειτουργία του συστήματος μπορούν να επηρεάσουν τη χρωματογραφική απόδοση κατά τη ρουτίνα εφαρμογή της μεθόδου (USP, 2024).

4.8.7 Επίδραση της θερμοκρασίας στήλης

Η θερμοκρασία επηρεάζει τόσο το ιξώδες της κινητής φάσης όσο και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ αναλύτη και στατικής φάσης. Ως αποτέλεσμα, μεταβολές στη θερμοκρασία μπορούν να οδηγήσουν σε αλλαγές στους χρόνους κατακράτησης και στη διακριτική ικανότητα της μεθόδου (Dong, 2019).

Κατά τις μελέτες ανθεκτικότητας εξετάζονται συνήθως μεταβολές της τάξης των $\pm 5^{\circ}\text{C}$ από τη θερμοκρασία λειτουργίας της μεθόδου. Η αξιολόγηση αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική σε εργαστήρια όπου οι περιβαλλοντικές συνθήκες ενδέχεται να παρουσιάζουν διακυμάνσεις.

4.8.8 Αξιολόγηση αποτελεσμάτων ανθεκτικότητας

Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας μιας αναλυτικής μεθόδου δεν περιορίζεται αποκλειστικά στον έλεγχο της περιεκτικότητας της δραστικής ουσίας, αλλά περιλαμβάνει και τη διερεύνηση της επίδρασης των μεταβολών στις βασικές χρωματογραφικές παραμέτρους του συστήματος. Για τον σκοπό αυτό αξιολογούνται συνήθως ο χρόνος κατακράτησης (retention time), η διακριτική ικανότητα (resolution), ο παράγοντας συμμετρίας ή ουράς της κορυφής (symmetry/tailing factor), ο αριθμός θεωρητικών πλακών (number of theoretical plates), η καθαρότητα της κορυφής (peak purity) και το ποσοστό προσδιορισμού της δραστικής ουσίας (% assay). Η παρακολούθηση των παραμέτρων αυτών επιτρέπει τη συνολική εκτίμηση της απόδοσης της μεθόδου και συμβάλλει στην επιβεβαίωση ότι μικρές μεταβολές των αναλυτικών συνθηκών δεν επηρεάζουν ουσιαστικά την αξιοπιστία και την καταλληλότητά της για τον επιδιωκόμενο σκοπό (Ermer, J., & Miller, J. H. M., 2005).

Οι παράμετροι αυτές συγκρίνονται με τα αποτελέσματα που λαμβάνονται υπό τις ονομαστικές συνθήκες λειτουργίας. Η μέθοδος θεωρείται ανθεκτική όταν οι μεταβολές δεν επηρεάζουν ουσιαστικά την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων και όλα τα προκαθορισμένα κριτήρια αποδοχής εξακολουθούν να ικανοποιούνται (ICH, 2023; USP, 2024).

4.8.9 Σημασία της ανθεκτικότητας για την αξιολόγηση των χρωματογραφικών συνθηκών

Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας παρέχει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την καταλληλότητα των επιλεγμένων χρωματογραφικών συνθηκών και συμβάλλει στην κατανόηση των παραγόντων που επηρεάζουν την απόδοση της μεθόδου. Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, η παράμετρος αυτή αποκτά ιδιαίτερη σημασία, καθώς συνδέεται άμεσα με την αξιολόγηση της σταθερότητας και της αξιοπιστίας των συνθηκών HPLC που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της δραστικής ουσίας στο φαρμακευτικό σκεύασμα.

Η επιτυχής τεκμηρίωση της ανθεκτικότητας υποδηλώνει ότι η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί με ασφάλεια σε συνθήκες καθημερινής εργαστηριακής πρακτικής χωρίς να επηρεάζεται σημαντικά από μικρές λειτουργικές αποκλίσεις. Ως εκ τούτου, η ανθεκτικότητα αποτελεί βασικό στοιχείο της συνολικής αξιολόγησης της ποιότητας μιας αναλυτικής διαδικασίας και ενισχύει την εμπιστοσύνη στα παραγόμενα αποτελέσματα (ICH, 2023b).

4.9 Έλεγχος Καταλληλότητας Συστήματος (System Suitability Testing)

4.9.1 Εισαγωγή

Ο έλεγχος καταλληλότητας συστήματος (System Suitability Testing – SST) αποτελεί αναπόσπαστο μέρος των χρωματογραφικών αναλύσεων και εφαρμόζεται προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι το αναλυτικό σύστημα λειτουργεί σύμφωνα με τις προκαθορισμένες απαιτήσεις απόδοσης πριν από την έναρξη της ανάλυσης των δειγμάτων. Η διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται εκτενώς στις αναλύσεις HPLC και θεωρείται βασικό στοιχείο της διασφάλισης της ποιότητας των αναλυτικών αποτελεσμάτων (USP, 2024).

Η φιλοσοφία του SST βασίζεται στην παραδοχή ότι ακόμη και μία πλήρως επικυρωμένη μέθοδος μπορεί να παράγει μη αξιόπιστα αποτελέσματα εάν το χρωματογραφικό σύστημα παρουσιάζει δυσλειτουργίες ή λειτουργεί εκτός των καθορισμένων ορίων απόδοσης. Για τον λόγο αυτό, πριν από κάθε σειρά αναλύσεων πραγματοποιούνται δοκιμές που επιβεβαιώνουν την ορθή λειτουργία του συστήματος και τη συμμόρφωση με συγκεκριμένα κριτήρια αποδοχής (European Pharmacopoeia, 2023).

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία και την USP, ο έλεγχος καταλληλότητας συστήματος δεν αξιολογεί αποκλειστικά την απόδοση του οργάνου, αλλά το σύνολο της αναλυτικής διαδικασίας, συμπεριλαμβανομένων της στήλης, της κινητής φάσης, του ανιχνευτή και των συνθηκών λειτουργίας της μεθόδου (USP, 2024; EDQM, 2023).

4.9.2 Στόχοι του System Suitability Testing

Ο βασικός στόχος του SST είναι η διασφάλιση ότι το χρωματογραφικό σύστημα είναι ικανό να παράγει αποτελέσματα με την απαιτούμενη ακρίβεια, πιστότητα και διακριτική ικανότητα. Μέσω της διαδικασίας αυτής επιβεβαιώνεται ότι οι κρίσιμες χρωματογραφικές παράμετροι παραμένουν εντός προκαθορισμένων ορίων και ότι η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί αξιόπιστα υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες ανάλυσης (USP, 2024).

Ο έλεγχος καταλληλότητας του συστήματος (System Suitability Test, SST) δεν χρησιμοποιείται μόνο για την επιβεβαίωση της αποδεκτής χρωματογραφικής απόδοσης πριν από την ανάλυση των δειγμάτων, αλλά και ως εργαλείο έγκαιρης ανίχνευσης πιθανών προβλημάτων που ενδέχεται να επηρεάσουν την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Μέσω της συνεχούς παρακολούθησης χαρακτηριστικών παραμέτρων του συστήματος είναι δυνατόν να εντοπιστούν δυσλειτουργίες που σχετίζονται με τη φθορά ή τη γήρανση της χρωματογραφικής στήλης, μεταβολές στη σύσταση ή την ποιότητα της κινητής φάσης, προβλήματα στη λειτουργία της αντλίας ή του συστήματος παροχής διαλύτη, καθώς και δυσλειτουργίες του ανιχνευτή (USP <621>, 2024).

Παράλληλα, το SST μπορεί να συμβάλει στην αναγνώριση σφαλμάτων που προκύπτουν κατά την προετοιμασία των προτύπων και των διαλυμάτων δείγματος. Ως εκ τούτου, αποτελεί βασικό στοιχείο της διασφάλισης ποιότητας στις χρωματογραφικές αναλύσεις και προϋπόθεση για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων που παράγονται κατά τον ποιοτικό έλεγχο φαρμακευτικών προϊόντων (Ermer & Miller, 2005).

Η εφαρμογή του SST πριν από κάθε αναλυτική σειρά μειώνει σημαντικά την πιθανότητα παραγωγής λανθασμένων αποτελεσμάτων και συμβάλλει στη διατήρηση της αξιοπιστίας της αναλυτικής διαδικασίας (Dong, 2019).

4.9.3 Χρωματογραφικές παράμετροι αξιολόγησης

Η καταλληλότητα ενός χρωματογραφικού συστήματος HPLC αξιολογείται μέσω ενός συνόλου παραμέτρων που περιγράφουν την ποιότητα του διαχωρισμού και τη συνολική απόδοση της μεθόδου. Οι παράμετροι αυτές χρησιμοποιούνται για να επιβεβαιωθεί ότι το χρωματογραφικό σύστημα λειτουργεί σύμφωνα με τις προκαθορισμένες προδιαγραφές πριν από την έναρξη της ανάλυσης των δειγμάτων. Μεταξύ των σημαντικότερων δεικτών περιλαμβάνονται ο χρόνος κατακράτησης (retention time), ο αριθμός θεωρητικών πλακών (number of theoretical plates), η διακριτική ικανότητα (resolution), ο παράγοντας συμμετρίας ή ουράς της κορυφής (symmetry/tailing factor), καθώς και η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) της χρωματογραφικής απόκρισης μετά από επαναλαμβανόμενες εγχύσεις του πρότυπου διαλύματος (Ahuja & Dong, 2005).

Η αξιολόγηση των παραμέτρων αυτών επιτρέπει τη διασφάλιση της αξιοπιστίας, της επαναληψιμότητας και της καταλληλότητας του συστήματος για την παραγωγή έγκυρων αναλυτικών αποτελεσμάτων. Οι παράμετροι αυτές χρησιμοποιούνται συνδυαστικά για την αξιολόγηση της λειτουργίας του συστήματος και την επιβεβαίωση της συμμόρφωσης με τα προκαθορισμένα κριτήρια αποδοχής (USP, 2024).

4.9.4 Χρόνος κατακράτησης (Retention Time)

Ο χρόνος κατακράτησης (tR) αντιπροσωπεύει το χρονικό διάστημα που απαιτείται για τη μετακίνηση μιας ουσίας από το σημείο έγχυσης έως τον ανιχνευτή. Ο χρόνος αυτός αποτελεί χαρακτηριστική ιδιότητα κάθε αναλύτη υπό συγκεκριμένες χρωματογραφικές συνθήκες και χρησιμοποιείται συχνά για σκοπούς ταυτοποίησης (Snyder et al., 2010).

Στο πλαίσιο του SST, η παρακολούθηση του χρόνου κατακράτησης επιτρέπει την έγκαιρη ανίχνευση μεταβολών στις συνθήκες λειτουργίας του συστήματος. Σημαντικές αποκλίσεις από τις αναμενόμενες τιμές ενδέχεται να υποδηλώνουν αλλαγές στη σύσταση της κινητής φάσης, προβλήματα στη λειτουργία της αντλίας ή φθορά της χρωματογραφικής στήλης (EDQM, 2023).

4.9.5 Αριθμός θεωρητικών πλακών (Number of Theoretical Plates)

Ο αριθμός θεωρητικών πλακών (N) αποτελεί μέτρο της αποδοτικότητας της χρωματογραφικής στήλης και εκφράζει την ικανότητά της να παράγει στενές και καλά διαχωρισμένες κορυφές. Υψηλότερες τιμές N υποδηλώνουν αποτελεσματικότερο διαχωρισμό και καλύτερη χρωματογραφική απόδοση (Snyder et al., 2010).

Ο υπολογισμός πραγματοποιείται σύμφωνα με τη σχέση:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

όπου:

- t_R = χρόνος κατακράτησης,
- W = πλάτος κορυφής στη βάση.

Η παράμετρος αυτή επηρεάζεται από το μέγεθος των σωματιδίων της στήλης, την ποιότητα πλήρωσης, τον ρυθμό ροής και την κατάσταση της χρωματογραφικής στήλης (USP, 2024).

4.9.6 Διακριτική ικανότητα (Resolution)

Η διακριτική ικανότητα (Resolution, R_s) αποτελεί μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους αξιολόγησης της χρωματογραφικής απόδοσης και εκφράζει τον βαθμό διαχωρισμού δύο γειτονικών κορυφών. Η παράμετρος αυτή είναι ιδιαίτερα κρίσιμη σε αναλύσεις όπου η δραστική ουσία πρέπει να διαχωρίζεται από προσμίξεις ή προϊόντα αποδόμησης (EDQM, 2023).

Ο υπολογισμός πραγματοποιείται σύμφωνα με τη σχέση:

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$$

Σύμφωνα με τη Φαρμακοποιία, τιμές:

$$R_s \geq 1.5$$

θεωρούνται γενικά επαρκείς για πλήρη διαχωρισμό των κορυφών (EDQM, 2023).

4.9.7 Παράγοντας Συμμετρίας (Tailing Factor)

Η συμμετρία των κορυφών αποτελεί σημαντικό δείκτη της ποιότητας ενός χρωματογραφικού διαχωρισμού. Ιδανικά, οι κορυφές πρέπει να εμφανίζουν συμμετρικό σχήμα τύπου Gaussian. Στην πράξη, όμως, συχνά παρατηρείται ασυμμετρία που εκδηλώνεται με τη μορφή ουράς (tailing) ή μετωπικότητας (fronting) (USP, 2024).

Ο παράγοντας ουράς υπολογίζεται σύμφωνα με τη σχέση:

$$T = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

Τιμές μικρότερες από 2 θεωρούνται γενικά αποδεκτές στις περισσότερες φαρμακευτικές εφαρμογές (USP, 2024).

Η παρουσία έντονης ασυμμετρίας ή ουράς στις χρωματογραφικές κορυφές (peak tailing) μπορεί να αποτελεί ένδειξη προβλημάτων που σχετίζονται είτε με τη χρωματογραφική στήλη είτε με τις συνθήκες της ανάλυσης. Συχνά, το φαινόμενο αυτό αποδίδεται στην ανάπτυξη δευτερογενών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αναλυτών και ενεργών θέσεων της στατικής φάσης, οι οποίες επηρεάζουν την ομοιόμορφη έκλυση των συστατικών (Dong, 2019).

Επιπλέον, η υπερφόρτωση της στήλης λόγω έγχυσης υπερβολικής ποσότητας δείγματος, η χρήση ακατάλληλου pH στην κινητή φάση ή η σταδιακή φθορά και γήρανση της χρωματογραφικής στήλης μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε αύξηση του παράγοντα ουράς (tailing factor). Η παρακολούθηση της συμμετρίας των κορυφών αποτελεί επομένως σημαντικό στοιχείο του ελέγχου καταλληλότητας του συστήματος και συμβάλλει στην έγκαιρη αναγνώριση πιθανών προβλημάτων της μεθόδου ή του εξοπλισμού (Meyer, 2010).

4.9.8 Πιστότητα του συστήματος (%RSD)

Η πιστότητα του συστήματος αξιολογείται συνήθως μέσω πολλαπλών διαδοχικών εγχύσεων πρότυπου διαλύματος. Η παράμετρος που χρησιμοποιείται συχνότερα είναι η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) του εμβαδού των κορυφών (USP, 2024).

Στις περισσότερες assay methods απαιτείται:

$$\%RSD \leq 2.0$$

για έξι επαναλαμβανόμενες εγχύσεις του πρότυπου διαλύματος.

Η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) της χρωματογραφικής απόκρισης μετά από διαδοχικές εγχύσεις πρότυπου διαλύματος αποτελεί σημαντικό δείκτη της επαναληψιμότητας και της σταθερότητας του χρωματογραφικού συστήματος. Η παράμετρος αυτή παρέχει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τη σταθερότητα της παροχής της κινητής φάσης από την αντλία, την ακρίβεια και την επαναληψιμότητα του αυτόματου δειγματολήπτη (autosampler), καθώς και τη σταθερότητα της απόκρισης του ανιχνευτή κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Χαμηλές τιμές %RSD υποδηλώνουν ομαλή λειτουργία του συστήματος και συμβάλλουν στην εξασφάλιση αξιόπιστων και αναπαραγώγιμων αναλυτικών αποτελεσμάτων (Ermer & Miller, 2005).

4.9.9 Σχέση SST και επικύρωσης της μεθόδου

Παρότι το SST δεν αποτελεί χαρακτηριστικό επικύρωσης με την αυστηρή έννοια του όρου, συνδέεται στενά με όλες τις παραμέτρους που αξιολογούνται κατά την επικύρωση. Η διατήρηση αποδεκτών τιμών resolution, tailing factor, theoretical plates και %RSD αποτελεί προϋπόθεση για την παραγωγή αξιόπιστων αναλυτικών αποτελεσμάτων και τη διατήρηση της επικυρωμένης κατάστασης της μεθόδου (USP, 2024).

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, ο έλεγχος καταλληλότητας συστήματος αποκτά ιδιαίτερη σημασία, καθώς επιτρέπει την αξιολόγηση της καταλληλότητας των επιλεγμένων χρωματογραφικών συνθηκών και παρέχει πρόσθετες αποδείξεις σχετικά με

την αξιοπιστία της αναλυτικής μεθόδου HPLC που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της δραστικής ουσίας.

5. Πειραματικό Μέρος

5.1 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η επαλήθευση της αναλυτικής μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού (Assay) της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης (Alfuzosin HCl) σε δισκία παρατεταμένης αποδέσμευσης 10 mg, σύμφωνα με τις απαιτήσεις της κατευθυντήριας οδηγίας PA/PH/OMCL (13) 82 R5 για την επικύρωση και επαλήθευση αναλυτικών διαδικασιών σε φαρμακευτικά προϊόντα δευτέρου κατόχου άδειας κυκλοφορίας (2nd MAH Medicinal Product).

Η μελέτη αποσκοπούσε στην τεκμηρίωση της καταλληλότητας της μεθόδου HPLC για τον ποσοτικό προσδιορισμό της δραστικής ουσίας στο τελικό φαρμακευτικό προϊόν, μέσω της αξιολόγησης κρίσιμων χαρακτηριστικών απόδοσης της μεθόδου.

5.2 Πεδίο εφαρμογής

Η παρούσα μελέτη επαλήθευσης περιελάμβανε την αξιολόγηση των βασικών χαρακτηριστικών επικύρωσης της αναλυτικής μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης σε δισκία παρατεταμένης αποδέσμευσης 10 mg.

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης αξιολογήθηκαν οι βασικές παράμετροι επαλήθευσης της αναλυτικής μεθόδου, σύμφωνα με τις απαιτήσεις των σχετικών κατευθυντήριων οδηγιών. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η ειδικότητα (Specificity) της μεθόδου μέσω της αξιολόγησης πιθανών παρεμβολών από τον διαλύτη αραίωσης, την κινητή φάση, το placebo και τα έκδοχα του φαρμακευτικού σκευάσματος, ώστε να διασφαλιστεί η αξιόπιστη ποσοτικοποίηση της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης. Παράλληλα, αξιολογήθηκε η γραμμικότητα (Linearity) εντός κατάλληλου εύρους συγκεντρώσεων γύρω από την ονομαστική συγκέντρωση της μεθόδου, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη γραμμικής σχέσης μεταξύ συγκέντρωσης και αναλυτικής απόκρισης.

Επιπλέον, προσδιορίστηκε η ακρίβεια (Accuracy) της μεθόδου μέσω μελετών ανάκτησης σε επίπεδα συγκέντρωσης πλησίον της θεωρητικής συγκέντρωσης του αναλύτη, ενώ η επαναληψιμότητα (Repeatability) αξιολογήθηκε μέσω ανεξάρτητων προσδιορισμών στην ονομαστική συγκέντρωση λειτουργίας της μεθόδου. Παράλληλα, εξετάστηκε η ανθεκτικότητα (Robustness) της μεθόδου μέσω της εφαρμογής μικρών και σκόπιμων μεταβολών σε κρίσιμες χρωματογραφικές παραμέτρους, όπως ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης, το μήκος κύματος ανίχνευσης, η θερμοκρασία της στήλης, το pH του ρυθμιστικού διαλύματος και ο τύπος της χρωματογραφικής στήλης. Η διερεύνηση των παραμέτρων αυτών πραγματοποιήθηκε με στόχο την τεκμηρίωση της αξιοπιστίας, της σταθερότητας και της καταλληλότητας της αναλυτικής διαδικασίας για την εφαρμογή της στον ποιοτικό έλεγχο του φαρμακευτικού προϊόντος Alfuzosin HCl 10 mg P.R. Tablets.

5.3 Αναλυτική μέθοδος

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης πραγματοποιήθηκε με μέθοδο Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας της δραστικής ουσίας σε δισκία παρατεταμένης αποδέσμευσης Alfuzosin HCl 10 mg/Tab.

Ως πρότυπη ουσία χρησιμοποιήθηκε πρότυπο υδροχλωρικής αλφουζοσίνης γνωστής περιεκτικότητας, το οποίο χρησιμοποιήθηκε χωρίς προηγούμενη ξήρανση ή άλλη επεξεργασία. Για τους υπολογισμούς εφαρμόστηκε ο διορθωτικός συντελεστής καθαρότητας (% Potency) όπως αναγράφεται στο πιστοποιητικό ανάλυσης του προτύπου υλικού.

5.4 Όργανα και αντιδραστήρια

Όργανα

- Σύστημα HPLC εξοπλισμένο με ανιχνευτή PDA.

Αντιδραστήρια

- Ακετονιτρίλιο (HPLC grade)

- Μεθανόλη (HPLC grade)
- Φωσφορικό οξύ 85% (H_3PO_4)
- Άνυδρο φωσφορικό δινάτριο (Na_2HPO_4)

Πρότυπη ουσία

- Πρότυπο αναφοράς υδροχλωρικής αλφουζοσίνης (Alfuzosin HCl Working Standard)

5.5 Χρωματογραφικές συνθήκες

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε στήλη Gemini C18 (110 Å, 150 × 4,6 mm, 5 μm) και η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 244 nm, ενώ ο όγκος έγχυσης ορίστηκε στα 10 μL. Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης ήταν 1,5 mL/min και η θερμοκρασία λειτουργίας διατηρήθηκε στους 25°C.

Η κινητή φάση αποτελούνταν από φωσφορικό διάλυμα pH 3,5 (80%, v/v) και ακετονιτρίλιο (20%, v/v). Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν 10 λεπτά τόσο για τα πρότυπα όσο και για τα δείγματα και ο χρόνος κατακράτησης της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες ήταν περίπου 3,5 λεπτά.

5.6 Παρασκευή κινητής φάσης

Για την παρασκευή της κινητής φάσης Α, διαλύθηκαν 1,56 g άνυδρου φωσφορικού δινάτριου σε περίπου 800 mL καθαρισμένου νερού. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στην τιμή 3,5 με χρήση ορθοφωσφορικού οξέος και στη συνέχεια το διάλυμα αφέθηκε να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου. Ο τελικός όγκος συμπληρώθηκε στα 1000 mL με απιονισμένο νερό και πραγματοποιήθηκε επανέλεγχος του pH πριν από τη χρήση του διαλύματος.

5.7 Παρασκευή πρότυπου διαλύματος αναφοράς

Για την παρασκευή του πρότυπου διαλύματος αναφοράς, ζυγίστηκαν με ακρίβεια, εις διπλούν, περίπου 20 mg πρότυπης υδροχλωρικής αλφουζοσίνης γνωστής περιεκτικότητας και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL.

Προστέθηκαν περίπου 50 mL μεθανόλης και το διάλυμα υποβλήθηκε σε επεξεργασία με υπερήχους για 15 λεπτά, προκειμένου να επιτευχθεί πλήρης διάλυση της πρότυπης ουσίας. Μετά την επίτευξη θερμοκρασίας δωματίου, ο όγκος συμπληρώθηκε με μεθανόλη έως τη χαραγή της ογκομετρικής φιάλης.

Από το διάλυμα αυτό μεταφέρθηκαν 10 mL σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL και ο όγκος συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό. Πριν από τη χρωματογραφική ανάλυση, το διάλυμα διηθήθηκε μέσω μεμβράνης φίλτρου 0,45 μm . Η τελική συγκέντρωση του πρότυπου διαλύματος ήταν 0,04 mg/mL υδροχλωρικής αλφουζοσίνης.

5.8 Παρασκευή διαλύματος δείγματος

Πέντε δισκία υδροχλωρικής αλφουζοσίνης παρατεταμένης αποδέσμευσης 10 mg ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 250 mL. Προστέθηκαν λίγες σταγόνες ακετονιτριλίου και στη συνέχεια περίπου 150 mL μεθανόλης. Το μίγμα αφέθηκε υπό συνεχή ανάδευση για μία ώρα, ώστε να διευκολυνθεί η εκχύλιση της δραστικής ουσίας από το φαρμακευτικό υπόστρωμα.

Ακολούθως, το διάλυμα υποβλήθηκε σε επεξεργασία σε λουτρό υπερήχων για χρονικό διάστημα μίας ώρας και τριάντα λεπτών. Μετά την επίτευξη θερμοκρασίας δωματίου, ο όγκος συμπληρώθηκε με μεθανόλη έως τη χαραγή της ογκομετρικής φιάλης. Από το παραπάνω διάλυμα μεταφέρθηκαν 10 mL σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL και αραιώθηκαν με απιονισμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο. Η προσθήκη του νερού πραγματοποιήθηκε προσεκτικά, ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός αφρού.

Το τελικό διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 4000 rpm για 10 λεπτά πριν από την έγχυση στο χρωματογραφικό σύστημα. Η τελική συγκέντρωση του διαλύματος δείγματος ήταν 0,04 mg/mL.

5.9 Έλεγχος καταλληλότητας συστήματος (System Suitability Test)

Πριν από την έναρξη των αναλύσεων πραγματοποιήθηκε έλεγχος καταλληλότητας του χρωματογραφικού συστήματος, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ορθή λειτουργία του εξοπλισμού και η καταλληλότητα των χρωματογραφικών συνθηκών.

Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα προκαθορισμένα κριτήρια αποδοχής της μεθόδου και περιλάμβανε τον έλεγχο της επαναληψιμότητας των διαδοχικών εγχύσεων του πρότυπου διαλύματος, της συμμετρίας της κορυφής της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης καθώς και της συνολικής μορφολογίας των χρωματογραφημάτων.

Συγκεκριμένα, οι κορυφές του πρότυπου και του δείγματος έπρεπε να εμφανίζουν παρόμοιο σχήμα και συγκρίσιμη χρωματογραφική συμπεριφορά. Επιπλέον, η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) των εμβαδών έξι διαδοχικών εγχύσεων του πρότυπου διαλύματος δεν έπρεπε να υπερβαίνει το 2,0%, ενώ ο παράγοντας συμμετρίας (symmetry factor) της κορυφής της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης δεν έπρεπε να υπερβαίνει την τιμή 1,8.

5.10 Διαδικασία χρωματογραφικής ανάλυσης

Η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με διαδοχικές εγχύσεις των πρότυπων και των δειγμάτων σύμφωνα με το καθορισμένο πρωτόκολλο της μεθόδου. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν έξι διαδοχικές εγχύσεις του Πρότυπου Διαλύματος 1 για τον έλεγχο της καταλληλότητας του συστήματος. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μία έγχυση του Πρότυπου Διαλύματος 2, ακολουθούμενη από μία έγχυση του διαλύματος δείγματος.

Μετά την ολοκλήρωση της ανάλυσης του δείγματος πραγματοποιήθηκε εκ νέου έγχυση του Πρότυπου Διαλύματος 1, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η σταθερότητα της απόκρισης του συστήματος κατά τη διάρκεια της αναλυτικής διαδικασίας.

5.11 Υπολογισμός της περιεκτικότητας σε υδροχλωρική αλφουζοσίνη

Η περιεκτικότητα των δισκίων σε υδροχλωρική αλφουζοσίνη υπολογίστηκε μέσω σύγκρισης της χρωματογραφικής απόκρισης του δείγματος με εκείνη του πρότυπου διαλύματος αναφοράς.

Για τον υπολογισμό λήφθηκαν υπόψη το μέσο εμβαδό της κορυφής του πρότυπου διαλύματος, το εμβαδό της κορυφής του δείγματος, οι παράγοντες αραίωσης των αντίστοιχων διαλυμάτων, η καθαρότητα της πρότυπης ουσίας, η μέση μάζα των δισκίων καθώς και η δηλωμένη περιεκτικότητα του προϊόντος σε δραστική ουσία. Η περιεκτικότητα της δραστικής ουσίας υπολογίστηκε ως ποσοστό (%) της δηλωμένης

περιεκτικότητας του φαρμακευτικού προϊόντος (10 mg Alfuzosin HCl ανά δισκίο) και συγκρίθηκε με τα προκαθορισμένα όρια αποδοχής, προκειμένου να αξιολογηθεί η συμμόρφωση του προϊόντος με τις απαιτούμενες προδιαγραφές ποιότητας.

5.12 Προδιαγραφές αποδοχής

Σύμφωνα με τις εγκεκριμένες προδιαγραφές του προϊόντος, η αποδεκτή περιεκτικότητα της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης στα δισκία παρατεταμένης αποδέσμευσης έπρεπε να κυμαίνεται μεταξύ 95,0% και 105,0% της δηλωμένης περιεκτικότητας.

Αποτελέσματα εκτός των καθορισμένων ορίων θεωρούνται μη συμμορφούμενα και υποδηλώνουν πιθανή απόκλιση είτε στη διαδικασία παραγωγής είτε στην αναλυτική διαδικασία ελέγχου.

5.13 Αξιολόγηση της ειδικότητας (Specificity)

Η ειδικότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε με σκοπό να αποδειχθεί η ικανότητά της να προσδιορίζει επιλεκτικά την υδροχλωρική αλφουζοσίνη παρουσία των εκδόχων του φαρμακευτικού σκευάσματος και πιθανών παρεμβαλλόμενων συστατικών.

Για την αξιολόγηση της ειδικότητας της μεθόδου αναλύθηκαν διαφορετικοί τύποι διαλυμάτων, ώστε να διερευνηθεί η πιθανότητα παρεμβολών στον προσδιορισμό της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν το πρότυπο διάλυμα (standard solution), το ενισχυμένο διάλυμα (spiked solution), ο διαλύτης αραίωσης (diluent) και το διάλυμα placebo που περιείχε όλα τα έκδοχα του φαρμακευτικού σκευάσματος χωρίς τη δραστική ουσία.

Η σύγκριση των χρωματογραφημάτων των παραπάνω διαλυμάτων επέτρεψε την αξιολόγηση πιθανών παρεμβολών από έκδοχα, διαλύτες ή άλλες ουσίες στη θέση έκλουσης της δραστικής ουσίας. Πριν από την εκτέλεση της μελέτης ειδικότητας πραγματοποιήθηκε έλεγχος καταλληλότητας του χρωματογραφικού συστήματος (System Suitability Test), προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ορθή λειτουργία του εξοπλισμού και η συμμόρφωση των βασικών χρωματογραφικών παραμέτρων με τα προκαθορισμένα κριτήρια αποδοχής.

5.13.1 Αποτελέσματα ελέγχου καταλληλότητας συστήματος

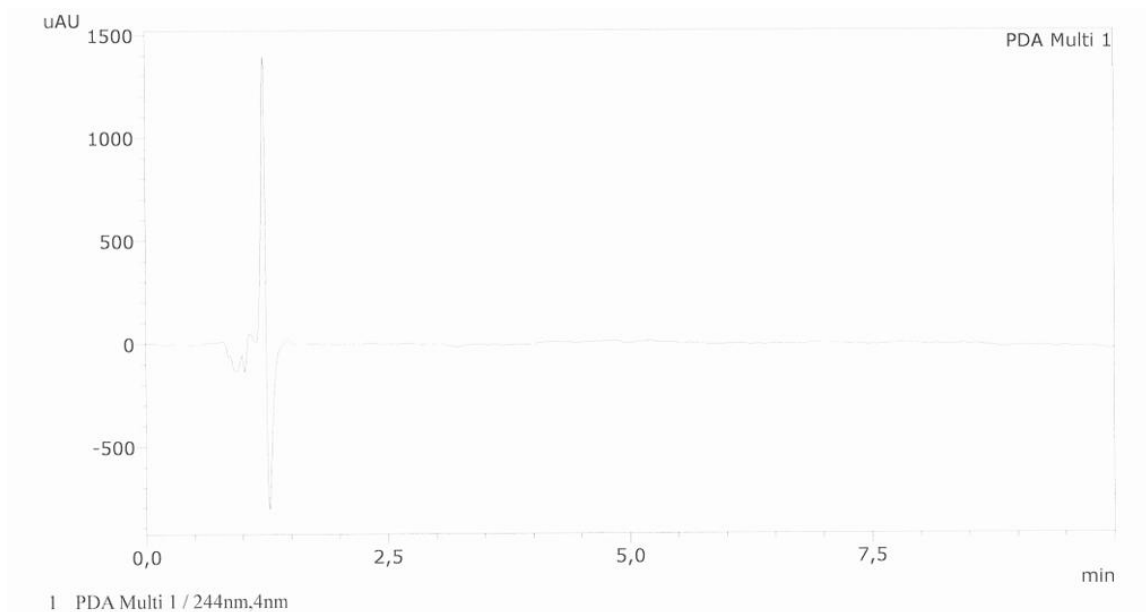
Τα αποτελέσματα του ελέγχου καταλληλότητας του συστήματος έδειξαν ότι όλες οι προκαθορισμένες απαιτήσεις της μεθόδου ικανοποιήθηκαν.

Η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) των εμβαδών από τις έξι διαδοχικές εγχύσεις του πρότυπου διαλύματος ήταν 0,15%, τιμή σημαντικά χαμηλότερη από το αποδεκτό όριο του 2,0%.

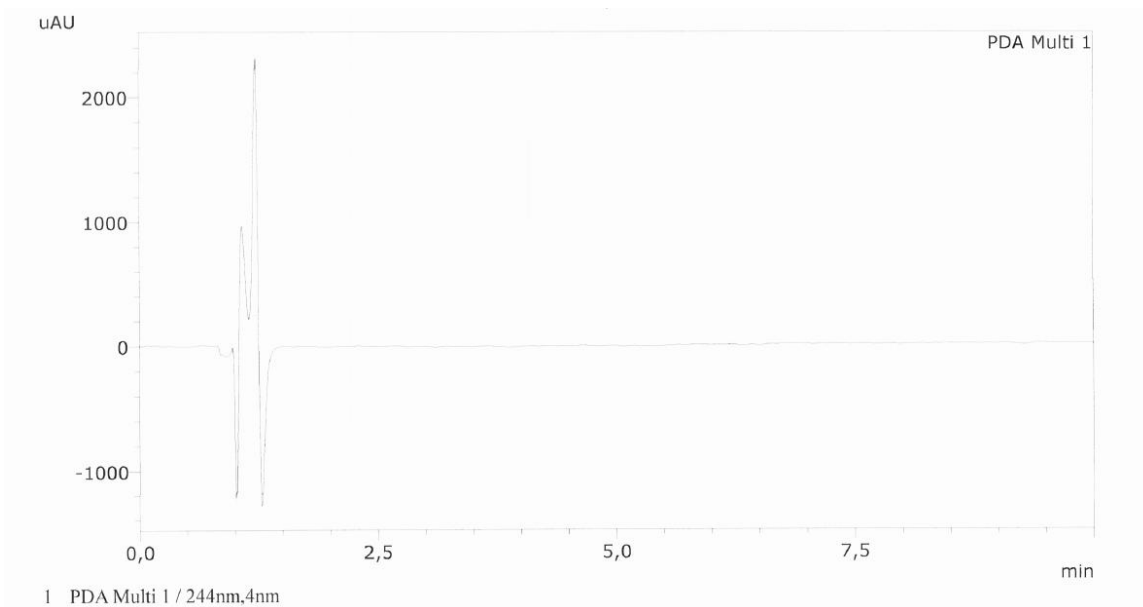
Ο μέγιστος παράγοντας συμμετρίας της κορυφής της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης ήταν 1,192, τιμή η οποία συμμορφώνεται με το προκαθορισμένο όριο αποδοχής (<1,8).

Επιπλέον, τα χρωματογραφήματα του πρότυπου και του δείγματος παρουσίασαν παρόμοια μορφολογία και αντίστοιχη χρωματογραφική συμπεριφορά, επιβεβαιώνοντας την ορθή λειτουργία του χρωματογραφικού συστήματος.

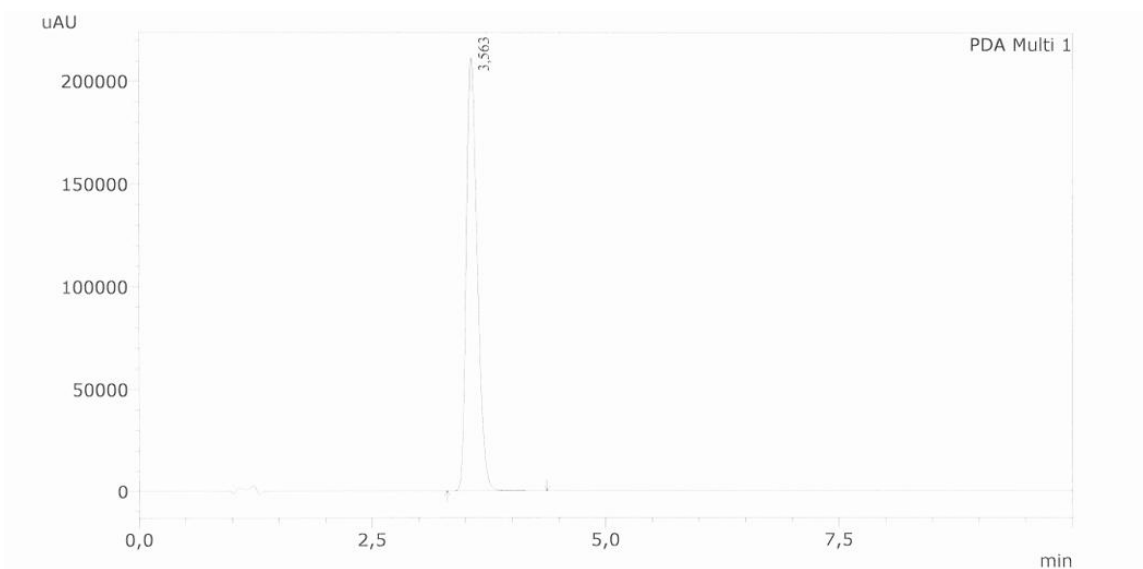
5.13.2 Αποτελέσματα ειδικότητας



Chromatogram 1: Diluent



Chromatogram 2: Placebo



Chromatogram 3: Spiked Solution

Η αξιολόγηση των χρωματογραφημάτων του διαλύτη αραιώσης και του placebo έδειξε ότι δεν παρατηρήθηκαν κορυφές στον χρόνο κατακράτησης της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης (περίπου 3,5 min).

Η απουσία παρεμβαλλόμενων κορυφών επιβεβαιώνει ότι τα έκδοχα του φαρμακευτικού προϊόντος και οι λοιπές εξεταζόμενες ουσίες δεν επηρεάζουν τον προσδιορισμό της δραστικής ουσίας.

Παράλληλα, ο δείκτης καθαρότητας κορυφής (Peak Purity Index) της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης στο πρότυπο διάλυμα ήταν ίσος με 1,000000, τιμή μεγαλύτερη από το ελάχιστο αποδεκτό όριο των 0,99.

Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, τεκμηριώνεται ότι η μέθοδος είναι ειδική για τον προσδιορισμό της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί με αξιοπιστία για τον ποσοτικό προσδιορισμό της δραστικής ουσίας στο υπό εξέταση φαρμακευτικό προϊόν.

5.14 Αξιολόγηση της Γραμμικότητας (Linearity)

Η γραμμικότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε με σκοπό να τεκμηριωθεί η ύπαρξη γραμμικής σχέσης μεταξύ της συγκέντρωσης της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης και της χρωματογραφικής απόκρισης του συστήματος εντός του εξεταζόμενου εύρους συγκεντρώσεων.

5.14.1 Προετοιμασία διαλυμάτων γραμμικότητας

Για την παρασκευή του μητρικού πρότυπου διαλύματος (stock solution), ζυγίστηκαν με ακρίβεια 20 mg πρότυπης υδροχλωρικής αλφουζοσίνης και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Η ουσία διαλύθηκε σε μεθανόλη και ο τελικός όγκος συμπληρώθηκε με τον ίδιο διαλύτη, ώστε να ληφθεί διάλυμα συγκέντρωσης 200 µg/mL.

Από το μητρικό διάλυμα παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα σε έξι επίπεδα συγκέντρωσης, τα οποία αντιστοιχούσαν στο 20%, 50%, 80%, 100%, 120% και 150% της ονομαστικής συγκέντρωσης εργασίας της μεθόδου (40 µg/mL). Οι τελικές συγκεντρώσεις που αξιολογήθηκαν ήταν 8, 20, 32, 40, 48 και 60 µg/mL αντίστοιχα.

Κάθε επίπεδο συγκέντρωσης αναλύθηκε εις τριπλούν και για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης χρησιμοποιήθηκε η μέση τιμή της χρωματογραφικής απόκρισης (εμβαδό κορυφής).

5.14.2 Έλεγχος καταλληλότητας συστήματος

Πριν από την αξιολόγηση της γραμμικότητας πραγματοποιήθηκε έλεγχος καταλληλότητας του χρωματογραφικού συστήματος.

Τα χρωματογραφήματα των προτύπων και των δοκιμαστικών διαλυμάτων παρουσίασαν παρόμοια μορφολογία και αντίστοιχη χρωματογραφική συμπεριφορά. Η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) των έξι διαδοχικών εγχύσεων του πρότυπου διαλύματος ήταν 0,15%, τιμή σημαντικά χαμηλότερη από το προκαθορισμένο όριο του 2,0%.

Παράλληλα, ο μέγιστος παράγοντας συμμετρίας της κορυφής της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης ήταν 1,192, τιμή που συμμορφώνεται με το αποδεκτό όριο (<1,8). Ως εκ τούτου, το χρωματογραφικό σύστημα κρίθηκε κατάλληλο για τη διεξαγωγή της μελέτης γραμμικότητας.

5.14.3 Αποτελέσματα γραμμικότητας

Theoretical level % in respect to Study Working C.	Actual level % in respect to Study Working C.	C µg/mL	Area	Response Average	Y intercept (b) from regression line
20	19.76	7.9	328692	328497	-14893
			328410		
			328389		
50	49.40	19.8	818942	812871	-45605
			807391		
			812281		
80	79.04	31.6	1343454	1343407	-30154
			1342984		
			1343783		
100	98.80	39.5	1678351	1678677	-38274
			1679363		
			1678317		
120	118.56	47.4	2022915	2024663	-35679
			2025212		
			2025861		
150	148.20	59.3	2548452	2557009	-18418
			2560044		
			2562530		

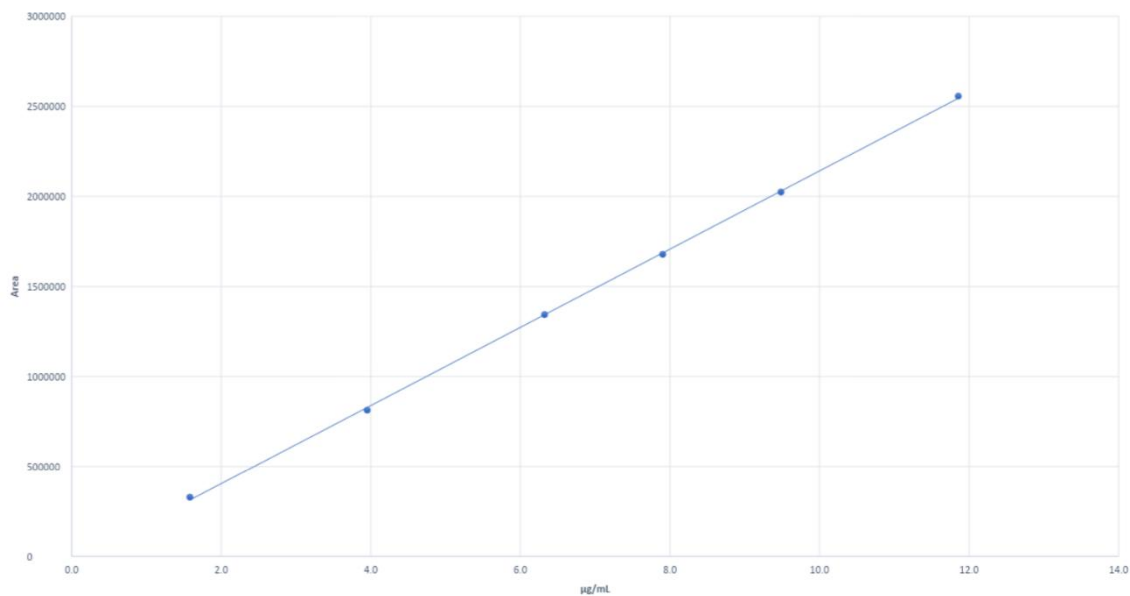
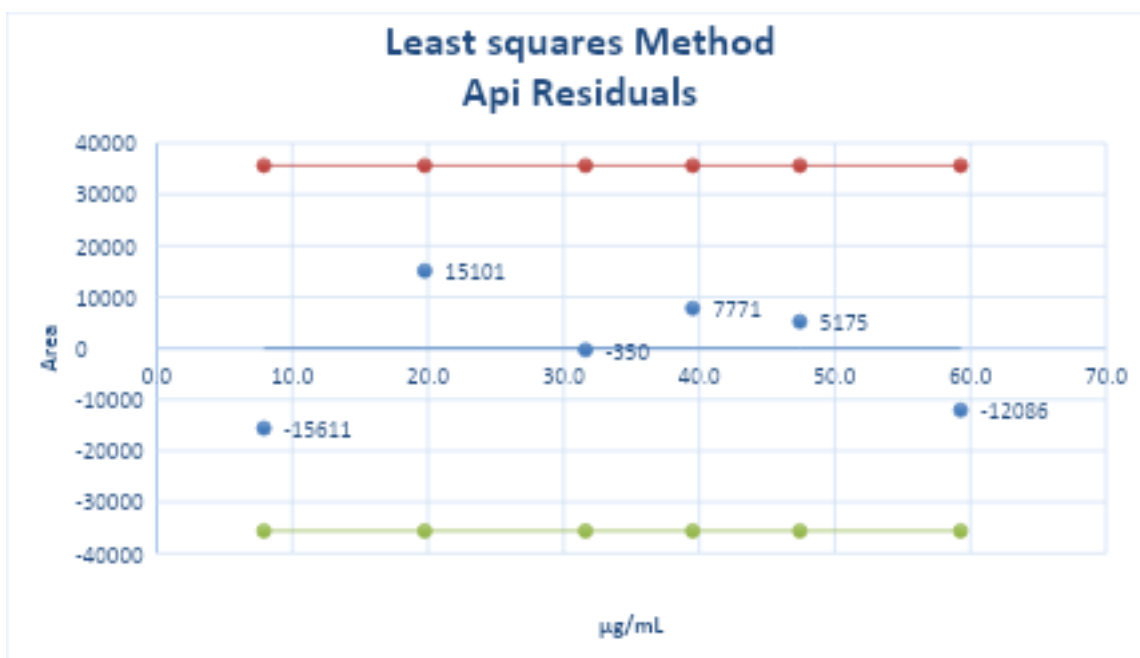


Figure 1: Least squares Method / API-Linear Regression

R^2	0.99979
Slope	43445
Intercept	-30504



Η απόκλιση της υπολογιζόμενης τεταγμένης επί την αρχή (Y-intercept) βρέθηκε εντός των αποδεκτών ορίων Μέση Τιμή $\pm 3\sigma$ των αντίστοιχων τιμών απόκρισης στο επίπεδο συγκέντρωσης αναφοράς, γεγονός που επιβεβαιώνει την απουσία συστηματικών αποκλίσεων και την καλή προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στο γραμμικό μοντέλο παλινδρόμησης. Ως εκ τούτου, το κριτήριο αποδοχής για τη γραμμικότητα της μεθόδου θεωρείται ότι ικανοποιείται.

Η γραμμικότητα αξιολογήθηκε με γραμμική παλινδρόμηση των μέσων τιμών της χρωματογραφικής απόκρισης έναντι των αντίστοιχων συγκεντρώσεων της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης.

Οι μέσες αποκρίσεις που καταγράφηκαν για τα επίπεδα συγκέντρωσης 20%, 50%, 80%, 100%, 120% και 150% ήταν 328.497, 812.871, 1.343.407, 1.678.677, 2.024.663 και 2.557.009 μονάδες εμβαδού αντίστοιχα.

Η εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης που προέκυψε ήταν:

$$y = 43445x - 30504$$

όπου:

- y = χρωματογραφική απόκριση (εμβαδό κορυφής)
- x = συγκέντρωση υδροχλωρικής αλφουζοσίνης ($\mu\text{g/mL}$)

Ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) υπολογίστηκε ίσος με 0,99979, υποδηλώνοντας εξαιρετική συσχέτιση μεταξύ συγκέντρωσης και χρωματογραφικής απόκρισης.

Η αξιολόγηση των υπολοίπων της παλινδρόμησης (residuals) έδειξε ότι οι αποκλίσεις των επιμέρους σημείων από τη θεωρητική ευθεία ήταν μικρές και κατανεμημένες τυχαία κατά μήκος της καμπύλης βαθμονόμησης. Επιπλέον, η απόκλιση του υπολογιζόμενου σημείου τομής (intercept) βρέθηκε εντός των ορίων Average $\pm 3\sigma$ της αντίστοιχης θεωρητικής απόκρισης του επιπέδου εργασίας, ικανοποιώντας το προκαθορισμένο κριτήριο αποδοχής.

5.14.4 Αξιολόγηση αποτελεσμάτων

Σύμφωνα με τα καθορισμένα κριτήρια αποδοχής, η αναλυτική απόκριση έπρεπε να είναι γραμμική εντός του εξεταζόμενου εύρους συγκεντρώσεων και ο συντελεστής συσχέτισης να μην είναι μικρότερος από 0,99.

Η τιμή του συντελεστή προσδιορισμού ($R^2 = 0,99979$), σε συνδυασμό με τη γραμμική κατανομή των πειραματικών σημείων και τη συμμόρφωση των υπολοίπων με τα προκαθορισμένα κριτήρια, επιβεβαιώνει την ύπαρξη ισχυρής γραμμικής σχέσης μεταξύ συγκέντρωσης και χρωματογραφικής απόκρισης.

Κατά συνέπεια, η μέθοδος θεωρείται γραμμική στο εύρος συγκεντρώσεων από 20% έως 150% της ονομαστικής συγκέντρωσης εργασίας και πληροί τις απαιτήσεις επαλήθευσης για τη συγκεκριμένη παράμετρο.

5.15 Αξιολόγηση της Ακρίβειας (Accuracy)

Η ακρίβεια της μεθόδου αξιολογήθηκε μέσω μελετών ανάκτησης (recovery studies), με σκοπό να διερευνηθεί η ικανότητα της μεθόδου να προσδιορίζει με ακρίβεια την πραγματική ποσότητα της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης στο εξεταζόμενο εύρος συγκεντρώσεων.

Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης, τα οποία αντιστοιχούσαν στο 50%, 100% και 150% της ονομαστικής συγκέντρωσης εργασίας της μεθόδου. Για κάθε επίπεδο παρασκευάστηκαν τρία ανεξάρτητα δείγματα και κάθε δείγμα αναλύθηκε σε τρεις επαναλαμβανόμενες εγχύσεις.

Πριν από την έναρξη των αναλύσεων πραγματοποιήθηκε έλεγχος καταλληλότητας του συστήματος. Η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) των έξι διαδοχικών εγχύσεων του πρότυπου διαλύματος ήταν 0,05%, ενώ ο μέγιστος παράγοντας συμμετρίας της κορυφής της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης ήταν 1,291. Όλα τα κριτήρια αποδοχής του συστήματος ικανοποιήθηκαν, επιβεβαιώνοντας την καταλληλότητα των χρωματογραφικών συνθηκών για τη διεξαγωγή της μελέτης.

	Standard 1	Standard 2
Weight (mg)	20.3	20.1
Dilution factor	0.002	0.002

Potency %	98.80%	98.80%
Concentration (µg/mL)	40.11	39.72
Areas of Standards	Standard 1	Standard 2
Injection 1	1737383	1718037
Injection 2	1737668	
Injection 3	1738815	
Injection 4	1737374	
Injection 5	1738050	
Injection 6	1739254	
Average	1738091	
RSD%	0.045	

Αποτελέσματα ανάκτησης στο επίπεδο συγκέντρωσης 50%

	Level A1 (50%)						
Injections	Area	Dilution factor	Weighted STD for Spiking (mg)	C μg/mL	%added	Determined	Recovery
1-1	934167	0.002	10.8	21.341	53.4	53.9	101.0
1-2	933306					53.8	100.9
1-3	933416					53.9	100.9
	Potency %			98.80%		Av:	101.0
						SD:	0.05
						RSD:	0.05

Level A2 (50%)							
Injections	Area	Dilution factor	Weighted STD for Spiking (mg)	C µg/mL	%added	Determined	Recovery
2-1	902373	0.0020000	10.4	20.550	51.4	52.1	101.3
2-2	902554					52.1	101.4
2-3	901367					52.0	101.2

	Potency %	98.80%	Av:	101.3
			SD:	0.07
			RSD:	0.07

	Level A3 (50%)						
Injections	Area	Dilution factor	Weighted STD for spiking (mg)	C µg/mL	%added	Determined	Recovery
3-1	903635	0.0020000	10.5	20.748	51.9	52.1	100.5
3-2	904350					52.2	100.6
3-3	902648					52.1	100.4
	Potency %			98.80%		Av:	100.5
						SD:	0.10
						RSD:	0.09

Τα αποτελέσματα της μελέτης ακρίβειας στο επίπεδο συγκέντρωσης 50% έδειξαν ότι η μέση ποσοστιαία ανάκτηση της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης ήταν 100,9%, με τις επιμέρους τιμές ανάκτησης να κυμαίνονται από 100,5% έως 101,3%. Η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) των ανακτήσεων ήταν 0,40%, γεγονός που καταδεικνύει την υψηλή ακρίβεια της μεθόδου και την εξαιρετική συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, η επαναληψιμότητα των τριπλών εγχύσεων αξιολογήθηκε μέσω των τιμών %RSD, οι οποίες κυμάνθηκαν από 0,05% έως 0,09%. Οι χαμηλές αυτές τιμές υποδηλώνουν πολύ καλή επαναληψιμότητα και σταθερότητα της αναλυτικής διαδικασίας. Συνεπώς, η μέθοδος πληροί τα προκαθορισμένα κριτήρια αποδοχής τόσο ως προς την ακρίβεια όσο και ως προς την επαναληψιμότητα στο επίπεδο συγκέντρωσης 50%.

Αποτελέσματα ανάκτησης στο επίπεδο συγκέντρωσης 100%

Level B1 (100%)							
Injections	Area	Dilution factor	Weighted STD for spiking (mg)	C µg/mL	%added	Determined	Recovery

1-1	1776561	0.0020000	20.4	40.310	100.8	102.5	101.7
1-2	1774671					102.4	101.6
1-3	1774991					102.4	101.6
	Potency %			98.80%		Av:	101.6
						SD:	0.06
						RSD:	0.06

	Level B2 (100%)						
Injections	Area	Dilution factor	Weighted STD for spiking (mg)	C µg/mL	%added	Determined	Recovery
2-1	1781530	0.0020000	20.5	40.508	101.3	102.8	101.5
2-2	1780503					102.7	101.4
2-3	1780632					102.7	101.4
	Potency %			98.80%		Av:	101.5
						SD:	0.03
						RSD:	0.03

	Level B3 (100%)						
Injections	Area	Dilution factor	Weighted STD for spiking (mg)	C µg/mL	%added	Determined	Recovery
3-1	1763922	0.0020000	20.6	40.706	101.8	101.8	100.0
3-2	1764293					101.8	100.0
3-3	1765586					101.9	100.1
	Potency %			98.80%		Av:	100.0
						SD:	0.05
						RSD:	0.05

Τα αποτελέσματα της μελέτης ακρίβειας στο επίπεδο συγκέντρωσης 100% έδειξαν ότι η μέση ποσοστιαία ανάκτηση της δραστικής ουσίας ήταν 101,1%, με τις επιμέρους τιμές να

κυμαίνονται από 100,0% έως 101,6%. Η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) των ανακτήσεων υπολογίστηκε σε 0,87%, τιμή που βρίσκεται εντός των προκαθορισμένων κριτηρίων αποδοχής και υποδηλώνει υψηλό βαθμό ακρίβειας της μεθόδου. Παράλληλα, η επαναληψιμότητα των τριπλών εγχύσεων αξιολογήθηκε μέσω των τιμών %RSD, οι οποίες κυμάνθηκαν από 0,03% έως 0,06%. Οι ιδιαίτερα χαμηλές αυτές τιμές καταδεικνύουν την εξαιρετική επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου στο επίπεδο συγκέντρωσης 100%, επιβεβαιώνοντας την αξιοπιστία της για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης.

Αποτελέσματα ανάκτησης στο επίπεδο συγκέντρωσης 150%

	Level C1 (150%)						
Injections	Area	Dilution factor	Weighted STD for spiking (mg)	C μg/mL	%added	Determined	Recovery
1	2639312	0.0020000	30.5	60.268	150.7	152.3	101.1
2	2639978					152.3	101.1
3	2637779					152.2	101.0
	Potency %			98.80%		Av:	101.1
						SD:	0.04
						RSD:	0.04

	Level C2 (150%)						
Injections	Area	Dilution factor	Weighted STD for spiking (mg)	C μg/mL	%added	Determined	Recovery
1	2618834	0.0020000	30.2	59.675	149.2	151.1	101.3
2	2615216					150.9	101.1
3	2619673					151.1	101.3
	Potency %			98.80%		Av:	101.2
						SD:	0.09

	RSD:	0.09
--	------	------

	Level C3 (150%)						
Injections	Area	Dilution factor	Weighted STD for spiking (mg)	C µg/mL	%added	Determined	Recovery
1	2627321	0.0020000	30.6	60.466	151.2	151.6	100.3
2	2623868					151.4	100.1
3	2625934					151.5	100.2
	Potency %			98.80%		Av:	100.2
						SD:	0.07
						RSD:	0.07

Τα αποτελέσματα της μελέτης ακρίβειας στο επίπεδο συγκέντρωσης 150% έδειξαν ότι η μέση ανάκτηση της δραστικής ουσίας ήταν 100,8%, με ελάχιστη και μέγιστη τιμή ανάκτησης 100,2% και 101,2%, αντίστοιχα. Η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) των τιμών ανάκτησης υπολογίστηκε σε 0,54%, γεγονός που υποδηλώνει υψηλό βαθμό συμφωνίας μεταξύ των ανεξάρτητων προσδιορισμών. Παράλληλα, η επαναληψιμότητα των τριπλών εγχύσεων αξιολογήθηκε μέσω των τιμών %RSD, οι οποίες κυμάνθηκαν από 0,04% έως 0,09%. Οι ιδιαίτερα χαμηλές αυτές τιμές καταδεικνύουν την εξαιρετική επαναληψιμότητα της μεθόδου και επιβεβαιώνουν ότι η αναλυτική διαδικασία παρέχει σταθερά και αναπαραγώγιμα αποτελέσματα στο εξεταζόμενο επίπεδο συγκέντρωσης.

Στο επίπεδο του 50% της συγκέντρωσης εργασίας, οι μέσες τιμές ανάκτησης κυμάνθηκαν από 100,5% έως 101,3%, με συνολική μέση ανάκτηση 100,9%. Η σχετική τυπική απόκλιση των ανακτήσεων ήταν 0,40%, ενώ η επαναληψιμότητα των τριπλών εγχύσεων παρουσίασε τιμές %RSD από 0,05% έως 0,09%.

Στο επίπεδο του 100% της συγκέντρωσης εργασίας, οι μέσες ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 100,0% έως 101,6%, με συνολική μέση ανάκτηση 101,1%. Η σχετική τυπική απόκλιση

των ανακτήσεων ήταν 0,87%, ενώ οι τιμές επαναληψιμότητας των επιμέρους εγχύσεων κυμάνθηκαν μεταξύ 0,03% και 0,06%.

Στο επίπεδο του 150% της συγκέντρωσης εργασίας, οι μέσες τιμές ανάκτησης κυμάνθηκαν από 100,2% έως 101,2%, με συνολική μέση ανάκτηση 100,8%. Η σχετική τυπική απόκλιση των ανακτήσεων ήταν 0,54%, ενώ οι αντίστοιχες τιμές επαναληψιμότητας κυμάνθηκαν από 0,04% έως 0,09%.

Σύμφωνα με τα προκαθορισμένα κριτήρια αποδοχής, οι τιμές ανάκτησης έπρεπε να βρίσκονται εντός του εύρους 97,5%–102,5%, ενώ η σχετική τυπική απόκλιση των ανακτήσεων σε κάθε επίπεδο δεν έπρεπε να υπερβαίνει το 2,0%. Όλα τα αποτελέσματα συμμορφώθηκαν πλήρως με τα καθορισμένα κριτήρια.

Τα ευρήματα της μελέτης καταδεικνύουν ότι η μέθοδος προσδιορίζει με ακρίβεια την περιεκτικότητα της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης σε ολόκληρο το εξεταζόμενο εύρος συγκεντρώσεων και παρουσιάζει εξαιρετική συμφωνία μεταξύ της προστιθέμενης και της προσδιοριζόμενης ποσότητας δραστικής ουσίας.

5.16 Αξιολόγηση της Επαναληψιμότητας (Repeatability)

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε μέσω έξι διαδοχικών εγχύσεων πρότυπου διαλύματος από τον ίδιο αναλυτή υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Κατά την πρώτη ημέρα ανάλυσης (Analyst 1 – Day 1), η μέση τιμή της επιφάνειας κορυφής ήταν 1.698.551 μονάδες, με τυπική απόκλιση (SD) 4.536 και σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) 0,267%. Η τιμή αυτή είναι σημαντικά χαμηλότερη από το συνήθως αποδεκτό όριο του 2,0%, γεγονός που υποδηλώνει υψηλή επαναληψιμότητα του συστήματος και της αναλυτικής διαδικασίας.

Επιπλέον, η σύγκριση των δύο ανεξάρτητα παρασκευασμένων προτύπων διαλυμάτων έδειξε λόγο απόκρισης (RF Standard 2 / Standard 1) ίσο με 101,1%, ο οποίος βρίσκεται εντός των προκαθορισμένων ορίων αποδοχής (98,0–102,0%). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την καλή ακρίβεια της μεθόδου υπό συνθήκες επαναληψιμότητας.

Η ενδιάμεση πιστότητα αξιολογήθηκε με επανάληψη της ανάλυσης από τον ίδιο αναλυτή σε διαφορετική ημέρα (Analyst 1 – Day 2), χρησιμοποιώντας νέο πρότυπο διάλυμα και τις

ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες. Η μέση επιφάνεια κορυφής που καταγράφηκε ήταν 1.773.054 μονάδες, με τυπική απόκλιση 6.019,8 και %RSD ίσο με 0,340%.

Ο λόγος απόκρισης μεταξύ των δύο ανεξάρτητα παρασκευασμένων προτύπων διαλυμάτων ήταν 100,3%, τιμή η οποία επίσης βρίσκεται εντός των προκαθορισμένων ορίων αποδοχής (98,0–102,0%). Οι χαμηλές τιμές %RSD και η συμφωνία των αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο ημερών καταδεικνύουν ότι η μέθοδος παρουσιάζει υψηλό βαθμό ενδιάμεσης πιστότητας και δεν επηρεάζεται ουσιαστικά από συνήθεις μεταβολές των συνθηκών ανάλυσης.

Standards of Analyst 1- Day 1 (a1d1)			Standards of Analyst 1- Day 2 (a1d2)		
	Standard 1	Standard 2		Standard 1	Standard 2
Weight (mg)	20,0	20,5	Weight (mg)	20,3	20,1
Dilution factor	0,002	0,002	Dilution factor	0,002	0,002
Potency%	98,80%	98,80%	Potency%	98,80%	98,80%
Concentration µg/mL	39,52	40,51	Concentration µg/mL	40,11	39,72
Areas	Standard 1	Standard 2	Areas	Standard 1	Standard 2
Injection 1	1701926	1759940	Injection 1	1765954	1760427
Injection 2	1702687		Injection 2	1775833	
Injection 3	1701301		Injection 3	1773541	
Injection 4	1699704		Injection 4	1773301	
Injection 5	1693227		Injection 5	1782474	
Injection 6	1692458		Injection 6	1767221	
Average	1698551		Average	1773054	
SD	4536		SD	6019,8	
RSD	0,267		RSD	0,340	

RF of st2/std1	Limit % (98,0-102,0)	101,1	RF of st2/std1	Limit % (98,0- 102,0)	100,3
----------------	-------------------------	-------	----------------	--------------------------	-------

Οι τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης (%RSD) των τριπλών εγχύσεων για όλα τα επίπεδα συγκέντρωσης ήταν ιδιαίτερα χαμηλές. Συγκεκριμένα, στο επίπεδο 50% οι τιμές %RSD κυμάνθηκαν από 0,05% έως 0,09%, στο επίπεδο 100% από 0,03% έως 0,06% και στο επίπεδο 150% από 0,04% έως 0,09%.

Όλες οι τιμές ήταν σημαντικά χαμηλότερες από το προκαθορισμένο όριο αποδοχής του 2,0%, γεγονός που υποδηλώνει εξαιρετική επαναληψιμότητα της αναλυτικής διαδικασίας, οπότε τα αποτελέσματα της επαναληψιμότητας και της ενδιάμεσης πιστότητας πληρούν τα προκαθορισμένα κριτήρια αποδοχής. Οι τιμές %RSD ήταν μικρότερες από 1,0% και οι λόγοι απόκρισης των ανεξάρτητων προτύπων διαλυμάτων κυμάνθηκαν εντός των ορίων 98,0–102,0%. Συνεπώς, η αναλυτική μέθοδος θεωρείται επαρκώς ακριβής και παρουσιάζει ικανοποιητική πιστότητα για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης σε δισκία παρατεταμένης αποδέσμευσης.

5.17 Αξιολόγηση της Ανθεκτικότητας (Robustness)

Η ανθεκτικότητα (robustness) εκφράζει την ικανότητα μιας αναλυτικής μεθόδου να παραμένει ανεπηρέαστη από μικρές αλλά σκόπιμες μεταβολές των αναλυτικών συνθηκών. Η αξιολόγηση της παραμέτρου αυτής παρέχει ένδειξη σχετικά με την αξιοπιστία της μεθόδου κατά την εφαρμογή της σε συνθήκες εργαστηριακής ρουτίνας και συμβάλλει στην αναγνώριση κρίσιμων παραμέτρων που ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοσή της.

Στο πλαίσιο της αρχικής επικύρωσης της μεθόδου εξετάστηκε η επίδραση μικρών μεταβολών σε βασικές χρωματογραφικές παραμέτρους, όπως ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης, το μήκος κύματος ανίχνευσης, η θερμοκρασία της στήλης, το pH του ρυθμιστικού διαλύματος και τα χαρακτηριστικά της χρωματογραφικής στήλης.

5.17.1 Επίδραση μεταβολής του ρυθμού ροής

Ο ρυθμός ροής μεταβλήθηκε κατά $\pm 20\%$ από την ονομαστική τιμή των 1,5 mL/min, εξετάζοντας τις συνθήκες 1,2 mL/min και 1,8 mL/min.

Η μείωση του ρυθμού ροής οδήγησε σε αύξηση του χρόνου κατακράτησης από 3,9 σε 4,8 λεπτά, ενώ η αύξηση του ρυθμού ροής προκάλεσε μείωση του χρόνου κατακράτησης στα 3,3 λεπτά. Παρά τις μεταβολές αυτές, η συμμετρία των κορυφών παρέμεινε εντός αποδεκτών ορίων (1,3–1,4) και η αποδοτικότητα της στήλης διατηρήθηκε σε ικανοποιητικά επίπεδα.

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η μέθοδος παρουσιάζει περιορισμένη ευαισθησία στις μεταβολές του ρυθμού ροής και παραμένει κατάλληλη εντός του εξεταζόμενου εύρους λειτουργίας.

5.17.2 Επίδραση μεταβολής του μήκους κύματος

Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε στα 242 nm και 246 nm αντί της ονομαστικής τιμής των 244 nm.

Η μεταβολή του μήκους κύματος επηρέασε μόνο το εμβαδό της κορυφής, όπως αναμενόταν λόγω διαφοροποίησης της απορρόφησης της ουσίας. Ωστόσο, ο χρόνος κατακράτησης παρέμεινε αμετάβλητος στα 3,9 λεπτά, ενώ η συμμετρία της κορυφής παρέμεινε σταθερή (1,3).

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι μικρές μεταβολές του μήκους κύματος δεν επηρεάζουν ουσιαστικά τη χρωματογραφική απόδοση της μεθόδου.

5.17.3 Επίδραση της θερμοκρασίας

Η θερμοκρασία της στήλης αυξήθηκε από 25°C σε 30°C.

Η μεταβολή αυτή προκάλεσε ελάχιστη μείωση του χρόνου κατακράτησης (3,9 σε 3,8 λεπτά), χωρίς σημαντική επίδραση στη συμμετρία της κορυφής ή στην αποδοτικότητα της στήλης.

Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η μέθοδος παραμένει σταθερή και αξιόπιστη εντός του εξεταζόμενου εύρους θερμοκρασίας.

5.17.4 Επίδραση μεταβολής του pH

Το pH του φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος μεταβλήθηκε κατά $\pm 0,5$ μονάδες γύρω από την ονομαστική τιμή 3,5.

Η μείωση του pH σε 3,0 είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου κατακράτησης στα 3,4 λεπτά, ενώ η αύξηση του pH σε 4,0 οδήγησε σε αύξηση του χρόνου κατακράτησης στα 4,3 λεπτά.

Παρά τις παρατηρούμενες μεταβολές στην κατακράτηση, η συμμετρία της κορυφής παρέμεινε σταθερή και η αποδοτικότητα της στήλης διατηρήθηκε σε αποδεκτά επίπεδα. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η μέθοδος εμφανίζει ικανοποιητική ανθεκτικότητα σε μικρές μεταβολές του pH.

5.17.5 Επίδραση αλλαγής στήλης

Η αρχική στήλη Gemini C18 (110 Å, 150 × 4,6 mm, 5 μm) αντικαταστάθηκε από ισοδύναμη στήλη Gemini C18 (110 Å, 150 × 4,6 mm, 3 μm).

Παρότι παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού θεωρητικών πλακών από 6581 σε 12808 και μικρή αύξηση του χρόνου κατακράτησης, η συμμετρία της κορυφής παρέμεινε εντός αποδεκτών ορίων.

Η διατήρηση της χρωματογραφικής απόδοσης επιβεβαιώνει τη δυνατότητα χρήσης ισοδύναμων στηλών χωρίς ουσιαστική επίδραση στην αξιοπιστία της μεθόδου.

5.17.6 Σταθερότητα διαλυμάτων

Η σταθερότητα των προτύπων και των διαλυμάτων δείγματος αξιολογήθηκε με επανέγχυση μετά από αποθήκευση σε ψυγείο για 24 και 48 ώρες.

Η μέγιστη διακύμανση της απόκρισης για το πρότυπο διάλυμα ήταν 0,4%, ενώ για το διάλυμα δείγματος 1,8%, τιμές οι οποίες ήταν χαμηλότερες από το προκαθορισμένο όριο του 2,0%.

Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι τόσο τα πρότυπα όσο και τα διαλύματα δείγματος παραμένουν σταθερά για τουλάχιστον 48 ώρες υπό συνθήκες ψυχρής αποθήκευσης.

5.17.7 Συμπεράσματα ανθεκτικότητας

Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας έδειξε ότι οι μικρές σκόπιμες μεταβολές στις χρωματογραφικές συνθήκες δεν επηρεάζουν ουσιαστικά την απόδοση της μεθόδου. Οι μεταβολές που εξετάστηκαν οδήγησαν κυρίως σε αναμενόμενες διαφοροποιήσεις στον χρόνο κατακράτησης και στο μέγεθος του σήματος, χωρίς όμως να επηρεάσουν τη συμμετρία των κορυφών, την αποδοτικότητα του διαχωρισμού ή τη δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης.

5.17.8 Αξιολόγηση ανθεκτικότητας

Η ανθεκτικότητα της αναλυτικής μεθόδου αξιολογήθηκε με τη μελέτη της επίδρασης μικρών και σκόπιμων μεταβολών σε κρίσιμες χρωματογραφικές παραμέτρους. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν μεταβολές στον ρυθμό ροής της κινητής φάσης ($\pm 20\%$), στο μήκος κύματος ανίχνευσης (± 2 nm), στη θερμοκρασία λειτουργίας της στήλης, στο pH του ρυθμιστικού διαλύματος της κινητής φάσης, καθώς και η χρήση εναλλακτικής χρωματογραφικής στήλης ισοδύναμων χαρακτηριστικών. Παράλληλα, διερευνήθηκε η σταθερότητα των πρότυπων και των διαλυμάτων δείγματος κατά την αποθήκευσή τους.

Η μεταβολή του ρυθμού ροής από 1,5 mL/min σε 1,2 mL/min και 1,8 mL/min επηρέασε κυρίως τον χρόνο κατακράτησης της Alfuzosin HCl, ο οποίος μεταβλήθηκε από 3,9 min σε 4,8 min και 3,3 min αντίστοιχα. Ωστόσο, οι τιμές συμμετρίας κορυφής παρέμειναν αποδεκτές (1,3–1,4), ενώ ο αριθμός των θεωρητικών πλακών διατηρήθηκε σε ικανοποιητικά επίπεδα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η μέθοδος παραμένει λειτουργική εντός του συγκεκριμένου εύρους μεταβολών.

Η μεταβολή του μήκους κύματος ανίχνευσης από 244 nm σε 242 nm και 246 nm δεν επέφερε ουσιαστικές αλλαγές στα χρωματογραφικά χαρακτηριστικά. Ο χρόνος κατακράτησης παρέμεινε σταθερός στα 3,9 min, ενώ τόσο ο αριθμός θεωρητικών πλακών όσο και ο παράγοντας συμμετρίας διατηρήθηκαν σε αποδεκτά επίπεδα. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η μέθοδος δεν παρουσιάζει ιδιαίτερη ευαισθησία σε μικρές αποκλίσεις του μήκους κύματος.

Η αύξηση της θερμοκρασίας της στήλης από 25°C σε 30°C είχε αμελητέα επίδραση στη χρωματογραφική συμπεριφορά του αναλύτη. Ο χρόνος κατακράτησης παρουσίασε

ελάχιστη μεταβολή (3,9 min έναντι 3,8 min), ενώ η συμμετρία των κορυφών και ο αριθμός θεωρητικών πλακών παρέμειναν ουσιαστικά αμετάβλητοι.

Αντίστοιχα, η μεταβολή του pH του φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος κατά $\pm 0,5$ μονάδες (pH 3,0 και pH 4,0) οδήγησε σε αναμενόμενες μεταβολές του χρόνου κατακράτησης, χωρίς όμως να επηρεάσει αρνητικά τη μορφή των κορυφών ή την αποδοτικότητα της στήλης. Ο παράγοντας συμμετρίας διατηρήθηκε στην τιμή 1,3 σε όλες τις περιπτώσεις, ενώ ο αριθμός θεωρητικών πλακών παρέμεινε σε αποδεκτά επίπεδα.

Η αντικατάσταση της αρχικής στήλης Gemini C18 (150 × 4,6 mm, 5 μ m) με ισοδύναμη στήλη Gemini C18 (150 × 4,6 mm, 3 μ m) δεν επηρέασε αρνητικά την απόδοση της μεθόδου. Αντιθέτως, παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού θεωρητικών πλακών από 6581 σε 12808, γεγονός που υποδηλώνει βελτίωση της χρωματογραφικής αποδοτικότητας, ενώ ο παράγοντας συμμετρίας παρέμεινε εντός των αποδεκτών ορίων.

Τέλος, η σταθερότητα των διαλυμάτων αξιολογήθηκε με επανέγχυση των πρότυπων και των διαλυμάτων δείγματος μετά από αποθήκευση σε ψυγείο για χρονικό διάστημα έως 48 ωρών. Οι τιμές του συντελεστή μεταβλητότητας (CV) ήταν 0,3% για το πρότυπο διάλυμα και 1,0% για το διάλυμα δείγματος, ενώ οι αποκλίσεις των παραγόντων απόκρισης δεν ξεπέρασαν το 0,4% και 1,8% αντίστοιχα, παραμένοντας χαμηλότερες από το προκαθορισμένο όριο αποδοχής του 2,0%.

Συνολικά, τα αποτελέσματα της μελέτης κατέδειξαν ότι οι μικρές μεταβολές των κρίσιμων αναλυτικών παραμέτρων δεν επηρεάζουν ουσιωδώς την απόδοση της μεθόδου. Επομένως, η μέθοδος προσδιορισμού της περιεκτικότητας της Alfuzosin HCl με HPLC χαρακτηρίζεται ως επαρκώς ανθεκτική και κατάλληλη για εφαρμογή στον ποιοτικό έλεγχο του φαρμακευτικού προϊόντος.

Επίδραση της μεταβολής του ρυθμού ροής στην απόδοση της μεθόδου

Παράμετρος	Κανονικές συνθήκες (1,5 mL/min)	Ρυθμός ροής -20% (1,2 mL/min)	Ρυθμός ροής +20% (1,8 mL/min)

Area	1968	2454	1639
Χρόνος κατακράτησης (min)	3,9	4,8	3,3
Θεωρητικές πλάκες (N)	6581	7545	5780
Παράγοντας συμμετρίας	1,3	1,4	1,3

Επίδραση της μεταβολής του μήκους κύματος ανίχνευσης

Παράμετρος	Κανονικές συνθήκες (244 nm)	λ -2 nm (242 nm)	λ +2 nm (246 nm)
Area	1968	1883	1954
Χρόνος κατακράτησης (min)	3,9	3,9	3,9
Θεωρητικές πλάκες (N)	6581	6609	6415
Παράγοντας συμμετρίας	1,3	1,3	1,3

Επίδραση της μεταβολής της θερμοκρασίας

Παράμετρος	Κανονικές συνθήκες (25°C)	Θερμοκρασία 30°C
Area	1968	1966
Χρόνος κατακράτησης (min)	3,9	3,8
Θεωρητικές πλάκες (N)	6581	6702
Παράγοντας συμμετρίας	1,3	1,3

Επίδραση της μεταβολής του pH της κινητής φάσης

Παράμετρος	Κανονικές συνθήκες (pH 3,5)	pH 3,0	pH 4,0
Area	1968	1970	1961

Χρόνος κατακράτησης (min)	3,9	3,4	4,3
Θεωρητικές πλάκες (N)	6581	6311	6859
Παράγοντας συμμετρίας	1,3	1,3	1,3

Επίδραση αλλαγής χρωματογραφικής στήλης

Παράμετρος	Gemini C18, 150 × 4,6 mm, 5 μm	Gemini C18, 150 × 4,6 mm, 3 μm
Area	1968	1924
Χρόνος κατακράτησης (min)	3,9	4,8
Θεωρητικές πλάκες (N)	6581	12808
Παράγοντας συμμετρίας	1,3	1,4

Αξιολόγηση σταθερότητας διαλυμάτων

Παράμετρος	Αποτέλεσμα	Κριτήριο αποδοχής
Μέγιστος CV προτύπου διαλύματος (%)	1,9	≤ 2,0
Μέγιστος CV διαλύματος δείγματος (%)	1,4	≤ 2,0

Σύνοψη μελέτης ανθεκτικότητας

Παράμετρος	Επίδραση	Καταλληλότητα	Αποδεκτό εύρος μεταβολής
Ρυθμός ροής	Χαμηλή	Ικανοποιητική	±20%
Μήκος κύματος (±2 nm)	Χαμηλή	Καλή	±2 nm
Θερμοκρασία	Χαμηλή	Καλή	έως 30°C
pH ρυθμιστικού διαλύματος	Χαμηλή	Καλή	±0,5 μονάδες pH

Χρωματογραφική στήλη	Χαμηλή	Καλή	Ισοδύναμη στήλη Gemini C18
Σταθερότητα διαλυμάτων	Χαμηλή	Καλή	Σταθερότητα έως 48 ώρες σε ψύξη

Συνεπώς, η μέθοδος μπορεί να χαρακτηριστεί ως ανθεκτική (robust) και κατάλληλη για εφαρμογή σε συνθήκες εργαστηριακής ρουτίνας.

5.18 Συνολική Αξιολόγηση της Επαλήθευσης της Αναλυτικής Μεθόδου

Η επαλήθευση της αναλυτικής μεθόδου HPLC για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης σε δισκία παρατεταμένης αποδέσμευσης 10 mg πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις απαιτήσεις της κατευθυντήριας οδηγίας PA/PH/OMCL (13) 82 R5 για φαρμακευτικά προϊόντα δεύτερου κατόχου άδειας κυκλοφορίας (2nd MAH Medicinal Products).

Στο πλαίσιο της μελέτης αξιολογήθηκαν οι παράμετροι ειδικότητας (specificity), γραμμικότητας (linearity), ακρίβειας (accuracy) και επαναληψιμότητας (repeatability), οι οποίες θεωρούνται κρίσιμες για την τεκμηρίωση της καταλληλότητας μίας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού δραστικής ουσίας.

Η αξιολόγηση της ειδικότητας έδειξε ότι ούτε ο διαλύτης αραίωσης ούτε τα έκδοχα του φαρμακευτικού προϊόντος παρουσίασαν παρεμβολές στον χρόνο κατακράτησης της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης. Επιπλέον, ο δείκτης καθαρότητας κορυφής ήταν ίσος με 1,000000, τιμή η οποία επιβεβαιώνει την απουσία συν-εκλούμενων ουσιών και τεκμηριώνει την επιλεκτικότητα της μεθόδου.

Η γραμμικότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε στο εύρος 20%–150% της ονομαστικής συγκέντρωσης εργασίας. Η γραμμική παλινδρόμηση των αποτελεσμάτων απέδωσε συντελεστή προσδιορισμού (R^2) ίσο με 0,99979, υποδεικνύοντας εξαιρετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ συγκέντρωσης και χρωματογραφικής απόκρισης. Παράλληλα, η αξιολόγηση των υπολοίπων της παλινδρόμησης επιβεβαίωσε την ορθότητα του γραμμικού μοντέλου εντός του εξεταζόμενου εύρους συγκεντρώσεων.

Η ακρίβεια της μεθόδου διερευνήθηκε μέσω μελετών ανάκτησης στα επίπεδα 50%, 100% και 150% της ονομαστικής συγκέντρωσης. Οι μέσες τιμές ανάκτησης ήταν 100,9%, 101,1% και 100,8% αντίστοιχα, ενώ όλες οι επιμέρους τιμές βρέθηκαν εντός των προκαθορισμένων ορίων αποδοχής (97,5%–102,5%). Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι η μέθοδος προσδιορίζει με ακρίβεια την πραγματική ποσότητα της δραστικής ουσίας στο εξεταζόμενο εύρος συγκεντρώσεων.

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε μέσω των τριπλών εγχύσεων των διαλυμάτων ακρίβειας. Οι τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης (%RSD) ήταν σημαντικά χαμηλότερες από το όριο αποδοχής του 2,0%, με μέγιστη παρατηρούμενη τιμή 0,09%. Η χαμηλή διακύμανση των αποτελεσμάτων επιβεβαιώνει την υψηλή πιστότητα και τη σταθερότητα της αναλυτικής διαδικασίας.

Τα αποτελέσματα όλων των παραμέτρων επαλήθευσης συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Παράμετρος	Κριτήριο αποδοχής	Αποτέλεσμα	Συμμόρφωση
Ειδικότητα	Απουσία παρεμβολών του Alfuzosin HCl	Καμία παρεμβολή	Συμμορφώνεται
Peak Purity Index	$\geq 0,99$	1,000000	Συμμορφώνεται
Γραμμικότητα	$r \geq 0,99$	$r = 0,99989$ ($R^2 = 0,99979$)	Συμμορφώνεται
Accuracy (50%)	97,5–102,5%	100,9%	Συμμορφώνεται
Accuracy (100%)	97,5–102,5%	101,1%	Συμμορφώνεται
Accuracy (150%)	97,5–102,5%	100,8%	Συμμορφώνεται
Repeatability	%RSD $\leq 2,0$	0,03–0,09%	Συμμορφώνεται
SST Precision	%RSD $\leq 2,0$	0,05–0,15%	Συμμορφώνεται

Symmetry Factor	$\leq 1,8$	1,192–1,291	Συμμορφώνεται
-----------------	------------	-------------	---------------

Συνολικά, όλα τα εξεταζόμενα χαρακτηριστικά απόδοσης της μεθόδου πληρούν τα προκαθορισμένα κριτήρια αποδοχής. Η μέθοδος αποδείχθηκε ειδική, γραμμική, ακριβής και επαναλήψιμη για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης σε δισκία παρατεταμένης αποδέσμευσης 10 mg.

Επιπλέον, η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας έδειξε ότι μικρές μεταβολές στις χρωματογραφικές συνθήκες, όπως ο ρυθμός ροής, το μήκος κύματος ανίχνευσης, η θερμοκρασία, το pH της κινητής φάσης και ο τύπος της χρωματογραφικής στήλης, δεν επηρέασαν ουσιαστικά την απόδοση της μεθόδου. Παράλληλα, η σταθερότητα των διαλυμάτων κρίθηκε ικανοποιητική για χρονικό διάστημα έως και 48 ωρών υπό συνθήκες ψύξης.

Συνολικά, τα αποτελέσματα τεκμηριώνουν ότι η εξεταζόμενη αναλυτική μέθοδος πληροί τα κριτήρια επαλήθευσης σύμφωνα με τις ισχύουσες κατευθυντήριες οδηγίες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί με αξιοπιστία για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υδροχλωρικής αλφουζοσίνης σε δισκία παρατεταμένης αποδέσμευσης στο πλαίσιο του ποιοτικού ελέγχου φαρμακευτικών προϊόντων. Κατά συνέπεια, η αναλυτική μέθοδος θεωρείται κατάλληλη για τη χρήση για την οποία προορίζεται και συμμορφώνεται με τις απαιτήσεις της κατευθυντήριας οδηγίας PA/PH/OMCL (13) 82 R5 για τις παραμέτρους που αξιολογήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης επαλήθευσης.

Βιβλιογραφία

- Ελληνική Φαρμακοποιία (2014) *Ελληνική Φαρμακοποιία V*. Αθήνα: Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων.
- Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων (ΕΟΦ) (2022) *Οδηγίες για την επικύρωση αναλυτικών μεθόδων*. Αθήνα: ΕΟΦ.
- Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων (ΕΟΦ) (2023) *Κατευθυντήριες οδηγίες ορθής παρασκευαστικής πρακτικής (GMP)*. Αθήνα: ΕΟΦ.

- Ευρωπαϊκή Επιτροπή (2022) *Κανόνες που διέπουν τα φαρμακευτικά προϊόντα στην Ευρωπαϊκή Ένωση, Τόμος 4: Οδηγίες ορθής παρασκευαστικής πρακτικής για φαρμακευτικά προϊόντα ανθρώπινης και κτηνιατρικής χρήσης*. Βρυξέλλες: Ευρωπαϊκή Επιτροπή.
- Υπουργείο Υγείας (2013) *Κανόνες ορθής παρασκευαστικής πρακτικής φαρμακευτικών προϊόντων*. Αθήνα: Υπουργείο Υγείας.
- Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων (ΕΟΦ) (2024) *Κατάλογος φαρμακευτικών προϊόντων ανθρώπινης χρήσης*. Αθήνα: ΕΟΦ.

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Ahuja, S. and Dong, M.W. (2005) *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Bakshi, M. and Singh, S. (2002) ‘Development of validated stability-indicating assay methods—critical review’, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28(6), pp. 1011–1040.
- Blessy, M., Patel, R.D., Prajapati, P.N. and Agrawal, Y.K. (2014) ‘Development of forced degradation and stability-indicating studies of drugs’, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 4(3), pp. 159–165.
- British Pharmacopoeia Commission (2024) *British Pharmacopoeia 2024*. London: The Stationery Office.
- Christian, G.D., Dasgupta, P.K. and Schug, K.A. (2014) *Analytical Chemistry*. 7th edn. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Debrus, B., Lebrun, P., Ceccato, A., Caliaro, G., Rozet, E., Nistor, I. and Hubert, P. (2011) ‘Application of analytical quality by design principles to pharmaceutical analysis’, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54(5), pp. 978–985.
- Dejaegher, B. and Vander Heyden, Y. (2011) ‘Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation and analytical applications’, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56(2), pp. 141–158.
- Dong, M.W. (2019) *Modern HPLC for Practicing Scientists*. 2nd edn. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.

- Ermer, J. and Miller, J.H.M. (2005) *Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice*. Weinheim: Wiley-VCH.
- EURACHEM (2022) *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. 2nd edn. Eurachem.
- European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM) (2023) *European Pharmacopoeia*. 11th edn. Strasbourg: Council of Europe.
- European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM) (2023) *European Pharmacopoeia 11th Edition, Chapter 2.2.46: Chromatographic Separation Techniques*. Strasbourg: Council of Europe.
- European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM) (2024) *PA/PH/OMCL (13) 82 R5: Validation/Verification of Analytical Procedures*. Strasbourg: Council of Europe.
- European Medicines Agency (EMA) (2022) *Guideline on Quality Documentation for Medicinal Products*. Amsterdam: European Medicines Agency.
- Fayed, A.S., Shehata, M.A., Hassan, N.Y. and El-Weshahy, S.A. (2006) ‘Validated HPLC and HPTLC stability-indicating methods for determination of alfuzosin hydrochloride in bulk powder and pharmaceutical formulations’, *Journal of Separation Science*, 29(18), pp. 2716–2724.
- Feinberg, M. (2007) *Validation of Analytical Methods Based on Accuracy Profiles*. Paris: Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques.
- Ferreira, S.L.C., Bruns, R.E., Ferreira, H.S., Matos, G.D., David, J.M. and Brandão, G.C. (2007) ‘Box-Behnken design: An alternative for analytical optimization’, *Analytica Chimica Acta*, 597(2), pp. 179–186.
- Food and Drug Administration (FDA) (2015) *Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics: Guidance for Industry*. Silver Spring, MD: U.S. Food and Drug Administration.
- Ganesh, M., Uppatyay, S., Tivari, R., Kalliappan, R., Govindasamy, R., Gangully, S. and Thangavel, S. (2009) ‘Quantitation of alfuzosin hydrochloride in pharmaceutical formulations by RP-HPLC’, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(3), pp. 263–266.

- Green, J.M. (1996) ‘A practical guide to analytical method validation’, *Analytical Chemistry*, 68(9), pp. 305A–309A.
- Harris, D.C. (2020) *Quantitative Chemical Analysis*. 10th edn. New York: W.H. Freeman.
- Hubert, P., Nguyen-Huu, J.J., Boulanger, B. and Chapuzet, E. (2004) ‘Harmonization of strategies for analytical validation’, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36(3), pp. 579–586.
- International Council for Harmonisation (ICH) (2003) *ICH Q1A(R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products*. Geneva: ICH.
- International Council for Harmonisation (ICH) (2006a) *ICH Q3A(R2): Impurities in New Drug Substances*. Geneva: ICH.
- International Council for Harmonisation (ICH) (2006b) *ICH Q3B(R2): Impurities in New Drug Products*. Geneva: ICH.
- International Council for Harmonisation (ICH) (2023a) *ICH Q2(R2): Validation of Analytical Procedures*. Geneva: ICH.
- International Council for Harmonisation (ICH) (2023b) *ICH Q14: Analytical Procedure Development*. Geneva: ICH.
- International Council for Harmonisation (ICH) (2023c) *ICH Q9(R1): Quality Risk Management*. Geneva: ICH.
- Joint Formulary Committee (2024) *British National Formulary (BNF 88)*. London: BMJ Group and Pharmaceutical Press.
- Kazakevich, Y. and Lobrutto, R. (2007) *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Meyer, V.R. (2010) *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. 5th edn. Chichester: John Wiley & Sons.
- Miller, J.N. and Miller, J.C. (2018) *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 7th edn. Harlow: Pearson Education.
- Monks, K., Molnár, I., Rieger, H.J., Bogáti, B. and Szabó, E. (2012) ‘Quality by design approach to chromatographic method development’, *Journal of Chromatography A*, 1232, pp. 218–230.

- Patel, D.B. and Patel, N.J. (2009) ‘Development and validation of reverse phase high performance liquid chromatography and high performance thin layer chromatography methods for estimation of alfuzosin hydrochloride in bulk and in pharmaceutical formulations’, *International Journal of ChemTech Research*, 1(4), pp. 985–990.
- Poole, C.F. (2012) *Liquid-Phase Separations*. Amsterdam: Elsevier.
- PubChem (2024) *Alfuzosin Hydrochloride*. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information.
- Raju, S.A., Karadi, A.B. and Manjunath, S. (2008) ‘Reverse phase HPLC method for the analysis of alfuzosin hydrochloride in pharmaceutical dosage forms’, *International Journal of Chemical Sciences*, 6(1), pp. 399–404.
- Rathore, A.S. and Winkle, H. (2009) ‘Quality by Design for biopharmaceuticals’, *Nature Biotechnology*, 27(1), pp. 26–34.
- Reid, G.L., Morgado, J., Barnett, K., Harrington, B., Wang, J. and Fortin, D. (2013) ‘Analytical Quality by Design (AQbD) in pharmaceutical development’, *American Pharmaceutical Review*, 16(3), pp. 71–79.
- Rozet, E., Ceccato, A., Hubert, C. and Hubert, P. (2007) ‘Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation’, *Journal of Chromatography A*, 1158(1–2), pp. 111–125.
- Shabir, G.A. (2003) ‘Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopoeia and the International Conference on Harmonization’, *Journal of Chromatography A*, 987(1–2), pp. 57–66.
- Shayanfar, A. and Ershadi, S. (2019) ‘Recent advances in analytical determination of alfuzosin’, *Current Pharmaceutical Analysis*, 15(5), pp. 467–475.
- Singh, S., Bakshi, M. and Ahuja, S. (2003) ‘Stability-indicating assay methods’, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33(5), pp. 1011–1040.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. and Crouch, S.R. (2018) *Principles of Instrumental Analysis*. 7th edn. Boston, MA: Cengage Learning.

- Snyder, L.R., Dolan, J.W. and Carr, P.W. (2004) ‘The hydrophobic-subtraction model of reversed-phase column selectivity’, *Journal of Chromatography A*, 1060(1–2), pp. 77–116.
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J. and Dolan, J.W. (2010) *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 3rd edn. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Sweetman, S.C. (ed.) (2020) *Martindale: The Complete Drug Reference*. 40th edn. London: Pharmaceutical Press.
- Swartz, M.E. and Krull, I.S. (2018) *Analytical Method Development and Validation*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Taverniers, I., De Loose, M. and Van Bockstaele, E. (2004) ‘Trends in quality in the analytical laboratory’, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(8), pp. 535–552.
- United States Pharmacopoeia (USP) (2024a) *General Chapter <621>: Chromatography*. Rockville, MD: United States Pharmacopoeial Convention.
- United States Pharmacopoeia (USP) (2024b) *General Chapter <1220>: Analytical Procedure Lifecycle*. Rockville, MD: United States Pharmacopoeial Convention.
- United States Pharmacopoeia (USP) (2024c) *General Chapter <1225>: Validation of Compendial Procedures*. Rockville, MD: United States Pharmacopoeial Convention.
- Vander Heyden, Y., Nijhuis, A., Smeyers-Verbeke, J., Vandeginste, B.G.M. and Massart, D.L. (2001) ‘Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation’, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24(5–6), pp. 723–753.
- World Health Organization (WHO) (2022) *Guidelines on Validation of Analytical Procedures*. Geneva: World Health Organization.