



Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας

Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση

Διπλωματική Εργασία

Αναλυτική Μελέτη του Ποιοτικού Ελέγχου στη Φαρμακευτική
Βιομηχανία: Ταυτοποίηση και Ποσοτικός Προσδιορισμός των
Προσμίξεων στα Φαρμακευτικά Προϊόντα

Κεχαγιά Ειρήνη

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Όρκουλα Μαλβίνα

Πάτρα, 2024

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.

Αναλυτική Μελέτη του Ποιοτικού Ελέγχου στη Φαρμακευτική
Βιομηχανία: Ταυτοποίηση και Ποσοτικός Προσδιορισμός των
Προσμίξεων στα Φαρμακευτικά Προϊόντα

Κεχαγιά Ειρήνη

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής/Επιβλέπουσα
Καθηγήτρια:

Όρκουλα Μαλβίνα

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Φαρμακευτικής Ανάλυσης,
Τμήμα Φαρμακευτικής,
Πανεπιστήμιο Πατρών

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής/Συν-
Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Κοντογιάννης Χρήστος

Καθηγητής Φαρμακευτικής Ανάλυσης,
Τμήμα Φαρμακευτικής,
Πανεπιστήμιο Πατρών

Πάτρα, Ιανουάριος, 2025

Με απέραντη ευγνωμοσύνη αφιερώνω αυτή τη διπλωματική εργασία στην οικογένεια μου, που με στήριζε με αγάπη, υπομονή και πίστη σε κάθε μου βήμα. Χωρίς την υποστήριξη τους, αυτό το ταξίδι δεν θα ήταν το ίδιο.

Επίσης, στις αγαπημένες μου φίλες, που στάθηκαν δίπλα μου με ενθάρρυνση, χαμόγελα και ατέλειωτες συζητήσεις που έκαναν τις δυσκολίες να μοιάζουν πιο εύκολες.

Σας ευχαριστώ από καρδιάς για την αγάπη και τη στήριξη σας.

Περίληψη

Ο έλεγχος της ποιότητας των φαρμακευτικών προϊόντων αποτελεί ένα αναπόσπαστο κομμάτι της σύγχρονης φαρμακοβιομηχανίας, με καθοριστικό ρόλο να διαδραματίζουν οι διάφορες ρυθμιστικές αρχές, όπως το Διεθνές Συμβούλιο για την Εναρμόνιση των Τεχνικών Απαιτήσεων για Φάρμακα για Ανθρώπινη Χρήση (ICH), ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών (FDA) και ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (EMA), οι οποίες δίνουν έμφαση στις απαιτήσεις καθαρότητας και στον προσδιορισμό των προσμίξεων στα ενεργά φαρμακευτικά συστατικά (API) και στα φαρμακευτικά προϊόντα. Μεταξύ των διάφορων πηγών προέλευσης των προσμίξεων σε φαρμακευτικά προϊόντα είναι τα αντιδραστήρια, τα βαρέα μέταλλα, καθώς και άλλα υλικά ή και προϊόντα αποικοδόμησης που προκύπτουν κατά τη διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας. Οι διάφορες φαρμακοποιίες όπως η Βρετανική Φαρμακοποιία, η Φαρμακοποιία των Ηνωμένων Πολιτειών, η Φαρμακοποιία της Ινδίας και η Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία ενσωματώνουν σιγά σιγά όρια στα επιτρεπόμενα επίπεδα προσμίξεων που υπάρχουν στα APIs και στα φαρμακευτικά σκευάσματα.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η βιβλιογραφική ανασκόπηση των διαφόρων μεθόδων που χρησιμοποιούνται στην σύγχρονη φαρμακοβιομηχανία για την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό των προσμίξεων σε φαρμακευτικά προϊόντα. Τέτοιες μέθοδοι είναι η υγρή χρωματογραφία, η αέρια χρωματογραφία, η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση, η υπερκρίσιμη ρευστή χρωματογραφία, η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Επιπλέον, γίνεται μελέτη του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και της φασματομετρίας μάζας, που δύναται να χρησιμοποιηθούν για την μελέτη προσμίξεων με άγνωστη δομή.

Λέξεις – Κλειδιά

Φάρμακο, Ενεργό φαρμακευτικό συστατικό, Προσμίξεις, Υγρή Χρωματογραφία, Αέρια Χρωματογραφία

Analytical Study of Pharmaceutical Quality Control: Identification and Quantification of Impurities in Pharmaceuticals

Eirini Kechagia

Abstract

The quality control of pharmaceutical products is an integral part of the modern pharmaceutical industry, with various regulatory authorities, such as the International Council for Harmonization of Technical Requirements for Drugs for Human Use (ICH), the United States Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA) playing a key role, emphasizing purity requirements and the identification of impurities in active pharmaceutical ingredients (APIs) and pharmaceutical products. Among the various sources of impurities in pharmaceutical products are reagents, heavy metals, as well as other materials and/or degradation products that arise during the production process. Various pharmacopoeias such as the British Pharmacopoeia, the United States Pharmacopoeia, the Indian Pharmacopoeia and the European Pharmacopoeia are gradually incorporating limits on the permissible levels of impurities present in APIs and pharmaceutical formulations.

The purpose of this thesis is to review the literature on the various methods used in the modern pharmaceutical industry for the isolation and characterization of impurities in pharmaceutical products, such as liquid chromatography, gas chromatography, capillary electrophoresis, supercritical fluid chromatography, thin layer chromatography, methods used for the separation of impurities as well as the study of methods such as nuclear magnetic resonance and mass spectrometry, which can be used to identify impurities with unknown structure.

Keywords

Drug, Active Pharmaceutical Ingredient, Impurities, Liquid Chromatography, Gas Chromatography

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	v
Abstract.....	vii
Περιεχόμενα	viii
Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων	x
Κατάλογος Πινάκων	xii
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια	xiii
1. Εισαγωγή στον Έλεγχο Ποιότητας Φαρμάκων	1
1.1 Ιστορική Αναδρομή.....	2
1.2 Διασφάλιση ποιότητας	5
1.3 Ορθή Παρασκευαστική Πρακτική (Good Manufacturing Practices, GMP)	7
1.4 Ποιοτικός έλεγχος	8
1.5 Κατευθυντήριες οδηγίες για την ποιότητα των φαρμάκων	9
2. Ανάπτυξη και Επικύρωση Αναλυτικών Μεθόδων	12
2.1 Εξειδίκευση (Specificity)	12
2.2 Ακρίβεια (Accuracy)	12
2.3 Πιστότητα (Precision)	12
2.3 Γραμμικότητα (Linearity)	13
2.4 Εύρος (Range)	14
2.5 Ανθεκτικότητα (Robustness)	14
2.6 Όριο ανίχνευσης (Detection limit, DL) και Όριο ποσοτικοποίησης (Quantitation limit, QL).....	14
2.7 Απαιτήσεις καταλληλότητας συστήματος (System Suitability).....	15
3. Προσμίξεις σε φαρμακευτικά προϊόντα	17
3.1 Ορισμός προσμίξεων	17
3.2 Ταξινόμηση προσμίξεων.....	18
3.2.1 Οργανικές προσμίξεις	18
3.2.2 Ανόργανες προσμίξεις	19
3.2.3 Υπολείμματα διαλυτών	19
3.3 Γενοτοξικές προσμίξεις.....	20
3.4 Προέλευση προσμίξεων	21
3.4.1 Προσμίξεις που σχετίζονται με τη στερεοχημεία	21
3.4.2 Προσμίξεις που σχετίζονται με την παραγωγική διαδικασία.....	23
3.5 Κατευθυντήριες οδηγίες του προφίλ προσμίξεων	26
4. Διαχωρισμός και προσδιορισμός προσμίξεων και προϊόντων αποικοδόμησης με γνωστή δομή	33
4.1 Μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).....	33
4.1.1 Μέθοδοι με φασματοφωτομετρική ανίχνευση UV	33
4.1.2 Μέθοδοι με ανιχνευτές που βασίζονται σε αερολύματα	38
4.1.3 Μέθοδοι με άλλους ανιχνευτές.....	41

4.2 Αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC)	41
4.3 Υπερκρίσιμη Ρευστή Χρωματογραφία (Superficial Fluid Chromatography, SFC)..	42
4.4 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin-Layer Chromatography, TLC)	44
4.5 Τριχοειδής μέθοδοι.....	44
4.5.1 Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση (Capillary Electrophoresis, CE)	44
4.5.2 Χρωματογραφικές τεχνικές που σχετίζονται με την ηλεκτροφόρηση	45
4.5.2.1 Ηλεκτροκινητική χρωματογραφία μικυλλίων (MEKC).....	45
4.6 Μέθοδοι που δεν απαιτούν διαχωρισμό	47
4.6.1 Φασματοσκοπικές μέθοδοι	47
4.6.2 Ηλεκτροανλυτικές μέθοδοι	47
5. Εφαρμογή χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών μεθόδων για τη διαλεύκανση της δομής των προσμίξεων	48
5.1 HPLC-MS	49
5.2 HPLC-NMR.....	51
5.3 GC-MS	54
6. Συζήτηση.....	55
Βιβλιογραφία.....	59

Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων

Εικόνα 1: Χρονολογική σειρά των γεγονότων που οδήγησαν στην Ορθή Παρασκευαστική Πρακτική (GMP) (Patel & Chotai, 2008).	5
Εικόνα 2: Σύνθεση της παρακεταμόλης μέσω ακετυλίωσης της 4-αμινοφαινόλης (Nagpal et al., 2011).....	24
Εικόνα 3: Σχηματισμός υποκατάστατου αιθυλίου μέσω της αντίδρασης του προπιονικού ανυδρίτη (II) με την πρώτη ύλη (I) (Ramachandra, 2016).....	25
Εικόνα 4: Σύγκριση για την ταξινόμηση υπολειμμάτων μετάλλων και στοιχειακών προσμίξεων σε φαρμακευτικά προϊόντα σύμφωνα με τις απαιτήσεις των EMA και ICH Q3D (Liu & Chen, 2019).....	30
Εικόνα 5: Σύγκριση του διαχωρισμού της λοραταδίνης και των επτά σχετικών προσμίξεων της PhEur σε στήλες Kinetex C ₁₈ 50 mm × 2,1 mm, 1,7 μm, 100 mm × 3 mm, 2,6 μm και 150 mm × 4,6 mm, 5 μm. Ο ρυθμός ροής ρυθμίστηκε σε 0,5 ml/min, 1 ml/min και 2,4 ml/min στις στήλες 50 mm × 2,1 mm, 100 mm × 3 mm και 150 mm × 4,6 mm, αντίστοιχα. Η βαθμιδωτή έκλυση πραγματοποιήθηκε σε 5, 10 και 15 λεπτά. Κινητή φάση Α: ρυθμιστικό διάλυμα διόξινου φωσφορικού νατρίου 30 mM, κινητή φάση Β: ακετονιτρίλιο (Kormány et al., 2014).....	37
Εικόνα 6: Διαχωρισμός των προσμίξεων και των προϊόντων αποικοδόμησης της ηρωίνης με UHPLC και στήλη Acquity BEH C ₁₈ 1,7 μm x 150 mm x 2,1 mm (a) θειαμίνη (0,040 mg/mL), (b) μορφίνη (0,002 mg/mL), (c) προκαΐνη (0,040 mg/mL), (d) ακεταμινοφαίνη (0,040 mg/mL), (e) κωδεΐνη (0,002 mg/mL), (f) καφεΐνη (0,040 mg/mL), (g) κινίνη (0,040 mg/mL), (gi) προσμίξεις κινίνης, (h) Ο3-μονοακετυλομορφίνη (0,020 mg/mL), (i) Ο6-μονοακετυλομορφίνη (0,009 mg/mL), (j) λιδοκαΐνη (0,040 mg/mL), (k) ακετυλκωδεΐνη (0,010 mg/mL), (l) ηρωίνη (0,020 mg/mL), (m) κοκαΐνη (0,020 mg/mL), (n) παπαβερίνη (0,002 mg/mL), (o) νοσκαπίνη (0,002 mg/mL), (p) διφαινυδραμίνη (0,020 mg/mL), (q) διλτιαζέμη (0,020 mg/mL) (Lurie et al., 2013).....	38
Εικόνα 7: Βαθμιδωτή έκλυση με στήλη Kinetix Biphenyl (4,6 × 250 mm, 5 μm), ρυθμό ροής 1,0 mL/min στους 25 °C και χρόνο εκτέλεσης 25 λεπτά της γκαμπαπεντίνης και των σχετικών προσμίξεων με ανιχνευτή CAD (Ragham & Chandrasekhar, 2016).	40
Εικόνα 8: Χρωματογράφημα SCF προτύπου διαλύματος επικύρωσης: πρόσμιξη D (2,6 λεπτά), πρόσμιξη G (3,2 λεπτά), άγνωστη πρόσμιξη (3,5 λεπτά), πρόσμιξη I (3,7 λεπτά),	

πρόσμιξη B (4,1 λεπτά), άγνωστη πρόσμιξη (4,4 λεπτά), θεική σαλβουταμόλη (4,8 λεπτά), πρόσμιξη F (6,2 λεπτά) (Dispas et al., 2017).....	43
Εικόνα 9: Ηλεκτροφερογράμματα που λαμβάνονται από την ανάλυση φαρμακευτικών σκευασμάτων. (Α) δισκίο VCV, (Β) δισκίο ACV, (C) Κρέμα ACV, (D) κρέμα ακυκλοβίρης, Κορυφές: 1, VCV; 2, Τυραμίνη; 3, Γουανίνη; 4, ACV (Al Azzam et al., 2010).	46
Εικόνα 10: Ανάλυση θεικής μπλεομυκίνης (0,5 mg/mL) με HPLC-UV (Α) και UPLC- UV/MS (Β), ταυτοποίηση των κύριων ενώσεων και σύγκριση των μεθόδων. Δίνονται τα φάσματα MS των κύριων ενώσεων μπλεομυκίνης A2 και B2, καθώς και οι προσμίξεις της μπλεομυκίνης A5 και της απομεθυλμπλεομυκίνης A2. (D'Hondt et al., 2016).....	51
Εικόνα 11: Μηχανισμός σχηματισμού των προσμίξεων της ιρβεσαρτάνης (Shah et al., 2010).....	53

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Όρια ανά ενεργό φαρμακευτικό συστατικό (ICH Q3A(R), 2003).....	26
Πίνακας 2: Όρια για προϊόντα αποικοδόμησης σε νέα φαρμακευτικά προϊόντα (ICH Q3B(R), 2003).	28
Πίνακας 3: Όρια ανόργανων προσμίξεων σε από του στόματος και ενέσιμα φαρμακευτικά σκευάσματα (Prajapati & Agrawal, 2014).	31
Πίνακας 4: Διαλύτες κατηγορίας 1 σε φαρμακευτικά προϊόντα (ICH Q3C(R6), 2016). ...	31
Πίνακας 5: Διαλύτες κατηγορίας 2 σε φαρμακευτικά προϊόντα (ICH Q3C(R6), 2016). ...	31
Πίνακας 6: Επιτρεπόμενο όριο ημερήσιας πρόσληψης γενοτοξικών προσμίξεων κατά την διάρκεια κλινικών δοκιμών (Prajapati & Agrawal, 2014).	32

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

Ακολουθούν κάποια παραδείγματα:

API Ενεργό Φαρμακευτικό Συστατικό

BP Βρετανική Φαρμακοποιία

EMA Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων

FDA Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων

GC Αέρια Χρωματογραφία

GMP Όρθη Παρασκευαστική Πρακτική

GTI Γενοτοξικές προσμίξεις

HPLC Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

IP Φαρμακοποιία της Ινδίας

MS Φασματομετρία Μάζας

NMR Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

USP Φαρμακοποιία των Ηνωμένων Πολιτειών

WHO Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

1. Εισαγωγή στον Έλεγχο Ποιότητας Φαρμάκων

Ως έννοια το φάρμακο εντοπίζεται ήδη από τους αρχαίους πολιτισμούς, καθώς οι ασθένειες και η ανάγκη για βελτίωση της υγείας αποτελούν από την έναρξη της ανθρώπινης ζωής κύριο ζήτημα μελέτης. Με το πέρασμα των χρόνων, έγινε αντιληπτό πως είναι απαραίτητο να διασφαλίζεται η ποιότητα των φαρμάκων καθώς συνέβησαν κάποια τραγικά γεγονότα που είχαν επιβλαβείς συνέπειες στην ανθρώπινη υγεία. Ως απόρροια αυτού, αναπτύχθηκαν διεθνείς απαιτήσεις και κανονισμοί για τα φάρμακα, με σκοπό την πρόληψη μελλοντικών δυσμενών περιστατικών.

Σήμερα, τα φάρμακα έχουν ποικίλες χρήσεις και δεν αποτελούν κοινά καταναλωτικά αγαθά. Ως φάρμακο, κατά την ευρεία έννοια, νοείται κάθε χημική ουσία η οποία, όταν εισάγεται στον οργανισμό, αλλάζει την λειτουργία του. Πιο συγκεκριμένα, φάρμακο είναι κάθε χημική ουσία η οποία χρησιμοποιείται για αγωγή, θεραπεία, πρόληψη ή διάγνωση μιας ασθένειας, ή χρησιμοποιείται για την βελτίωση της φυσικής και ψυχικής κατάστασης. Σύμφωνα με την Οδηγία 2001/83/EK του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 6ης Νοεμβρίου 2001 περί κοινοτικού κώδικος για τα φάρμακα που προορίζονται για ανθρώπινη χρήση, ως φάρμακο ορίζεται:

- α. κάθε ουσία ή συνδυασμός ουσιών που χαρακτηρίζεται ως έχουσα θεραπευτικές ή προληπτικές ιδιότητες έναντι ανθρώπινων ασθενειών, ή
- β. κάθε ουσία ή συνδυασμός ουσιών δυνάμενη να χρησιμοποιηθεί ή να χορηγηθεί σε άνθρωπο, με σκοπό είτε να αποκατασταθούν, να διορθωθούν ή να τροποποιηθούν φυσιολογικές λειτουργίες με την άσκηση φαρμακολογικής, ανοσολογικής ή μεταβολικής δράσης, είτε να γίνει ιατρική διάγνωση (Οδηγία 2001/83/EK, 2001).

Η παρούσα οδηγία εφαρμόζεται μόνο στα φάρμακα για ανθρώπινη χρήση που προορίζονται να κυκλοφορήσουν στην αγορά των κρατών μελών και παρασκευάζονται βιομηχανικώς ή για την παρασκευή των οποίων χρησιμοποιείται κάποια βιομηχανική μέθοδος. Σε περιπτώσεις αμφιβολίας, όταν βάσει όλων των χαρακτηριστικών του ένα προϊόν μπορεί να ανταποκρίνεται στον ορισμό του «φαρμάκου» και στον ορισμό προϊόντος καλυπτόμενου από άλλο κοινοτικό νομοθετικό κείμενο, εφαρμόζεται η Οδηγία 2001/83/EK.

1.1 Ιστορική Αναδρομή

Η έννοια του ποιοτικού ελέγχου άρχισε να διαμορφώνεται κατά τη διάρκεια της Βιομηχανικής Επανάστασης. Μια από τις πρώτες γνωστές αναφορές στον ποιοτικό έλεγχο χρονολογείται κατά τον 13^ο αιώνα στη μεσαιωνική Ευρώπη, με τον σχηματισμό συντεχνιών για την ρύθμιση της ποιότητας των προϊόντων και την προστασία των εμπορικών μυστικών.

Στο πλαίσιο των φαρμακευτικών προϊόντων, ο ποιοτικός έλεγχος άρχισε να εμφανίζεται πιο έντονα στα τέλη του 19^{ου} και στις αρχές του 20^{ου} αιώνα με την ανάπτυξη της φαρμακευτικής βιομηχανίας και την αυξανόμενη ζήτηση για τυποποιημένα και ασφαλή φάρμακα. Καθώς προχωρούσε η επιστημονική κατανόηση της χημείας και της βιολογίας, υπήρχε μια αυξανόμενη αναγνώριση της ανάγκης για αυστηρά μέτρα ποιοτικού ελέγχου για τη διασφάλιση της αποτελεσματικότητας, της συνέπειας και της ασφάλειας των φαρμακευτικών σκευασμάτων.

Ένα κομβικό γεγονός στην ιστορία του ποιοτικού ελέγχου των φαρμακευτικών προϊόντων ήταν η ψήφιση του νόμου περί καθαρών τροφίμων και φαρμάκων (Pure Food and Drug Act) στις Ηνωμένες Πολιτείες το 1906, η οποία προκλήθηκε από την ανησυχία του κοινού για νοθευμένα και εσφαλμένα τρόφιμα και φάρμακα, σηματοδοτώντας την αρχή της ρυθμιστικής εποπτείας της φαρμακευτικής βιομηχανίας. Ο νόμος αυτός θεωρείται συχνά ο πρώτος από τους πολλούς νόμους των ΗΠΑ όπου θεσπίστηκε για την προστασία της δημόσιας υγείας από αναποτελεσματικά ή επικίνδυνα φάρμακα. Ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration, FDA) δεν υπήρχε σε εκείνο το σημείο και οι διατάξεις του παρόντος νόμου επιβλήθηκαν από το Προεδρείο της Χημείας του Τμήματος Γεωπονίας όπου τελικά μετονομάστηκε σε FDA το 1930. Ο νόμος του 1906 αποσκοπούσε συγκεκριμένα στην απαγόρευση της παρασκευής, πώλησης ή μεταφοράς νοθευμένων, εσφαλμένων, δηλητηριωδών ή επιβλαβών τροφίμων, ποτών και φαρμάκων, και στην τήρηση ορισμένων προτύπων ποιότητας και απαιτήσεων επισήμανσης, θέτοντας τις βάσεις για τη σύγχρονη φαρμακευτική ρύθμιση και πρακτικές ποιοτικού ελέγχου (FDA, 2006; Kille, 2017).

Ορισμένα γεγονότα που αποτέλεσαν σταθμό στην εξέλιξη της ρύθμισης των φαρμάκων παρουσιάζονται στην Εικόνα 1. Το σημαντικότερο γεγονός που οδήγησε στην θέσπιση του Ομοσπονδιακού νόμου συνέβη το 1937, όταν πάνω από 100 άτομα στις Ηνωμένες Πολιτείες

δηλητηριάστηκαν και πέθαναν από διαιθυλενογλυκόλη μετά τη χρήση του ελιξιρίου σουλφανιλαμίδης, στο οποίο χρησιμοποιήθηκε ο διαλύτης χωρίς καμία δοκιμή ασφαλείας. Το ατυχές αυτό συμβάν διευκόλυνε την εισαγωγή του Ομοσπονδιακού Νόμου για τα τρόφιμα, τα φάρμακα και τα καλλυντικά, το 1938, με την απαίτηση γνωστοποίησης των νέων προϊόντων πριν εισαχθούν στο εμπόριο.

Επιπλέον, ένα ακόμα γεγονός που συνέβη το 1941, όπου σχεδόν 300 άνθρωποι πέθαναν μετά τη λήψη δισκίων σουλφαθειαζόλης μολυσμένα με φαινοβαρβιτάλη, με κατασκευαστή την Winthrop Chemical Company, οδήγησε στην θέσπιση της νομοθεσίας που αφορά τον φαρμακευτικό κόσμο. Συγκεκριμένα, η έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τον FDA για την παραγωγή των συγκεκριμένων δισκίων από την Winthrop Chemical Company αποκάλυψε ανεπάρκειες στο εργοστάσιο και σοβαρές παρατυπίες στην προσπάθεια της εταιρείας να ανακαλέσει τα μολυσμένα δισκία. Αυτό το περιστατικό οδήγησε στην αναθεώρηση των απαιτήσεων παραγωγής και ποιοτικού ελέγχου σε όλη τη βιομηχανία, μια προσέγγιση που έγινε η βάση για τα πρότυπα ελέγχου παραγωγής για όλα τα φαρμακευτικά προϊόντα που οδήγησαν σε αυτό που αργότερα θα ονομαζόταν Ορθή Παρασκευαστική Πρακτική (Good manufacturing practice, GMP).

Ειδικότερα, ο όρος Ορθή Παρασκευαστική Πρακτική εμφανίστηκε για πρώτη φορά επίσημα στην τροποποίηση του 1962 του νόμου για τα τρόφιμα, τα φάρμακα και τα καλλυντικά των ΗΠΑ. Το προσχέδιο του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) σχετικά με τα GMP ετοιμάστηκε μετά από αίτημα της εικοστής Παγκόσμιας Συνέλευσης Υγείας το 1967 από μια ομάδα συμβούλων. Στη συνέχεια υποβλήθηκε και έγινε δεκτό από την εικοστή πρώτη Παγκόσμια Συνέλευση Υγείας με τίτλο «Σχέδιο απαιτήσεων για την ορθή παρασκευαστική πρακτική στην παρασκευή και τον ποιοτικό έλεγχο φαρμάκων». Το κείμενο αναπαράχθηκε περαιτέρω με ορισμένες αναθεωρήσεις το 1968 από μια επιτροπή εμπειρογνομόνων του ΠΟΥ και στη συνέχεια το 1971 στη δεύτερη έκδοση της Διεθνούς Φαρμακοποιίας (Aragne et al., 2008).

Η επιβολή της νομοθεσίας για τη διασφάλιση της ποιότητας των φαρμάκων, από μόνη της, δεν είναι επαρκής. Είναι ευθύνη του κατασκευαστή να διασφαλίσει ότι ποιοτικά προϊόντα διατίθενται στην αγορά. Ενώ απαιτείται ο έλεγχος για τη διασφάλιση της ποιότητας των φαρμακευτικών προϊόντων, πρέπει να γίνει αντιληπτό ότι ο απώτερος στόχος του ποιοτικού ελέγχου είναι η επίτευξη της τελειότητας στη διαδικασία παραγωγής. Συγκεκριμένα, ο

ποιοτικός έλεγχος πρέπει να διασφαλίζει στον τελικό καταναλωτή ότι κάθε παρτίδα ενός προϊόντος συμμορφώνεται με τα πρότυπα ποιότητας, πληρεί τον ισχυρισμό της ετικέτας και όλες τις νομικές απαιτήσεις. Ο ποιοτικός έλεγχος από μόνος του, παρόλο που ουσιαστικά περιλαμβάνει όλους τους επιστημονικούς ελέγχους, δεν επαρκεί για την επίτευξη όλων των στόχων, αν και αναμφισβήτητα είναι ζωτικής σημασίας, με την υιοθέτηση των GMP να ελαχιστοποιούν τους κινδύνους που ενέχει οποιαδήποτε διαδικασία παραγωγής φαρμακευτικών προϊόντων (Arayne et al., 2008).

1902	Biologics Control Act
1906	Pure Food and Drug Act
1938	Federal Food, Drug and Cosmetic (FD & C) Act
1941	Two Unrelated Events Insulin Amendment requires FDA to test and certify purity and potency of insulin. Tragedy: nearly 300 deaths and injuries from distribution of sulfathiazole tablets tainted with Phenobarbital. Result: FDA revises manufacturing and quality controls drastically, the beginning of what will later be called GMPs.
1944	Public Health Services Act
1946	Publication by the Pharmaceutical Manufacturers Association of America of a "Guideline for Good Manufacturing Practices for Pharmaceuticals"
1962	The "Thalidomide Tragedy" leads the US Congress to add GMP to the Food, Drugs and Cosmetic Act. The FDA publishes their first Regulation on Good Manufacturing Practices" – A drug which is not made following GMP is adulterated (Contaminated)
1969	The World Health Organization publishes the first universal guideline "Basic Rules for the Manufacture of Pharmaceuticals and the Assurance of their Quality"
1972	The Daily Telegraph published as its main news the recall of 5% Dextrose Infusion Solution after 5 patients die at Devonport Hospital ("The Devonport Hospital Affair")
1974	Allergic reaction due to extremely small traces of penicillin in other drug products lead to demands for separation of penicillin and non-penicillin production.
1974	FDA Starts investigating some US toxicology laboratories and finds evidence of widespread mis-management and even fraud.
1976	FDA publishes their proposals for "Good Laboratory Practices for Non-Clinical Studies"
1975	The EU Directive 75/319 lays down the basic procedures (approximations) for the registration, trade and compensation for damages for "Medicinal Products" with the EU.
1978	CGMPs Final Rules for Drugs (21 CFR Parts 210–211)
1979	Infant Formula Act
1982	Temper-Resistant Packaging Regulations Issued for OTC Products
1983	The Guide to the Inspection of Computerized Systems in Drug Processing initiates tighter controls on computers and computer validation.
1986	Microbial contamination of an API for veterinary use later causes the deaths of several hundred cattle in Germany.
1987	Guideline on General Principles of Process Validation
1989	FDA discovers mis-management and even fraud in the applications by US generic drug manufacturers in trying to get approval for the sale of their products. (One company even tested not its own product, but the competitor's product against the competitor's products in order to get approval for sale from the FDA.) This leads to PRE-APPROVAL INSPECTIONS (PAIs)
1989	The inspectors of the EU agree on a Guideline for GMP and the EU publishes its Directive on the "Approximation of provisions for GMP in the European Community", i.e. a legal basis is established for pharmaceutical GMP within the European Community.
1991	FDA publishes their "Guide to the Inspection of Bulk Pharmaceuticals" which strongly influences the way in which Starting Materials for pharmaceuticals are produced.
1994	The EU and the FDA open negotiations on the mutual recognition of GMP inspections. (Agreement was finally reached and a DRAFT was signed.
1996	PIC accepts the European industry's GMP Guide
1998	"GMPs for Starting Materials" is added to the ICH work programme to be decided by an Expert Working Group.
2001	ICH Q7A API Guidance ICH's "Good Manufacturing Practice Guidance for Active Pharmaceutical Ingredients (APIs)"

Εικόνα 1: Χρονολογική σειρά των γεγονότων που οδήγησαν στην Ορθή Παρασκευαστική Πρακτική (GMP) (Patel & Chotai, 2008).

1.2 Διασφάλιση ποιότητας

Η «διασφάλιση ποιότητας» είναι μια ευρεία έννοια που καλύπτει το σύνολο των ρυθμίσεων που έχουν γίνει με στόχο να διασφαλιστεί ότι τα φαρμακευτικά προϊόντα είναι της ποιότητας που απαιτείται για τη χρήση για την οποία προορίζονται. Επομένως, η διασφάλιση ποιότητας ενσωματώνει GMP και άλλους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων

εκείνων που δεν εμπίπτουν στο πεδίο εφαρμογής των GMPs, όπως ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη προϊόντων.

Το σύστημα διασφάλισης ποιότητας που είναι κατάλληλο για την παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων θα πρέπει να διασφαλίζει ότι:

- a. τα φαρμακευτικά προϊόντα σχεδιάζονται και αναπτύσσονται κατά τρόπο που να λαμβάνονται υπόψη οι απαιτήσεις των GMP και άλλων συναφών οδηγών, όπως αυτές της Ορθής Εργαστηριακής Πρακτικής (GLP) και της Ορθής Κλινικής Πρακτικής (GCP)
- b. οι διαδικασίες παραγωγής και ελέγχου προσδιορίζονται σαφώς σε γραπτή μορφή και υιοθετούνται οι απαιτήσεις των GMP
- c. οι διευθυντικές αρμοδιότητες προσδιορίζονται σαφώς στις περιγραφές θέσεων εργασίας
- d. καθορίζονται οι συνθήκες για την κατασκευή, την προμήθεια και τη χρήση των σωστών πρώτων υλών και των συσκευασιών
- e. διενεργούνται όλοι οι απαραίτητοι έλεγχοι στις πρώτες ύλες, στα ενδιάμεσα προϊόντα και στα τελικά προϊόντα
- f. το τελικό προϊόν έχει υποστεί σωστή επεξεργασία και έλεγχο, σύμφωνα με τις καθορισμένες διαδικασίες
- g. τα φαρμακευτικά προϊόντα δεν πωλούνται ή παρέχονται πριν από τα εξουσιοδοτημένα άτομα, πιστοποιήσουν ότι κάθε παρτίδα παραγωγής έχει παραχθεί και ελεγχθεί σύμφωνα με τις απαιτήσεις της άδειας κυκλοφορίας και οποιωνδήποτε άλλων κανονισμών σχετικών με την παραγωγή, τον έλεγχο και την κυκλοφορία των φαρμακευτικών προϊόντων
- h. υπάρχουν ικανοποιητικές ρυθμίσεις ώστε να διασφαλίζεται, στο μέτρο του δυνατού, ότι τα φαρμακευτικά προϊόντα αποθηκεύονται από τον κατασκευαστή, διανέμονται και στη συνέχεια χειρίζονται έτσι ώστε η ποιότητα να διατηρείται καθ' όλη τη διάρκεια ζωής τους
- i. υπάρχει διαδικασία για αυτοεπιθεώρηση ή/και έλεγχο ποιότητας που αξιολογεί τακτικά την αποτελεσματικότητα και τη δυνατότητα εφαρμογής του συστήματος διασφάλισης ποιότητας ενώ οι αποκλίσεις αναφέρονται, διερευνώνται και καταγράφονται

- j. οι αποκλίσεις της διαδικασίας αναφέρονται, διερευνώνται και καταγράφονται
- k. υπάρχει σύστημα για την έγκριση αλλαγών που ενδέχεται να έχουν αντίκτυπο στην ποιότητα του προϊόντος
- l. θα πρέπει να διενεργούνται τακτικές αξιολογήσεις της ποιότητας των φαρμακευτικών προϊόντων με σκοπό την επαλήθευση της συνέπειας της διαδικασίας και τη διασφάλιση της συνεχούς βελτίωσής της

1.3 Ορθή Παρασκευαστική Πρακτική (Good Manufacturing Practices, GMP)

Η Ορθή Παρασκευαστική Πρακτική (GMP) αναφέρεται σε ένα διεθνές σύνολο κανονισμών που νομοθετήθηκαν για εφαρμογή στις βιομηχανίες φαρμάκων/φαρμακευτικών προϊόντων για τη διασφάλιση της ποιότητας, της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας τους. Κατά συνέπεια, διασφαλίζουν ότι τα προϊόντα παράγονται και ελέγχονται σύμφωνα με τα πρότυπα ποιότητας που είναι κατάλληλα για τη χρήση για την οποία προορίζονται και όπως απαιτείται από την άδεια κυκλοφορίας τους.

Τα GMP στοχεύουν κυρίως στη μείωση των κινδύνων που υπάρχουν σε οποιαδήποτε φαρμακευτική παραγωγή. Τέτοιοι κίνδυνοι είναι ουσιαστικά δύο ειδών: η διασταυρούμενη μόλυνση, λόγω προσμίξεων, και η σύγχυση που προκαλείται, για παράδειγμα, από την τοποθέτηση ψευδών ετικετών.

Σύμφωνα με τα GMP:

- a) όλες οι διαδικασίες παραγωγής καθορίζονται σαφώς, αναθεωρούνται συστηματικά και επικυρώνεται ότι είναι ικανές να παράγουν με συνέπεια φαρμακευτικά προϊόντα της απαιτούμενης ποιότητας που συμμορφώνονται με τις προδιαγραφές τους
- b) διενεργείται πιστοποίηση και επικύρωση των διαδικασιών παραγωγής
- c) παρέχονται όλοι οι απαραίτητοι πόροι, συμπεριλαμβανομένων:
 - i. κατάλληλα καταρτισμένο και εκπαιδευμένο προσωπικό
 - ii. επαρκείς και ασφαλείς εγκαταστάσεις
 - iii. κατάλληλος εξοπλισμός και υπηρεσίες
 - iv. κατάλληλα υλικά, δοχεία και ετικέτες

- v. εγκεκριμένες διαδικασίες και οδηγίες
- vi. κατάλληλη αποθήκευση και μεταφορά
- vii. επαρκές προσωπικό, εργαστήρια και εξοπλισμός για ελέγχους κατά την παραγωγική διαδικασία
- d) οι οδηγίες και οι διαδικασίες καταγράφονται σε σαφή και ξεκάθαρη γλώσσα, που ισχύουν ειδικά για τις παρεχόμενες εγκαταστάσεις
- e) οι χειριστές είναι εκπαιδευμένοι να εκτελούν σωστά τις διαδικασίες
- f) τηρούνται αρχεία κατά την παραγωγική διαδικασία για να αποδειχθεί ότι έχουν όντως γίνει όλα τα βήματα που απαιτούνται από τις καθορισμένες διαδικασίες και οδηγίες και ότι η ποσότητα και η ποιότητα του προϊόντος είναι η αναμενόμενη, ενώ τυχόν σημαντικές αποκλίσεις καταγράφονται και διερευνώνται πλήρως
- g) τηρούνται αρχεία που καλύπτουν την παρασκευή και τη διανομή, τα οποία επιτρέπουν τον εντοπισμό του πλήρους ιστορικού μιας παρτίδας και διατηρούνται σε κατανοητή και προσβάσιμη μορφή
- h) η σωστή αποθήκευση και διανομή των προϊόντων ελαχιστοποιεί κάθε κίνδυνο για την ποιότητά τους
- i) είναι διαθέσιμο ένα σύστημα για την ανάκληση οποιασδήποτε παρτίδας προϊόντος από την πώληση ή την προμήθεια
- j) εξετάζονται τα παράπονα για προϊόντα που διατίθενται στο εμπόριο, διερευνώνται τα αίτια των ποιοτικών ελαττωμάτων και λαμβάνονται κατάλληλα μέτρα σχετικά με τα ελαττωματικά προϊόντα για την αποφυγή επανάληψης τους (WHO, 2007).

1.4 Ποιοτικός έλεγχος

Με την πάροδο του χρόνου, καθώς η φαρμακευτική βιομηχανία συνέχισε να εξελίσσεται και τα ρυθμιστικά πλαίσια έγιναν πιο ισχυρά, ο ποιοτικός έλεγχος στα φαρμακευτικά προϊόντα έγινε όλο και πιο περίπλοκος. Οι φαρμακευτικές εταιρείες υποχρεούνταν να τηρούν αυστηρά πρότυπα ποιοτικού ελέγχου που ορίζονταν από ρυθμιστικές αρχές όπως ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA), ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (European Medicines Agency, EMA), ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization, WHO). Προκειμένου να ακολουθείται μια κοινή πορεία αλλά και να ελαχιστοποιηθούν οι διαφορές στις τεχνικές απαιτήσεις για την παραγωγή φαρμάκων μεταξύ των ρυθμιστικών φορέων, το 1990 ιδρύθηκε το Διεθνές Συμβούλιο για την

Εναρμόνιση των Τεχνικών Απαιτήσεων για Φάρμακα για Ανθρώπινη Χρήση (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH). Το έργο αυτό συγκεντρώνει τις ρυθμιστικές αρχές της Ευρώπης, της Ιαπωνίας και των Ηνωμένων Πολιτειών και έχει στόχο την βελτίωση και τον εξορθολογισμό της διαδικασίας ανάπτυξης φαρμάκων. Παράλληλα παρέχει ένα εκτεταμένο σύνολο κατευθυντήριων γραμμών για την έγκριση και τη χορήγηση άδειας κυκλοφορίας νέων φαρμακευτικών προϊόντων, δίνοντας έτσι εγγυήσεις για την ποιότητα, την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα τους, συμβάλλοντας στην προστασία της δημόσιας υγείας. Αυτά τα πρότυπα καλύπτουν κάθε πτυχή της φαρμακευτικής παραγωγής, από την προμήθεια πρώτων υλών έως τις διαδικασίες παραγωγής του τελικού προϊόντος (Higby, 2006; Kille, 2017).

Στην Ελλάδα, ο Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων (ΕΟΦ) ιδρύθηκε το 1983 και αποτελεί τη ρυθμιστική αρχή που έχει την ευθύνη της έγκρισης και παρακολούθησης των φαρμακευτικών προϊόντων. Αποστολή του ΕΟΦ είναι η προστασία της Δημόσιας Υγείας σε σχέση με την κυκλοφορία φαρμακευτικών προϊόντων ανθρώπινης και κτηνιατρικής χρήσης, φαρμακούχων ζωοτροφών και προσθετικών ζωοτροφών, τροφίμων ειδικής διατροφής και συμπληρωμάτων διατροφής, βιοκτόνων, ιατρικών βοηθημάτων και καλλυντικών. Ο ΕΟΦ σε συνεργασία με την Ευρωπαϊκή Ένωση, αξιολογεί και εγκρίνει νέα προϊόντα, παρακολουθεί μετεγκριτικά την ποιότητα, την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα των προϊόντων κατά την κυκλοφορία τους στη χώρα, ελέγχει την παραγωγή, τις κλινικές μελέτες και την κυκλοφορία στην ελληνική αγορά. Έτσι εξασφαλίζεται η τήρηση των κανόνων ορθής παραγωγής, εργαστηριακής και κλινικής πρακτικής και εφαρμόζεται η νομοθεσία όσον αφορά στη διακίνηση, διάθεση, εμπορία και διαφήμισή τους. Επιπλέον, αναπτύσσει και προωθεί την ιατρική και φαρμακευτική έρευνα, ενημερώνει τους επιστήμονες υγείας, τους αρμόδιους φορείς και το κοινό με αντικειμενικές και χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τα φαρμακευτικά και λοιπά προϊόντα με σκοπό την ορθολογική τους χρήση και την αντικειμενική εκτίμηση της φαρμοκοοικονομικής διάστασης της.

1.5 Κατευθυντήριες οδηγίες για την ποιότητα των φαρμάκων

Οι πιο ευρέως εφαρμόσιμες κατευθυντήριες οδηγίες που χρησιμοποιούνται στην παγκόσμια φαρμακοβιομηχανία είναι οι κατευθυντήριες οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας,

της Ευρωπαϊκής Ένωσης και του Διεθνούς Συμβουλίου για την Εναρμόνιση των Τεχνικών Απαιτήσεων για Φαρμακευτικά Προϊόντα για Ανθρώπινη Χρήση (ICH).

Ειδικότερα, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας δημοσίευσε ένα εγχειρίδιο για τα GMP, με τίτλο: Quality Assurance of Pharmaceuticals, a compendium of guidelines and related material, Volume 2: Good Manufacturing Practices and Inspection, το οποίο αποτελείται από τα εξής κεφάλαια και παραρτήματα που αφορούν τα GMP και με τα οποία πρέπει να εναρμονίζεται η παγκόσμια φαρμακοβιομηχανία (WHO, 2007):

- **Κεφάλαιο 1:** GMP, κύριες αρχές για φαρμακευτικά προϊόντα
- **Κεφάλαιο 2:** Ορθές παρασκευαστικές πρακτικές: πρώτες ύλες
- **Κεφάλαιο 3:** Ορθές παρασκευαστικές πρακτικές: συγκεκριμένα φαρμακευτικά προϊόντα
- **Κεφάλαιο 4:** Επιθεώρηση
- **Παράρτημα 3:** Ραδιοφαρμακευτικά προϊόντα
- **Παράρτημα 4:** Ορθές παρασκευαστικές πρακτικές για φαρμακευτικά προϊόντα: κύριες αρχές
- **Παράρτημα 5:** Υπόδειγμα Πιστοποιητικού GMP
- **Παράρτημα 6:** Αποστειρωμένα φαρμακευτικά προϊόντα
- **Παράρτημα 6:** Οδηγίες για την επιθεώρηση GMP
- **Παράρτημα 7:** Έλεγχος προέγκρισης
- **Παράρτημα 8:** Απαιτήσεις συστήματος ποιότητας για εθνικές επιθεωρήσεις GMP

Όσον αφορά τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης συγκεντρώνονται στο κεφάλαιο 1 και κεφάλαιο 5 του εγγράφου «Οι κανόνες που διέπουν τα φάρμακα στην Ευρωπαϊκή Ένωση» τα οποία αφορούν τα εξής:

- **Κεφάλαιο 1:** Φαρμακευτική νομοθεσία της ΕΕ για φαρμακευτικά προϊόντα για ανθρώπινη χρήση
- **Κεφάλαιο 5:** Φαρμακευτική νομοθεσία της ΕΕ για φαρμακευτικά προϊόντα για κτηνιατρική χρήση

Η βασική νομοθεσία υποστηρίζεται από μια σειρά κατευθυντήριων οδηγιών που δημοσιεύονται επίσης στα ακόλουθα κεφάλαια του εγγράφου «Οι κανόνες που διέπουν τα φαρμακευτικά προϊόντα στην Ευρωπαϊκή Ένωση»:

- **Κεφάλαιο 2:** Ανακοίνωση προς τους αιτούντες και κανονιστικές κατευθυντήριες οδηγίες για φαρμακευτικά προϊόντα για ανθρώπινη χρήση
- **Κεφάλαιο 3:** Επιστημονικές οδηγίες για φαρμακευτικά προϊόντα ανθρώπινης χρήσης
- **Κεφάλαιο 4:** Κατευθυντήριες οδηγίες για ορθές παρασκευαστικές πρακτικές για φάρμακα για ανθρώπινη και κτηνιατρική χρήση
- **Κεφάλαιο 6:** Ανακοίνωση προς τους αιτούντες και κανονιστικές κατευθυντήριες οδηγίες για φαρμακευτικά προϊόντα για κτηνιατρική χρήση
- **Κεφάλαιο 7:** Επιστημονικές οδηγίες για φαρμακευτικά προϊόντα για κτηνιατρική χρήση
- **Κεφάλαιο 8:** Μέγιστα όρια καταλοίπων
- **Κεφάλαιο 9:** Κατευθυντήριες οδηγίες για τη φαρμακοεπαγρύπνηση των φαρμακευτικών προϊόντων για ανθρώπινη και κτηνιατρική χρήση
- **Κεφάλαιο 10:** Οδηγίες για κλινικές δοκιμές (Haleem et al., 2013).

Τέλος, το Διεθνές Συμβούλιο για την Εναρμόνιση των τεχνικών απαιτήσεων για την καταχώριση φαρμακευτικών προϊόντων για ανθρώπινη χρήση (ICH) είναι μια πρωτοβουλία που συγκεντρώνει τις ρυθμιστικές αρχές της Ευρώπης, της Ιαπωνίας και των Ηνωμένων Πολιτειών και εμπειρογνώμονες από τη φαρμακευτική βιομηχανία στις τρεις διαφορετικές περιοχές για να συζητήσουν επιστημονικές και τεχνικές πτυχές της καταχώρισης προϊόντων (Haleem et al., 2013).

Στόχος του ICH είναι η ανάπτυξη κατευθυντήριων γραμμών για την ποιότητα, την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα των φαρμακευτικών προϊόντων. Αυτές οι κατευθυντήριες γραμμές εγκρίνονται στη συνέχεια από τα ρυθμιστικά μέλη και τους παρατηρητές του ICH με αποτέλεσμα τη διεθνή εναρμόνιση. Το ICH «Q10 Pharmaceutical Quality Systems» είναι ένα βασικό έγγραφο καθοδήγησης για τους κατασκευαστές φαρμακευτικών προϊόντων που προσπαθούν να αναπτύξουν συστήματα για να διασφαλίσουν την ποιότητα των προϊόντων τους. Αυτό το έγγραφο οριστικοποιήθηκε τον Ιούνιο του 2008 και εφαρμόστηκε αργότερα από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή τον Ιούλιο του 2008 και τον FDA τον Απρίλιο του 2009 (Van Duyse et al., 2021).

2. Ανάπτυξη και Επικύρωση Αναλυτικών Μεθόδων

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του ICH, τα χαρακτηριστικά ποιότητας που μελετώνται προκειμένου να επικυρωθεί μια αναλυτική μέθοδος είναι τα ακόλουθα.

2.1 Εξειδίκευση (Specificity)

Η εξειδίκευση είναι η ικανότητα αναμφισβήτητης αξιολόγησης της αναλυόμενης ουσίας παρουσία συστατικών όπως έκδοχα ή/ και με προϊόντα αποδόμησης/ διάσπασης και προσμίξεις. Η έλλειψη εξειδίκευσης μιας μεμονωμένης αναλυτικής διαδικασίας μπορεί να αντισταθμιστεί από άλλες υποστηρικτικές αναλυτικές διαδικασίες όπως οι ακόλουθες:

- Μελέτες ταυτοποίησης: για να εξασφαλιστεί η ταυτότητα μιας αναλυόμενης ουσίας.
- Μελέτες καθαρότητας: για να διασφαλιστεί ότι όλες οι αναλυτικές διαδικασίες που εκτελούνται εξασφαλίζουν ότι το σήμα προέρχεται μόνο από την αναλυόμενη ουσία που πρόκειται να προσδιοριστεί. Μεταξύ αυτών των μελετών εντοπίζονται μελέτες σχετικών ουσιών, βαρέων μετάλλων, και μελέτες περιεκτικότητας σε υπολειμματικούς διαλύτες (ICH, 2005).

2.2 Ακρίβεια (Accuracy)

Η ακρίβεια μιας αναλυτικής διαδικασίας εκφράζει την εγγύτητα μεταξύ της τιμής που γίνεται αποδεκτή είτε ως συμβατική πραγματική τιμή είτε ως αποδεκτή τιμή αναφοράς και της πειραματικής τιμής. Η ακρίβεια συνήθως εκφράζεται ως ανάκτηση (%Recovery) (ICH, 2005).

2.3 Πιστότητα (Precision)

Η πιστότητα, γνωστή και ως τυπική απόκλιση, διακύμανση ή συντελεστής διακύμανσης μιας σειράς μετρήσεων, μιας αναλυτικής διαδικασίας εκφράζει την εγγύτητα συμφωνίας (βαθμός διασποράς) μεταξύ μιας σειράς μετρήσεων που λαμβάνονται από πολλαπλή δειγματοληψία του ίδιου ομοιογενούς δείγματος υπό προδιαγεγραμμένες συνθήκες. Ωστόσο, εάν δεν είναι δυνατό να ληφθεί ένα ομοιογενές δείγμα, μπορεί να διερευνηθεί χρησιμοποιώντας τεχνητά παρασκευασμένα δείγματα, γνωστά ως πρότυπα διαλύματα (ICH, 2005).

Η ακρίβεια μπορεί να εξεταστεί σε τρία επίπεδα: επαναληψιμότητα, ενδιάμεση ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα.

- Επαναληψιμότητα

Η επαναληψιμότητα εκφράζει την ακρίβεια κάτω από τις ίδιες συνθήκες λειτουργίας σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η επαναληψιμότητα ονομάζεται επίσης ακρίβεια εντός της ανάλυσης (ICH, 2005). Ειδικότερα, για τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας πάντα χρησιμοποιείται το ίδιο δείγμα. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές του ICH, η επαναληψιμότητα της μεθόδου μπορεί να προσδιοριστεί με δύο τρόπους:

- ✓ Για τις σχετικές ουσίες και τις δοκιμές υπολειμματικών διαλυτών, η επαναληψιμότητα μπορεί να αξιολογηθεί με την προσθήκη προσμίξεων ή διαλυτών στο όριο προδιαγραφών για τα προϊόντα.
- ✓ Για τον προσδιορισμό ισχύος, η επαναληψιμότητα μπορεί να αξιολογηθεί χρησιμοποιώντας φαρμακευτικά προϊόντα (δισκίο ή κάψουλες) με τουλάχιστον έξι επαναλήψεις στο 100% της περιεκτικότητας της προσδιοριζόμενης δραστικής ουσίας (Fang et al., 2017; Shabir, 2004).

- Ενδιάμεση ακρίβεια

Η ενδιάμεση ακρίβεια εκφράζει παραλλαγές εντός των εργαστηρίων: διαφορετικές ημέρες, διαφορετικοί αναλυτές, διαφορετικός εξοπλισμός κ.λπ (ICH, 2005).

- Αναπαραγωγιμότητα

Η αναπαραγωγιμότητα εκφράζει την ακρίβεια μεταξύ εργαστηρίων, όπως συνεργατικές μελέτες, που συνήθως εφαρμόζονται στην τυποποίηση της αναλυτικής διαδικασίας (ICH, 2005).

2.3 Γραμμικότητα (Linearity)

Η γραμμικότητα μιας αναλυτικής διαδικασίας είναι η ικανότητά της (εντός ενός δεδομένου εύρους) να λαμβάνει αποτελέσματα δοκιμών που είναι άμεσα ανάλογα με τη συγκέντρωση (ποσότητα) της αναλυόμενης ουσίας στο δείγμα. Η γραμμικότητα εξετάζεται μετρώντας

την απόκριση (response) σε σχέση με τη συγκέντρωση σε όλο το εύρος της περιοχής συγκεντρώσεων της αναλυτικής μεθόδου (ICH, 2005).

2.4 Εύρος (Range)

Το εύρος μιας αναλυτικής διαδικασίας είναι το διάστημα μεταξύ της ανώτερης και της χαμηλότερης συγκέντρωσης της αναλυόμενης ουσίας στο δείγμα για το οποίο έχει αποδειχθεί ότι η αναλυτική διαδικασία έχει κατάλληλο επίπεδο ακρίβειας, επαναληψιμότητας και γραμμικότητας (ICH, 2005).

2.5 Ανθεκτικότητα (Robustness)

Η ανθεκτικότητα μιας αναλυτικής διαδικασίας είναι ένα μέτρο της ικανότητάς της να παραμένει ανεπηρέαστη από μικρές, αλλά σκόπιμες διακυμάνσεις στις παραμέτρους της μεθόδου και παρέχει μια ένδειξη της αξιοπιστίας της κατά την διάρκεια της αναλυτικής διαδικασίας (ICH, 2005).

2.6 Όριο ανίχνευσης (Detection limit, DL) και Όριο ποσοτικοποίησης (Quantitation limit, QL)

Το όριο ανίχνευσης μιας μεμονωμένης αναλυτικής διαδικασίας είναι η χαμηλότερη ποσότητα αναλυόμενης ουσίας σε ένα δείγμα που μπορεί να ανιχνευθεί αλλά όχι απαραίτητα να ποσοτικοποιηθεί με ακρίβεια.

Το όριο ποσοτικοποίησης μιας μεμονωμένης αναλυτικής διαδικασίας είναι η χαμηλότερη ποσότητα αναλυόμενης ουσίας σε ένα δείγμα που μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με ακρίβεια και πιστότητα. Το όριο ποσοτικοποίησης είναι μια παράμετρος ποσοτικών δοκιμασιών για χαμηλά επίπεδα ενώσεων σε μήτρες δειγμάτων και χρησιμοποιείται ιδιαίτερα για τον προσδιορισμό προσμίξεων ή/και προϊόντων αποδόμησης (ICH, 2005).

Τα DL και το QL μπορούν να υπολογιστούν ως εξής:

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

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

Όπου,

- σ η τυπική απόκλιση του προτύπου χαμηλότερης συγκέντρωσης της καμπύλης βαθμονόμησης
- S η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης

Ειδικότερα, το σ μπορεί να εκτιμηθεί από την τυπική απόκλιση του τυφλού δείγματος, με μέτρηση του μεγέθους της αναλυτικής απόκρισης χρησιμοποιώντας έξι τυφλά δείγματα, την τυπική απόκλιση της γραμμής παλινδρόμησης ή την σχετική τυπική απόκλιση των τομών στον άξονα y (Fang et al., 2017).

2.7 Απαιτήσεις καταλληλότητας συστήματος (System Suitability)

Η δοκιμή καταλληλότητας του συστήματος στη βιομηχανία των φαρμακευτικών προϊόντων χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση των αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται σε αναλύσεις ρουτίνας στα εργαστήρια ποιοτικού ελέγχου. Οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται στην μελέτη των δοκιμών καταλληλότητας συστήματος (SST) είναι οι εξής:

- Αριθμός θεωρητικών πλακών ή Απόδοση (N)
- Συντελεστής χωρητικότητας (k')
- Διαχωρισμός ή Σχετική κατακράτηση (α)
- Διαχωριστική ικανότητα (R_s)
- Παράγοντας συμμετρίας (symmetry factor ή tailing factor)
- Σχετική Τυπική Απόκλιση (RSD)

Αναλυτικότερα, ο αριθμός θεωρητικών πλακών ανά στήλη για την κορυφή μπορεί να υπολογιστεί από την πρώτη έγχυση του προτύπου διαλύματος εργασίας ως εξής (Fang et al., 2017):

$$N = 16 \left(\frac{t}{w} \right)^2$$

Όπου,

t ο χρόνος συγκράτησης της ενεργού κορυφής

w το πλάτος κορυφής της κορυφής

Ο συντελεστής χωρητικότητας (k') είναι ανεξάρτητος από το ρυθμό ροής της κινητής φάσης καθώς και από τις διαστάσεις της στήλης που είναι το μέτρο της έκτασης κατακράτησης που σχετίζεται με μια αναλυόμενη ουσία σε σχέση με μια μη συγκρατημένη κορυφή και υπολογίζεται ως εξής:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Όπου,

t_R ο χρόνος κατακράτησης της κορυφής του αναλυόμενου δείγματος

t_M ο χρόνος κατακράτησης μιας μη κατακρατημένης κορυφής (Ravisankar et al., 2015)

Ο παράγοντας κατακράτησης (α) αποτελεί ποσοτικό μέτρο της εκλεκτικότητας της χρωματογραφικής στήλης δηλαδή της ικανότητας αυτής να διακρίνει δύο συστατικά μεταξύ τους. Για δύο ουσίες A και B ο παράγοντας εκλεκτικότητας ορίζεται ως:

$$\alpha = KB/KA$$

όπου KA και KB οι συντελεστές κατανομής των ουσιών (Skoog et al., 2007).

Η διαχωριστική ικανότητα είναι η ικανότητα μιας στήλης να διαχωρίζει δύο ενώσεις σε δύο μεμονωμένες κορυφές ή χρωματογραφικές ζώνες και βελτιώνεται με την ενίσχυση του μήκους της στήλης, τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων και την αύξηση της θερμοκρασίας. Η διαχωριστική ικανότητα υπολογίζεται με τη χρήση του παρακάτω τύπου:

$$R_s = (t_{R2} - t_{R1}) / 0.5 (t_{w1} - t_{w2})$$

Όπου,

t_{R1} και t_{R2} οι χρόνοι κατακράτησης των δύο κορυφών

t_{w1} και t_{w2} το πλάτος των δύο κορυφών

Η ελάχιστη διαχωριστική ικανότητα μεταξύ κάθε προσδιορισμένου κρίσιμου ζεύγους γειτονικών κορυφών θα πρέπει να είναι ≥ 1.5 .

Η χρωματογραφική κορυφή υποτίθεται ότι έχει σχήμα σύμφωνα με την κανονική κατανομή κατά Gauss υπό ιδανικές συνθήκες. Ωστόσο, σε πρακτικές συνθήκες, υπάρχει πάντα μια απόκλιση από την κανονική κατανομή που υποδηλώνει ανομοιόμορφη μετανάστευση των κορυφών. Ως εκ τούτου, οι ρυθμιστικοί οργανισμοί όπως η USP και η EP έχουν προτείνει τον παράγοντα συμμετρίας ως μία από τις παραμέτρους καταλληλότητας του συστήματος. Οι τιμές θα πρέπει κανονικά να είναι μεταξύ 1,0-1,5 και τιμές μεγαλύτερες από 2 δεν είναι αποδεκτές. Ο παράγοντας συμμετρίας υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τον εξής τύπο:

$$T = B/A$$

Όπου,

B η απόσταση από το μεσαίο σημείο της κορυφής μέχρι το πίσω άκρο της κορυφής.

A η απόσταση από το μπροστινό άκρο της κορυφής μέχρι το μεσαίο σημείο της κορυφής (Ravisankar et al., 2015).

3. Προσμίξεις σε φαρμακευτικά προϊόντα

3.1 Ορισμός προσμίξεων

Σύμφωνα με τις οδηγίες του Διεθνούς Συμβουλίου για την Εναρμόνιση των Τεχνικών Απαιτήσεων για Φάρμακα για Ανθρώπινη Χρήση (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH) ως προσμίξεις ορίζονται (ICH, 2006) :

«Ουσίες του προϊόντος που δεν αποτελούν τα ίδια τα ενεργά φαρμακευτικά συστατικά (API) ή το έκδοχο που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του»

Ενώ, η Επιτροπή Φαρμακοποιίας της Ινδίας (Indian Pharmacopoeia Commission, IPC) έχει ορίσει τις προσμίξεις ως οποιοδήποτε συστατικό των φαρμακευτικών ουσιών που προορίζονται για φαρμακευτική χρήση ή ενός φαρμακευτικού προϊόντος που ωστόσο δεν αποτελεί την χημική οντότητα που ορίζει την ουσία ή δεν είναι το έκδοχο του προϊόντος (IPC, 2014).

Γενικά, οι περισσότερες από αυτές τις προσμίξεις είναι μικρά μόρια, ιδιαίτερα σε στερεές μορφές φαρμακευτικών προϊόντων όπου η περιορισμένη κινητικότητα περιορίζει την αντιδραστικότητα μεγαλύτερων μορίων. Για τα περισσότερα φαρμακευτικά προϊόντα, τα αντιδρώντα είδη αποτελούνται από νερό, μικρά ηλεκτρόφιλα μόρια, όπως παράγωγα αλδεϋδης και καρβοξυλικού οξέος, υπεροξειδία και μέταλλα. Η παρουσία αυτών των ανεπιθύμητων ενώσεων, ακόμη και σε μικρές ποσότητες, μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια των φαρμακευτικών προϊόντων. Το προφίλ προσμίξεων, δηλαδή η ταυτότητα καθώς και η συγκέντρωση των προσμίξεων στα φαρμακευτικά προϊόντα, τυγχάνει πλέον ιδιαίτερης προσοχής από τις ρυθμιστικές αρχές, με τις διάφορες φαρμακοποιίες όπως η BP (Βρετανική Φαρμακοποιία), η USP (Φαρμακοποιία Ηνωμένων Πολιτειών), η IP (Φαρμακοποιία της Ινδίας) και ούτω καθεξής, να ενσωματώνουν σιγά σιγά όρια στα επιτρεπόμενα επίπεδα προσμίξεων που υπάρχουν σε ενεργά φαρμακευτικά συστατικά (API) ή σκευάσματα (Pilaniya et al., 2010).

3.2 Ταξινόμηση προσμίξεων

Σύμφωνα με τις οδηγίες του ICH, οι προσμίξεις ταξινομούνται κυρίως σε οργανικές προσμίξεις, ανόργανες προσμίξεις και υπολείμματα διαλυτών. Οι οργανικές προσμίξεις, οι οποίες είναι οι πιο κοινές προσμίξεις που εντοπίζονται σε κάθε API, μπορεί να αναπτυχθούν από πρώτες ύλες, ενδιάμεσα συνθετικών διεργασιών και προϊόντα αποικοδόμησης. Οι ανόργανες προσμίξεις μπορεί να προκύψουν από τη διαδικασία παραγωγής και συνήθως προσδιορίζονται ως αντιδραστήρια, ανόργανα άλατα, καταλύτες και βαρέα μέταλλα. Τα υπολείμματα διαλυτών είναι προσμίξεις που προέρχονται από διαλύτες (Görög, 2003; Ramachandra, 2016). Ορισμένες από τις προσμίξεις που προαναφέρθηκαν είναι μεταλλαξιογόνες ή καρκινογόνες ουσίες με τη δυνατότητα να προκαλέσουν δυσμενείς επιπτώσεις στον ανθρώπινο οργανισμό, ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Ο έλεγχος και ο προσδιορισμός των λεγόμενων «γενετοξικών προσμίξεων (GTIs)» αποτελεί μία από τις σημαντικότερες προκλήσεις για την φαρμακευτική βιομηχανία.

3.2.1 Οργανικές προσμίξεις

Αυτές οι προσμίξεις μπορεί να προκύψουν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παρασκευής ή να δημιουργηθούν κατά την αποθήκευση της φαρμακευτικής ουσίας και μπορεί να έχουν χαμηλή δραστηριότητα σε σύγκριση με τις φαρμακευτικές ουσίες ενώ θα πρέπει να

απομακρύνονται ή να ελέγχονται στις πρώτες ύλες, στο ενδιάμεσο ή στο τελικό στάδιο. Μπορεί να είναι ταυτοποιημένες ενώσεις ή μη, πτητικές ή μη και περιλαμβάνουν (Shaikh, 2019):

- Πρώτες ύλες
- Υποπροϊόντα
- Ενδιάμεσα προϊόντα
- Προϊόντα αποδόμησης
- Αντιδραστήρια και καταλύτες

3.2.2 Ανόργανες προσμίξεις

Οι ανόργανες προσμίξεις προκύπτουν κατά την παραγωγική διαδικασία, ενώ δεν παρέχουν κανένα θεραπευτικό όφελος και μπορούν να αποφευχθούν χρησιμοποιώντας απεσταγμένο νερό και αντιδραστήρες με επένδυση από γυαλί. Είναι συνήθως γνωστές ενώσεις και περιλαμβάνουν (Shaikh, 2019):

- Αντιδραστήρια και καταλύτες
- Βαρέα μέταλλα
- Ανόργανα άλατα

3.2.3 Υπολείμματα διαλυτών

Πρόκειται για οργανικούς διαλύτες που χρησιμοποιούνται κατά τη διαδικασία παραγωγής. Εφόσον είναι γενικά γνωστής τοξικότητας, η επιλογή των κατάλληλων διαλυτών επιτυγχάνεται εύκολα. Με βάση τον πιθανό κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία, τα υπολείμματα διαλυτών ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες.

- Διαλύτες κατηγορίας 1: Αυτοί οι διαλύτες θα πρέπει να αποφεύγονται λόγω γνωστών κινδύνων για καρκινογένεση για τον άνθρωπο και τους περιβαλλοντικούς κινδύνους. Στην κατηγορία αυτών των διαλυτών εμπίπτουν το 1,1-διχλωροαιθάνιο, το βενζόλιο, το 1,2-διχλωροαιθάνιο και ο τετραχλωράνθρακας.
- Διαλύτες κατηγορίας 2: Αυτοί οι διαλύτες πρέπει να περιοριστούν καθώς είναι μη γονιδιοτοξικοί, αλλά έγκειται στην κατηγορία των νευροτοξικών και τερατογόνων.

Στην κατηγορία αυτών των διαλυτών εμπίπτουν το ακετονιτρίλιο, το χλωροφόρμιο και το κυκλοεξάνιο.

- Διαλύτες κατηγορίας 3: Στην κατηγορία αυτή εμπίπτουν οι διαλύτες που έχουν χαμηλό τοξικό δυναμικό για τον άνθρωπο με επιτρεπόμενη ημερήσια έκθεσή (PDE) 50 mg ή λιγότερο την ημέρα όπως το οξικό οξύ, η αιθανόλη και η μεθανόλη, και οι διαλύτες για τους οποίους δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα τοξικότητας, όπως το ισοοκτάνιο, το τριφθοροξικό οξύ και το τριχλωροξικό και οι οποίοι πρέπει να περιορίζονται στις φαρμακευτικές ουσίες με βάση την επιτρεπόμενη ημερήσια έκθεσή σε αυτούς (Shaikh, 2019).

3.3 Γενοτοξικές προσμίξεις

Η Ένωση Φαρμακευτικής Έρευνας και Κατασκευαστών (PhRMA) σχημάτισε μια ομάδα εργασίας το 2004 για να συζητήσει σχετικά με τις δοκιμές, την ταξινόμηση, την πιστοποίηση και την αξιολόγηση τοξικολογικού κινδύνου των GTI στα φαρμακευτικά προϊόντα. Όρισε ότι, ορισμένες λειτουργικές ομάδες είναι γνωστό ότι εμπλέκονται σε αντιδράσεις με το DNA. Αυτές οι λειτουργικές ομάδες που επηρεάζουν το DNA κατηγοριοποιήθηκαν σε τρεις ομάδες οι οποίες είναι οι εξής:

- Ομάδα 1: αρωματικές ομάδες, για παράδειγμα, N-υδροξυαρύλια, N-ακυλιωμένα αμινοαρύλια, N-οξείδια, αμινοαρύλια και αλκυλιωμένα αμινοαρύλια, πουρίνες ή πυριμιδίνες.
- Ομάδα 2: αλκυλ- και αρυλ- ομάδες, για παράδειγμα, αλδεΐδες, N-μεθυλόλες, N-νιτροζαμίνες, νιτροενώσεις, καρβαμιδικές ενώσεις, εποξείδια, αζιριδίνες, προπιολακτόνες, προπιουσουλτόνες, υδραζίνες και αζωενώσεις.
- Ομάδα 3: ετεροαρωματικές ομάδες που περιλαμβάνουν δέκτες ηλεκτρονίων (αντίδραση Michael), αλκυλεστέρες φωσφονικά άλατα, πρωτοταγείς φωσφονικές ενώσεις.

Η PhRMA κατηγοριοποίησε περαιτέρω τις προσμίξεις σε πέντε κατηγορίες:

- Κατηγορία 1: προσμίξεις που είναι γνωστό ότι είναι γονιδιοτοξικές (μεταλλαξιογόνες) και καρκινογόνες. Αυτές οι προσμίξεις αντιπροσωπεύουν τον πιο σοβαρό κίνδυνο γονιδιοτοξικότητας και πρέπει να εξαλειφθούν τροποποιώντας τη

παραγωγική διαδικασία. Εάν αυτό δεν είναι δυνατό, είναι αναγκαίο να οριστεί το κατώφλι τοξικολογικής ανησυχίας (TTC) για αυτές τις ενώσεις.

- Κατηγορία 2: προσμίξεις που είναι γνωστό ότι είναι γονιδιοτοξικές (μεταλλαξιόνες), αλλά με άγνωστη δυνατότητα καρκινογένεσης. Αυτές οι προσμίξεις πρέπει να ελέγχονται χρησιμοποιώντας τις αρχές TTC.
- Κατηγορία 3: προσμίξεις που περιέχουν δομές που δεν σχετίζονται με την δομή της δραστικής φαρμακευτικής ουσίας και άγνωστης γονιδιοτοξικής (μεταλλαξιόγνου) δυνατότητας. Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει προσμίξεις με λειτουργικές ομάδες, οι οποίες βάση της δομής τους, μπορούν να συνδεθούν με γονοτοξικότητα.
- Κατηγορία 4: προσμίξεις που περιέχουν προειδοποιητικές δομές που σχετίζονται με το API. Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει προσμίξεις που περιέχουν ένα προειδοποιητικό λειτουργικό τμήμα που είναι κοινό με τη μητρική δομή.
- Κατηγορία 5: προσμίξεις χωρίς προειδοποιητικές δομές που αντιμετωπίζονται ως κανονικές προσμίξεις και ελέγχονται σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές της ICH.

Εάν οι ενώσεις της κατηγορίας 3 ή 4 είναι γονοτοξικές ή δεν έχουν δοκιμαστεί, μεταφέρονται στην κατηγορία 2. Εάν αυτές δεν είναι γονοτοξικές, εντάσσονται στην κατηγορία 5. Οι γονοτοξικές προσμίξεις πρέπει να εξετάζονται προσεκτικά λόγω της τοξικότητάς τους σε ακόμη και πολύ χαμηλά επίπεδα (Ambavaram et al., 2015).

3.4 Προέλευση προσμίξεων

Υπάρχουν διάφορες πηγές προέλευσης των προσμίξεων στα API και τα φαρμακευτικά προϊόντα, οι οποίες περιλαμβάνουν προσμίξεις σχετικές με την στερεοχημεία, συνθετικές ενδιάμεσες προσμίξεις και υποπροϊόντα. Επιπλέον, περιλαμβάνουν προσμίξεις που προκύπτουν κατά τη σύνθεση, την αποθήκευση, την αμοιβαία αλληλεπίδραση μεταξύ των συστατικών και την αποικοδόμηση που σχετίζεται με τη λειτουργική ομάδα της φαρμακευτικής ένωσης (Dhangar et al., 2017).

3.4.1 Προσμίξεις που σχετίζονται με τη στερεοχημεία

Η δράση του φαρμάκου στο βιολογικό σύστημα εξαρτάται από τη χωρική διάταξη των ατόμων στο μόριο του φαρμάκου, δηλαδή την στερεοχημεία του. Είναι σημαντικό να

αναζητούμε ενώσεις που σχετίζονται με τη στερεοχημεία, δηλαδή εκείνες οι ενώσεις που έχουν ανάλογη χημική δομή αλλά διαφορετικό χωρικό προσανατολισμό, καθώς αυτές οι ενώσεις μπορούν να θεωρηθούν ως προσμίξεις στα API. Τα χειρόμορφα μόρια ονομάζονται γενικά εναντιομερή. Σε περίπτωση χειρόμορφου φαρμάκου που χορηγείται ως καθαρό εναντιομερές, το ισομερές του θεωρείται ως πρόσμιξη. Η απλή εναντιομερική μορφή χειρόμορφου φαρμάκου θεωρείται σήμερα ως μια βελτιωμένη χημική οντότητα που μπορεί να προσφέρει καλύτερο φαρμακολογικό προφίλ και πιο ευνοϊκό προφίλ ανεπιθύμητων αντιδράσεων (Dhangar et al., 2017).

Η χειρόμορφη φύση των φαρμάκων δεν είναι απαραίτητη για τη δράση του φαρμάκου, αλλά όταν υπάρχει μπορεί να οδηγήσει σε έντονες διαφορές στην φαρμακοκινητική, φαρμακοδυναμική και στις τοξικολογικές ιδιότητες των στερεοϊσομερών του φαρμάκου που προκύπτουν. Η *in vivo* επίδραση ενός φαρμάκου εξαρτάται από αυτές τις ιδιότητες, επομένως δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι τα στερεοϊσομερή συχνά προκαλούν διαφορετικές αποκρίσεις σε τέτοια συστήματα. Διαφορετικοί συνδυασμοί αυτών των ιδιοτήτων μπορούν δυνητικά να οδηγήσουν σε δραματικά διαφορετικές βιολογικές συνέπειες. Για παράδειγμα, οι πιο συχνά συνταγογραφούμενοι β-αναστολείς πωλούνται ως ρακεμικά μίγματα, αλλά τα αντι-υπερτασικά αποτελέσματα αυτής της κατηγορίας φαρμάκων βασίζονται στο S-εναντιομερές. Το R-εναντιομερές σε κάθε περίπτωση έχει σημαντικά χαμηλότερη αντιυπερτασική δράση, ωστόσο, δεν προκαλεί σημαντικές παρενέργειες. Το εναντιομερές με την υψηλότερη ισχύ για μια συγκεκριμένη φαρμακολογική δράση ονομάζεται *eutomer*, ενώ το εναντιομερές που είναι λιγότερο ισχυρό ονομάζεται *distomer*. Μια άλλη κατάσταση που συναντάται *in vivo* είναι όταν το *distomer* εμφανίζει ανεπιθύμητες παρενέργειες. Για παράδειγμα, το φάρμακο κατά της αρθρίτιδας πενικιλλαμίνη διατίθεται στο εμπόριο ως το καθαρό S-εναντιομερές, καθώς το *distomer* (R-εναντιομερές) είναι μια ισχυρή τοξίνη (Hadley, 2007).

Υπάρχουν επίσης γνωστές περιπτώσεις εναντιομερών φαρμάκων που διαθέτουν εντελώς διαφορετικές θεραπευτικές ιδιότητες. Το (+)-2R,3S-στερεοϊσομερές της προποξυφαίνης (δεξτροπροποξυφαίνη) διατίθεται στο εμπόριο ως αναλγητικός παράγοντας, ενώ το εναντιομερές του (-)-(2S,3R)-προποξυφαίνη (λεβοπροποξυφαίνη) είναι διαθέσιμο ως αποτελεσματικός αντιβηχικός παράγοντας. Τα εναντιομερή ορισμένων χειρόμορφων φαρμάκων είναι γνωστό ότι διαθέτουν ουσιαστικά ταυτόσημες ποιοτικές και ποσοτικές

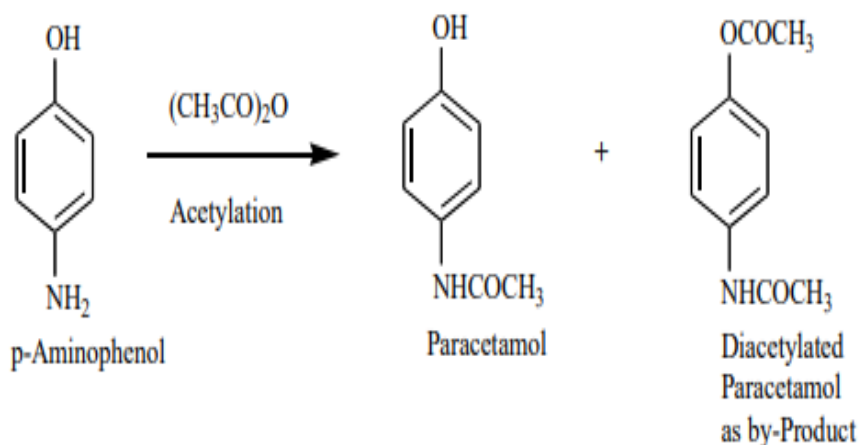
φαρμακολογικές δράσεις, για παράδειγμα, το αντισταμινικό προμεθαζίνη, το οποίο διατίθεται στο εμπόριο ως ρακεμικό μίγμα. Τα φάρμακα της τελευταίας κατηγορίας είναι, ωστόσο, μειοψηφία και είναι σπάνιο τα ζωντανά συστήματα να μην είναι σε θέση να διακρίνουν μεταξύ των στερεοϊσομερών μορφών ενός χειρόμορφου φαρμακευτικού προϊόντος (Hadley, 2007).

3.4.2 Προσμίξεις που σχετίζονται με την παραγωγική διαδικασία

Οι προσμίξεις σε φαρμακευτικές ενώσεις ή μια νέα χημική οντότητα μπορεί να προκύπτουν κατά τη διάρκεια της συνθετικής διαδικασίας από πρώτες ύλες, ενδιάμεσα προϊόντα και ή υποπροϊόντα. Οι πρώτες ύλες κατασκευάζονται σχετικά με πολύ χαμηλότερες απαιτήσεις ποιότητας από μια φαρμακευτική ουσία. Ως εκ τούτου, είναι εύκολο να καταλάβουμε γιατί μπορεί να περιέχουν έναν αριθμό συστατικών που μπορεί να επηρεάσουν την καθαρότητα των φαρμακευτικών ουσιών. Κατά τη διάρκεια της σύνθεσης, το προϊόν έχει πιθανότητες να δημιουργήσει προσμίξεις, επειδή μπορεί να συμβούν πολλές αντιδράσεις ταυτόχρονα, όπως κατά την χημική μετατροπή των βάσεων σε άλας και αντίστροφα (Dhangar et al., 2017).

Προσμίξεις που προκύπτουν στο τελευταίο στάδιο της συνθετικής διαδικασίας

Οι προσμίξεις που εμπίπτουν σε αυτή την κατηγορία ονομάζονται συχνά «πιθανές» ή «αναμενόμενες» προσμίξεις. Για παράδειγμα, το τελευταίο βήμα στη σύνθεση της παρακεταμόλης είναι η ακετυλίωση της 4-αμινοφαινόλης, με την διακετυλιωμένη παρακεταμόλη να είναι μια πιθανή πρόσμιξη στα χύδην φαρμακευτικά προϊόντα (Εικόνα 2) (Nagpal et al., 2011). Διάφορα φαρμακευτικά προϊόντα 17α-αιθινυλ-17-υδροξυστεροειδή παρασκευάζονται με την αιθινυλίωση των 17-οξοστεροειδών και για αυτό το λόγο τα 17-οξοστεροειδή είναι πιθανές προσμίξεις των αιθινυλοστεροειδών. Ένα άλλο παράδειγμα επίσης από το πεδίο των στεροειδών είναι η πρεδνιζολόνη. Το τελευταίο βήμα στη σύνθεσή της είναι η εισαγωγή του διπλού δεσμού Δ^1 συνήθως με μικροβιολογική αφυδρογόνωση. Για το λόγο αυτό η πιο πιθανή πρόσμιξη στην πρεδνιζολόνη είναι το 1,2-διυδροπαραγωγή (υδροκορτιζόνη) (Görög, 2000).

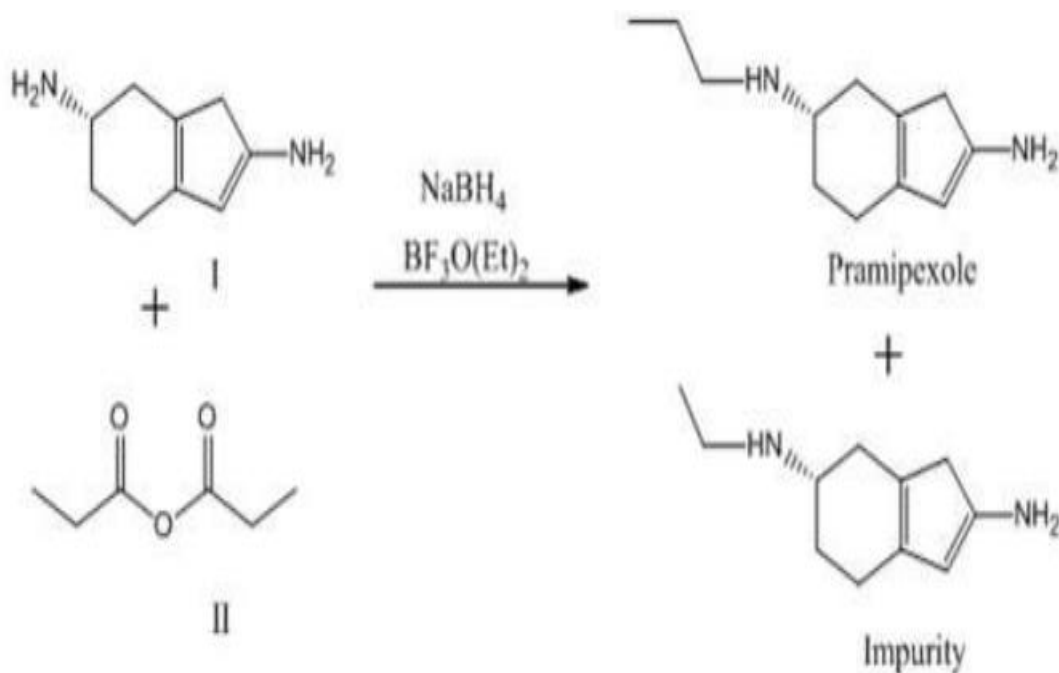


Προσμίξεις που είναι προϊόντα ατελούς αντίδρασης κατά τη συνθετική διαδικασία

Εάν το τελευταίο ενδιάμεσο έχει δύο λειτουργικές ομάδες και το τελικό βήμα περιλαμβάνει την ίδια αντίδραση και στις δύο, υπάρχει πάντα η πιθανότητα να αντιδράσει μόνο μία από αυτές και να εμφανιστεί μια μερικώς αντιδρούσα πρόσμιξη. Οι προσμίξεις αυτού του είδους εμπίπτουν επίσης στην κατηγορία των πιθανών προσμίξεων. Για παράδειγμα, σε μία από τις συνθέσεις της διοξικής αιθυνοδιόλης, το τελικό στάδιο είναι η διακετυλίωση της αιθυνοδιόλης. Δεδομένου ότι η αντιδραστικότητα της δευτεροταγούς 3-υδροξυ ομάδας είναι πολύ υψηλότερη από αυτή του τριτοταγούς 17-υδροξυλίου, μια πιθανή πρόσμιξη είναι η 3-οξική-αιθυνοδιόλη. Ομοίως, το τελικό στάδιο στη σύνθεση του βρωμιούχου πιπεκουρονίου είναι η διακετυλίωση του 3α,17β-διυδροξυ παραγώγου, του οποίου η πιθανή πρόσμιξη είναι το παράγωγο 17β-μονοακετύλιο. Η ατελής αντίδραση ως πηγή προσμίξεων δεν περιορίζεται στο τελικό στάδιο της σύνθεσης. Για παράδειγμα, σε μία από τις συνθέσεις μηλεϊνικής εναλαπρίλης και λισινοπρίλης η μονάδα $\text{-CH}_2\text{-Phe}$ εισάγεται στο μόριο ως -CO-Phe . Αυτό μεταπίπτει σε $\text{-CH}_2\text{-Phe}$ με καταλυτική υδρογόνωση της οξοομάδας. Η μη ανηγμένη ή μερικώς ανηγμένη οξοομάδα οδηγεί σε οξο- και υδροξυ- παράγωγα της εναλαπρίλης και της λισινοπρίλης, τα οποία εμφανίζονται ως προσμίξεις (Görög, 2000).

Προσμίξεις που προέρχονται από πρώτες ύλες

Οι προσμίξεις στις πρώτες ύλες μπορούν επίσης να γίνουν η πηγή για το σχηματισμό άλλων προσμίξεων σε πολλά φαρμακευτικά προϊόντα. Σε τέτοιες περιπτώσεις, οι προσμίξεις υφίστανται τις ίδιες αντιδράσεις στις ίδιες συνθήκες με αυτές της κύριας φαρμακευτικής ουσίας γεγονός που οδηγεί στον σχηματισμό προσμίξεων. Ένα παράδειγμα αυτού, είναι η εμφάνιση της πρόσμιξης υποκατάστατου αιθυλίου στο φαρμακευτικό σκεύασμα Pramipexole. Αυτό σχηματίζεται από την αντίδραση του προπιονικού ανυδρίτη (II) με την πρώτη ύλη (I) (Εικόνα 3) (Ramachandra, 2016).



Εικόνα 3: Σχηματισμός υποκατάστατου αιθυλίου μέσω της αντίδρασης του προπιονικού ανυδρίτη (II) με την πρώτη ύλη (I) (Ramachandra, 2016).

Προσμίξεις που προέρχονται από τον διαλύτη της αντίδρασης

Σε ορισμένες περιπτώσεις, είτε οι διαλύτες είτε οι προσμίξεις τους θα μπορούσαν να μετασχηματιστούν κατά τη διάρκεια της συνθετικής διαδικασίας οδηγώντας σε ένα πλήθος προσμίξεων στις φαρμακευτικές ουσίες. Για παράδειγμα, κατά την πορεία της σύνθεσης της μηλεϊνικής εναλαπρίλης το πρώτο στάδιο της σύνθεσης είναι μια αντίδραση Friedel-Crafts μεταξύ του βενζολίου και του μηλεϊνικού ανυδρίτη για να σχηματιστεί 1-φαινυλ-1-οξοβουτ-2-ενε-4-οξικό οξύ. Εάν το βενζόλιο χρησιμοποιείται σε μεγάλη περίσσεια ως διαλύτης της αντίδρασης, ίχνη τολουολίου σε αυτό οδηγούν σε ένα παράγωγο 4'-μεθυλίου

του παραπάνω ενδιάμεσου, το οποίο αποτελεί μια πρόσμιξη στο τελικό προϊόν (Göög, 2000).

3.5 Κατευθυντήριες οδηγίες του προφίλ προσμίξεων

Η φαρμακευτική βιομηχανία και οι παγκόσμιες ρυθμιστικές αρχές έχουν από καιρό αναγνωρίσει τη σημασία του ελέγχου των προσμίξεων σε φαρμακευτικές ουσίες και φαρμακευτικά προϊόντα. Η σύνταξη και η υιοθέτηση των ICH Q3A(R), Q3B(R) και Q3C(R) αντιπροσωπεύουν τις κατευθυντήριες οδηγίες σχετικά με τον τρόπο ελέγχου των προσμίξεων στα προϊόντα που διατίθενται στο εμπόριο. Ωστόσο, μια σειρά από σημαντικά ζητήματα δεν αντιμετωπίζονται στις κατευθυντήριες οδηγίες, όπως για παράδειγμα, τα αποδεκτά επίπεδα προσμίξεων στα φάρμακα κατά την ανάπτυξη των φαρμακευτικών προϊόντων και τον έλεγχο γονιδιοτοξικών προσμίξεων. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της ICH, οι προσμίξεις μπορεί να προκύψουν από διάφορα μέρη όπως: οι πρώτες ύλες, τα υποπροϊόντα, τα ενδιάμεσα προϊόντα, τα προϊόντα αποικοδόμησης και αντιδραστήρια. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το Q3A υποδεικνύει ότι οι φαρμακευτικές βιομηχανίες θα πρέπει «να συνοψίσουν τις πραγματικές και τις πιθανές προσμίξεις που είναι πιο πιθανό να προκύψουν κατά τη σύνθεση και την αποθήκευση μιας νέας φαρμακευτικής ουσίας». Ο Πίνακας 1 απεικονίζει μια σειρά ορίων που περιγράφονται στο ICH Q3A(R) τα οποία είναι το όριο αναφοράς, ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης. Τα όρια εξαρτώνται ελάχιστα από την ποσότητα φαρμάκου που καταναλώνει ο ασθενής. Εφόσον η κατανάλωση μεγάλης ποσότητας φαρμακευτικής ουσίας θα σήμαινε επίσης έκθεση σε υψηλότερα επίπεδα προσμίξεων, τα όρια είναι χαμηλότερα όταν η ημερήσια μέγιστη έκθεση είναι μεγαλύτερη από 2g ανά API.

Πίνακας 1: Όρια ανά ενεργό φαρμακευτικό συστατικό (ICH Q3A(R), 2003).

Μέγιστη ημερήσια δόση	Όριο αναφοράς	Όριο ταυτοποίησης	Όριο ποσοτικοποίησης
≤ 2g/ημέρα	0.05%	0.1% ή 1mg/ημέρα	0.15% ή 1mg/ημέρα
> 2g/ημέρα	0.03%	0.05%	0.05%

Όταν μια πρόσμιξη φτάσει στο επίπεδο που απαιτεί «ποσοτικοποίηση», εναπόκειται στον κατασκευαστή του φαρμάκου να διαπιστώσει την ασφάλεια της πρόσμιξης. Στο ICH Q3A(R) αναφέρεται ότι: «Το επίπεδο προσμίξεων που υπάρχει σε μια νέα φαρμακευτική

ουσία και έχει ελεγχθεί επαρκώς σε μελέτες ασφάλειας ή/και κλινικές μελέτες θεωρείται κατάλληλο. Οι προσμίξεις που είναι επίσης σημαντικοί μεταβολίτες που υπάρχουν σε μελέτες σε ζώα ή ανθρώπους θεωρούνται γενικά πιστοποιημένες». Αυτό υποδηλώνει ότι μια πρόσμιξη χαρακτηρίζεται εφόσον υπήρχε στο API που χρησιμοποιείται σε προκλινικές και κλινικές μελέτες σε επίπεδο ίσο ή υψηλότερο από αυτό που βρίσκεται στο προϊόν που διατίθεται στην αγορά. Η κατευθυντήρια οδηγία σημειώνει στη συνέχεια ότι μια πρόσμιξη μπορεί να χαρακτηριστεί ακόμα και αν το επίπεδο στο προϊόν που διατίθεται στην αγορά είναι υψηλότερο από αυτό που χρησιμοποιήθηκε κατά την ανάπτυξη, εφόσον η απόλυτη ποσότητα που δοκιμάστηκε σε αυτές τις μελέτες είναι μεγάλη σε σύγκριση με την έκθεση που προκύπτει από την κατανάλωση του προϊόντος που διατίθεται στο εμπόριο. Για παράδειγμα, ένας μολυσματικός παράγοντας μπορεί να υπάρχει σε ποσοστό 0,05% στη φαρμακευτική ουσία που χρησιμοποιείται στην ανάπτυξη, αλλά βρίσκεται σε ποσοστό 0,1% στη φαρμακευτική ουσία που διατίθεται στο εμπόριο. Εάν υπάρχουν διαθέσιμα τοξικολογικά δεδομένα όπου η πρόσμιξη μελετήθηκε σε υψηλά κλινικά επίπεδα, έτσι ώστε η απόλυτη ποσότητα που δοκιμάστηκε να είναι υψηλή σε σύγκριση με την ποσότητα που καταναλώθηκε κλινικά, μπορεί να θεωρηθεί κατάλληλη.

Το ICH Q3A(R) σημειώνει ότι οι δοκιμές ασφαλείας μπορούν να αποφευχθούν με τη μείωση του επιπέδου των προσμίξεων κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης ή με την παροχή δεδομένων ασφαλείας από τη δημοσιευμένη επιστημονική βιβλιογραφία, ενώ όταν αυτό δεν είναι δυνατό, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί μια σειρά μελετών για να προσδιοριστεί η πρόσμιξη. Η σειρά των μελετών περιλαμβάνει γενικά μια δοκιμασία για γονιδιακές μεταλλάξεις, μια μελέτη για χρωμοσωμικές βλάβες και μια μελέτη γενικής τοξικότητας. Ανάλογα με την κατηγορία της πρόσμιξης, μπορεί επίσης να απαιτηθούν πρόσθετες μελέτες. Στις οδηγίες σημειώνεται επίσης ότι σε ορισμένες περιπτώσεις τα όρια μπορεί να χρειαστεί να οριστούν χαμηλότερα εάν η πρόσμιξη είναι γνωστό ότι ανήκει σε μια ιδιαίτερα τοξική κατηγορία χημικών ουσιών ή μπορεί να οριστούν υψηλότερα, εάν η πρόσμιξη είναι κατηγορίας χημικών που γενικά θεωρείται μη τοξική (ICH Q3A(R), 2003).

Το ICH Q3B(R) αναφέρεται σε προσμίξεις σε νέα φαρμακευτικά προϊόντα που είναι προϊόντα αποικοδόμησης της φαρμακευτικής ουσίας ή προϊόντα αντίδρασης της φαρμακευτικής ουσίας με κάποιο έκδοχο. Η συγκεκριμένη κατευθυντήρια οδηγία δεν αφορά προσμίξεις που προκύπτουν από έκδοχα ενώ δεν ισχύει για προϊόντα που

χρησιμοποιούνται στην ανάπτυξη, δηλαδή σε κλινικές δοκιμές. Εξαιρείται επίσης ένα ευρύ φάσμα προϊόντων που περιλαμβάνει βιοφαρμακευτικά, πεπτίδια, ολιγονουκλεοτίδια, ραδιοφάρμακα, προϊόντα ζύμωσης και ημισυνθετικά προϊόντα που προέρχονται από ακατέργαστα προϊόντα ζωικής ή φυτικής προέλευσης. Η κατευθυντήρια οδηγία δεν ισχύει επίσης για πολυμορφικές μορφές φαρμάκων και εναντιομερείς προσμίξεις.

Τα όρια αναφοράς, ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης των προσμίξεων σε νέα φαρμακευτικά προϊόντα φαίνονται στον Πίνακα 2. Όπως φαίνεται στον πίνακα, οι ποσότητες του φαρμάκου που καταναλώνονται είναι πολύ πιο διαστρωματοποιημένες από τα επίπεδα που καθορίζονται για τις φαρμακευτικές ουσίες. Τα κριτήρια ταυτοποίησης για τις προσμίξεις σε νέα φαρμακευτικά προϊόντα ακολουθούν αυτά που αναφέρονται παραπάνω για τις νέες φαρμακευτικές ουσίες. Ένα προϊόν αποικοδόμησης θεωρείται πιστοποιημένο εάν υπήρχε σε συγκρίσιμα ή υψηλότερα επίπεδα κατά τη διάρκεια μελετών ασφάλειας ή κλινικών μελετών. Επίσης, όπως και στο Q3A(R), κάθε προϊόν αποικοδόμησης που υπάρχει ως σημαντικός μεταβολίτης σε τοξικολογικές ή κλινικές μελέτες θεωρείται πιστοποιημένο. Ομοίως, υψηλότερα επίπεδα μπορεί να υπάρχουν στο προϊόν που διατίθεται στην αγορά, εφόσον η απόλυτη ποσότητα που δοκιμάστηκε σε αυτές τις μελέτες είναι μεγάλη σε σύγκριση με την έκθεση που προκύπτει από την κατανάλωση του προϊόντος που διατίθεται στην αγορά. Οι προσμίξεις που υπάρχουν σε επίπεδα που υπερβαίνουν το όριο ποσοτικοποίησης θα πρέπει να μειωθούν ή να προσδιοριστούν χρησιμοποιώντας δεδομένα από την επιστημονική βιβλιογραφία ή με πραγματικά πειραματικά δεδομένα. Οι τοξικολογικές μελέτες που αναφέρονται στο Q3B(R) είναι πανομοιότυπες με αυτές που αναφέρονται στο Q3A(R) (ICH Q3B(R), 2003).

Πίνακας 2: Όρια για προϊόντα αποικοδόμησης σε νέα φαρμακευτικά προϊόντα (ICH Q3B(R), 2003).

Μέγιστη ημερήσια δόση	Όριο αναφοράς	Όριο ταυτοποίησης	Όριο ποσοτικοποίησης
≤ 1mg/ημέρα	0.1%	1.0% ή 5μg/ημέρα	1.0% ή 50μg/ημέρα
1-10mg	0.1%	0.5% ή 20μg/ημέρα	1.0% ή 50μg/ημέρα
10mg	0.1%	0.5% ή 20μg/ημέρα	0.5% ή 200μg/ημέρα
10-100mg	0.1%	0.2% ή 2mg/ημέρα	0.5% ή 200μg/ημέρα
100mg-1g	0.1%	0.2% ή 2mg/ημέρα	0.2% ή 3mg/ημέρα

1-2g	0.05%	0.2% ή 2mg/ημέρα	0.2% ή 3mg/ημέρα
>2g	0.05%	0.10%	0.15%

Το ICH Q3C ορίζει τις αποδεκτές ποσότητες υπολειμμάτων διαλυτών σε φαρμακευτικά προϊόντα που διατίθενται στο εμπόριο. Όπως και με τις άλλες προσμίξεις που συζητήθηκαν παραπάνω, οι διαλύτες χρησιμοποιούνται στην παρασκευή φαρμακευτικών προϊόντων και συχνά δεν είναι δυνατό να μειωθούν στο τελικό προϊόν σε επίπεδα κάτω από το όριο ανίχνευσης. Όπως και με άλλες προσμίξεις, τα υπολείμματα διαλυτών δεν προσδίδουν κανένα όφελος, παρά μόνο κίνδυνο. Η προσέγγιση που ακολουθείται στην κατευθυντήρια οδηγία Q3C είναι να απαριθμήσει τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους διαλύτες και να τους ταξινομήσει σε μία από τις τρεις ομάδες. Οι διαλύτες κατηγορίας 1 θεωρείται ότι προκαλούν «μη αποδεκτές» τοξικότητες και, εάν είναι δυνατόν, θα πρέπει να αποφεύγονται κατά την παρασκευή φαρμακευτικών ουσιών, εκδόχων και φαρμακευτικών προϊόντων. Αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει χημικές ουσίες που είναι γνωστές ή πιστεύεται ότι είναι καρκινογόνες για τον άνθρωπο ή που είναι γνωστό ότι αποτελούν σημαντικούς περιβαλλοντικούς κινδύνους, για παράδειγμα, βενζόλιο και τετραχλωράνθρακας. Οι διαλύτες κατηγορίας 2 περιγράφονται ως χημικές ουσίες που προκαλούν «λιγότερο σοβαρή τοξικότητα». Παραδείγματα περιλαμβάνουν το χλωροφόρμιο, το διχλωρομεθάνιο και την μεθανόλη. Αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει διαλύτες που έχουν βρεθεί ότι είναι μη γονιδιοτοξικά ζωικά καρκινογόνα, τερατογόνα ή νευροτοξίνες. Περιλαμβάνονται επίσης διαλύτες «ύποπτοι για άλλες σημαντικές αλλά αναστρέψιμες τοξικότητες». Οι διαλύτες κατηγορίας 3 θεωρούνται οι λιγότερο τοξικοί και πρέπει να χρησιμοποιούνται όποτε είναι πρακτικό. Το επίπεδο των μολυσματικών διαλυτών μπορεί να καθοριστεί με έναν από τους δύο τρόπους: το φαρμακευτικό προϊόν μπορεί να δοκιμαστεί απευθείας ή η σωρευτική ποσότητα μπορεί να προκύψει από το άθροισμα των επιπέδων σε κάθε συστατικό. Όπως και με τις άλλες κατευθυντήριες οδηγίες, το Q3C αφορά μόνο προϊόντα που διατίθενται στην αγορά, όχι υλικά που χρησιμοποιούνται σε κλινικές δοκιμές (ICH Q3C(R), 2003).

Οι στοιχειακές προσμίξεις μπορεί να προκύψουν από υπολείμματα μετάλλων που προστίθενται σκόπιμα στη σύνθεση ή μπορεί να υπάρχουν ως προσμίξεις π.χ. μέσω αλληλεπιδράσεων με τον εξοπλισμό επεξεργασίας ή από την παρουσία τους σε συστατικά του φαρμακευτικού προϊόντος. Επειδή οι στοιχειακές προσμίξεις δημιουργούν τοξικολογικές ανησυχίες και δεν παρέχουν κανένα θεραπευτικό όφελος στον ασθενή, τα

επίπεδα τους στα φαρμακευτικά προϊόντα θα πρέπει να ελέγχονται εντός αποδεκτών ορίων. Τα συνιστώμενα μέγιστα αποδεκτά όρια συγκέντρωσης για τα υπολείμματα μετάλλων ή αντιδραστηρίων που ενδέχεται να υπάρχουν σε φαρμακευτικά προϊόντα έχουν εκδοθεί από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMA). Μια άλλη ταξινόμηση των στοιχειακών προσμίξεων με τις οποίες πρέπει να συμμορφώνεται η φαρμακοβιομηχανία ορίστηκε πρόσφατα στο ICH Q3D. Σύγκριση της ταξινόμησης υπολειμμάτων μετάλλων ή στοιχειακών προσμίξεων σε φαρμακευτικά προϊόντα όπως ορίζεται από τον EMA και το ICH παρουσιάζονται στην Εικόνα 4 (Liu & Chen, 2019).

Li	Be	Element		B	C	N	O								
-	-	Classification of EMA		-	-	-	-								
Class 3	-	Classification of ICH Q3D		Other	-	-	-								
Na	Mg			Al	Si	P	S								
-	-			-	-	-	-								
Other	Other			Other	-	-	-								
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se
-	-	-	-	Class 1C	Class 1C	Class 2	Class 3	-	Class 1C	Class 2	Class 3	-	-	-	-
Other	Other	-	-	Class 2A	Class 3	Other	Other	Class 2A	Class 2A	Class 3	Other	-	-	Class 1	Class 2B
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te
-	-	-	-	-	Class 1C	-	Class 1B	Class 1B	Class 1A	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	Class 3	-	Class 2B	Class 2B	Class 2B	Class 2B	Class 1	-	Class 3	Class 3	-
Cs	Ba	Lu	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po
-	-	-	-	-	-	-	Class 1B	Class 1B	Class 1A	-	-	-	-	-	-
-	Class 3	-	-	-	Other	-	Class 2B	Class 2B	Class 2B	Class 2B	Class 1	Class 2B	Class 1	-	-

Εικόνα 4: Σύγκριση για την ταξινόμηση υπολειμμάτων μετάλλων και στοιχειακών προσμίξεων σε φαρμακευτικά προϊόντα σύμφωνα με τις απαιτήσεις των EMA και ICH Q3D (Liu & Chen, 2019).

Συγκεκριμένα, έχουν προταθεί τα όρια συγκεντρώσεων για 14 μέταλλα σε δραστικές ουσίες ή έκδοχα τα οποία είναι διαφορετικά όταν αφορούν από του στόματος χορήγηση ή ενέσιμα φαρμακευτικά σκευάσματα (Πίνακα 3) (Prajapati & Agrawal, 2014).

Πίνακας 3: Όρια ανόργανων προσμίξεων σε από του στόματος και ενέσιμα φαρμακευτικά σκευάσματα (Prajapati & Agrawal, 2014).

Τάξη μετάλλων	Από του στόματος χορήγηση		Ενέσιμα	
	PDE (μg/ημέρα)	Συγκέντρωση (ppm)	PDE (μg/ημέρα)	Συγκέντρωση (ppm)
Class 1A: Pt, Pd	100	10	10a	1
Class 1B: Ir, Rh, Ru, Os	100b	10b	10b	1b
Class 1C: Mo, Ni, Cr, V	300	30	30a	3a
Class 2: Cu, Mn	2500	250	250	25
Class 3: Fe, Zn	13000	1300	1300	130

Όσον αφορά τα όρια ελέγχου των υπολειμμάτων διαλυτών, οι διάφορες ρυθμιστικές αρχές μεταξύ των οποίων η USP, BP και EP, έχουν θέσει διαφορετικά όρια ανάλογα με την κατηγορία στην οποία εμπίπτουν (Πίνακας 4 & Πίνακας 5) (ICH Q3C(R6), 2016).

Πίνακας 4: Διαλύτες κατηγορίας 1 σε φαρμακευτικά προϊόντα (ICH Q3C(R6), 2016).

Διαλύτης	Όριο ποσοτικοποίησης (ppm)	
Βενζόλιο	2	Καρκινογόνο
Τετραχλωριούχος άνθρακας	4	Τοξικό και Περιβαλλοντικός κίνδυνος
1,2-Διχλωροαιθάνιο	5	Τοξικό
1,1-Διχλωροαιθένιο	8	Τοξικό
1,1,1-Τριχλωροαιθάνιο	150	Περιβαλλοντικός κίνδυνος

Πίνακας 5: Διαλύτες κατηγορίας 2 σε φαρμακευτικά προϊόντα (ICH Q3C(R6), 2016).

Διαλύτης	PDE (μg/ημέρα)	Συγκέντρωση (ppm)
Ακετονιτρίλιο	4.1	410

Χλωροβενζένιο	3.6	360
Χλωροφόρμιο	0.6	60
Κυκλοεξάνιο	38.8	3880
1,2-Διχλωροαιθέριο	18.7	1870
Διχλωρομεθάνιο	6.0	600
Φορμαμίδιο	2.2	220
Εξάνιο	2.9	290
Μεθανόλη	30.0	3000
Νιτρομεθάνιο	0.5	50
Τολουένιο	8.9	890

Οι διαλύτες της κατηγορίας 3, μπορεί να θεωρηθούν λιγότερο τοξικοί και με χαμηλότερο κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Ωστόσο, δεν υπάρχουν μελέτες μακροπρόθεσμης τοξικότητας ή καρκινογένεσης για πολλούς από τους διαλύτες αυτής της κατηγορίας. Τα διαθέσιμα δεδομένα δείχνουν ότι είναι λιγότερο τοξικοί σε οξείες ή βραχυπρόθεσμες μελέτες και αρνητικοί στις μελέτες γονοτοξικότητας. Θεωρείται ότι ποσότητες αυτών των υπολειμμάτων διαλυτών των 50 mg ημερησίως ή λιγότερο (που αντιστοιχούν σε 5000 ppm ή 0,5%) είναι εντός των αποδεκτών ορίων (ICH Q3C(R6), 2016). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι εξής διαλύτες: 1-βουτανόλη, οξικός μεθυλεστέρας, 1-πεντανόλη, αιθανόλη, επτάνιο, 1-προπανόλη, οξικός προπυλεστέρας, οξικός αιθυλεστέρας, 2-βουτανόλη, 3-μεθυλ-1-βουτανόλη, 2-προπανόλη, οξικό οξύ, μορφότυπο αιθυλίου, κουμένιο, πεντάνιο, μυρμηκικό οξύ, οξικός βουτυλεστέρας και διμεθυλοσουλφοξείδιο (Prajapati & Agrawal, 2014).

Τέλος, οι υφιστάμενες κατευθυντήριες γραμμές του ICH δεν παρέχουν αποδεκτά τοξικολογικά όρια γενοτοξικών προσμίξεων στα φαρμακευτικά προϊόντα. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια κλινικών δοκιμών, ορισμένα δεδομένα αποσαφηνίζουν την επιτρεπόμενη ημερήσια δόση, και συνοψίζονται στον Πίνακα 6 (Prajapati & Agrawal, 2014).

Πίνακας 6: Επιτρεπόμενο όριο ημερήσιας πρόσληψης γενοτοξικών προσμίξεων κατά την διάρκεια κλινικών δοκιμών (Prajapati & Agrawal, 2014).

Διάρκεια έκθεσης				
≤ 1 μήνα	> 1–3 μήνες	> 3–6 μήνες	> 6–12 μήνες	> 12 μήνε

Επιτρεπόμενη ημερήσια πρόσληψη (μg/ημέρα) για όλες τις φάσεις ανάπτυξης του φαρμακευτικού σκευάσματος	120	40	20	10	1.5
Μέγιστο ποσοστό προσμίξεων στα API	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%

4. Διαχωρισμός και προσδιορισμός προσμίξεων και προϊόντων αποικοδόμησης με γνωστή δομή

Το προφίλ προσμίξεων και προϊόντων αποικοδόμησης ξεκινά με την ανίχνευση και τη διαλεύκανση της δομής των προσμίξεων και των προϊόντων αποικοδόμησης και ακολουθείται από την ανάπτυξη εκλεκτικών μεθόδων για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους. Εάν η δομή τους, ωστόσο, είναι γνωστή, πρότυπα αυτών είναι διαθέσιμα, με το αναλυτικό έργο να περιορίζεται στην ανάπτυξη χρωματογραφικών ή σχετικών μεθόδων για τον διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των προσμίξεων και των προϊόντων αποικοδόμησης νέων φαρμάκων ή στη βελτίωση της εξειδίκευσης, της ακρίβειας και της πιστότητας της μεθόδου καθώς και τη μείωση του χρόνου ανάλυσης για εμπορικά φαρμακευτικά σκευάσματα.

4.1 Μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

4.1.1 Μέθοδοι με φασματοφωτομετρική ανίχνευση UV

Στη συντριπτική πλειονότητα των περιπτώσεων, έχει αναφερθεί η χρήση HPLC αντίστροφης φάσης (RP) με ανιχνευτή UV για την βελτίωση της εξειδίκευσης, της ακρίβειας και της πιστότητας της μεθόδου. Ένα από τα πολλά παραδείγματα είναι ο προσδιορισμός των προϊόντων αποικοδόμησης στις οφθαλμικές σταγόνες αζιθρομυκίνης. Στην συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε στήλη Dikma Technologies Diamonsil C₁₈, 5

μm, 150 mm×4,6 mm και 1-σουλφονικό οξύ άλας νατρίου ως αντιδραστήριο ζεύγους ιόντων. Ειδικότερα, το ιόν που χρησιμοποιείται ενώνεται με το ιόν του αναλύτη και σχηματίζει ένα ουδέτερο ζεύγος ιόντων, το οποίο κατακρατείται από το υλικό πλήρωσης της στήλης αντίστροφης φάσης. Ο διαχωρισμός και η ποσοτικοποίηση στην συγκεκριμένη μελέτη ήταν επαρκής, με τον χρόνο εκτέλεσης να είναι 25 λεπτά (Yang et al., 2009). Παρόμοια διάρκεια, 20 λεπτά, βρέθηκε όταν μια στήλη Waters Xterra RP18 (5 μm, 250 mm×4,6 mm) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των πιθανών προσμίξεων στο ενεργό φαρμακευτικό συστατικό φαμπριδίνης (Thomas et al., 2016). Σε επόμενη μελέτη αξιολογήθηκε η χρήση χρωματογραφίας ζεύγους ιόντων για τον προσδιορισμό των προσμίξεων της L-ασπαραγίνης. Προκειμένου να μειωθεί ο χρόνος ανάλυσης εφαρμόστηκε μια βραχύτερη στήλη και ο ρυθμός ροής αυξήθηκε έως και 1,5 mL/min, ωστόσο, σε όλες τις περιπτώσεις ο διαχωρισμός των προσμίξεων δεν ήταν επαρκής. Τελικά μια στήλη 250mm x 4,6mm, 5μm και ρυθμό ροής 0,7 mL/min έδωσε τον καλύτερο διαχωρισμό όλων των ενώσεων (Schilling et al., 2016).

Η χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC), στην οποία η επιφάνεια του πυριτίου της στατικής φάσης καλύπτεται με ομάδες διόλης για να αυξηθεί η επιλεκτικότητα στην ανάλυση πολικών ενώσεων, χρησιμοποιείται συχνά στον διαχωρισμό και τον προσδιορισμό των προσμίξεων στα φάρμακα (Olsen & Pack, 2012). Αυτή η τεχνική χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για τον διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των προσμίξεων σε φαρμακευτικό σκεύασμα μετοπρολόλης. Συγκεκριμένα, οι προσμίξεις της μετοπρολόλης, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία (EP), M και N είναι πολικές υδροξυαμίνες, οι οποίες κατακρατούνται ελάχιστα σε ένα συμβατικό χρωματογραφικό σύστημα αντίστροφης φάσης και δεν ανιχνεύονται με ανιχνευτή UV. Οι προσμίξεις M και N αναλύονται επί του παρόντος με μεθόδους TLC σύμφωνα με την EP ως γνωστές προσμίξεις ενώ σύμφωνα με την USP ως άγνωστες προσμίξεις. Προκειμένου να εκσυγχρονιστούν οι μονογραφίες της USP των φαρμακευτικών ουσιών μετοπρολόλης και των σχετικών φαρμακευτικών προϊόντων, διερευνήθηκε μια μέθοδος χρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC) συζευγμένη με έναν ανιχνευτή φορτισμένου αερούματος (CAD). Ο διαχωρισμός της μετοπρολόλης και των προσμίξεων M και N επιτεύχθηκαν εντός σύντομου χρονικού πλαισίου (<8 λεπτά). Η μέθοδος HILIC-CAD στη συνέχεια επικυρώθηκε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες επικύρωσης της USP σε σχέση με την ειδικότητα, την ανθεκτικότητα, τη γραμμικότητα, την ακρίβεια και την

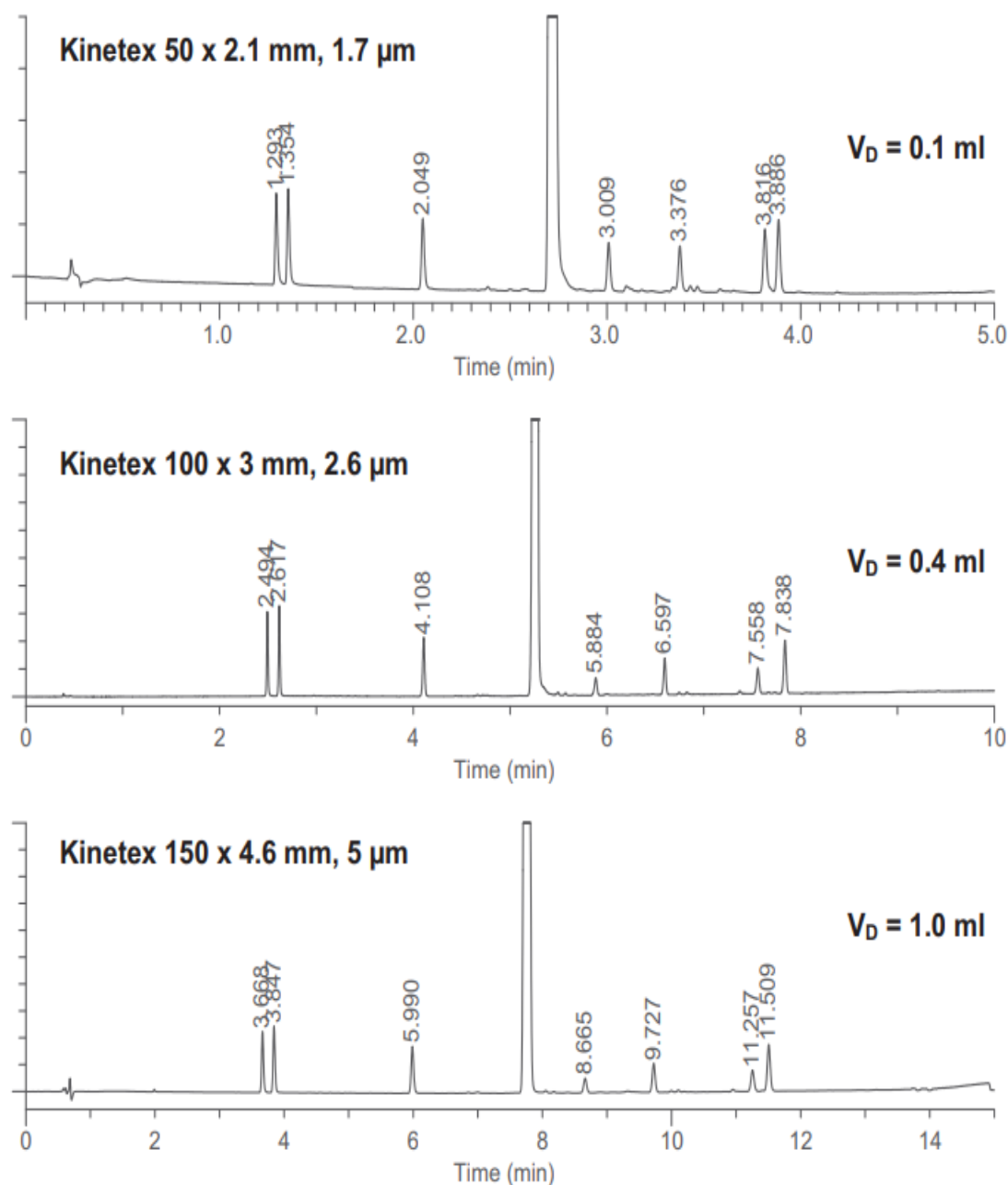
πιστότητα και θα μπορούσε να ενσωματωθεί στις τρέχουσες μονογραφίες της USP για να αντικαταστήσει τις απαρχαιωμένες μεθόδους TLC. Επιπλέον, η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόστηκε με επιτυχία για τον προσδιορισμό των οργανικών προσμίξεων σε δισκία παρατεταμένης αποδέσμευσης μετοπρολόλης (Xu et al., 2016).

Συμπερασματικά, σε σύγκριση με την συμβατικά χρησιμοποιούμενη χρωματογραφία ανάστροφης φάσης η οποία δεν θεωρείται κατάλληλη για ανάλυση πολύ πολικών αναλυτών η υδρόφιλη χρωματογραφία αλληλεπίδρασης (HILIC) είναι κατάλληλη για την ανάλυση πολικών μικρών μορίων καθώς λαμβάνεται καλό σχήμα κορυφής για βασικές ενώσεις, η σειρά έκλουσης των αναλυόμενων ουσιών είναι διαφορετική και αντίθετη από αυτή που του διαχωρισμού με χρωματογραφία ανάστροφης φάσης, επομένως άλλες λιγότερο πολικές προσμίξεις της μετοπρολόλης όπως τα A-D θα μπορούσαν εύκολα να διαχωριστούν από τις προσμίξεις M και N, ενώ είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν υψηλοί ρυθμοί ροής λόγω της υψηλής οργανικής περιεκτικότητας και, επομένως, του χαμηλότερου ιξώδους των κινητών φάσεων (Xu et al., 2016).

Η πιο σημαντική ανάπτυξη της HPLC την τελευταία δεκαετία είναι ότι έχουν αναπτυχθεί και διαδοθεί ευρέως νέες στατικές φάσεις, οι οποίες χρησιμοποιούνται στα πλαίσια των εφαρμογών της Υγρής Χρωματογραφίας Υπερυψηλής Απόδοσης (UHPLC) ή UPLC. Αυτές αποτελούνται από πορώδη σωματίδια μικρότερα των 2 μm και σωματίδια τεχνολογίας πυρήνας-κέλυφος (core-shell) μικρότερα των 3 μm ως στατικές φάσεις, αντικαθιστώντας με την πάροδο του χρόνου τα σωματίδια των 5 μm που χρησιμοποιούνται γενικά για δεκαετίες μετά την εισαγωγή της HPLC στη φαρμακευτική ανάλυση. Αυτές οι αλλαγές βελτιώνουν την ευαισθησία των φαρμακευτικών αναλύσεων, ωστόσο η πιο σημαντική αλλαγή είναι η δυνατότητα δραστηκής μείωσης του χρόνου εκτέλεσης (Russo et al., 2008; Fekete et al., 2012).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν μελέτες που αφορούν τη σύγκριση στηλών κλασικού και νέου τύπου και τη βελτιστοποίηση της ανάλυσης των προσμίξεων και του χρόνου εκτέλεσης, χρησιμοποιώντας κατάλληλα λογισμικά. Συγκεκριμένα σε μία μελέτη, συγκρίθηκαν στήλες Kinetex των 1,3, 1,7, 2,6 και 5 μm με επιφανειακά πορώδη σωματίδια (Phenomenex, Torrance, ΗΠΑ) και χρησιμοποιώντας το λογισμικό Drylab συγκρίθηκε η βέλτιστη ανάλυση και ο χρόνος εκτέλεσης με άλλες στήλες. Σε αυτή τη μελέτη, αναπτύχθηκε μια μέθοδος υψηλής απόδοσης για τον προσδιορισμό της λοραταδίνης και 7

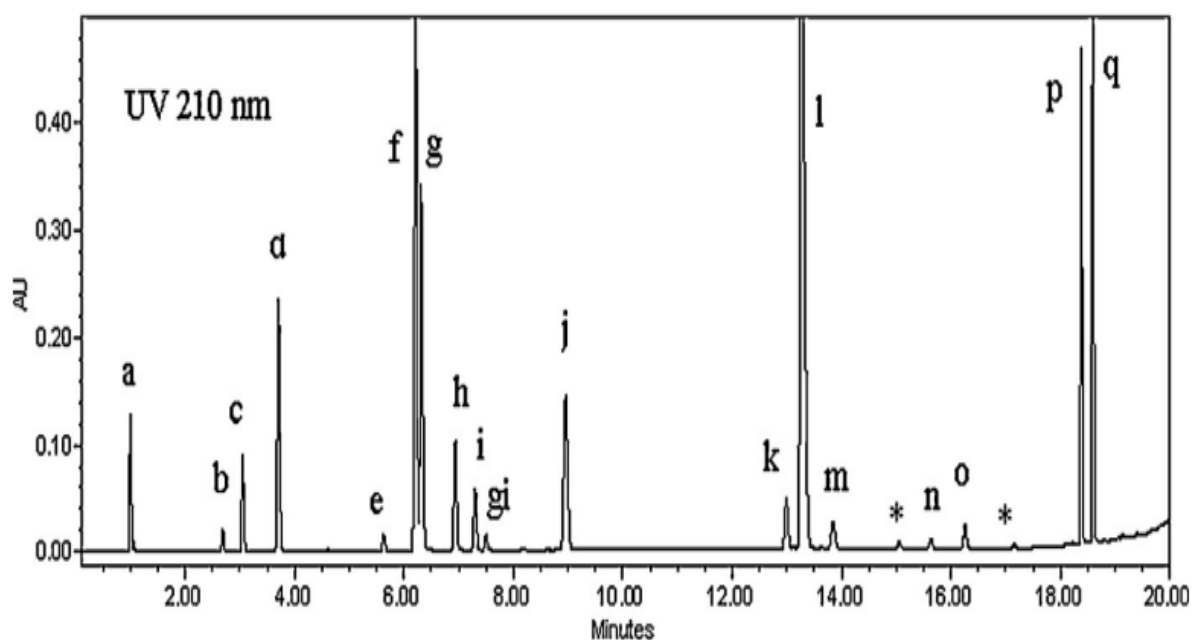
σχετικών προσμίξεων, χρησιμοποιώντας στατικές φάσεις τελευταίας τεχνολογίας με επιφανειακά πορώδη σωματίδια κάτω των 2 μm . Ο βέλτιστος διαχωρισμός επιτεύχθηκε με μια στήλη 50 mm \times 2,1 mm, 1,3 μm , χρησιμοποιώντας βαθμιδωτή έκλυση από 10 έως 90% ACN σε 5 λεπτά, σε θερμοκρασία 40 $^{\circ}\text{C}$, pH 3 και ταχύτητα ροής της κινητής φάσης 0,5 ml/min. Ως αποτέλεσμα αυτού, ο χρόνος εκτέλεσης των 50 λεπτών της μεθόδου της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας για προσμίξεις που σχετίζονται με τη λορατιδίνη μειώθηκε σε λιγότερο από 4 λεπτά. Η Εικόνα 5 δείχνει τα πειραματικά παρατηρούμενα χρωματογραφήματα σε τρεις διαφορετικές στήλες και συστήματα. Η διαχωριστική ικανότητα των στηλών ήταν ισοδύναμη, καθώς όλες εξασφάλιζαν επαρκή διαχωρισμό μεταξύ όλων των ζευγών κορυφών (Kormány et al., 2014).



Εικόνα 5: Σύγκριση του διαχωρισμού της λοραταδίνης και των επτά σχετικών προσμίξεων της PhEur σε στήλες Kinetex C₁₈ 50 mm × 2,1 mm, 1,7 μ m, 100 mm × 3 mm, 2,6 μ m και 150 mm × 4,6 mm, 5 μ m. Ο ρυθμός ροής ρυθμίστηκε σε 0,5 ml/min, 1 ml/min και 2,4 ml/min στις στήλες 50 mm × 2,1 mm, 100 mm × 3 mm και 150 mm × 4,6 mm, αντίστοιχα. Η βαθμιδωτή έκλυση πραγματοποιήθηκε σε 5, 10 και 15 λεπτά. Κινητή φάση A: ρυθμιστικό διάλυμα διόξινο φωσφορικού νατρίου 30 mM, κινητή φάση B: ακετονιτρίλιο (Kormány et al., 2014).

Μερικά από τα πολλά παραδείγματα για τη χρήση της U(H)PLC στο προφίλ προσμίξεων ναρκωτικών είναι ο προσδιορισμός προσμίξεων και προϊόντων αποικοδόμησης στην

ηρωίνη. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 6, οι βασικές προσμίξεις και οι κοινές ενώσεις νόθευσης της ηρωίνης όπως η θειαμίνη, η προκαΐνη, η ακεταμινοφαίνη, η καφεΐνη, η κινίνη, η λιδοκαΐνη, η κοκαΐνη, η διφαινυδραμίνη και η διλτιαζέμη διαχωρίζονται επαρκώς, με εξαιρετικά σχήματα κορυφής σε λιγότερο από 20 λεπτά, σε αντίθεση με την HPLC όπου απαιτείται χρόνος εκτέλεσης 1 ώρας ενώ με τη χρήση CE, απαιτείται συνολικός χρόνος λειτουργίας 35 λεπτών (Lurie et al., 2013)



Εικόνα 6: Διαχωρισμός των προσμίξεων και των προϊόντων αποικοδόμησης της ηρωίνης με UHPLC και στήλη Acquity BEH C₁₈ 1,7 μm x 150 mm x 2,1 mm (a) θειαμίνη (0,040 mg/mL), (b) μορφίνη (0,002 mg/mL), (c) προκαΐνη (0,040 mg/mL), (d) ακεταμινοφαίνη (0,040 mg/mL), (e) κωδεΐνη (0,002 mg/mL), (f) καφεΐνη (0,040 mg/mL), (g) κινίνη (0,040 mg/mL), (gi) προσμίξεις κινίνης, (h) O3-μονοακετυλομορφίνη (0,020 mg/mL), (i) O6-μονοακετυλομορφίνη (0,009 mg/mL), (j) λιδοκαΐνη (0,040 mg/mL), (k) ακετυλκωδεΐνη (0,010 mg/mL), (l) ηρωίνη (0,020 mg/mL), (m) κοκαΐνη (0,020 mg/mL), (n) παπαβερίνη (0,002 mg/mL), (o) νοσκαπίνη (0,002 mg/mL), (p) διφαινυδραμίνη (0,020 mg/mL), (q) διλτιαζέμη (0,020 mg/mL) (Lurie et al., 2013).

4.1.2 Μέθοδοι με ανιχνευτές που βασίζονται σε αερολύματα

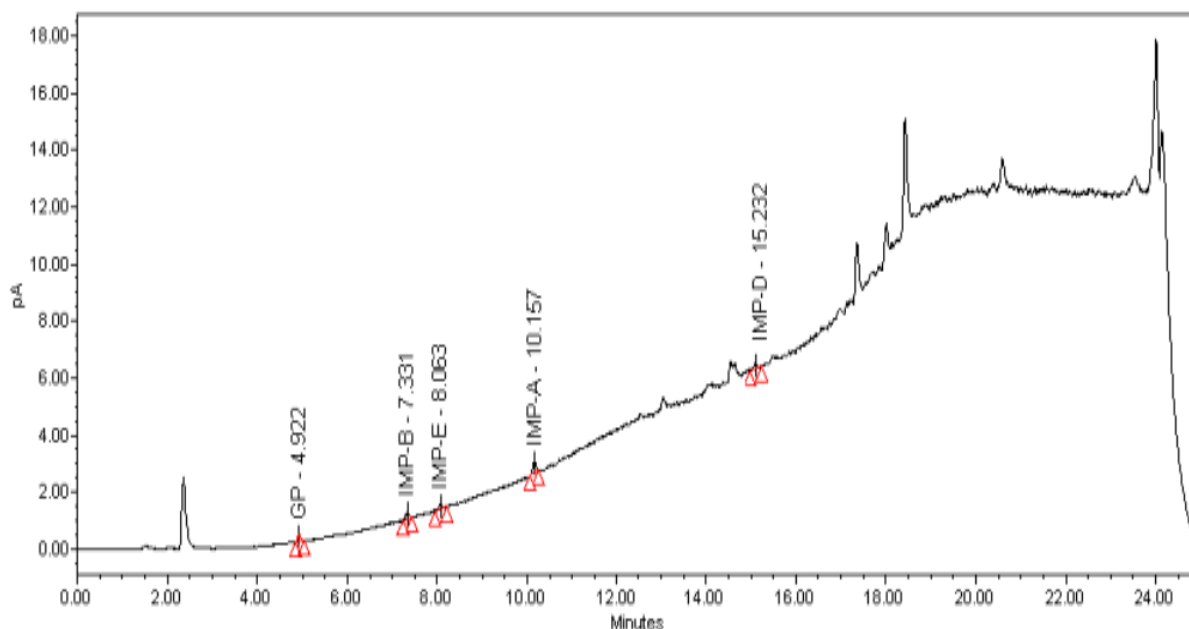
Ένα σημαντικό ποσοστό φαρμακευτικών σκευασμάτων στερείται απορρόφησης στην υπεριώδη ακτινοβολία, οδηγώντας σε ελλιπή προφίλ προσμίξεων. Για την ανάλυση HPLC αυτών των ενώσεων διατίθενται ανιχνευτές που βασίζονται σε αερολύματα (Magnusson et

al., 2015). Το αναλυτικό σήμα που παράγεται από αυτούς τους ανιχνευτές βασίζεται στη νεφελοποίηση των εκροών της HPLC, στην εξάτμιση, ξήρανση των σχηματιζόμενων σταγονιδίων και στη μέτρηση των στερεών σωματιδίων των αναλυτών με διαφορετικές μεθόδους. Ο ανιχνευτής, που χρησιμοποιείται συχνά στη διαμόρφωση του προφίλ προσμίξεων φαρμάκων είναι ο εξατμιστικός ανιχνευτής σκέδασης φωτός (ELSD) που βασίζεται στη μέτρηση του φωτός που σκεδάζεται από τα σωματίδια. Αυτή η τεχνική χρησιμοποιείται έως και σήμερα, για το προφίλ προσμίξεων της φονταπαρινόξης, μίας ηπαρίνης χαμηλού μοριακού βάρους. Δεδομένης της πολυπλοκότητας της δομής της φονταπαρινόξης, πολλές προσμίξεις μπορούν να σχηματιστούν κατά τη διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας, οι οποίες πρέπει να ελεγχθούν σε ένα αποδεκτό όριο. Καθώς η φονταπαρινόξη είναι μόριο χαμηλής απορρόφησης στην υπεριώδη ακτινοβολία, καθώς δεν υπάρχει καμία ελεύθερη ομάδα $-OH$ στο αναγωγικό άκρο, η επιλογή ανιχνευτών UV για την μελέτη των προσμίξεων της δεν είναι δυνατή. Επιπλέον, η φονταπαρινόξη και οι δομικά σχετικές προσμίξεις δεν μπορούν να διαχωριστούν σε συνθήκες ισοκρατικής έκλουσης, επομένως οι ανιχνευτές δείκτη διάθλασης αποκλείονται λόγω της μη συμβατότητάς τους με το πρόγραμμα βαθμίδωτης έκλουσης. Επομένως, για την μελέτη του προφίλ προσμίξεων της φονταπαρινόξης επιλέγεται η ELSD με κινητή φάση που είναι ένα μείγμα οξικού οξέος και αμίνης, το οποίο είναι πτητικό στη φύση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον ανιχνευτή ELSD (Deshpande et al., 2016). Η σχετικά χαμηλή ευαισθησία, η μη γραμμική απόκριση του ανιχνευτή και η εμφάνιση μη αναπαραγώγιμων κορυφών σε υψηλές συγκεντρώσεις αναλυόμενης ουσίας είναι σαφείς περιορισμοί του ELSD. Επομένως, αυτός ο ανιχνευτής δεν είναι απαραίτητα η καταλληλότερη επιλογή για φαρμακευτικές εφαρμογές όπως ο έλεγχος προσμίξεων, όπου συνήθως χρησιμοποιούνται υψηλές συγκεντρώσεις αναλυόμενης ουσίας και η υψηλή ευαισθησία είναι βασική απαίτηση για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των σχετικών προσμίξεων που συχνά υπάρχουν κάτω από το 0,1% συγκέντρωση στο δείγμα (Almeling et al., 2012).

Μια νεότερη παραλλαγή των ανιχνευτών που βασίζονται σε αερολύματα, ο ανιχνευτής φορτισμένου αερολύματος (Charged Aerosol Detector, CAD), πλεονεκτεί έναντι των ELSD καθώς εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία, γεγονός που τον κάνει κατάλληλο για τον προσδιορισμό του προφίλ προσμίξεων σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Σε αυτή την τεχνική τα σωματίδια λαμβάνουν αρνητικό φορτίο και τα φορτισμένα σωματίδια μετρώνται με την

βοήθεια ενός ηλεκτρόμετρου (ανιχνευτής ηλεκτρικού φορτίου ή διαφοράς δυναμικού) (Almeling et al., 2012).

Μερικές από τις εφαρμογές του ανιχνευτή CAD είναι το προφίλ προσμίξεων της γκαμπαπεντίνης (Ragham & Chandrasekhar, 2016) και της μετοπρολόλης (Xu et al., 2016). Συγκεκριμένα, η USP έχει δημοσιεύσει μια μονογραφία για τη γκαμπαπεντίνη, η οποία χρησιμοποιεί δύο μεθόδους για την ανάλυση της γκαμπαπεντίνης και των τεσσάρων σχετικών προσμίξεων της. Καθώς η γκαμπαπεντίνη είναι ασθενώς χρωμοφόρα ένωση και έχει μικρή απορρόφηση στην υπεριώδη ακτινοβολία, η συγκέντρωση δείγματος που αναφέρεται στη USP είναι 15 mg/mL, η οποία είναι πολύ υψηλή και δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε ασθενώς χρωμοφόρες προσμίξεις. Στην συγκεκριμένη μελέτη όλες οι ενώσεις εκλούστηκαν και διαχωρίστηκαν επαρκώς (Εικόνα 7), σε συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης με στήλη Kinetix Biphenyl (4,6 mm × 250 mm, 5 μm), με ρυθμό ροής 1,0 mL/min στους 25 °C και χρόνο εκτέλεσης 25 λεπτά. Η βελτιστοποιημένη μέθοδος επικυρώθηκε ως προς την ακρίβεια, την πιστότητα και την γραμμικότητα σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της ICH (Ragham & Chandrasekhar, 2016).



Εικόνα 7: Βαθμιδωτή έκλουση με στήλη Kinetix Biphenyl (4,6 × 250 mm, 5 μm), ρυθμό ροής 1,0 mL/min στους 25 °C και χρόνο εκτέλεσης 25 λεπτά της γκαμπαπεντίνης και των σχετικών προσμίξεων με ανιχνευτή CAD (Ragham & Chandrasekhar, 2016).

4.1.3 Μέθοδοι με άλλους ανιχνευτές

Οι μέθοδοι ηλεκτροχημικής ανίχνευσης έχουν μικρή σημασία στο προφίλ προσμίξεων φαρμάκων με HPLC. Ως παραδείγματα αναφέρονται το προφίλ προσμίξεων του βρωμιούχου πιπεκουρονίου με χρήση ανίχνευσης συστοιχίας ηλεκτροδίων κυκλομετρίας (Blazewicz et al., 2008) και της τομπραμυκίνης με παλμική ηλεκτροχημική ανίχνευση (Manyanga et al., 2013). Ο ανιχνευτής δείκτη διάθλασης (RI) ήταν μεταξύ των πιο διαδεδομένων ανιχνευτών στην πρώιμη φάση ανάπτυξης της HPLC. Λόγω της χαμηλής ευαισθησίας της, αυτή η τεχνική δεν χρησιμοποιείται συχνά για τον προσδιορισμό του προφίλ προσμίξεων φαρμάκων. Σε αντίθεση με αυτό, η φασματομετρία μάζας συζευγμένη με HPLC (HPLC-MS) είναι η πιο ανεπτυγμένη και διαδεδομένη μέθοδος σε αυτόν τον τομέα. Δεδομένου ότι στην πλειονότητα αυτών των περιπτώσεων το MS χρησιμοποιείται επίσης για την αναγνώριση/διασαφήνιση της δομής των προσμίξεων, η χρήση αυτής της τεχνικής θα συζητηθεί αναλυτικά στο επόμενο κεφάλαιο 5.

4.2 Αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC)

Δεδομένου ότι οι δυνατότητες χρήσης αέριας χρωματογραφίας περιορίζονται σε σχετικά μικρά μόρια και λιγότερο πολικές, πτητικές ενώσεις, η εφαρμογή αυτής της μεθόδου για το προφίλ προσμίξεων δεν είναι τόσο διαδεδομένη όσο της HPLC. Στην πλειονότητα των εφαρμογών η GC είναι συζευγμένη με MS και για αυτόν τον λόγο τα παραδείγματα για αυτή συζητούνται στο Κεφάλαιο 5.

Πριν από δεκαετίες, όταν η GC συζευγμένη με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detector, FID) ήταν η κύρια μέθοδος για τη δημιουργία προφίλ προσμίξεων, οι δυνατότητες χρήσης της επεκτάθηκαν μέσω της παραγωγοποίησης των πολικών λειτουργικών ομάδων των αναλυόμενων ουσιών. Συγκεκριμένα, οι ατμοί των προς ανάλυση ενώσεων καθώς εξέρχονται από τη στήλη ατμοποιούνται σε φλόγα υδρογόνου, δημιουργώντας ηλεκτρικούς φορείς που κάνουν τη φλόγα ηλεκτρικά αγωγική. Η παραγωγοποίηση εξακολουθεί να είναι μια χρήσιμη μέθοδος πριν από τον προσδιορισμό του GC-FID και τον προσδιορισμό του προφίλ προσμίξεων των παράνομων ναρκωτικών (Molnár & Molnár-Perl, 2015). Το GC-FID εξακολουθεί να είναι μια σημαντική μέθοδος για τον προσδιορισμό και το προφίλ προσμίξεων αμφεταμινών, π.χ. της μεθαμφεταμίνης στην εγκληματολογία (Lee et al., 2016).

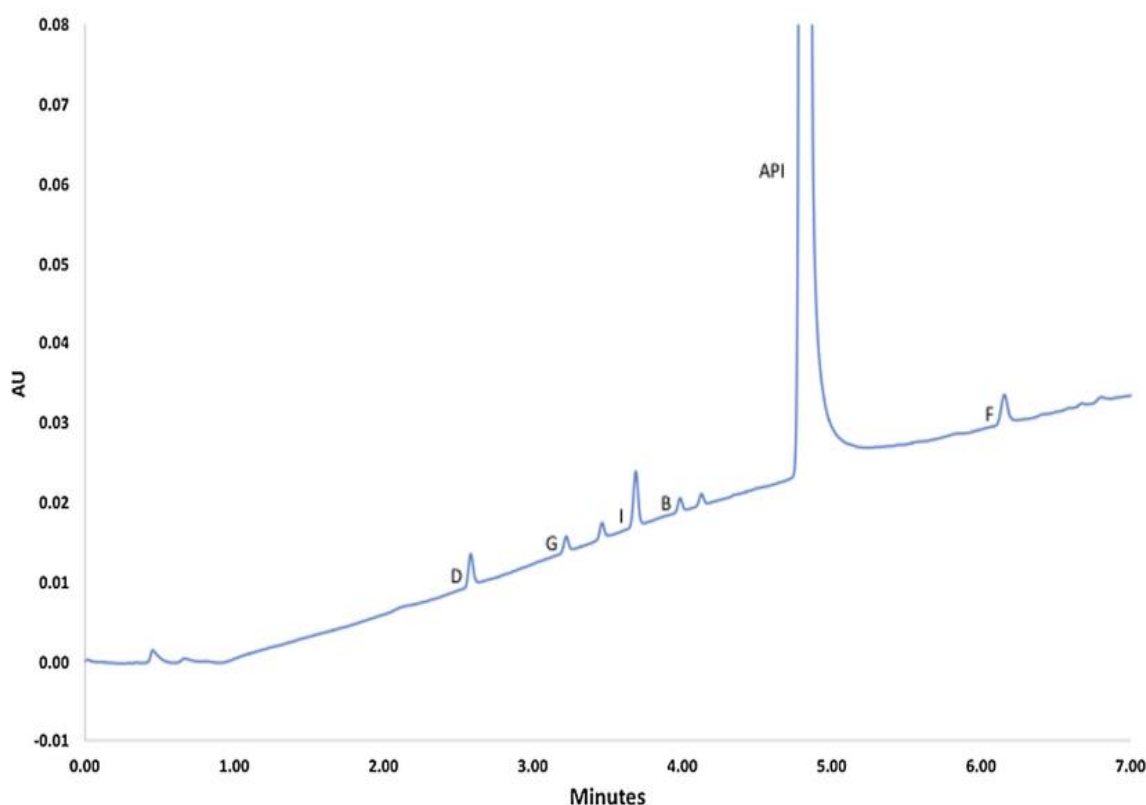
Ένα άλλο πεδίο εφαρμογής αυτής της μεθόδου είναι η ανάλυση των ενδιάμεσων ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους των συνθέσεων των φαρμακευτικών προϊόντων. Συγκεκριμένα, στην μελέτη των Tang et al., αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μία μέθοδος για την ανάλυση των προσμίξεων του 5-χλωροβαλεροϋλοχλωρίδιο (5-CVC). Το 5-CVC χρησιμοποιείται συνήθως ως αλκυλιωτικός παράγοντας στη σύνθεση φαρμακευτικών ενδιάμεσων, δραστικών ενώσεων, καθώς και άλλων χημικών ουσιών. Είναι κρίσιμο να εξετάζονται οι προσμίξεις που εντοπίζονται στο 5-CVC καθώς μπορεί να έχουν άμεσο αντίκτυπο στο προφίλ προσμίξεων και στην ποιότητα του τελικού προϊόντος. Η τελική μέθοδος χρησιμοποιεί μεθανόλη για παραγωγοποίηση και διαχωρίζει τους μεθυλεστέρες του 5-CVC και τις βασικές προσμίξεις, 4-πεντενοϋλοχλωρίδιο, 4-χλωροβαλεροϋλοχλωρίδιο, 5-χλωροεξανοϋλοχλωρίδιο και 4-μεθυλο-5-χλωροβαλεροϋλοχλωρίδιο. Στο διαλύτη του δείγματος χρησιμοποιήθηκε 3-μεθοξυπυριδίνη για να καταστεί δυνατή η ανίχνευση του 5-χλωροβαλερικού οξέος (5-CVA) που είναι το κύριο προϊόν αποικοδόμησης του 5-CVC. Η μέθοδος επικυρώθηκε για την ειδικότητα, τη γραμμικότητα, την ακρίβεια, την πιστότητα, την ευαισθησία και την ανθεκτικότητα, ενώ αποτελεί μία μέθοδο GC εφαρμόσιμη στην ανάλυση προσμίξεων άλλων χλωριδίων ή αλογονιδίων (Tang et al., 2010).

4.3 Υπερκρίσιμη Ρευστή Χρωματογραφία (Superficial Fluid Chromatography, SFC)

Η εισαγωγή των νέων στατικών φάσεων και των νέων οργάνων ειδικά σχεδιασμένων για υπερκρίσιμη ρευστή χρωματογραφία και η πληθώρα πλεονεκτημάτων αυτής της μεθόδου, όπως το χαμηλό ιξώδες των κινητών φάσεων, ο σύντομος χρόνος ανάλυσης, η κινητή φάση που αποτελείται από υπερκρίσιμο CO₂, το οποίο λειτουργεί σε σχετικά χαμηλή πίεση (73,8 bar) και θερμοκρασία (31,1 °C) και είναι μια μη τοξική, μη εύφλεκτη και φυσικά απαντώμενη ουσία, οδήγησε στον αυξανόμενο αριθμό δημοσιεύσεων που περιγράφουν νέες εφαρμογές στη φαρμακευτική ανάλυση, μεταξύ άλλων στο προφίλ προσμίξεων φαρμάκων. Η SFC είναι μια καλή συμπληρωματική τεχνική της RP-HPLC που επιτρέπει σε πολλές περιπτώσεις την ανίχνευση προσμίξεων που δεν ανιχνεύονται με HPLC (Galea et al., 2015).

Μεταξύ της πληθώρας των μελετών, η μελέτη των Dispas et al., αναφέρει την εφαρμογή της SFC στο προφίλ προσμίξεων της θειικής σαλβουταμόλης, ως εναλλακτική μέθοδο στην μέθοδο αναφοράς που χρησιμοποιείται HPLC από την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία (EP). Ο

διαχωρισμός της θειικής σαλβουταμόλης και των σχετικών προσμίξεων B, D, F και G, δύναται να επιτευχθεί σε μόλις 7 λεπτά, χρόνος ο οποίος είναι επτά φορές ταχύτερος από τη μέθοδο LC-UV που προτείνεται από την ΕΡ. Επιπλέον, στην συγκεκριμένη μέθοδο πραγματοποιήθηκε επικύρωση για τον προσδιορισμό των προσμίξεων B, D, F και G και στην πρώτη ύλη της θειικής σαλβουταμόλης (Εικόνα 8). Το επικυρωμένο εύρος δοσολογίας αφορούσε το 50 έως 150% της στοχευόμενης συγκέντρωσης, που αντιστοιχεί στο 0,3% του API, με LOD 0,5 g/mL. Σε αντίθεση με προηγούμενα ευρήματα, η ευαισθησία του SFC-UV ήταν επαρκής για τον προσδιορισμό των προσμίξεων σε χαμηλή συγκέντρωση. Η μέθοδος SFC που προτείνεται στην παρούσα μελέτη θα μπορούσε να παρουσιαστεί ως κατάλληλη εναλλακτική λύση καθώς ο χρόνος ανάλυσης και οι χρόνοι εξισορρόπησης της στήλης μειώθηκαν, παρέχοντας μια γρήγορη μέθοδο στο πλαίσιο της φαρμακευτικής βιομηχανίας (Dispas et al., 2017).



Εικόνα 8: Χρωματογράφημα SCF προτύπου διαλύματος επικύρωσης: πρόσμιξη D (2,6 λεπτά), πρόσμιξη G (3,2 λεπτά), άγνωστη πρόσμιξη (3,5 λεπτά), πρόσμιξη I (3,7 λεπτά), πρόσμιξη B (4,1 λεπτά), άγνωστη πρόσμιξη (4,4 λεπτά), θεική σαλβουταμόλη (4,8 λεπτά), πρόσμιξη F (6,2 λεπτά) (Dispas et al., 2017).

4.4 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin-Layer Chromatography, TLC)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική διαχωρισμού λόγω της ευκολίας χρήσης, της αποδοτικότητας, της καλής ευαισθησίας, της ταχύτητας διαχωρισμού, καθώς και της ικανότητάς της να αναλύει πολλά δείγματα ταυτόχρονα. Η TLC διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στο πρώιμο στάδιο της ανάπτυξης του φαρμάκου, όταν η γνώση σχετικά με τις προσμίξεις και τα προϊόντα αποικοδόμησης σε μια φαρμακευτική ουσία και ένα φαρμακευτικό προϊόν είναι περιορισμένη. Ως συνέπεια της ανάπτυξης στον τομέα της τεχνολογίας της TLC, η εισαγωγή της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης – HPTLC, και των οργάνων, πολύχρηστα πυκνόμετρα, η TLC διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις ποσοτικές αναλυτικές πτυχές του προφίλ προσμίξεων φαρμάκων (Görög, 2012).

Σε ορισμένες από τις πρόσφατα δημοσιευμένες μελέτες σχετικά με τον προσδιορισμό των προσμίξεων με TLC αξίζει να αναφερθεί η διερεύνηση της παρακεταμόλης και της χλωροζοξασζόνης (Abdelaleem et al., 2013) και της μονοοξιδίνης (Filipić et al., 2015).

4.5 Τριχοειδείς μέθοδοι

Λόγω των πλεονεκτικών ιδιοτήτων τους, η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση και οι σχετικές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιτυχώς στη φαρμακευτική ανάλυση, μεταξύ άλλων στη διαμόρφωση του προφίλ προσμίξεων στα φαρμακευτικά προϊόντα. Ωστόσο, δεδομένου ότι η HPLC είναι η προτιμώμενη μέθοδος των ρυθμιστικών φορέων για το σκοπό αυτό, η χρήση αυτών των μεθόδων είναι μέτριας σημασίας.

4.5.1 Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση (Capillary Electrophoresis, CE)

Ειδικότερα, η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE) έπαιξε σημαντικό ρόλο στην επίλυση του προβλήματος της τοξικότητας ορισμένων παρτίδων ηπαρίνης με τον διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό της τοξικής πρόσμιξης της υπερθειικής θειικής χονδροϊτίνης (OSCS) και επίσης της θειικής δερματάνης (DS). Συγκεκριμένα, στην μελέτη των Somsen et al., αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μία μέθοδος CE συζευγμένη με UV για την ανίχνευση της τοξικής πρόσμιξης OSCS και της πρόσμιξης DS σε δείγματα μη κλασματοποιημένης ηπαρίνης. Χρήση υψηλών συγκεντρώσεων φωσφορικού διαλύματος, με pH 3,0 σε

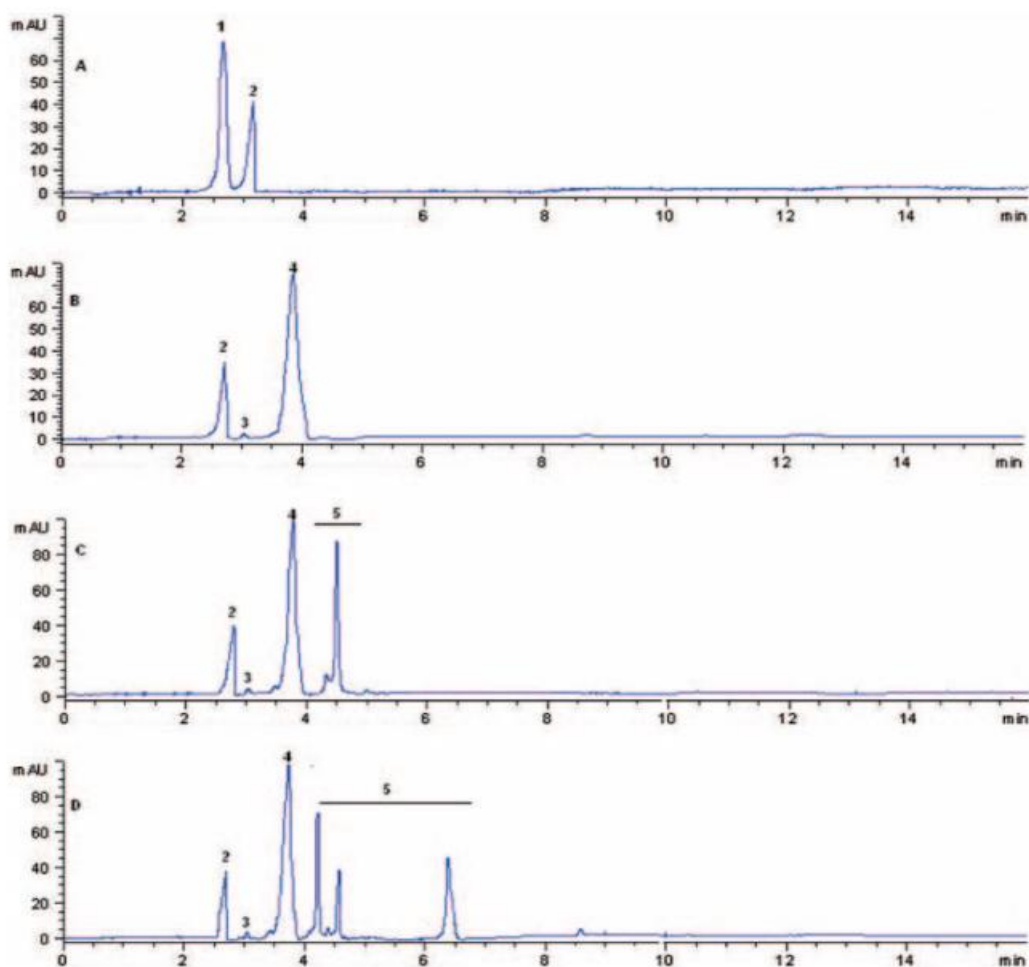
συνδυασμό με 25μm τριχοειδές, παρέχει καλό διαχωρισμό του OSCS και του DS από την ηπαρίνη. Λόγω της δυνατότητας έγχυσης σχετικά μεγάλων όγκων δειγμάτων και υψηλών συγκεντρώσεων ηπαρίνης, το OSCS μπορεί να ανιχνευθεί μέχρι το επίπεδο του 0,1%. Οι αναλύσεις CE-UV των παρτίδων μολυσμένης ηπαρίνης και των προτύπων ηπαρίνης απέδειξαν τη δυνατότητα εφαρμογής της αναπτυγμένης μεθόδου για τον ποιοτικό έλεγχο των φαρμακευτικών ουσιών ηπαρίνης (Somsen et al., 2009).

4.5.2 Χρωματογραφικές τεχνικές που σχετίζονται με την ηλεκτροφόρηση

Καθώς, η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση είναι κατάλληλη για τη διερεύνηση μόνο ιοντικών ενώσεων κατά τον διαχωρισμό και τον προσδιορισμό των προσμίξεων στα φάρμακα αναπτύχθηκαν χρωματογραφικές τεχνικές που σχετίζονται με ηλεκτροφόρηση, όπως η ηλεκτροκινητική χρωματογραφία μικυλλίων (Micellar Electrokinetic Chromatography, MEKC) και η ηλεκτροκινητική χρωματογραφία μικρογαλακτώματος (Microemulsion Electrokinetic Chromatography, MEEKC). Αξίζει να σημειωθεί ότι λόγω των καλών χαρακτηριστικών αυτών των μεθόδων, ορισμένες από αυτές εφαρμόζονται και σε ιονιζόμενα φάρμακα. Ωστόσο, παρά τα καλά αυτά χαρακτηριστικά, η σημασία αυτών των μεθόδων στον τομέα αυτό δεν είναι συγκρίσιμη με εκείνη της HPLC.

4.5.2.1 Ηλεκτροκινητική χρωματογραφία μικυλλίων (MEKC)

Στην MEKC ο ηλεκτρολύτης υποβάθρου περιέχει μία επιφανειοδραστική ένωση (π.χ. sodium dodecyl sulfate-SDS) σε συγκέντρωση υψηλότερη από την κρίσιμη μυκυλλιακή συγκέντρωση (CMC). Αυτό το τροποποιημένο περιβάλλον διαχωρισμού επιτρέπει τον περαιτέρω διαχωρισμό των αναλυτών σύμφωνα με την υδροφοβικότητά τους (Linde, 2001). Μία από τις εφαρμογές αυτής της μεθόδου είναι ο προσδιορισμός της βαλακυκλοβίρης (VCV) και ακυκλοβίρης (ACV) και των προσμίξεων τους σε φαρμακευτικά σκευάσματα και σκευάσματα κρέμας. Σε όλες τις περιπτώσεις, επιτεύχθηκε καλή συμφωνία μεταξύ των τιμών που ισχυρίζεται ο κατασκευαστής και της προτεινόμενης μεθόδου MEKC. Τα επίπεδα προσμίξεων γουανίνης σε όλα τα δείγματα ήταν εντός του επιτρεπόμενου ορίου όπως καθορίζεται στην Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία (max 0,7%) (Εικόνα 9) (Al Azzam et al., 2010).



Εικόνα 9: Ηλεκτροφερογράμματα που λαμβάνονται από την ανάλυση φαρμακευτικών σκευασμάτων. (Α) δισκίο VCV, (Β) δισκίο ACV, (C) Κρέμα ACV, (D) κρέμα ακυκλοβίρης, Κορυφές: 1, VCV; 2, Τυραμίνη; 3, Γουανίνη; 4, ACV (Al Azzam et al., 2010).

4.5.2.2 Ηλεκτροκινητική χρωματογραφία μικρογαλακτώματος (MEEKC)

Όπως και στην MECK, έτσι και στην MEEKC σχηματίζονται δύο φάσεις, η φάση του υδατικού διαλύματος ηλεκτρολύτη (κινητή φάση) και η φάση του μικρογαλακτώματος (ψευδο-στατική φάση). Συγκεκριμένα, σε μία μελέτη χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά η MEEKC με στόχο τον προσδιορισμό της κλεμαστίνης και των τριών βασικών προσμίξεων της τόσο σε φαρμακευτικές ουσίες όσο και σε δισκία. Η προσθήκη μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνης και 2,6-δι-Ο-μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνης στην ψευδο-στατική φάση του μικρογαλακτώματος ήταν απαραίτητη για την αύξηση της ικανότητας διαχωρισμού των ενώσεων, με τον διαχωρισμό να ολοκληρώνεται σε περίπου 5,5 λεπτά (Orlandini et al., 2014).

4.6 Μέθοδοι που δεν απαιτούν διαχωρισμό

4.6.1 Φασματοσκοπικές μέθοδοι

Παρόλο που οι φασματοσκοπικές μέθοδοι (MS, NMR και UV) χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του προφίλ προσμίξεων φαρμάκων είτε σε λειτουργία off-line, με χρήση φασμάτων καταγραφής μεμονωμένων προσμίξεων μετά τον διαχωρισμό τους, είτε σε λειτουργία on-line, με χρήση φασματοσκοπικών μεθόδων διαχωρισμού, η καταγραφή των φασμάτων δειγμάτων φαρμάκων μπορεί να είναι πολύ χρήσιμη σε ορισμένες περιπτώσεις (Görög & Szántay, 2017).

Συγκεκριμένα, το NMR χρησιμοποιείται με επιτυχία για την ανίχνευση της νόθευσης φαρμάκων. Ειδικότερα, στην μελέτη των Beyer et al., αξιολογήθηκε η ανίχνευση και ο προσδιορισμός της τοξικής υπερθειικής θειικής χονδροϊτίνης και της θειικής δερματάνης στην ηπαρίνη με NMR. Σε αυτή τη μελέτη η φασματοσκοπία NMR στα 300 ή 400 MHz είναι αρκετή για να ποσοτικοποιήσει τις προσμίξεις στην ηπαρίνη, όπως τα OCSC και DS, μέσω των σημάτων N-ακετυλίου. Έτσι, η ποιότητα της ηπαρίνης μπορεί να εγγυηθεί με συνήθεις μετρήσεις NMR κατά την εφαρμογή επαρκούς μεγάλου αριθμού σαρώσεων. Ωστόσο, υψηλότερες εντάσεις πεδίου και κρυοανιχνευτές μπορούν να ενισχύσουν αυτές τις αναλυτικές δυνατότητες (Beyer et al., 2008).

4.6.2 Ηλεκτροανλυτικές μέθοδοι

Οι ηλεκτροανλυτικές μέθοδοι δεν έπαιξαν ποτέ σημαντικό ρόλο στο προφίλ προσμίξεων φαρμάκων. Ωστόσο, λόγω της πρόσφατης προόδου στους αισθητήρες (Zhang et al., 2008) έχουν γίνει διαθέσιμες κάποιες ενδιαφέρουσες εναλλακτικές για την επίλυση ορισμένων προβλημάτων. Για παράδειγμα, ο ποτενσιομετρικός αισθητήρας είναι κατάλληλος για την αξιολόγηση της καθαρότητας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης A (Voitechovič et al., 2016). Ένας άλλος ηλεκτροχημικός αισθητήρας, ένα αναστρέψιμο παλμικό ηλεκτρόδιο πολυανιοεκλεκτικής μεμβράνης προσφέρει μια καλή εναλλακτική λύση στις χρωματογραφικές και ηλεκτροφορητικές μεθόδους για τον προσδιορισμό της τοξικής πρόσμιξης υπερθειωμένης θειικής χονδροϊτίνης στην ηπαρίνη (Lester et al., 2015).

5. Εφαρμογή χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών μεθόδων για τη διαλεύκανση της δομής των προσμίξεων

Μια πολύ απλή, χρήσιμη και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τη διαλεύκανση της δομής των προσμίξεων και των προϊόντων αποικοδόμησης σε χύδην φαρμακευτικά προϊόντα και στις συνθέσεις τους είναι η off-line μέθοδος, δηλαδή η απομόνωση των προσμίξεων που ακολουθείται από φασματοσκοπικές μελέτες. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων χρησιμοποιούνται προπαρασκευαστικές στήλες C_{18} και C_8 , που προστατεύουν την αναλυτική στήλη από μόλυνση, για την απομόνωση των προσμίξεων, ωστόσο σε μια πρόσφατη μελέτη περιγράφονται τα πλεονεκτήματα της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης. Συγκεκριμένα, στην μελέτη Li et al., κατά την ανάπτυξη της χονοκιόλης και της κερκετίνης ως υποψήφια αντικαρκινικά φάρμακα, έγινε σύγκριση της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης και της προπαρασκευαστικής HPLC για τον προσδιορισμό του προφίλ προσμίξεων και την ταυτοποίηση της χονοκιόλης και της κερκετίνης. Διάφορες παράμετροι όπως ο όγκος της στήλης διαχωρισμού, η μέγιστη φόρτωση δείγματος, ο χρόνος διαχωρισμού και η κατανάλωση διαλύτη διερευνήθηκαν προκειμένου να συγκριθεί η ακρίβεια του διαχωρισμού. Διαπιστώθηκε ότι η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης υπερτερεί έναντι της προπαρασκευαστικής HPLC καθώς χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερες εγχύσεις δειγμάτων, μικρότερη κατανάλωση διαλύτη υψηλότερη διαχωριστική ικανότητα (Li et al., 2014).

Επιπλέον, η φασματοσκοπία NMR παίζει σημαντικό ρόλο στη διαλεύκανση της δομής των προσμίξεων αρκετών φαρμακευτικών προϊόντων. Ένα παράδειγμα όπου η φασματοσκοπία NMR έπαιξε κυρίαρχο ρόλο στη διαλεύκανση της δομής των προσμίξεων, είναι η περίπτωση της δαποξετίνης (Darcis et al., 2017). Αν και η φασματοσκοπία υπερύθρων και οι μέθοδοι περίθλασης ακτίνων X δεν παίζουν σημαντικό ρόλο στο προφίλ προσμίξεων φαρμάκων, αξίζει να αναφερθεί ότι αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούνται μερικές φορές για να επιβεβαιώσουν τη διαλεύκανση της δομής των προσμίξεων που απομονώνονται για ανάλυση με NMR.

5.1 HPLC-MS

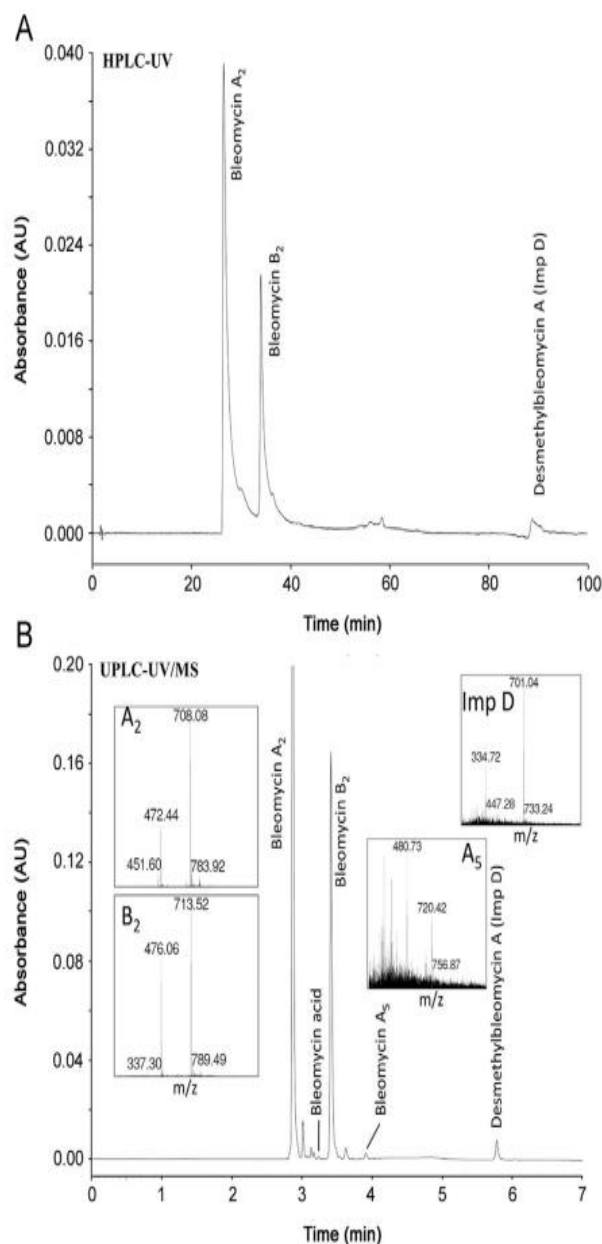
Η υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS) είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την αναγνώριση και τον δομικό χαρακτηρισμό οργανικών μορίων σε διάφορες μήτρες. Παράγει δεδομένα φασμάτων μάζας που μπορούν να παράγουν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με το μοριακό βάρος, την ταυτότητα, την ποσότητα, την καθαρότητα και τη δομή ενός δείγματος. Μπορεί να αναλύσει ενώσεις που έχουν έλλειψη κατάλληλου χρωμοφόρου, κάτι που δεν είναι δυνατό με LC-UV/PDA. Ως εκ τούτου, μπορεί να θεωρηθεί ως ένας ιδανικός ανιχνευτής για την ανάλυση φαρμακευτικών δειγμάτων.

Αρκετές τεχνικές ιονισμού έχουν αναπτυχθεί με τα χρόνια ανάλογα με την κατάσταση και τη φύση του δείγματος. Κατά τη διαδικασία ιονισμού, οι αναλυόμενες ουσίες μετατρέπονται σε ιόντα θραύσματος, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για επακόλουθη ανάλυση με βάση την αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z). Οι κύριες μέθοδοι ιονισμού περιλαμβάνουν τον ιονισμό με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (EI), τον χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI), τον ιονισμό ηλεκτροψεκασμού (ESI), τον ιονισμό εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενο από υπόστρωμα (MALDI), τον χημικό ιονισμό (CI) και τον ιονισμό με ταχέως κινούμενα άτομα (FAB), από τις οποίες οι τεχνικές ESI και APCI χρησιμοποιούνται συχνά στην ανάπτυξη και ανάλυση φαρμάκων (Ramachandra, 2016).

Η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος για τον προσδιορισμό του προφίλ προσμίξεων φαρμάκων. Ωστόσο, ορισμένοι παράγοντες θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τη επικύρωση μιας αποτελεσματικής μεθόδου LC-MS. Μη πτητικά ρυθμιστικά διαλύματα όπως φωσφορικά, βορικά και κιτρικά θα πρέπει να αποφεύγονται στις μεθόδους LC-MS. Τα καταλληλότερα ρυθμιστικά διαλύματα για ανάλυση LC-MS είναι το πτητικό μυρμηκικό αμμώνιο και το οξικό αμμώνιο. Επιπλέον, η επιτυχής χρήση αυτής της τεχνικής για τη διαλεύκανση της δομής όλων των προσμίξεων και των προϊόντων αποικοδόμησης, χωρίς τη χρήση φασματοσκοπίας NMR, απαιτεί τη χρήση σύγχρονων τεχνολογιών HPLC και ανιχνευτών MS και, τέλος, υψηλό επίπεδο τεχνογνωσίας των αναλυτών για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων από το προφίλ διαχωρισμού των κορυφών (Ramachandra, 2016; Narayanam et al., 2014).

Μερικά από τα πολλά παραδείγματα όπου η τεχνική HPLC-MS χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για το προφίλ προσμίξεων και προϊόντων αποικοδόμησης είναι στην θεική μπλεομυκίνη,

στην τυροθρισίνη, στην υδροχλωρική βανκομυκίνη και στην βακιτρακίνη. Συγκεκριμένα, τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν από ανάλυση HPLC-UV και UPLC-UV/MS της θειικής μπλεομυκίνης παρουσιάζονται στην Εικόνα 10. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο HPLC-UV, η μπλεομυκίνη A2 και B2 αναγνωρίστηκαν από τις υψηλές κανονικοποιημένες περιοχές της κορυφής τους (62,79% και 34,05%). Η πρόσμιξη D ταυτοποιήθηκε από τον σχετικό χρόνο κατακράτησης της (RRT). Αν και αυτή η μέθοδος HPLC-UV ακολουθεί τα όρια που δίνονται για το system suitability, παρατηρήθηκε σημαντική ασυμμετρία, πάνω από τη μέγιστη τιμή του 1,5 όπως δίνεται στην EP και η συγκέντρωση της μπλεομυκίνης B2 ξεπέρασε το όριο που ορίζεται από την EP. Αυτό είναι ένα παράδειγμα του πώς μια μέθοδος HPLC-UV με μικρή ακρίβεια σε συνδυασμό με ανεπαρκή ολοκλήρωση, μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς χαμηλής ποιότητας αποτελέσματα. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο UPLC-UV/MS, η οποία οδήγησε σε καλύτερο χρωματογραφικό διαχωρισμό όλων των ενώσεων, όπως αποδεικνύεται από συμμετρία των κορυφών των κύριων ενώσεων μπλεομυκίνης, η ποσότητα της μπλεομυκίνης B2 προσδιορίστηκε σε 29,0%, τηρώντας έτσι το όριο της EP. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας ανίχνευση MS, επιβεβαιώθηκε η δομή της μπλεομυκίνης A2 (m/z 708,08 και 472,44, $z=2, 3$) και B2 (m/z 713,52 και 476,06, $z=2, 3$). Επιπλέον, δύο ακόμα προσμίξεις που περιλαμβάνονται στον κατάλογο της EP ταυτοποιήθηκαν από τα φάσματα μάζας τους, το μπλεομυκινικό οξύ (m/z 657,34· $z=2$) και η μπλεομυκίνη A5 (m/z 720,42 και 480,73· $z=2,3$). Η δομή της απομεθυλμπλεομυκίνης A2 (πρόσμιξη D) επιβεβαιώθηκε επίσης με MS (m/z 701,04, $z=2$). Τέλος, σημειώθηκε ότι ο συνολικός χρόνος εκτέλεσης της μεθόδου UPLC-UV/MS μειώθηκε στα 20 λεπτά, ενώ ο χρόνος εκτέλεσης της HPLC-UV ήταν 100 λεπτά (D'Hondt et al., 2016).



Criteria	Acceptance limits	Result	
		UPLC-UV/MS	HPLC-UV
System suitability test			
Bleomycin A ₂ -B ₂ resolution	≥5	6.382	5.95
Quality requirements			
ΣBleomycin A ₂ and B ₂	Min. 85.0%	93.51%	96.83%
Bleomycin A ₂	55%-70%	64.6%	62.79%
Bleomycin B ₂	25%-30%	29.0%	34.05%
Impurity D	5.5 %	1.79%	0.91%
ΣImpurities other than D	Max. 9.0%	4.70%	2.26%
Sensitivity			
LOD	-	UV: 0.159 µg/mL (0.032 % relative to 0.5 mg/mL solution)* QDa [†] : 0.0232 µg/mL (0.0046 % relative to 0.5 mg/mL solution)	1.51 µg/mL (0.30% relative to 0.5 mg/mL solution)*
Extra Parameters			
Run time	-	20.0 min	100.0 min
Reported peaks	-	9	7
Identified peaks	-	5	3

* Calculated using the Bleomycin A₂ peak in the 0.5 mg/mL bleomycin sulfate chromatogram

[†] Selective ion monitoring using m/z value of 708.08

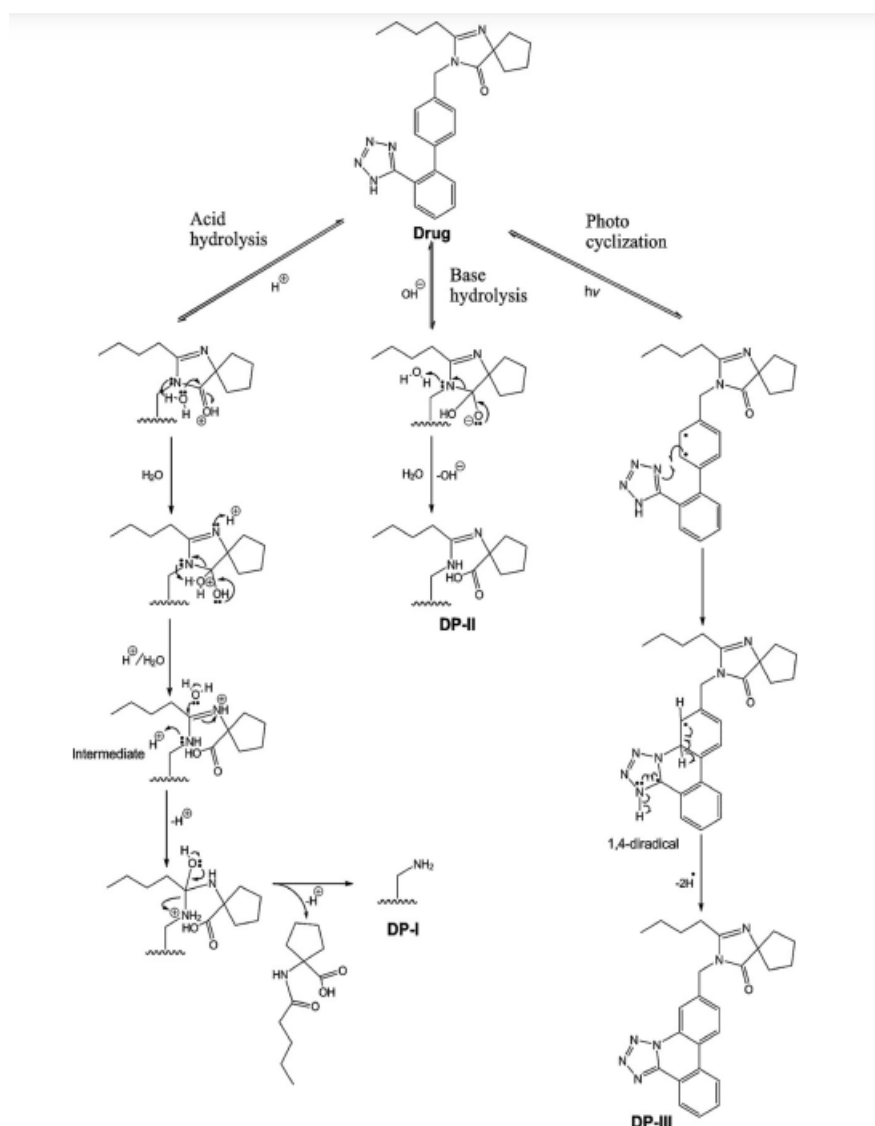
Εικόνα 10: Ανάλυση θευκής μπλεομυκίνης (0,5 mg/mL) με HPLC-UV (A) και UPLC-UV/MS (B), ταυτοποίηση των κύριων ενώσεων και σύγκριση των μεθόδων. Δίνονται τα φάσματα MS των κύριων ενώσεων μπλεομυκίνης A₂ και B₂, καθώς και οι προσμίξεις της μπλεομυκίνης A₅ και της απομεθυλμπλεομυκίνης A₂. (D'Hondt et al., 2016).

5.2 HPLC-NMR

Η φασματοσκοπία NMR εκμεταλλεύεται τις μαγνητικές ιδιότητες ορισμένων ατομικών πυρήνων. Η δομική αποσαφήνιση των προσμίξεων σε φαρμακευτική ουσία/προϊόν περιλαμβάνει κυρίως την εφαρμογή φασματοσκοπίας NMR ¹H και ¹³C. Επιπλέον, τα

δισδιάστατα πειράματα όπως η διπλή κβαντική φιλτραρισμένη φασματοσκοπία συσχέτισης (DFC-COSY) και η ετεροπυρηνική απλή κβαντική συνοχή (HSQC) είναι επίσης χρήσιμα στη διαλεύκανση της δομής των οργανικών μορίων. Ο συνδυασμός τεχνικών χρωματογραφικού διαχωρισμού με φασματοσκοπία NMR (LC-NMR) προσφέρει πλεονεκτήματα για τον on-line διαχωρισμό και τη δομική διαλεύκανση άγνωστων ενώσεων. Οι εξελίξεις στις κλίσεις παλμικού πεδίου, η βελτίωση της τεχνολογίας ανιχνευτών και η κατασκευή μαγνητών υψηλού πεδίου είναι οι κινητήριες δυνάμεις αυτής της τεχνικής. Μείγματα όπως τα ακατέργαστα μείγματα αντίδρασης στην ανακάλυψη φαρμάκων μπορούν να αναλυθούν χωρίς προηγούμενο διαχωρισμό. Συγκεκριμένα, η διασύνδεση υγρής χρωματογραφίας με παράλληλο NMR και φασματομετρία μάζας (LC-NMR-MS) παρέχει ολοκληρωμένα δομικά δεδομένα για μεταβολίτες νέων φαρμάκων υπό ανάπτυξη. Όλες αυτές οι αναλυτικές τεχνικές χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της ποιότητας, της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας των φαρμακευτικών προϊόντων (Ramachandra, 2016).

Η εμπορική διαθεσιμότητα συζευγμένων οργάνων HPLC-NMR προσφέρει μια επιπλέον δυνατότητα για τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR στον προσδιορισμό προφίλ προσμίξεων φαρμάκων. Ένα παράδειγμα της χρήσης αυτής της μεθόδου είναι το προφίλ των προϊόντων αποικοδόμησης της ιβεσαρτάνης. Η ιβεσαρτάνη υποβλήθηκε σε υδρολυτική, οξειδωτική, φωτολυτική και θερμική καταπόνηση, σύμφωνα με την οδηγία ICH Q1A (R2). Το φάρμακο παρουσίασε αποικοδόμηση μόνο σε όξινες, βασικές και φωτοόξιμες συνθήκες, ενώ ήταν σταθερό σε άλλες συνθήκες στρες. Σχηματίστηκαν συνολικά τρία προϊόντα αποικοδόμησης, τα οποία διαχωρίστηκαν σε στήλη C₈ χρησιμοποιώντας μια μέθοδο HPLC βαθμιδωτής έκλουσης. Τα αποτελέσματα του MS βοήθησαν στην δημιουργία των δομών των προϊόντων αποικοδόμησης, τα οποία επαληθεύτηκαν μέσω πειραμάτων 1 και 2D COZY LC-NMR. Ειδικότερα, ο σχηματισμός του DP-I σε όξινη κατάσταση εξηγείται από τη διαδοχική υδρόλυση ομάδων αμιδίου και ιμίνης της ιβεσαρτάνης. Το DP-II παράγεται από το ενεργό φαρμακευτικό συστατικό με απλή υδρόλυση αμιδίου, ενώ η έκθεση του φαρμάκου στην υπεριώδη ακτινοβολία έχει ως αποτέλεσμα την προώθηση των ηλεκτρονίων σε ένα τροχιακό και παράγει δύο ρίζες αρυλίου, η μία από τις οποίες προσβάλλει τον παρακείμενο δακτύλιο τετραζόλης για να δώσει κυκλοποιημένο DP-III (Εικόνα 11) (Shah et al., 2010).



Εικόνα 11: Μηχανισμός σχηματισμού των προσμίξεων της ιβεσαρτάνης (Shah et al., 2010).

Επιπλέον, στην μελέτη των Makuc et al., αξιολογήθηκε η εισαγωγή της μεθόδου DOSY-NMR για τον προσδιορισμό των επιπέδων των προσμίξεων της d-κυκλοσερίνης σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Η προτεινόμενη μέθοδος DOSY-NMR επέτρεψε τον διαχωρισμό της d-κυκλοσερίνης, των προϊόντων αποικοδόμησής της και των προσμίξεων σε συγκεντρώσεις κάτω από τα όρια των προδιαγραφών της παγκόσμιας φαρμακοποιίας, ενώ επέτρεψε την ακριβή ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση του διμερούς κυκλοσερίνης, κάτι που δεν ήταν δυνατό με τη χρήση της μεθόδου HPLC που προτείνεται από την EP (Makuc et al., 2020).

5.3 GC-MS

Η GC-MS είναι μια αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό πτητικών, ημιπτητικών ενώσεων, υπολειμμάτων διαλυτών και θερμικά σταθερών ενώσεων. Ο μηχανισμός διαχωρισμού εξαρτάται από τις διαστάσεις της στήλης, τον τύπο του φέροντος αερίου, τη θερμοκρασία της στήλης και τις χημικές ιδιότητες της αναλυόμενης ουσίας, όπως η τάση ατμών και η πολικότητα. Οι αναλυόμενες ουσίες πρέπει να έχουν σημαντική τάση ατμών μεταξύ 30°C και 300°C για καλύτερο διαχωρισμό. Όταν μίγμα ατμοποιημένων αναλυτών μεταφέρεται μέσω της στήλης GC με τη βοήθεια θερμαινόμενου αερίου, λόγω διαφοράς στα σημεία βρασμού πραγματοποιείται ο διαχωρισμός τους εντός της στήλης. Στη συνέχεια, τα διαχωρισμένα συστατικά εισέρχονται στο MS μέσω μιας ενδιάμεσης φάσης. Αυτό ακολουθείται από ιονισμό, ανάλυση μάζας και ανίχνευση των αναλογιών m/z των ιόντων που παράγονται από κάθε αναλυόμενη ουσία. Δύο ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές ιονισμού στο GC-MS είναι ο ιονισμός πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI) και ο χημικός ιονισμός (CI). Το κύριο πλεονέκτημα του GC-MS είναι ότι τα φάσματα μάζας δείχνουν μία συγκεκριμένη δομή που αντιστοιχεί σε ενώσεις. Επομένως, η σύγκριση ενός μετρούμενου φάσματος με μια βάση δεδομένων είναι μια αποτελεσματική μέθοδος αναγνώρισης ενώσεων. Το GC-MS είναι επίσης ένα σημαντικό εργαλείο για την ταυτοποίηση, τον χαρακτηρισμό φαρμάκων και μεταβολιτών φαρμάκων καθώς και την ανάλυση προσμίξεων σε φαρμακευτικά προϊόντα (Ramachandra, 2016).

Συγκεκριμένα, στην μελέτη των Reddy et al., αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μία μέθοδος GC-MS για τον προσδιορισμό πέντε γονοτοξικών προσμίξεων, το βρωμιούχο μεθύλιο (MeBr), το βρωμιούχο αιθύλιο (EtBr), το ισοπροπυλοβρωμίδιο (IprBr), το n-προπυλοβρωμίδιο (n-PrBr) και n-βουτυλοβρωμίδιο (n-ButBr) σε φαρμακευτικό σκεύασμα βαλπροϊκού οξέος. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των πέντε γονοτοξικών προσμίξεων επιτεύχθηκε σε στήλη DB-1 30 m × 0,32 mm, 3,0 μm, η οποία αποτελείται από 100% διμεθυλοπολυσιλοξάνη ως στατική φάση και ως φέρον αέριο το ήλιο. Τα θραύσματα μάζας (m/z) επιλέχθηκαν για την ποσοτικοποίηση των MeBr (m/z 94), EtBr (m/z 108), IprBr (m/z 122), n-PrBr (m/z 122) και n-ButBr (m/z 136). Η απόδοση της μεθόδου αξιολογήθηκε με την αξιολόγηση των πειραμάτων ειδικότητας, γραμμικότητας, ευαισθησίας, ακρίβειας και πιστότητας. Το καθορισμένο όριο ανίχνευσης και το όριο των τιμών ποσοτικού προσδιορισμού για τις γονιδοτοξικές προσμίξεις ήταν στην περιοχή 0,005–0,019 μg mL⁻¹.

Οι τιμές των συντελεστών συσχέτισης του πειράματος γραμμικότητας ήταν στην περιοχή 0,9947–0,9983. Η μέση ανάκτηση για την ακρίβεια κυμαίνονταν από 97,6–111,3%. Τα αποτελέσματα απέδειξαν ότι η μέθοδος είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό των συγκεκριμένων γονοτοξικών προσμίξεων σε φαρμακευτικά σκευάσματα βαλπροϊκού οξέος (Reddy et al., 2018).

6. Συζήτηση

Η διασφάλιση ποιότητας και ο ποιοτικός έλεγχος των ενεργών φαρμακευτικών συστατικών (APIs) και των εκδόχων είναι μείζονα ζητήματα στη φαρμακευτική ανάλυση, η οποία σκοπός της είναι η μείωση της πιθανότητας ενδεχόμενης βλάβης στους ασθενείς. Οι μέθοδοι ποιοτικού ελέγχου ρυθμίζονται από τις διεθνείς φαρμακοποιίες σε κατευθυντήριες οδηγίες, οι οποίες αναθεωρούνται συνεχώς προκειμένου να διατηρούνται ενημερωμένα τα φάρμακα, τα έκδοχα, καθώς και οι μέθοδοι ανάλυσης τους. Επιπλέον, οι διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες, όπως αυτές που εκδόθηκαν από το Διεθνές Συμβούλιο για την Εναρμόνιση των Τεχνικών Απαιτήσεων για Φάρμακα για Ανθρώπινη Χρήση Διεθνή (ICH) συνεχώς ανανεώνονται στο πέρας των ετών ενσωματώνοντας τις πιο σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές.

Οι φαρμακευτικές προσμίξεις είναι ανεπιθύμητες χημικές ουσίες που παραμένουν στο API, αναπτύσσονται κατά τη σύνθεση ή κατά την αποικοδόμηση τόσο του API όσο και των φαρμακευτικών προϊόντων. Η παρουσία τους, ακόμη και σε μικρές ποσότητες, μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια των φαρμακευτικών προϊόντων. Ως εκ τούτου, η καθαρότητα του φαρμάκου συνδέεται με την ποιότητα του φαρμάκου. Η εξέλιξη της τεχνολογίας και η εμφάνιση ολοένα και πιο ευαίσθητων και επιλεκτικών αναλυτικών μεθόδων διεγείρουν συνεχώς το ενδιαφέρον για τον προσδιορισμό της καθαρότητας του φαρμάκου και των ίδιων των προσμίξεων τόσο στα φυσικά όσο και στα συνθετικά προϊόντα. Το γεγονός αυτό είναι σύμφωνο με την πολιτική της φαρμακευτικής βιομηχανίας, η οποία ανέκαθεν απαιτούσε τα API να είναι όσο το δυνατόν πιο καθαρά ως προς τις προσμίξεις. Ο αριθμός των πρόσφατα δημοσιευμένων μελετών σχετικά με το θέμα καταδεικνύει την αυξανόμενη σημασία των φαρμακευτικών προσμίξεων και του προφίλ προσμίξεων, ενώ αντικατοπτρίζει το συνεχές ενδιαφέρον των ρυθμιστικών αρχών, της βιομηχανίας και των επιστημόνων σε αυτούς τους τομείς.

Η αξιολόγηση της καθαρότητας του φαρμάκου σύμφωνα με αυτά τα αυστηρά πρότυπα απαιτεί τη χρήση επικυρωμένων αναλυτικών μεθόδων τελευταίας τεχνολογίας, ολοένα και πιο ευαίσθητων ανιχνευτών καθώς και επαγγελματικό προσωπικό που δύναται να ερμηνεύσει κριτικά τα αποτελέσματα. Τα διαθέσιμα εργαλεία για τη δημιουργία προφίλ προσμίξεων έχουν ήδη αναθεωρηθεί. Η HPLC είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική επειδή δεν είναι καταστροφική και εφαρμόζεται και σε θερμικά ασταθές ενώσεις, σε αντίθεση με την GC. Η ανάπτυξη πληθώρας στηλών ως στατικές φάσεις, καθώς και οι ανιχνευτές που είναι διαθέσιμοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ένα μεγάλο φάσμα φαρμακευτικών ενώσεων για ακριβή διαχωρισμό. Η υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης (RPLC) χρησιμοποιείται λόγω της ευρείας εκλεκτικότητας, της αναπαραγωγιμότητας, της συμβατότητας με φαρμακευτικά δείγματα και της καταλληλότητάς της για σύζευξη με MS. Στις περισσότερες περιπτώσεις, χρησιμοποιούνται οι στήλες ανάστροφης φάσης (C₁₈, C₈ κ.λπ.) και οι ανιχνευτές UV και PDA. Αν και η υγρή χρωματογραφία χαρακτηρίζεται από πληθώρα πλεονεκτημάτων, εμφανίζει και κάποιους περιορισμούς. Αυτές οι διαδικασίες είναι χρονοβόρες και μπορεί να γίνουν δύσκολες εάν οι προσμίξεις ή τα προϊόντα αποικοδόμησης βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις. Τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρήθηκε μια αξιοσημείωτη πρόοδος στις σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές για να ξεπεραστούν οι δυσκολίες των συμβατικών μεθόδων, ιδιαίτερα στη φαρμακευτική ανάλυση, με την ανάπτυξη και επικύρωση τεχνικών όπως η UPLC, η LC-MS, GC-MS και LC-NMR και HPTLC.

Η UPLC αποτελεί τεχνολογικά την διάδοχο των μεθόδων HPLC ενώ χαρακτηρίζεται από παρόμοια αναλυτική ακρίβεια με αυτή της HPLC, αλλά λειτουργεί σε πολύ υψηλότερες πιέσεις. Οι περισσότερες στήλες HPLC περιέχουν μέγεθος σωματιδίων από 2,5 έως 5 μm. Ενώ οι στήλες UPLC αναπτύχθηκαν με πορώδη σωματίδια κάτω των 2 μικρών. Αυτά απαιτούν υψηλότερη πίεση ~15.000 psi προκειμένου να επιτευχθούν υψηλοί ρυθμοί ροής σε σύγκριση με τα σωματίδια στη στήλη HPLC (< 6000 psi). Λόγω του μικρού μεγέθους των σωματιδίων, η διάχυση μεταξύ της στατικής φάσης και των αναλυτών είναι μικρότερη και η απόδοση είναι υψηλότερη. Εννοιολογικά, η ευαισθησία της ανίχνευσης UPLC είναι 2-3 φορές υψηλότερη από την ανίχνευση HPLC, ανάλογα με την τεχνική ανίχνευσης που χρησιμοποιείται. Λόγω της σημαντικής προόδου στην τεχνολογία οργάνων και στηλών, έγινε σημαντική πρόοδος στην ταχύτητα, την ανάλυση και την ευαισθησία στην UPLC. Ένα άλλο αξιοσημείωτο πλεονέκτημα είναι ότι η μέθοδος πιο χρησιμοποιείται για ανάλυση σε

όργανα HPLC μπορεί να μεταφερθεί για χρήση στην UPLC, διατηρώντας πανομοιότυπες συνθήκες με αυτές της HPLC, όπως η θερμοκρασία και τα διαλύματα έκλουσης.

Επιπλέον, ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών δείχνει τη χρησιμότητα τόσο της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) όσο και της φασματομετρίας μάζας (MS) ως πρόσθετων εργαλείων για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του προφίλ προσμίξεων. Ειδικότερα, η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (LC-MS) είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την αναγνώριση και τον δομικό χαρακτηρισμό οργανικών μορίων σε διάφορες μήτρες. Παράγει δεδομένα φασμάτων μάζας που μπορούν να παράγουν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με το μοριακό βάρος, την ταυτότητα, την ποσότητα, την καθαρότητα και τη δομή ενός δείγματος. Μπορεί να αναλύσει ενώσεις που έχουν έλλειψη κατάλληλου χρωμοφόρου, κάτι που δεν είναι δυνατό με LC-UV/PDA.

Ο συνδυασμός τεχνικών χρωματογραφικού διαχωρισμού με φασματοσκοπία NMR (LC-NMR) προσφέρει πλεονεκτήματα για τον on-line διαχωρισμό και τη διαλεύκανση δομικά αγνωστων ενώσεων. Οι εξελίξεις στις κλίσεις παλμικού πεδίου, η βελτίωση της τεχνολογίας ανιχνευτών και η κατασκευή μαγνητών υψηλού πεδίου είναι οι κινητήριες δυνάμεις αυτής της τεχνικής. Μείγματα όπως τα ακατέργαστα μείγματα αντίδρασης στην ανακάλυψη φαρμάκων μπορούν να αναλυθούν χωρίς προηγούμενο διαχωρισμό. Ωστόσο, το LC-NMR δεν ήταν ευρέως πρακτικό λόγω της χαμηλής ευαισθησίας του. Το LC-NMR, παρέχει συμπληρωματικές πληροφορίες για δομές ταυτόχρονα και προσφέρει μια μέθοδο για πιο ακριβή και γρήγορη δομική ανάλυση. Ωστόσο, η σύζευξη υγρής χρωματογραφίας με NMR και φασματομετρία μάζας (LC-NMR-MS) παρέχει ολοκληρωμένα δομικά δεδομένα για μεταβολίτες νέων φαρμάκων υπό ανάπτυξη. Όλες αυτές οι αναλυτικές τεχνικές χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της ποιότητας, της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας των φαρμακευτικών προϊόντων.

Συμπερασματικά, αν και η χρήση πολλών τεχνικών έχει περιγραφεί την τελευταία δεκαετία για το προφίλ προσμίξεων και προϊόντων αποικοδόμησης των φαρμάκων, οι πιο γενικά χρησιμοποιούμενες τεχνικές παρέμειναν η HPLC-UV για τον προσδιορισμό προσμίξεων με γνωστές δομές και η on-line HPLC-MS ή off-line HPLC-NMR για την αναγνώριση/διαλεύκανση της δομής άγνωστων προσμίξεων και προϊόντων αποικοδόμησης. Στον τομέα της HPLC η πιο σημαντική εξέλιξη ήταν η βελτίωση των

στατικών φάσεων με την προσθήκη μικρού μεγέθους σωματιδίων πυρήνα-κέλυφος. Αυτά μαζί με τη χρήση νέων ή ανεπτυγμένων λογισμικών για τη βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών έχουν αυξήσει σημαντικά την ευαισθησία και την επιλεκτικότητα της μεθόδου και έχουν συντομεύσει δραματικά τον χρόνο που απαιτείται για ακριβή μελέτη των προσμίξεων ή των προϊόντων αποικοδόμησης. Ωστόσο, παρά την πληθώρα μελετών που επιδεικνύουν τις δυνατότητες των νέων τεχνολογιών στην φαρμακευτική ανάλυση απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την επίλυση σημαντικών περιορισμών όπως ο χρόνος που απαιτείται για τον διαχωρισμό των αναλυόμενων ουσιών καθώς και το επίπεδο συγκέντρωσης των πιθανών προσμίξεων.

Βιβλιογραφία

Ακολουθούν οι βιβλιογραφικές αναφορές (πηγές) της Εργασίας.

Abdelaleem EA, Abdelwahab NS. Stability-indicating TLC-densitometric method for simultaneous determination of paracetamol and chlorzoxazone and their toxic impurities. J Chromatogr Sci. 2013 Feb;51(2):187-91. doi: 10.1093/chromsci/bms125. Epub 2012 Jul 26. PMID: 22843763.

Al Azzam KM, Saad B, Makahleah A, Aboul-Enein HY, Elbashir AA. Assay and stability-indicating micellar electrokinetic chromatography method for the simultaneous determination of valacyclovir, acyclovir and their major impurity guanine in pharmaceutical formulations. Biomed Chromatogr. 2010 May;24(5):535-43. doi: 10.1002/bmc.1323. PMID: 19739243.

Almeling S, Ilko D, Holzgrave U. Charged aerosol detection in pharmaceutical analysis. J Pharm Biomed Anal. 2012 Oct;69:50-63. doi: 10.1016/j.jpba.2012.03.019. Epub 2012 Mar 21. PMID: 22487591.

Ambavaram Vijaya Bhaskar Reddy, Jafariah Jaafar, Khalid Umar, Zaiton Abdul Majid, Azmi Bin Aris, Juhaizah Talib, Gajulapalle Madhavi, Identification, control strategies, and analytical approaches for the determination of potential genotoxic impurities in pharmaceuticals: A comprehensive review, J. Sep. Sci. (2015), 00, 1–16. doi: 10.1002/jssc.201401143

Arayne, M. S., Sultana, N., & Zaman, M. K. (2008). *Historical incidents leading to the evolution of good manufacturing practice. Accreditation and Quality Assurance, 13*(8), 431–432. doi:10.1007/s00769-008-0363-0

Beyer T, Diehl B, Randel G, Humpfer E, Schäfer H, Spraul M, Schollmayer C, Holzgrave U. Quality assessment of unfractionated heparin using ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. J Pharm Biomed Anal. 2008 Sep 10;48(1):13-9. doi: 10.1016/j.jpba.2008.06.014. Epub 2008 Jul 3. PMID: 18678460.

Błazewicz A, Fijałek Z, Samsel K. Determination of pipecuronium bromide and its impurities in pharmaceutical preparation by high-performance liquid chromatography with

coulometric electrode array detection. J Chromatogr A. 2008 Aug 8;1201(2):191-5. doi: 10.1016/j.chroma.2008.05.008. Epub 2008 May 10. PMID: 18533165.

Darcsi A, Rácz Á, Béni S. Identification and characterization of a new dapoxetine impurity by NMR: Transformation of N-oxide by Cope elimination. J Pharm Biomed Anal. 2017 Feb 5;134:187-194. doi: 10.1016/j.jpba.2016.11.029. Epub 2016 Nov 27. PMID: 27915196.

Deshpande, A. A. (2016). Novel, Precise, Accurate Ion-Pairing Method to Determine the Related Substances of the Fondaparinux Sodium Drug Substance: Low-Molecular-Weight Heparin. Scientia Pharmaceutica, 84(1), 19–40. doi:10.3797/scipharm.1505-20

Dhangar, K. R., Jagtap, R. B., Surana, S. J., & Shirkhedkar, A. A. (2017). *Impurity profiling of drugs towards safety and efficacy: theory and practice. Journal of the Chilean Chemical Society*, 62(2), 3543–3557. doi:10.4067/s0717-97072017000200024

D'Hondt M, Gevaert B, Wynendaele E, De Spiegeleer B. Implementation of a single quad MS detector in routine QC analysis of peptide drugs. J Pharm Anal. 2016 Feb;6(1):24-31. doi: 10.1016/j.jpha.2015.09.002. Epub 2015 Sep 26. PMID: 29403959; PMCID: PMC5762454.

Dispas A, Desfontaine V, Andri B, Lebrun P, Kottoni D, Clarke A, Guilleme D, Hubert P. Quantitative determination of salbutamol sulfate impurities using achiral supercritical fluid chromatography. J Pharm Biomed Anal. 2017 Feb 5;134:170-180. doi: 10.1016/j.jpba.2016.11.039. Epub 2016 Nov 27. PMID: 27915194.

Fang, X. (F.), Carr, G., & Freeze, R. C. (2017). Analytical Development and Validation for Solid Oral Dosage Forms. Developing Solid Oral Dosage Forms, 593–611. doi:10.1016/b978-0-12-802447-8.00021-2

FDA. Promoting Safe and Effective Drugs for 100Years. FDA Consumer Magazine. 2006.

Fekete S, Oláh E, Fekete J. Fast liquid chromatography: the domination of core-shell and very fine particles. J Chromatogr A. 2012 Mar 9;1228:57-71. doi: 10.1016/j.chroma.2011.09.050. Epub 2011 Sep 22. PMID: 21982449.

Filipic, S., Shenger, M. S. M., Nikolic, K., & Agbaba, D. (2015). Determination of Moxonidine and Its Impurities by Thin-Layer Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38(11), 1121–1125. doi:10.1080/10826076.2015.1028291

Galea C, Mangelings D, Heyden YV. Method development for impurity profiling in SFC: The selection of a dissimilar set of stationary phases. *J Pharm Biomed Anal*. 2015;111:333-43. doi: 10.1016/j.jpba.2014.12.043. Epub 2015 Jan 5. PMID: 25630237.

Görög S. The paradigm shifting role of chromatographic methods in pharmaceutical analysis. *J Pharm Biomed Anal*. 2012 Oct;69:2-8. doi: 10.1016/j.jpba.2012.01.031. Epub 2012 Jan 30. PMID: 22341481.

Görög, S. (2000). The nature and origin of the impurities in drug substances. *Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 9–22. doi:10.1016/s1464-3456(00)80004-6

Görög, S. (2003). *Chemical and analytical characterization of related organic impurities in drugs. Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377(5), 852–862. doi:10.1007/s00216-003-2140-6

Görög S., Szántay Cs. Jr., *Spectroscopic Methods in Drug Quality Control and Development*, in: J. Lindon, G.E. Trantner, E. Koppenaal (Eds.) *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* 3rd Edition, Academic Press – Elsevier, Oxford, 2017, pp. 178-187.

Hadley, M. R. (n.d.). Stereochemical Impurities. *Analysis of Drug Impurities*, 47–81. doi:10.1002/9780470988749.ch3

Haleem, R.M., Salem, M.Y., Fatahallah, F.A., Abdelfattah, L.E., *Quality in the Pharmaceutical Industry- A Literature Review, Saudi Pharmaceutical Journal* (2013), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2013.11.004>

Higby, G. J. (2006). *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 21st Edition. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.

ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, 1-13.

ICH Q3 Q3A(R): impurities in new drug substances (revised guideline), Federal Register 68 (68) (2003) 6924–6925.

ICH Q3B (R2). Impurities in new drug substances Proceedings of the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, 25, 2006.

ICH Q3B(R): impurities in new drug products (revised guideline), Federal Register 68 (220) (2003) 64628–64629.

ICH Q3C: impurities: guideline for residual solvents, Federal Register 68 (219) (2003) 64352–64353.

ICH Q3C(R6). Impurities: Guideline for Residual Solvents Step 4, 2016.

Kille, J. W. (2017). *Regulatory Toxicology. A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development*, 499–539. doi:10.1016/b978-0-12-803620-4.00019-0

Kormány, R., Fekete, J., Guillarme, D., & Fekete, S. (2014). Reliability of computer-assisted method transfer between several column dimensions packed with 1.3–5µm core-shell particles and between various instruments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 94, 188–195. doi:10.1016/j.jpba.2014.01.037

Lee HJ, Han E, Lee J, Chung H, Min SG. Development of visual peak selection system based on multi-ISs normalization algorithm to apply to methamphetamine impurity profiling. *Forensic Sci Int*. 2016 Nov;268:116-122. doi: 10.1016/j.forsciint.2016.09.019. Epub 2016 Sep 28. PMID: 27718476.

Lester J, Chandler T, Gemene KL. Reversible Electrochemical Sensor for Detection of High-Charge Density Polyanion Contaminants in Heparin. *Anal Chem*. 2015 Nov 17;87(22):11537-43. doi: 10.1021/acs.analchem.5b03347. Epub 2015 Oct 28. PMID: 26485655.

- Li S, Wang W, Tang H, Chen K, Yang J, He L, Ye H, Peng A, Chen L. Comparison of counter-current chromatography and preparative high performance liquid chromatography applied to separating minor impurities in drug preparations. *J Chromatogr A*. 2014 May 30;1344:51-8. doi: 10.1016/j.chroma.2014.04.004. Epub 2014 Apr 12. PMID: 24767948.
- Linde M.K., Petersen J.R., Mohammad A.A (2001). Amino acid analysis. *Clin. Forensic Appl. Capill. Electrophor*, Humana Press, Totowa, NJ, pp. 167–192. doi.org/10.1007/978-1-59259-120-6
- Liu, K.-T., & Chen, C.-H. (2019). Determination of Impurities in Pharmaceuticals: Why and How? *Quality Management and Quality Control - New Trends and Developments*. doi:10.5772/intechopen.83849
- Lurie IS, Driscoll SE, Cathapermal SS, Panicker S. Determination of heroin and basic impurities for drug profiling by ultra-high-pressure liquid chromatography. *Forensic Sci Int*. 2013 Sep 10;231(1-3):300-5. doi: 10.1016/j.forsciint.2013.06.008. Epub 2013 Jul 6. PMID: 23890653.
- Magnusson LE, Risley DS, Koropchak JA. Aerosol-based detectors for liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2015 Nov 20;1421:68-81. doi: 10.1016/j.chroma.2015.07.045. Epub 2015 Jul 14. PMID: 26212804.
- Makuc, D., Švab, Ž., Naumoska, K., Plavec, J., & Časar, Z. (2020). *Determination of d-Cycloserine Impurities in Pharmaceutical Dosage Forms: Comparison of the International Pharmacopoeia HPLC–UV Method and the DOSY NMR Method*. *Molecules*, 25(7), 1684. doi:10.3390/molecules25071684
- Manyanga V, Elkady E, Hoogmartens J, Adams E. Improved reversed phase liquid chromatographic method with pulsed electrochemical detection for tobramycin in bulk and pharmaceutical formulation. *J Pharm Anal*. 2013 Jun;3(3):161-167. doi: 10.1016/j.jpha.2012.12.008. Epub 2013 Jan 3. PMID: 29403811; PMCID: PMC5760981.
- Molnár, B., & Molnár-Perl, I. (2015). *The role of alkylsilyl derivatization techniques in the analysis of illicit drugs by gas chromatography*. *Microchemical Journal*, 118, 101–109. doi:10.1016/j.microc.2014.08.014

Nagpal S, Karan, Upadhyay A, Bhardwaj R, Thakkar A. A review on need and importance of impurity profiling. *Curr Pharm Anal.* 2011;7(1):6270.

Narayanam M, Handa T, Sharma P, Jhajra S, Muthe PK, Dappili PK, Shah RP, Singh S. Critical practical aspects in the application of liquid chromatography-mass spectrometric studies for the characterization of impurities and degradation products. *J Pharm Biomed Anal.* 2014 Jan;87:191-217. doi: 10.1016/j.jpba.2013.04.027. Epub 2013 Apr 28. PMID: 23706957.

Olsen B.A, Pack B.W, *Hydrophyllic Interaction Chromatography: A Guide for Practitioners*, Wiley, Hoboken NJ, 2012.

Orlandini S, Pasquini B, Stocchero M, Pinzauti S, Furlanetto S. An integrated quality by design and mixture-process variable approach in the development of a capillary electrophoresis method for the analysis of almotriptan and its impurities. *J Chromatogr A.* 2014 Apr 25;1339:200-9. doi: 10.1016/j.chroma.2014.02.088. Epub 2014 Mar 12. PMID: 24656544.

Patel KT, Chotai NP. Pharmaceutical GMP: past, present, and future--a review. *Pharmazie.* 2008 Apr;63(4):251-5. PMID: 18468382

Pharmacopoeia, I. Ghaziabad: Indian Pharmacopoeial Commission. *Govt. of India-Ministry of Health and Family Welfare*, 1948, 2014.

Pilaniya K, Chandrawanshi HK, Pilaniya U, Manchandani P, Jain P, Singh N. Recent trends in the impurity profile of pharmaceuticals. *J Adv Pharm Technol Res.* 2010 Jul;1(3):302-10. doi: 10.4103/0110-5558.72422. PMID: 22247862; PMCID: PMC3255420.

Prajapati, P., & Agrawal, Y. K. (2014). *Analysis and impurity identification in pharmaceuticals. Reviews in Analytical Chemistry*, 33(2). doi:10.1515/revac-2014-0001

Ragham PK, Chandrasekhar KB. Development and validation of a stability-indicating RP-HPL C-CAD method for gabapentin and its related impurities in presence of degradation products. *J Pharm Biomed Anal.* 2016 Jun 5;125:122-9. doi: 10.1016/j.jpba.2016.03.035. Epub 2016 Mar 17. PMID: 27018505.

Ramachandra B., (2016): Development of impurity profiling methods using modern analytical techniques, Critical Reviews in Analytical Chemistry, DOI:10.1080/10408347.2016.1169913

Reddy, S. R., Reddy, K. H., Kumar, M. N., Reddy, P. M., Reddy, J. V. R., & Sharma, H. K. (2018). *A Validated GC-MS Method for the Determination of Genotoxic Impurities in Divalproex Sodium Drug Substance. Journal of Chromatographic Science.* doi:10.1093/chromsci/bmy089

Russo R, Guillarme D, T-T Nguyen D, Bicchi C, Rudaz S, Veuthey JL. Pharmaceutical applications on columns packed with sub-2 microm particles. J Chromatogr Sci. 2008 Mar;46(3):199-208. doi: 10.1093/chromsci/46.3.199. PMID: 18334085.

Schilling K, Amstalden MC, Meinel L, Holzgrabe U. Impurity profiling of l-asparagine monohydrate by ion pair chromatography applying low wavelength UV detection. J Pharm Biomed Anal. 2016 Nov 30;131:202-207. doi: 10.1016/j.jpba.2016.08.035. Epub 2016 Aug 30. PMID: 27599350.

Shabir, G., (2004). Step-by step Analytical methods validation and protocol in the quality system compliance industry.

Shah RP, Sahu A, Singh S. Identification and characterization of degradation products of irbesartan using LC-MS/TOF, MS(n), on-line H/D exchange and LC-NMR. J Pharm Biomed Anal. 2010 Apr 6;51(5):1037-46. doi: 10.1016/j.jpba.2009.11.008. Epub 2009 Nov 13. PMID: 20018473.

Shaikh, Tabrez, Impurities Characterization in Pharmaceuticals: A Review (2019). www.ijppr.humanjournals.com, Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3958603>

Somsen GW, Tak YH, Toraño JS, Jongen PM, de Jong GJ. Determination of oversulfated chondroitin sulfate and dermatan sulfate impurities in heparin by capillary electrophoresis. J Chromatogr A. 2009 May 1;1216(18):4107-12. doi: 10.1016/j.chroma.2009.02.063. Epub 2009 Feb 26. PMID: 19272607.

Tang L, Kim A, Miller SA, Lloyd DK. Development and validation of a specific and sensitive GC-FID method for the determination of impurities in 5-chlorovaleroyl chloride.

J Pharm Biomed Anal. 2010 Nov 2;53(3):309-14. doi: 10.1016/j.jpba.2010.03.042. Epub 2010 Apr 7. PMID: 20439146.

Thomas S, Shandilya S, Bharti A, Agarwal A. A stability indicating simultaneous dual wavelength UV-HPLC method for the determination of potential impurities in fampridine active pharmaceutical ingredient. J Pharm Biomed Anal. 2012 Jan 25;58:136-40. doi: 10.1016/j.jpba.2011.09.009. Epub 2011 Sep 19. PMID: 22000073.

Van Duyse SA, Fulford MJ, Bartlett MG. ICH Q10 Pharmaceutical Quality System Guidance: Understanding Its Impact on Pharmaceutical Quality. AAPS J. 2021 Nov 12;23(6):117. doi: 10.1208/s12248-021-00657-y. PMID: 34773177; PMCID: PMC8689590.

Voitechovič E, Korepanov A, Kirsanov D, Jahatspanian I, Legin A. Bio-assisted potentiometric multisensor system for purity evaluation of recombinant protein A. Talanta. 2016 Aug 15;156-157:87-94. doi: 10.1016/j.talanta.2016.05.009. Epub 2016 May 2. PMID: 27260439.

World Health Organization. (2007). Quality assurance of pharmaceuticals: a compendium of guidelines and related materials: vol. 2: Good manufacturing practices and inspection, 2nd ed. World Health Organization. <https://iris.who.int/handle/10665/43532>

Xu Q, Tan S, Petrova K. Development and validation of a hydrophilic interaction chromatography method coupled with a charged aerosol detector for quantitative analysis of nonchromophoric α -hydroxyamines, organic impurities of metoprolol. J Pharm Biomed Anal. 2016 Jan 25;118:242-250. doi: 10.1016/j.jpba.2015.11.002. Epub 2015 Nov 10. PMID: 26580821.

Yang ZY, Wang L, Tang X. Determination of azithromycin by ion-pair HPLC with UV detection. J Pharm Biomed Anal. 2009 Apr 5;49(3):811-5. doi: 10.1016/j.jpba.2008.12.018. PMID: 19162426.

Zhang X., Ju H., Wang J., Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biochemical Applications, Elsevier - Academic Press, San Diego, CA, 2008

Οδηγία 2001/83/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 6ης
Νοεμβρίου 2001 περί κοινοτικού κώδικος για τα φάρμακα που προορίζονται για ανθρώπινη
χρήση

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.