

**ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟ  
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ HPLC  
Ε.Φ.(2.2.29)ΕΚΔΟΣΗ 5<sup>Η</sup>, Β.Φ., Α.Φ.)**

**ΛΩΡΑ ΠΑΡΤΑΣΙΔΟΥ**  
**ΓΕΝΙΚΟ ΧΗΜΕΙΟ ΤΟΥ ΚΡΑΤΟΥΣ ΚΥΠΡΟΥ**  
**ΚΙΜΩΝΟΣ 44, ΛΕΥΚΩΣΙΑ 1451**  
e-mail:dpartassides@sgl.moh.gov.cy

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Τα αναλυτικά εργαστήρια σκοπό έχουν τη διεξαγωγή δοκιμών μέσω χημικών/φυσικών διεργασιών για την παροχή αξιόπιστων αποτελεσμάτων προς τους πελάτες τους.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιεί ένα Εργαστήριο πρέπει να είναι αφενός κατάλληλα επιλεγμένες και να ανταποκρίνονται πλήρως στις απαιτήσεις των πελατών του και αφετέρου το εργαστήριο να αποδεικνύει ότι τις εφαρμόζει σωστά .

Οι δραστηριότητες του αναλυτικού εργαστηρίου καθορίζονται από τις απαιτήσεις συγκεκριμένων δοκιμών οι οποίες αποσκοπούν στον προσδιορισμό αναλυτών σε καθορισμένα είδη δειγμάτων. Η καταλληλότητα της μεθόδου ως προς τον τρόπο και σκοπό που εφαρμόζεται στο εργαστήριο διασφαλίζεται με την επικύρωση.

Ευθύνη του εργαστηρίου είναι η επιλογή της καταλληλότερης διαδικασίας επικύρωσης και πρωτοκόλλου εφαρμογής της χρησιμοποιούμενης μεθόδου.

Μέσα από την επικύρωση της μεθόδου πρέπει να αποδεικνύεται ότι τα κύρια χαρακτηριστικά επίδοσής της διασφαλίζονται και ότι η μέθοδος όπως εφαρμόζεται στο εργαστήριο μπορεί να παρέχει ορθά και αξιόπιστα αποτελέσματα λαμβάνοντας παράλληλα υπ όψιν και τους παράγοντες χρόνο και κόστος.

**ΑΡΜΟΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΕΠΙΣΗΜΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΦΑΡΜΑΚΩΝ  
(ΕΕΕΦ)**

Ένα Επίσημο Εργαστήριο Ελέγχου Φαρμάκων (ΕΕΕΦ) είναι ένα αναλυτικό εργαστήριο το οποίο στα πλαίσια των δραστηριοτήτων του διεξάγει δοκιμές σε φαρμακευτικά σκευάσματα και πρώτες ύλες. Μια από τις αρμοδιότητες του είναι ο έλεγχος για συμμόρφωση εγκεκριμένων φαρμακευτικών προϊόντων .

**ΙΔΙΑΙΤΕΡΟΤΗΤΕΣ ΣΤΙΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ ΕΝΟΣ ΕΕΕΦ**

Ένα εργαστήριο ελέγχου ποιότητας σε μια φαρμακοβιομηχανία έχει την υπευθυνότητα του ελέγχου συγκεκριμένου φάσματος προϊόντων , όσον μεγάλο και αν είναι αυτό, των οποίων (προϊόντων) τις μεθόδους εξέτασής τους έχει υποχρέωση όχι μόνο να αναπτύξει αλλά και να τις επικυρώσει αποδεικνύοντας έτσι ότι είναι κατάλληλες για τον σκοπό που προορίζονται.

Το ΕΕΕΦ ασκεί αρμοδιότητες πολύ διαφορετικές από ένα εργαστήριο ελέγχου ποιότητας σε μια φαρμακοβιομηχανία παρ' όλο που και τα δύο εργαστήρια αντικείμενο έχουν την ανάλυση φαρμακευτικών ουσιών ή σκευασμάτων. Το ΕΕΕΦ στις πλείστες των περιπτώσεων καλείται να διεξάγει αναλύσεις όχι ρουτίνας καθώς επίσης και να ανταποκριθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα, πράγμα που δυσχεραίνει την εργασία εάν για κάθε περίπτωση πρέπει να προχωρεί σε επικύρωση . Ο έλεγχος για συμμόρφωση ως προς τις απαιτήσεις εγκεκριμένων φαρμακευτικών προϊόντων γίνεται βάσει των προδιαγραφών του σκευάσματος. Για τον σκοπό αυτό συνήθως χρησιμοποιούνται

επίσημες και επικυρωμένες μέθοδοι όπως Μέθοδοι Φαρμακοποιών (όπως της Ευρωπαϊκής (Ε.Φ.) , Βρετανικής (Β.Φ.) ή Αμερικάνικης (Α.Φ.)) ή ήδη επικυρωμένες μέθοδοι, από τον κατασκευαστή, οι οποίες περιέχονται στους φακέλους των αντιστοιχών σκευασμάτων.

Παράδειγμα μιας τέτοιας δραστηριότητας ενός ΕΕΕΦ είναι ο έλεγχος περιεκτικότητας της ενεργού ουσίας (π.χ. διλτιαζέμη ή αμπικιλίνη ή άλλη ) σε ένα φαρμακευτικό σκεύασμα (δισκίο, καψάκιο, ενέσιμο ή άλλο..). Η τεχνική που ακολουθείται περιγράφεται όπως αναφέραμε πιο πάνω στη μονογραφία του σκευάσματος ή της ουσίας στην Φαρμακοποιία. Η εφαρμογή τέτοιων μεθόδων, απαιτεί μόνο επαλήθευση και όχι πλήρη επικύρωση. Χαρακτηριστικό ορισμένων τέτοιων μεθόδων είναι η παρόμοια προσέγγιση στην ανάλυση ανεξαρτήτως εάν το μετρούμενο είναι η διλτιαζέμη ή η αμπικιλίνη κλπ σε δισκία, καψάκια ή άλλη μορφή σκευάσματος. Για την επικύρωση της ανάλυσης κάθε ουσίας στα διάφορα σκεύασματά το εργαστήριο θα έπρεπε να επικυρώσει για κάθε σκεύασμα την μέθοδο. Γίνεται αντιληπτό ότι τέτοια προσέγγιση είναι δαπανηρή και χρονοβόρος. Πρακτική λύση είναι η εφαρμογή γενικής μεθόδου ( Τεχνικής ).

### **ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΜΕΤΑΞΥ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΠΟ ΤΕΧΝΙΚΗΣ**

Η επικύρωση τεχνικής (ή με γενική μέθοδο ή γενερική μέθοδο (generic method) όπως αλλιώς μπορεί κάποιος να την συναντήσει) περιγράφει την ομοιόμορφη γενική διαδικασία που ακολουθείται από το εργαστήριο για τον προσδιορισμό (π.χ. ποσοτικό , ταυτοποίηση) κάποιου συστατικού σε διάφορα δείγματα (όπως φαρμακευτικών σκευασμάτων ή/ και πρώτων υλών), εφαρμόζοντας μια τεχνική όπως πχ της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης, της Φασμοτοφωτομετρίας ορατού/ υπεριώδους, της ογκομέτρησης κ.α. Η επικύρωση αυτής της Γενικής Διαδικασίας (Τεχνικής) διαφέρει από αυτή της επικύρωσης μιας μεθόδου.

Στις διαφορές όπως προκύπτει και από την συνέχεια αυτής της παρουσίας περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων και τα εξής :

Στη γενική μέθοδο δεν περιγράφεται ο προσδιορισμός συγκεκριμένου αναλύτη /ων, ή ουσίας αλλά ο τρόπος με τον οποίο εξετάζεται κάθε μια ουσία, από μια ομάδα ουσιών (φαρμακευτικών), οι οποίες έχουν κοινές ιδιότητες ώστε να μπορούν να ανιχνευτούν και υπολογιστούν ποσοτικά με τη συγκεκριμένη τεχνική .

Παρ όλον που για τις ουσίες αυτές υπάρχει όμοιος τρόπος προετοιμασίας δείγματος και μέτρησης ( πχ στη συσκευή HPLC ) για κάθε δείγμα ακολουθείται η δική του μονογραφία με περιορισμένες αποδεκτές αποκλίσεις που ορίζονται από τα γενικά κεφάλαια εφαρμογής της τεχνικής στις φαρμακοποιίες .

Οι εμπλεκόμενες συσκευές προετοιμασίας του δείγματος ,δεν είναι για όλες τις ουσίες και μορφές δειγμάτων οι ίδιες αλλά ποικίλουν ανάλογα με τις απαιτήσεις της μονογραφίας κάθε δείγματος και έτσι απαιτούνται διάφορες συσκευές όπως φυγόκεντροι, μηχανικοί αναδευτήρες ,υδρόλουτρα ,φούρνοι, κα., τα οποία καλύπτουν σχεδόν όλο το φάσμα βοηθητικών συσκευών του εργαστηρίου.

Για τη συσκευή μέτρησης (πχ HPLC) δεν πρέπει να αποδεικνύεται η σωστή λειτουργία και καταλληλότητα της με τους ελέγχους και τις διακριβώσεις σε εξειδικευμένη περιοχή αλλά σε όλο το φάσμα δυνατότητας μέτρησης καθ' ότι δεν γίνεται μέτρηση μιας συγκεκριμένης ουσίας μόνο αλλά κάθε πιθανής που μπορεί να σταλεί στο εργαστήριο για εξέταση.

Κατ, επέκταση με τα πιο πάνω η ίδια προσέγγιση ακολουθείται στον έλεγχο για την καταλληλότητα των παρελκομένων της συσκευής , όπως πχ στήλες HPLC , οι οποίες πρέπει να υπόκεινται σε γενικό έλεγχο και κριτήρια καλής λειτουργίας.

Τα εμπλεκόμενα αντιδραστήρια και οι πρότυπες ουσίες δεν είναι τα ίδια που μπορεί να χρησιμοποιούνται για κάθε ανάλυση ξεχωριστά. Έτσι γίνεται χρήση μεγάλου φάσματος των ειδών αυτών και για τον έλεγχο και ποιότητα τους πρέπει να λαμβάνονται ιδιαίτερα μέτρα .

Ο εσωτερικός έλεγχος δεν εφαρμόζεται όπως στην περίπτωση μιας επικυρωμένης μεθόδου ρουτίνας αλλά με διαφορετικό πακέτο μέτρων που περιλαμβάνει πχ πολλαπλούς προσδιορισμούς κ.α..

Στην γενική μέθοδο (Τεχνική) η σωστή και κατάλληλη εφαρμογή της μεθόδου πρέπει να τεκμηριώνεται μέσα από μια σειρά μέτρων, τα οποία λαμβάνονται για κάθε στάδιο εφαρμογής της μεθόδου, με τέτοιο τρόπο ώστε για κάθε πιθανή περίπτωση που μπορεί να προκύψει, καθ όλη την διεξαγωγή της ανάλυσης τα αποτελέσματα που λαμβάνονται να είναι αξιόπιστα .

Όποια και να είναι η τεχνική (HPLC, ογκομέτρηση κλπ ) που περιγράφει μια γενική μέθοδο τα κριτήρια καταλληλότητας και χαρακτηριστικά επίδοσης της όπως εφαρμόζονται στο εργαστήριο πρέπει να διασφαλίζονται με τον ίδιο τρόπο που ισχύει για την κλασική περίπτωση επικύρωσης μεθόδου ανάλυσης συγκεκριμένου αναλύτη σε συγκεκριμένο υπόστρωμα και με εφαρμογή συγκεκριμένης τεχνικής προσδιορισμού.

### **ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ HPLC ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΩΝ ΥΛΩΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΛΕΓΧΟΥ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΚΑΙ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΓΧΚ ΤΗΣ ΚΥΠΡΟΥ**

Στην παρουσίαση αυτή θα περιγραφεί η διαδικασία για την Επικύρωση και εφαρμογή Τεχνικής Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) για τον έλεγχο φαρμακευτικών σκευασμάτων και πρώτων υλών που εφαρμόστηκε στο εργαστήριο Ελέγχου Φαρμάκων και Καλλυντικών του ΓΧΚ της Κύπρου.

Το Εργαστήριο Ελέγχου Φαρμάκων και Καλλυντικών είναι ένα ΕΕΕΦ και ένα από τα 21 εργαστήρια του Γενικού Χημείου του Κράτους της Κύπρου. Το Εργαστήριο επέλεξε την υιοθέτηση των σχετικών Γενικών Τυποποιημένων Διαδικασιών Λειτουργίας (ΤΔΛ) οι οποίες αναφέρονται στην επικύρωση μεθόδων , ενιαίο τρόπο γραφής τους ,Εσωτερικούς Ελέγχους κλπ. και εφαρμόζονται από όλα τα εργαστήρια (για τις επικυρώσεις μεθόδων με συγκεκριμένο αναλύτη, υπόστρωμα ,βάση μιας συγκεκριμένης τεχνικής ) με τις ανάλογες προσαρμογές .Η άλλη επιλογή θα ήταν η καταγραφή ενός πρωτοκόλλου με απλή αναφορά και παραπομπή σ όλες τις εμπλεκόμενες ΤΔΛ.

### **ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ**

Κατηγορίες Μεθόδων που αναλύονται στο εργαστήριο

#### **Μέθοδοι από επίσημες Φαρμακοποιίες**

Οι μέθοδοι που περιλαμβάνονται στις επίσημες Φαρμακοποιίες θεωρούνται επικυρωμένες ως προς την εκλεκτικότητα (specificity), ευαισθησία (sensitivity), γραμμικότητα (linearity),

ακρίβεια (precision), ανάκτηση (recovery) και ανθεκτικότητα (robustness). Για τον λόγο αυτό η εφαρμογή της μεθόδου δεν προνοεί περαιτέρω επικύρωση.

Η διαδικασία που αναφέρεται σε κάθε μονογραφία των ουσιών ή σκευασμάτων εφαρμόζεται σε συνδυασμό με τα Γενικά Κριτήρια της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας (ΕΦ 2.2.46)

#### **Μέθοδοι από φακέλους των κατασκευαστών**

Παρόλο που οι φάκελοι των κατασκευαστών θα πρέπει να περιλαμβάνουν επικυρωμένες μεθόδους εν τούτοις αυτό δεν συμβαίνει πάντοτε. Γι' αυτό ανάλογα με την επικύρωση και τεκμηρίωση της μεθόδου από τον κατασκευαστή γίνεται η απ' ευθείας εφαρμογή της (όταν είναι πλήρης) ή αν χρειάζεται, πρώτα συμπληρώνεται η επικύρωση της και μετά εφαρμόζεται.

Η επικύρωση της μεθόδου από τον κατασκευαστή θα πρέπει οπωσδήποτε να περιλαμβάνει έλεγχο για εκλεκτικότητα, ακρίβεια (συνήθως με ανάκτηση), επαναληψιμότητα και γραμμικότητα με τουλάχιστον τρία σημεία γύρω στην αναμενόμενη τιμή.

### **Μέθοδοι εκτός επίσημων Φαρμακοποιών ή φακέλων των κατασκευαστών**

Για την επικύρωση μεθόδων οι οποίες δεν περιγράφονται σε επίσημη Φαρμακοποιία ή σε φάκελο κατασκευαστή ακολουθούνται οι σχετικές διαδικασίες για πλήρη επικύρωση μεθόδου

### **ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ**

Η Υγρή Χρωματογραφία είναι μέθοδος διαχωρισμού, στην οποία η κινητή φάση, είναι ένα υγρό και η στατική φάση που περιέχεται σε στήλη, είναι είτε κάποιο λεπτά διαμερισμένο στερεό ή υγρό επιστρωμένο σε στερεό υπόστρωμα ή στερεό υπόστρωμα χημικά τροποποιημένο με εισαγωγή οργανικών ομάδων.

Η Υγρή Χρωματογραφία βασίζεται σε μηχανισμούς προσρόφησης, κατανομής, ιονανταλλαγής ή αποκλεισμού κατά μέγεθος.

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου το προς εξέταση ενεργό συστατικό παραλαμβάνεται σε διάλυμα ακολουθώντας τον τρόπο επεξεργασίας του δείγματος, όπως περιγράφεται στη μονογραφία του σκευάσματος στην επίσημη μέθοδο Φαρμακοποιίας ή στη μέθοδο του φακέλου των κατασκευαστών και ακολούθως ανιχνεύεται και υπολογίζεται ποσοτικά με την τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης.

### **ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ**

Γίνεται σαφής καθορισμός της ποιότητας των **αντιδραστηρίων**, του **νερού** καθώς και ο τρόπος προετοιμασίας της **κινητής φάσης** που χρησιμοποιείται είτε δίδοντας την συγκεκριμένη ποιότητα είτε παραπέμποντας σε συγκεκριμένη Τυποποιημένη Διαδικασία Λειτουργίας (ΤΔΛ) η οποία καθορίζει την ποιότητα (αναλυτική καθαρότητα), έλεγχο και χρήση των αντιδραστηρίων στο Εργαστήριο.

### **ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΒΟΗΘΗΤΙΚΑ ΜΕΣΑ**

#### **Συσκευή Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC).**

Μια από τις απαιτήσεις του προτύπου ISO/ IEC 17025 είναι όπως γίνεται σωστή και κατάλληλη επιλογή και έλεγχος καλής λειτουργίας των μηχανημάτων που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές. Ιδιαίτερα είναι απαραίτητο όπως γίνονται έλεγχοι και βαθμονομήσεις /διακριβώσεις πριν και κατά την διάρκεια της χρήσης των οργάνων και όπου χρειάζεται επίσης να διεξάγονται και ενδιάμεσοι έλεγχοι Στην περίπτωση της γενικής μεθόδου (τεχνικής), θα πρέπει αυτές οι απαιτήσεις να διασφαλίζονται όχι μόνο για μια συγκεκριμένη περιοχική λειτουργία του μηχανήματος όπως θα ήταν η περίπτωση διεξαγωγής μια ανάλυσης ρουτίνας αλλά για όλο το φάσμα μέτρησης του οργάνου που

θα καλύπτει όλες τις πιθανές απαιτήσεις για μέτρηση των διαφόρων αναλύτων. Έτσι αυστηροί έλεγχοι καλής λειτουργίας του οργάνου γίνονται ως ακολούθως:

Η σωστή λειτουργία, η βαθμονόμηση και ο έλεγχος της συσκευής HPLC καθορίζεται στις αντίστοιχες ΤΔΛ της .

Ο Καθημερινός Έλεγχος καλής λειτουργίας του συστήματος HPLC εφαρμόζεται βάσει της κοινής για όλες τις συσκευές του Εργαστηρίου ΤΔΛ Β 04 05 16. Σ αυτή καθορίζεται ο τρόπος ελέγχου καθώς και κριτήρια αποδοχής της απόδειξης καλής λειτουργίας της συσκευής

Ο Περιοδικός Έλεγχος, διακρίβωση και συντήρηση των συσκευών HPLC περιγράφεται επιπλέον λεπτομερώς και εφαρμόζεται βάσει της κοινής για όλα τα μηχανήματα ΤΔΛ Β040515. Σ αυτή περιγράφεται η συχνότητα αλλά και οι έλεγχοι που διενεργούνται καθώς επίσης και κριτήρια αποδοχής. Οι έλεγχοι καλύπτουν τόσο τα μετρητικά μέρη του οργάνου όσο και το λογισμικό . Η καλή λειτουργία του οργάνου τεκμηριώνεται με τον έλεγχο καλής λειτουργίας ( Performance Qualification Test) βάσει πρωτοκόλλου και με την χρήση πιστοποιημένων υλικών αναφοράς και στήλης HPLC.

#### **Στήλες HPLC.**

Καθορίζεται ο τρόπος επιλογής της κατάλληλης στήλης για κάθε εφαρμογή της μεθόδου, ο τρόπος διαχείρισης και ελέγχου απόδοσης των χρωματογραφικών στηλών HPLC ( ο οποίος περιγράφεται στην σχετική ΤΔΛ ( Β 04 05 14) του εργαστηρίου) καθώς τα κριτήρια αποδοχής της καταλληλότητας της στήλης για την εφαρμοζόμενη μέθοδο.

#### **Αναλυτικός ζυγός**

Ορίζεται ο αναλυτικός ηλεκτρονικός ζυγός και τα χαρακτηριστικά του , ο οποίος θα χρησιμοποιείται για τις διάφορες ζυγίσεις για την προετοιμασία των δειγμάτων.

Για τη σωστή λειτουργία και τον έλεγχο του γίνεται παραπομπή στις σχετικές γραπτές διαδικασίες λειτουργίας και στην Οδηγία (ΟΔΗ Β 04 05 05) η οποία περιγράφει τον καθημερινό έλεγχο της .

#### **Γυάλινα σκεύη**

Καθορίζεται η ποιότητα των ογκομετρικών σκευών (φιάλες πληρώσεως και σιφώνια) που χρησιμοποιούνται (κατηγορίας Α) και γίνεται αναφορά στις σχετικές γραπτές διαδικασίες που ισχύουν για τον έλεγχο τους .

#### **Φίλτρα**

Δίνονται οι απαιτήσεις για τα χρησιμοποιούμενα φίλτρα ( πχ μεμβράνης μιας χρήσης 0,22 ή 0,45 μm (Millex GV– SLGV025LS ή αντίστοιχα) για το τελικό φιλτράρισμα των διαλυμάτων) .

#### **Άλλες Βοηθητικές συσκευές**

Δηλώνεται ότι οποιαδήποτε άλλη βοηθητική συσκευή χρησιμοποιηθεί, για την προετοιμασία του δείγματος, ακολουθείται η αντίστοιχη ΤΔΛ ή Οδηγία της συσκευής.

### **ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ / ΥΠΟ- ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ**

Περιγράφονται όλες οι προφυλάξεις που λαμβάνονται με βάση τη μέθοδο (δειγματοληψίας, ποσότητα δείγματος κλπ), την ενδεχόμενη ευαισθησία του αναλύτη στο φως και ο τρόπος παρασκευής αγνώστου διαλύματος (δείγματος) καθώς και των Πρότυπων διαλυμάτων.

Ακολουθούνται οι οδηγίες όπως περιγράφονται στην εφαρμοζόμενη μέθοδο (Φαρμακοποιίας ή στο φάκελο του κατασκευαστή). Για κάθε δείγμα γίνεται τουλάχιστον διπλή ζύγιση και διπλές αναλύσεις. Γίνεται παραπομπή στην σχετική ΤΔΛ Β 04 07 02 η οποία περιλαμβάνει τον τρόπο λήψης δείγματος από κάθε πιθανή μορφή παρασκευάσματος (δισκία, καψάκια, ενέσιμα, σκόνες, αλοιφές κα ) και τον τρόπο επεξεργασία τους.

Καθορίζονται οι ουσίες που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων, είτε πρότυπες ουσίες όπως ορίζεται από τη μέθοδο (δηλαδή αν η εφαρμοζόμενη μέθοδος είναι της Β.Φ. τότε θα χρησιμοποιηθούν οι πρότυπες ουσίες BPCRS της μεθόδου Β.Φ. ή αντίστοιχες τους δηλαδή EPCRS (Ε.Φ.) ή USP RS (Α.Φ.) είτε δευτερογενείς ουσίες, οι οποίες έχουν ελεγχθεί με Πρότυπες Ουσίες ή με Χημικές Ουσίες Αναφοράς (ΧΟΑ), ή βάσει των απαιτήσεων των φαρμακοποιών, ως προς την ποιότητα τους. Η διαχείριση, χρήση, έλεγχος και φύλαξης των χρησιμοποιούμενων προτύπων ουσιών από το εργαστήριο, ορίζεται από σχετική ΤΔΛ (B 04 06 01). Καθορίζεται ο αριθμός των διαλυμάτων (διπλές ζυγίσεις) και προσδιορισμών (διπλοί) της ουσίας αναφοράς καθώς και ο τρόπος χρήσης τους.

### **ΤΡΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Καθορίζεται η πιστή εφαρμογή της μεθόδου όσο αφορά την ανάλυση του τελικού διαλύματος εντός καθορισμένου χρόνου όταν απαιτείται και διασαφηνίζεται ότι η επιτρεπόμενη αλλαγή στις χρωματογραφικές συνθήκες της εφαρμοζόμενης μεθόδου (σύνθεση κινητής φάσης, συνθήκες συσκευής, αλλαγή στήλης, κλπ) καθορίζεται μέσα στα επιτρεπόμενα όρια της Ε.Φ. (2.2.46)

### **Συνθήκες Λειτουργίας Οργάνου HPLC**

Γίνεται παραπομπή στις αντίστοιχες οδηγίες ΤΔΛ κάθε οργάνου για τη συναρμολόγηση και προετοιμασία της στήλης στην συσκευή HPLC καθώς και τη σωστή λειτουργία του οργάνου. Αναφέρονται οι προϋποθέσεις για την έναρξη ανάλυσης αγνώστων δειγμάτων (ο επιτυχής έλεγχος της καταλληλότητας του συστήματος της εφαρμοζόμενης μεθόδου) και οι κατάλληλες και επιτρεπτές τροποποιήσεις όπως π.χ. αλλαγή ροής, διαφοροποίηση της σύστασης της κινητής φάσης ή και αλλαγή της στήλης με άλλη αντίστοιχη της, ώστε να επιτευχθεί η επιτυχής καταλληλότητα του συστήματος της μεθόδου, προϋπόθεση για την περαιτέρω εξέταση. Τονίζεται ότι τροποποίηση των συνθηκών της μεθόδου μπορεί να γίνει μόνο για επίτευξη της επιτυχούς καταλληλότητας του συστήματος της και σε περίπτωση που με τις τροποποιήσεις δεν συνεπάγεται κίνδυνος εσφαλμένων αποτελεσμάτων π.χ. η περίπτωση αλλοίωσης της διαχωριστικής ικανότητας του συστήματος με την αύξηση της ροής της κινητής φάσης ιδίως όταν πρόκειται για προσδιορισμό συγγενών ουσιών σε μεθόδους που δεν χρησιμοποιείται πρότυπη ουσία.

### **Μέτρηση δειγμάτων**

Δίνεται ο προκαθορισμένος τρόπος λειτουργίας και μέτρησης των δειγμάτων από την αντίστοιχη ΤΔΛ του οργάνου καθώς και η καθορισμένη σειρά εισαγωγής των διαλυμάτων (προτύπων και αγνώστων) στο μηχάνημα (αυτόματο δειγματολήπτη).

### **Κατασκευή Καμπύλης Αναφοράς**

Καθορίζεται πότε είναι απαραίτητο να ελεγχθεί η γραμμικότητα της απορρόφησης του αναλύτη ως προς την συγκέντρωση στην εξεταζόμενη περιοχή και ο τρόπος κατασκευής της καμπύλης αναφοράς καθώς και πότε είναι αναγκαίος ο έλεγχος για την διέλευση της καμπύλης αναφοράς από το μηδέν (Δοκιμή t- test)

## **ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ – ΕΚΦΡΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

### **Ποιοτικός Προσδιορισμός**

Ο ποιοτικός προσδιορισμός (ταυτοποίηση) των ουσιών με την τεχνική HPLC δεν αποτελεί από μόνος του κριτήριο ταυτοποίησης γιατί και γίνεται σε συνδυασμό με τις άλλες δοκιμές ταυτοποίησης που περιλαμβάνει η μονογραφία του εξεταζόμενου σκευάσματος. Δίνεται ο τρόπος ταυτοποίησης με την τεχνική HPLC στο εργαστήριο και τα κριτήρια αποδοχής για κάθε περίπτωση.

### Ποσοτικός προσδιορισμός

Ο τρόπος υπολογισμού της περιεκτικότητας του αγνώστου δείγματος σε ενεργό συστατικό υπολογίζεται από το λογισμικό του οργάνου με σύγκριση των εμβαδών των επιφανειών των κορυφών προτύπων και αγνώστων διαλυμάτων και των στοιχείων που δίνονται στο πρόγραμμα (συγκέντρωση προτύπων διαλύματος που χρησιμοποιείται).

Γενικά ο υπολογισμός της μάζας δραστικού συστατικού ανά μονάδα σκευάσματος δίνεται από τη σχέση :

$$\text{Μάζα Δραστ.Συστατ./ Μονάδα Σκευάσμ.} = \frac{A_{\text{Δειγμ}} \cdot X_{\text{ΜW}_{\text{Δειγμ}}} \cdot X_{\text{D}_{\text{Δειγμ}}} \cdot X_{\text{P}_{\text{Προτ}}} \cdot X_{\text{W}_{\text{Προτ}}}}{A_{\text{Προτ}} \cdot X_{\text{W}_{\text{Δειγμ}}} \cdot X_{\text{D}_{\text{Προτ}}}}$$

Η

$$\% \text{ Περιεκτ. της δηλουμένης ποσότητας} / = \frac{A_{\text{Δειγμ}} \cdot X_{\text{ΜW}_{\text{Δειγμ}}} \cdot X_{\text{D}_{\text{Δειγμ}}} \cdot X_{\text{P}_{\text{Προτ}}} \cdot X_{\text{W}_{\text{Προτ}}}}{X_{\text{100}} \cdot A_{\text{Προτ}} \cdot X_{\text{W}_{\text{Δειγμ}}} \cdot X_{\text{D}_{\text{Προτ}}} \cdot X_{\text{S}_{\text{Δειγμ}}}}$$

Όπου

$A_{\text{Δειγμ}}$  = η απόκριση του δείγματος στο υποδεικνυόμενο μήκος κύματος

$A_{\text{Προτ}}$  = η απόκριση της πρότυπης ουσίας στο υποδεικνυόμενο μήκος κύματος

$W_{\text{Δειγμ}}$  = βάρος του δείγματος

$W_{\text{Προτ}}$  = βάρος της πρότυπης ουσίας

$D_{\text{Δειγμ}}$  = συντελεστής αραίωσης για το δείγμα

$D_{\text{Προτ}}$  = συντελεστής αραίωσης για την πρότυπη ουσία

$MW_{\text{Δειγμ}}$  = μέσο βάρος ανά μονάδα σκευάσματος

$S_{\text{Δειγμ}}$  = δύναμη του σκευάσματος (περιεκτικότητα σε ενεργό συστατικό ανά μονάδα σκευάσματος)

$P_{\text{Προτ}}$  = συντελεστής καθαρότητας του προτύπου

Ο υπολογισμός του ποσοτικού προσδιορισμού Πρώτης Ύλης γίνεται ανάλογα με την πιο πάνω περίπτωση για σκευάσματα, από τη σχέση:

$$\text{Μάζα Δραστ.Συστατ./ Μάζα Δείγματος} = \frac{A_{\text{Δειγμ}} \cdot X_{\text{D}_{\text{Δειγμ}}} \cdot X_{\text{P}_{\text{Προτ}}} \cdot X_{\text{W}_{\text{Προτ}}}}{A_{\text{Προτ}} \cdot X_{\text{W}_{\text{Δειγμ}}} \cdot X_{\text{D}_{\text{Προτ}}}}$$

Για την επεξήγηση των συντιμήσεων ισχύουν τα πιο πάνω.

### Κριτήρια Αποδοχής

Μέσος όρος και ακρίβεια αποτελεσμάτων

α) Έτοιμα Φαρμακευτικά Σκευάσματα

Γίνονται τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες μετρήσεις του κάθε δείγματος χρησιμοποιώντας είτε την καμπύλη αναφοράς ή το διάλυμα πρότυπης ουσίας ίδιας συγκέντρωσης με το διάλυμα αγνώστου .

β) Πρώτες Ύλες

Γίνονται τουλάχιστον τρεις ανεξάρτητες μετρήσεις του κάθε δείγματος χρησιμοποιώντας είτε την καμπύλη αναφοράς ή διάλυμα πρότυπης ουσίας ίδιας συγκέντρωσης με το διάλυμα αγνώστου .

Υπολογίζεται ο μέσος όρος και η σχετική μέση απόκλιση.

### **Αποτελέσματα και μέτρα**

Δεδομένου ότι ο μέσος όρος είναι εντός των αποδεκτών ορίων της μονογραφίας και η σχετική τυπική απόκλιση των πολλαπλών αναλύσεων δεν υπερβαίνει το 2% για τα σκευάσματα και το 1% για τις πρώτες ύλες τα αποτελέσματα γίνονται αποδεκτά. Σε περίπτωση που δεν ισχύουν τα πιο πάνω τότε ορίζονται σαφώς τα μέτρα που λαμβάνονται σε κάθε περίπτωση ανολόγως με τον λόγο απόκλισης. Τα μέτρα αφορούν την εκτέλεση περαιτέρω αναλύσεων μέχρι ενός ορίου και την στατιστική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων καθώς και σαφή κριτήρια απόρριψης.

### **ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ**

Για τον τρόπο εφαρμογής μιας μεθόδου λαμβάνονται υπόψη οι ειδικές μονογραφίες αλλά και οι γενικές οδηγίες που παρέχουν οι Φαρμακοποιίες, ( ΕΦ, ΒΦ και ΑΦ ), οι κατευθυντήριες οδηγίες του European Department for the Quality of Medicines (EDQM) του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου, οι οδηγίες του ICH (International Conference on Harmonization), Validation of Analytical Procedures, Methodology καθώς και οι φάκελοι σκευασμάτων των κατασκευαστών.

### **ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ**

#### **Εσωτερικός έλεγχος ποιότητας**

Ο εσωτερικός έλεγχος ποιότητας για κάθε ανάλυση μπορεί, ανάλογα με την περίπτωση, να περιλαμβάνει όλα ή μερικά από τα πιο κάτω :

(α) Με την επιτυχή εκτέλεση του ελέγχου καταλληλότητας συστήματος ως προϋπόθεση πριν από οποιοδήποτε προσδιορισμό.

(β) Μέτρηση «λευκού αντιδραστηρίου» πριν από την εισαγωγή των προτύπων και αγνώστων διαλυμάτων.

(γ) Μέτρηση «λευκού δείγματος» όταν θεωρηθεί απαραίτητο ανάλογα με την εικόνα που προκύπτει από το χρωματογράφημα του αγνώστου δείγματος.

Οι επίσημες μέθοδοι (φαρμακοποιίας) καθώς και αυτές των φακέλων των κατασκευαστών θεωρούνται ότι είναι επικυρωμένες και ως προς την εκλεκτικότητα (specificity) των μετρούμενων συστατικών.

(δ) Με τη χρήση διπλών δειγμάτων για κάθε ανάλυση και διπλών μετρήσεων κάθε δείγματος. Η μέτρηση θεωρείται αποδεκτή μόνο όταν οι πολλαπλές μετρήσεις διαφέρουν μεταξύ τους λιγότερο από 2% .

(ε) Χρήση καμπύλης αναφοράς και ελέγχου γραμμικότητας που να περιλαμβάνει την περιοχή μέτρησης του 80-120 % της θεωρητικής συγκέντρωσης του αγνώστου διαλύματος

(ζ) Μέτρηση δευτέρου προτύπου διαλύματος, το οποίο χρησιμοποιείται ως «γνωστό /άγνωστο» στην ίδια συγκέντρωση με το πρότυπο διάλυμα. Η μετρηθείσα συγκέντρωση του δεν πρέπει να απέχει περισσότερο από το 2% της θεωρητικής.

(η) Προσδιορισμός ορίου ανίχνευσης και ορίου ποσοτικοποίησης όταν οι μετρούμενες συγκεντρώσεις είναι πολύ χαμηλές και η εικόνα που παρουσιάζει η βασική γραμμή, στο χρωματογράφημα, είναι αμφιβόλου ποιότητας.

(θ) Έλεγχος για “ carry - over ”, κυρίως όταν υπάρχει υποψία από τα δεδομένα της ανάλυσης, με ανάλυση του διαλύτη («λευκού αντιδραστηρίου») ενδιάμεσα δυο ενέσεων του ίδιου δείγματος.

(ι) Σε περίπτωση που κριθεί αναγκαίο, κυρίως όταν το δείγμα βρεθεί εκτός προδιαγραφών, ο εσωτερικός έλεγχος μπορεί να προεκταθεί αναλόγα, όπως π.χ. σε έλεγχο της ανάκτησης του αναλύτη ( με standard addition ), χρήση προτύπου σκευάσματος ως QCS ( Quality control Sample ), έλεγχο με άλλο σύστημα, αλλαγή άλλης στήλης, έλεγχο του ορίου ανίχνευσης κλπ

Τα στοιχεία του εσωτερικού ελέγχου, Διαφορά Διπλών Προσδιορισμών, καταγράφονται στον Πίνακα EAE /HPLC στον Η/Υ και οι εκτυπώσεις τους καθώς και των διαγραμμάτων ελέγχου που προκύπτουν από αυτά, φυλάσσονται στο «Ενιαίο Αρχείο Εσωτερικού Ελέγχου» (APX EAE) του εργαστηρίου.

### **Εξωτερικός έλεγχος ποιότητας**

Ο έλεγχος της ποιότητας επιτυγχάνεται με την εφαρμογή εξωτερικού ελέγχου με τα αποτελέσματα διεργαστηριακών εξετάσεων

## **ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ**

Απαραίτητη προϋπόθεση για την εκτέλεση μιας ανάλυσης με τη τεχνική της HPLC είναι ο έλεγχος της καταλληλότητας του συστήματος. Οι επίσημες Μέθοδοι των Φαρμακοποιών, ως επικυρωμένες που είναι, περιλαμβάνουν “σύστημα καταλληλότητας” (System suitability).

Σε περίπτωση που δεν δηλώνεται διαφορετικά στην μονογραφία του δείγματος πρέπει να πληρούνται οι πιο κάτω απαιτήσεις ( Ε.Φ 2.2.46 )

- **Ο συντελεστής συμμετρίας (  $A_s$  )** της προς εξέτασης κορυφής να βρίσκεται μεταξύ των τιμών 0,8 και 1,5.
- Στις δοκιμές για προσδιορισμό των συγγενών ουσιών το **όριο ανίχνευσης της κορυφής** (το οποίο να αντιστοιχεί σε τιμή signal-to-noise ratio 3 ) είναι μικρότερο του ορίου απόρριψης ( reporting threshold ) της μεθόδου.
- Στις δοκιμές για προσδιορισμό των συγγενών ουσιών το **όριο ποσοτικοποίησης της κορυφής** (το οποίο να αντιστοιχεί σε τιμή signal-to-noise ratio 10 ) είναι ίσο ή μικρότερο του ορίου απόρριψης ( reporting threshold ) της μεθόδου.

Το πακέτο ελέγχου καταλληλότητας του συστήματος μπορεί να περιλαμβάνει στοιχεία από τα πιο κάτω:

Ανάλυση Λευκού

Χρήση Προτύπου διαλύματος:

Παρασκευάζεται πρότυπο διάλυμα όπως περιγράφεται στην εφαρμοζόμενη μέθοδο και εκτελείται ανάλυση για την ανεύρεση των συνθηκών όπως απαιτεί το σύστημα καταλληλότητας της μεθόδου . Το σύστημα θεωρείται ικανοποιητικό όταν πληρούνται οι καθορισμένες απαιτήσεις του, οι οποίες συνήθως είναι κάποιες από τις πιο κάτω :

- α. Συντελεστής διαχωριστικότητας
- β. Θεωρητικές Πλάκες
- γ. Συντελεστής συμμετρίας
- δ. Παράθυρο
- ε. Επαναληψιμότητα των χρόνων κατακράτησης
- ζ. Επαναληψιμότητα εμβαδού κορυφής απόκρισης.
- η. Signal-to-noise ratio (S/N )

Ο τρόπος υπολογισμού των παραμέτρων αυτών δίδεται από την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία

## **ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑ**

Κατά απαίτηση του προτύπου ISO/IEC 17025 §5.4.6 θα πρέπει, ανάλογα με την φύση της μεθόδου να γίνεται όσο είναι δυνατό ένας λογικός προσδιορισμός και υπολογισμός της αβεβαιότητας.

Όπου απαιτείται η εκτίμηση της συνδυασμένης τιμής αβεβαιότητας, υπολογίζεται ακολουθώντας τη διαδικασία “step – by – step” κατά την οποία όλες οι συνιστώσες σχετικές αβεβαιότητες ταυτοποιούνται και ποσοτικοποιούνται ξεχωριστά η κάθε μια ή όπου είναι δυνατό ως συνδυασμός. Οι επί μέρους αβεβαιότητες υπολογίζονται και εκφράζονται ως **Μέγιστη σχετική αβεβαιότητα** και τελικά αθροίζονται ως η **Συνδυασμένη μέγιστη σχετική αβεβαιότητα**.

Παράδειγμα υπολογισμού της αβεβαιότητας στην εφαρμογή της μεθόδου έγινε με τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού με την τεχνική HPLC της ουσίας Καπτοπρίλης σε δισκία όπως προέκυψαν κατά την επικύρωση της σχετικής μεθόδου στο εργαστήριο.

Από τον υπολογισμό της εκτεταμένης αβεβαιότητας του παραδείγματος επιβεβαιώθηκε ότι το εργαστήριο δεν υπερβαίνει το στόχο που έχει θέσει το δίκτυο των επισήμων εργαστηρίων Ελέγχου Φαρμάκων του Συμβουλίου της Ευρώπης ( EDQM ,OMCL – Network) . Για τιμές ποσοτικού προσδιορισμού με τεχνική HPLC ο στόχος του δικτύου (όπως έχει προκύψει μετά από μελέτες διεργαστηριακών ελέγχων στους οποίους συμμετείχε και το εργαστήριό μας) είναι, Συνδυασμένη Αβεβαιότητα  $\pm 2.0\%$  .

### **ΕΚΘΕΣΗ ΕΞΕΤΑΣΗΣ**

Τα αποτελέσματα της δοκιμής για τον **ποιοτικό έλεγχο** περιλαμβάνονται στην έκθεση του δείγματος και δίδονται με την έκφραση "Συμφωνεί " ή "Δε συμφωνεί " ανάλογα.

Όσο αφορά τον **ποσοτικό προσδιορισμό** του ενεργού συστατικού το αποτέλεσμα μπορεί να δοθεί ως εκατοστιαία ποσότητα της δηλούμενης ποσότητας ή απλώς ως συγκέντρωση του μετρούμενου δραστικού συστατικού στο σκεύασμα.Όπου δεν εφαρμόζονται τα προηγούμενα χρησιμοποιείται η έκφραση "Συμφωνεί " ή "Δε συμφωνεί " .

### **ΑΣΦΑΛΕΙΑ**

Η εφαρμογή της δοκιμής δεν απαιτεί ειδικά μέτρα προφύλαξης.

Σε κάθε περίπτωση όμως ισχύουν όλα τα σχετικά μέτρα προφύλαξης για την χρήση χημικών ουσιών και ασφάλειας στο εργαστήριο.

### **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ**

Η εφαρμογή και επικύρωσης τεχνικής η οποία είναι μια γενική μέθοδος (generic method) διαφέρει σίγουρα από την επικύρωση μιας μεθόδου που αναφέρεται σε συγκεκριμένο είδος αναλύτη και υπόστρωμα. Όμως για την επικύρωση της, δηλαδή για την απόδειξη της καταλληλότητας στην εφαρμογή της στο εργαστήριο, είναι απαραίτητο όπως τα ίδια κριτήρια καταλληλότητας πρέπει να διασφαλίζονται .Το Εργαστήριο Ελέγχου Φαρμάκων παρ' όλες τις ιδιομορφίες του έχει υποχρέωση να αποδεικνύει ότι εφαρμοζόμενες μέθοδοι που χρησιμοποιεί είναι κατάλληλες για τον σκοπό τους και παρέχουν επίσης αξιόπιστα αποτελέσματα.

### **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. ISO / IEC 17025 “ General requirements for the competence of testing and calibration laboratories” ( Geneva 1999)
2. “Quantifying uncertainty in analytical measurement ” 2<sup>nd</sup> edition , Eurachem / CITAC Guide (2000)
3. European Pharmacopoeia, 5th Edition, January 2005
4. British Pharmacopoeia,2000, version 4.1

5. United States Pharmacopoeia, USP 28
6. "Validation of Analytical procedures", PA/PH/OMCL (99) 37,R
7. PA/PH/OMCL (2001) 6,5 April2002,EDQM, Strasbourg
8. PA/PH/OMCL (2001) 7,4 April2002,EDQM, Strasbourg
9. International Conference on Harmonization (ICH), Validation of Analytical Procedures. Methodology,
10. Dass A.G.J. and J.H. McB. Miller; "Relationship Between Content Limits, System suitability for precision and acceptance/rejection criteria for Assays using chromatographic methods", PHARMEUROPA Vol. 11 No. 4, December 1999,571-577.
11. Εκτίμηση Αβεβαιότητας στις χημικές Μετρήσεις ,Δρ. Ν. Σ. Θωμαΐδης (Γ.Χ.Κ. Ελλάδας)
12. Rose U. and J. Fuchs , "Validation of the value for specific absorbance in monographs of the European Pharmacopoeia", PHARMEUROPA Vol. 10 No. 1, March 1998,146-148.
13. EC Risk and Safety Phrases
14. Dass A.G.J. and J.H. McB. Miller; "Content limit in the European Pharmacopoeia", PHARMEUROPA Vol. 10 No. 1, March 1998,137-146.