

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ: ΕΡΕΥΝΑ, ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑ ΚΑΙ
ΠΡΟΣΒΑΣΗ»**

Διπλωματική Εργασία

Ανάπτυξη και εφαρμογή νεότερων τεχνικών ποιοτικού ελέγχου φαρμάκων

**ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΧΑΡΛΑ
Α.Μ. 7450602100055**

ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2024

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Ηλίας Κοπέας, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Σχολής
ΕΚΠΑ

ΜΕΛΟΣ: Κωνσταντίνος Συρίγος, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

ΜΕΛΟΣ: Ανδριαννή Χαρπίδου, Επιστημονικός Συνεργάτης Ιατρικής Σχολής
ΕΚΠΑ

Πίνακας Περιεχομένων

Πίνακας Περιεχομένων	3
Πίνακας Εικόνων	6
Περίληψη	7
Abstract	9
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή στον έλεγχο ποιότητας φαρμάκων	11
1.1 Ιστορική αναδρομή	12
1.2 Διασφάλιση ποιότητας	15
1.3 Ορθή Παρασκευαστική Πρακτική (Good Manufacturing Practices, GMP)	18
1.4 Ποιοτικός έλεγχος	20
1.4.1 Κατευθυντήριες οδηγίες για την ποιότητα των φαρμάκων	21
Κεφάλαιο 2: Ανάπτυξη και επικύρωση αναλυτικής μεθόδου	25
2.1 Κατηγορίες ελέγχων	26
2.1.1 Μελέτες ταυτοποίησης	26
2.1.2 Μελέτες προσμίξεων (Impurities – Related substances)	27
2.1.3 Μελέτες διάλυτοποίησης και καταθρυμματισμού (Dissolution & Disintegration tests)	28
2.1.4 Μελέτες ομοιομορφίας περιεχομένου δόσης (Uniformity of dosage units)	30
2.2 Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου	31

2.2.1 Παράμετροι επικύρωσης μεθόδου για χρωματογραφικές μεθόδους	31
2.2.2.1 Ακρίβεια (Accuracy).....	36
2.2.2.2 Πιστότητα (Precision)	37
2.2.2.3 Γραμμικότητα (Linearity).....	39
2.2.2.4 Εξειδίκευση (Specificity).....	40
2.2.2.5 Σταθερότητα προτύπων διαλυμάτων και δειγμάτων	41
2.2.2.6 Όριο ανίχνευσης (Detection limit, DL) και Όριο ποσοτικοποίησης (Quantitation limit, QL).....	42
2.2.2.7 Ανθεκτικότητα (Robustness).....	44
Κεφάλαιο 3: Αναλυτικές τεχνικές	46
3.1 Flash sizer	48
3.2 Απεικόνιση κηλίδων με laser (ILS).....	48
3.3 Τομογραφία	51
3.4 Φασματοσκοπία Αποδόμησης Επαγόμενη από laser (LIBS)	53
3.5 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).....	54
3.6 Φασματοσκοπία Terahertz.....	56
3.7 Φασματοσκοπία Raman	58
3.8 Φασματοφωτομετρία Εγγύς Υπέρυθρου (NIR).....	61
3.9 Φωσφορισμός	63

3.10 Ακουστικές μέθοδοι	64
3.11 Φασματομετρία Μαζών (MS)	65
3.12 Φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων Χ (XRF).....	66
Κεφάλαιο 4: Εφαρμογή των PAT στην παραγωγική διαδικασία	68
4.1 Ανάμειξη	68
4.2 Κοκκοποίηση.....	70
4.3 Ξήρανση.....	73
4.4 Επικάλυψη.....	74
4.5 Δισκιοποίηση.....	75
Κεφάλαιο 5: Συζήτηση	77
Εκτενής σύνοψη	81
Βιβλιογραφία.....	88

Πίνακας Εικόνων

Εικόνα 1.1: Χρονολογική σειρά των γεγονότων που οδήγησαν στην Ορθή Παρασκευαστική Πρακτική (GMP) [6].	15
Εικόνα 3.1: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου ILS. Τύποι ακτινοβολίας φωτός laser: (α) περίθλαση & κατοπτρική ανάκλαση και (β) διάχυτη ανάκλαση [32]	50
Εικόνα 3.2: Σχηματική αναπαράσταση της μικροτομογραφίας ακτίνων X για την ανάλυση φαρμακευτικών δισκίων [25].	51
Εικόνα 3.3: Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου LIBS για την ανάλυση φαρμακευτικών δισκίων [25].	53
Εικόνα 3.4: Σχηματική απεικόνιση φασματογράφου NMR [25].	55
Εικόνα 3.5: Σχηματική απεικόνιση φασματογράφου Terahertz [25].	57
Εικόνα 3.6: Διαφορετικές διαμορφώσεις δειγματοληψίας για την λήψη φασμάτων Raman a) περίπτωση εμφανίζεται ο απλός τρόπος φασματοσκοπίας Raman, στη b) η μέθοδος φωτισμού ευρείας περιοχής (WAI) και στην c) η φασματοσκοπία ενισχυμένης ανάκλασης (Raman transmission) [44].	60
Εικόνα 3.7: Βασική διαμόρφωση φασματόμετρου NIR [25].	62

Περίληψη

Ο έλεγχος της ποιότητας των φαρμακευτικών προϊόντων αποτελεί ένα αναπόσπαστο κομμάτι της σύγχρονης φαρμακοβιομηχανίας, με καθοριστικό ρόλο να διαδραματίζουν οι Ορθές Παρασκευαστικές Πρακτικές (GMPs). Στην παρούσα διπλωματική εργασία αρχικά πραγματοποιήθηκε εισαγωγή στον ποιοτικό έλεγχο των φαρμάκων, όπου προσεγγίστηκαν η έννοια της διασφάλισης ποιότητας, καθώς και οι κατευθυντήριες οδηγίες για την ασφάλεια των φαρμάκων που ορίζονται 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).

Στην συνέχεια αναλύονται τα βασικά χαρακτηριστικά της ανάπτυξης και επικύρωσης μιας αναλυτικής μεθόδου, όπου εξετάστηκαν χαρακτηριστικά ποιότητας όπως η γραμμικότητα, η πιστότητα, η ακρίβεια, η ανθεκτικότητα και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης. Η αξιολόγηση των σχετικών χαρακτηριστικών για κάθε μέθοδο, είναι απαραίτητο να πραγματοποιείται ακολουθώντας τις διεθνείς οδηγίες του Διεθνούς Συμβουλίου για την Εναρμόνιση των Τεχνικών Απαιτήσεων για Φάρμακα για Ανθρώπινη Χρήση [ICH Guidelines Q2(R1) και Q3B(R2)]. Ειδικότερα, η κάθε φαρμακοτεχνική μορφή, με την παρούσα διπλωματική εργασία να εστιάζει στα στερεά δισκία, παρασκευάζεται με διαφορετικό τρόπο και οι GMPs περιλαμβάνουν τις προδιαγραφές για κάθε μορφή και τις οδηγίες για όλη τη διαδικασία. Ακολούθως αναλύονται οι έλεγχοι που πραγματοποιούνται

στα τελικά προϊόντα, μεταξύ των οποίων μελέτες ομοιομορφίας, διαλυτοποίησης και προσμίξεων.

Τέλος, αναλύονται οι διεργασίες αναλυτικής τεχνολογίας (Process Analytical Technology, PAT), οι οποίες ορίζονται ως ένας μηχανισμός σχεδιασμού, ανάλυσης και ελέγχου των διεργασιών παραγωγής φαρμακευτικών προϊόντων μέσω της μέτρησης των κρίσιμων σημείων ελέγχου (Critical Control Point, CCP) που επηρεάζουν τα κρίσιμα ποιοτικά χαρακτηριστικά (CQA). Η επιλογή των κατάλληλων μεθόδων βασίζεται αρχικά στη διαθεσιμότητα εργαστηριακού εξοπλισμού, στην ύπαρξη κατάλληλα καταρτισμένου επιστημονικού δυναμικού και το κόστος. Οι κυριότερες φασματοσκοπικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην PAT είναι η φασματοσκοπία υπέρυθρης ακτινοβολίας, η φασματοσκοπία Raman, η φασματοσκοπία Terahertz, η φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X (XRF) και σε ελάχιστες περιπτώσεις ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός, οι οποίες αποτελούν μη επεμβατικές και μη καταστρεπτικές τεχνικές. Τέλος, αναλύονται οι προοπτικές ενσωμάτωσης των PAT σε βιομηχανική κλίμακα και μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο συγκεκριμένο πεδίο.

Λέξεις κλειδιά: ποιοτικός έλεγχος, φαρμακοβιομηχανία, αναλυτικές τεχνικές, PAT

Abstract

Quality control of pharmaceutical products is an integral part of the modern pharmaceutical industry, with Good Manufacturing Practices (GMPs) playing a key role. In this thesis, an introduction to quality control of pharmaceuticals was firstly provided, where the concept of quality assurance was approached, as well as the guidelines for drug safety set by regulatory authorities such as the US Food and Drug Administration (FDA), the European Medicines Agency (EMA) and the World Health Organization (WHO).

The following section discusses the key features of the development and validation of an analytical method, where quality attributes such as linearity, precision, reproducibility, accuracy, robustness and limits of detection and quantification were analyzed. The evaluation of the relevant characteristics for each method, it is necessary to follow the international guidelines of the International Council for Harmonization of Technical Requirements for Medicinal Products for Human Use [ICH Guidelines Q2(R1) and Q3B(R2)]. In particular, each pharmaceutical form, with this thesis focusing on solid tablets, is prepared differently and the GMPs include the specifications for each form and the guidelines for the whole process. This is followed by an analysis of the tests carried out on the finished products, including homogeneity, solubility and impurity studies.

Finally, Process Analytical Technology (PAT), defined as a mechanism for the design, analysis and control of pharmaceutical manufacturing processes through the measurement of critical process parameters (CPPs) that affect critical quality attributes

(CQAs), is discussed. The selection of appropriate methods is initially based on the availability of laboratory equipment, the availability of suitably qualified scientific personnel and cost. The main spectroscopic techniques used in PAT are infrared spectroscopy, Raman spectroscopy, Terahertz spectroscopy, X-ray fluorescence spectroscopy (XRF) and, in a few cases, nuclear magnetic resonance, which are non-invasive and non-destructive techniques. Finally, the prospects for the integration of PATs on an industrial scale and studies that have been carried out in this field are discussed.

Key words: quality control, pharmaceutical industry, analytical techniques, PAT

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή στον έλεγχο ποιότητας φαρμάκων

Η έννοια του φαρμάκου έχει ρίζες από τους αρχαίους πολιτισμούς, καθώς οι ασθένειες και η ανάγκη για αποκατάσταση ή βελτίωση της υγείας συνοδεύουν τον άνθρωπο από την αρχή της ιστορίας του. Με το πέρασμα των χρόνων, έγινε αντιληπτό πως είναι απαραίτητο να διασφαλίζεται η ποιότητα των φαρμάκων καθώς συνέβησαν κάποια τραγικά περιστατικά που είχαν επιβλαβείς συνέπειες στην ανθρώπινη υγεία. Έτσι, αναπτύχθηκαν 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. Οι αποφάσεις σχετικά με την ποιότητα τους δεν μπορούν να ληφθούν από τον μέσο καταναλωτή. 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 δυναμένη 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 [1].

Για την εξασφάλιση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας των φαρμακευτικών προϊόντων απαιτούνται ειδικές γνώσεις και τεχνογνωσία προκειμένου να διαφυλάσσεται η ανθρώπινη υγεία. Ειδικότερα, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) το φάρμακο αποτελεί όρο με ποικίλες χρήσεις και πιο συγκεκριμένα « Στην ιατρική, αναφέρεται σε οποιαδήποτε ουσία με δυνατότητα πρόληψης ή θεραπείας ασθένειας ή ενίσχυσης της σωματικής ή διανοητικής ευημερίας και στη Φαρμακολογία σε οποιονδήποτε χημικό παράγοντα που μεταβάλλει τις βιοχημικές, φυσιολογικές διαδικασίες ιστών ή οργανισμών» [2].

1.1 Ιστορική αναδρομή

Από την αρχή του πολιτισμού οι άνθρωποι ανησυχούσαν για την ποιότητα και την ασφάλεια των τροφίμων και των φαρμάκων. Μία από τις πρώτες γνωστές αναφορές στον ποιοτικό έλεγχο χρονολογείται το 1202, όταν ο βασιλιάς Ιωάννης της Αγγλίας κήρυξε τον πρώτο αγγλικό νόμο για τα τρόφιμα, το Assize of Bread, ο οποίος απαγόρευε τη νοθεία του ψωμιού με συστατικά όπως αλεσμένα μπιζέλια ή φασόλια. Οι κοινωνικοπολιτικές αλλαγές των επόμενων αιώνων στις δυτικές κοινωνίες, καθώς και η σημαντική πρόοδος στις επιστήμες, οδήγησαν, τελικά, στην εισαγωγή και εφαρμογή κανονισμών και απαιτήσεων για την ποιότητα και την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων, με στόχο την

ασφάλεια της ανθρώπινης υγείας. Ο νόμος για τον βιολογικό έλεγχο (1902), που εισήχθη για πρώτη φορά στις ΗΠΑ , νομοθετήθηκε αφού περισσότερα από δώδεκα παιδιά πέθαναν από μια αντιτοξίνη διφθερίτιδας που είχε μολυνθεί με τον βάκιλλο του τετάνου. Αυτό το γεγονός αποτέλεσε ένα κομβικό σημείο στην ιστορία του ποιοτικού ελέγχου, σηματοδοτώντας την αρχή της ρυθμιστικής εποπτείας της φαρμακευτικής βιομηχανίας [3].

Ακολούθως, η ψήφιση του νόμου περί καθαρών τροφίμων και φαρμάκων που κυκλοφόρησε το 1906 στις Ηνωμένες Πολιτείες κατέστησε παράνομη την πώληση νοθευμένων τροφίμων ή φαρμάκων. Ειδικότερα, ο νόμος περιλάμβανε διατάξεις κατά της «λανθασμένης επωνυμίας» ενώ όριζε ως ένα φάρμακο εσφαλμένο εάν περιείχε αλκοόλ, μορφίνη, όπιο, κοκαΐνη ή οποιοδήποτε από πολλά άλλα δυνητικά επικίνδυνα ή εθιστικά ναρκωτικά ή εάν η ετικέτα του δεν έδειχνε την ποσότητα ή την αναλογία τέτοιων ναρκωτικών ουσιών. Ο νόμος του 1906 αποσκοπούσε συγκεκριμένα στην τήρηση ορισμένων προτύπων ποιότητας και απαιτήσεων επισήμανσης, θέτοντας τις βάσεις για τη σύγχρονη φαρμακευτική ρύθμιση και πρακτικές ποιοτικού ελέγχου [4-5].

Ορισμένα γεγονότα που αποτέλεσαν σταθμό στην εξέλιξη της ρύθμισης των φαρμάκων παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.1. Το σημαντικότερο ίσως 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, το 1941, σχεδόν 300 άνθρωποι πέθαναν μετά τη λήψη δισκίων σουλφαθειαζόλης μολυσμένα με φαινοβαρβιτάλη, που κατασκευάζονται από την Winthrop Chemical Company. Η έρευνα του FDA για την παραγωγή σουλφαθειαζόλης της Winthrop αποκάλυψε κατασκευαστικές ανεπάρκειες στο εργοστάσιο και σοβαρές παρατυπίες στην προσπάθεια της εταιρείας να ανακαλέσει τα μολυσμένα δισκία. Αυτό το περιστατικό ώθησε τον FDA να αναθεωρήσει τις απαιτήσεις 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). Ο όρος εμφανίστηκε για πρώτη φορά επίσημα στην τροποποίηση του 1962 του νόμου για τα τρόφιμα, τα φάρμακα και τα καλλυντικά των ΗΠΑ. Το πρώτο 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 τον 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 [3].

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 1.1: Χρονολογική σειρά των γεγονότων που οδήγησαν στην Ορθή Παρασκευαστική Πρακτική (*GMP*) [6].

1.2 Διασφάλιση ποιότητας

Η «διασφάλιση ποιότητας» είναι μια ευρεία έννοια που καλύπτει όλα τα θέματα που επηρεάζουν μεμονωμένα ή συλλογικά την ποιότητα ενός προϊόντος. Είναι 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:

- τα φαρμακευτικά προϊόντα σχεδιάζονται και αναπτύσσονται κατά τρόπο που να λαμβάνονται υπόψη οι απαιτήσεις των GMP και άλλων συναφών οδηγιών, όπως αυτές της Ορθής Εργαστηριακής Πρακτικής (GLP) και της Ορθής Κλινικής Πρακτικής (GCP)
- οι διαδικασίες παραγωγής και ελέγχου προσδιορίζονται σαφώς σε γραπτή μορφή και υιοθετούνται οι απαιτήσεις των GMP
- οι διευθυντικές αρμοδιότητες προσδιορίζονται σαφώς στις περιγραφές θέσεων εργασίας
- καθορίζονται οι συνθήκες για την κατασκευή, την προμήθεια και τη χρήση των σωστών πρώτων υλών και των συσκευασιών
- διενεργούνται όλοι οι απαραίτητοι έλεγχοι στις πρώτες ύλες, στα ενδιάμεσα προϊόντα και στα τελικά προϊόντα
- το τελικό προϊόν έχει υποστεί σωστή επεξεργασία και έλεγχο, σύμφωνα με τις καθορισμένες διαδικασίες

- 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
- 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·
- 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
- υπάρχει σύστημα για την έγκριση αλλαγών που ενδέχεται να έχουν αντίκτυπο στην ποιότητα του προϊόντος
- διενεργούνται τακτικές αξιολογήσεις της ποιότητας των φαρμακευτικών προϊόντων με στόχο την επαλήθευση της συνέπειας της διαδικασίας και τη διασφάλιση της συνεχούς βελτίωσής της

Ο κατασκευαστής πρέπει να αναλάβει την ευθύνη για την ποιότητα των φαρμακευτικών προϊόντων για να διασφαλίσει ότι είναι κατάλληλα για την προβλεπόμενη χρήση τους, ότι συμμορφώνονται με τις απαιτήσεις της άδειας κυκλοφορίας και δεν θέτει σε κίνδυνο τους ασθενείς λόγω ανεπαρκούς ασφάλειας, ποιότητας ή αποτελεσματικότητας. Η επίτευξη

αυτού του ποιοτικού στόχου είναι ευθύνη της ανώτερης διοίκησης και απαιτεί τη συμμετοχή και τη δέσμευση του προσωπικού σε πολλά διαφορετικά τμήματα και σε όλα τα επίπεδα εντός της εταιρείας, των προμηθευτών της εταιρείας και των διανομέων. Για την αξιόπιστη επίτευξη του ποιοτικού στόχου πρέπει να υπάρχει ένα ολοκληρωμένα σχεδιασμένο και σωστά εφαρμοσμένο σύστημα διασφάλισης ποιότητας που να ενσωματώνει GMP και ποιοτικό έλεγχο, το οποίο θα πρέπει να τεκμηριώνεται πλήρως και να παρακολουθείται η αποτελεσματικότητά του. Όλα τα μέρη του συστήματος διασφάλισης ποιότητας θα πρέπει να είναι επαρκώς στελεχωμένα με ικανό προσωπικό και να διαθέτουν κατάλληλους και επαρκείς χώρους, εξοπλισμό και εγκαταστάσεις [7].

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 των φαρμάκων/φαρμακευτικών προϊόντων. Κατά συνέπεια διασφαλίζουν ότι τα προϊόντα παράγονται και ελέγχονται με συνέπεια σύμφωνα με τα πρότυπα ποιότητας που είναι κατάλληλα για τη χρήση για την οποία προορίζονται και όπως απαιτείται από την άδεια κυκλοφορίας.

Τα GMP στοχεύουν κυρίως στη μείωση των κινδύνων που υπάρχουν σε οποιαδήποτε φαρμακευτική παραγωγή. Τέτοιοι κίνδυνοι είναι ουσιαστικά δύο ειδών: διασταυρούμενη

μόλυνση, λόγω προσμίξεων, και 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 ασφαλής 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 επανάληψής τους [7].

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 έως το τελικό προϊόν [5, 8].

1.4.1 Κατευθυντήριες οδηγίες για την ποιότητα των φαρμάκων

Οι πιο σημαντικές κατευθυντήριες γραμμές που εφαρμόζονται ευρέως στη φαρμακοβιομηχανία είναι:

Κατευθυντήριες οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO)

Ο ΠΟΥ δημοσίευσε ένα εγχειρίδιο για τα GMP ειδικότερα, με τίτλο: Quality Assurance of Pharmaceuticals, a compendium of guidelines and related material, Volume 2: Good Manufacturing Practices and Inspection [7].

Αποτελείται από τέσσερα κεφάλαια:

- **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

Και επτά παραρτήματα:

- **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

Κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Ο πυρήνας της νομοθεσίας της Ευρωπαϊκής Ένωσης στον φαρμακευτικό τομέα συγκεντρώνεται στο κεφάλαιο 1 και κεφάλαιο 5 του εγγράφου «Οι κανόνες που διέπουν τα φάρμακα στην Ευρωπαϊκή Ένωση».

- **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 [9].

Κατευθυντήριες οδηγίες του Διεθνούς Συμβουλίου για την Εναρμόνιση των Τεχνικών Απαιτήσεων για Φαρμακευτικά Προϊόντα για Ανθρώπινη Χρήση (ICH)

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.

Ο στόχος αυτής της πρωτοβουλίας είναι η αποτελεσματικότερη χρήση των ανθρώπινων, ζωικών και υλικών πόρων και η άρση οποιασδήποτε καθυστέρησης που δεν είναι απαραίτητη για την παγκόσμια ανάπτυξη και διαθεσιμότητα νέων φαρμάκων, διατηρώντας παράλληλα εγγυήσεις για την ποιότητα, την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα και τις ρυθμιστικές υποχρεώσεις για την προστασία της δημόσιας υγείας [9].

Κεφάλαιο 2: Ανάπτυξη και επικύρωση αναλυτικής μεθόδου

Η ανάπτυξη και επικύρωση μιας αξιόπιστης αναλυτικής μεθόδου είναι βασικό στοιχείο του τμήματος ποιοτικού ελέγχου στην φαρμακευτική βιομηχανία. Ειδικότερα, αναπτύσσονται και εφαρμόζονται αναλυτικοί μέθοδοι για την αναγνώριση, τον προσδιορισμό της αντοχής, τη μέτρηση της καθαρότητας και τον έλεγχο άλλων ποιοτικών χαρακτηριστικών των φαρμακευτικών προϊόντων. Για την πλειονότητα των στερεών από του στόματος φαρμακευτικών προϊόντων, απαιτούνται οι ακόλουθες δοκιμές: φυσική εμφάνιση, ταυτοποίηση, προσδιορισμός δραστικής ουσίας (Assay), προσδιορισμός προσμίξεων (Impurities-Related substances), έλεγχος διάλυσης και καταθρυμματισμού (Dissolution & Disintegration test) και προσδιορισμός υγρασίας, ενώ για συγκεκριμένα από του στόματος φαρμακευτικά προϊόντα απαιτείται μικροβιακός έλεγχος. Επιπλέον, ενδέχεται να απαιτούνται και άλλες δοκιμές, ειδικά όταν οι δραστικές ουσίες (Active Pharmaceutical Ingredient, API) έχουν πολλαπλά πολύμορφα που μπορεί να έχουν διαφορετικά φυσικά χαρακτηριστικά. Ο χαρακτηρισμός των πολυμόρφων, μεταξύ άλλων, περιλαμβάνει φασματοσκοπία φθορισμού ακτινών Χ (XRF), φασματοφωτομετρία εγγύς υπέρυθρου (IR) και φασματοσκοπία Raman. Είναι εξαιρετικά σημαντικό η πολυμορφική μορφή των API στα προϊόντα να είναι υπό έλεγχο κατά τη διάρκεια της μεθόδου ανάπτυξης των φαρμακευτικών προϊόντων και των μελετών σταθερότητας (stability test). Επιπλέον, μπορεί να απαιτείται ο προσδιορισμός των χειρόμοφων ενώσεων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της αναλυτικής μεθόδου. Υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες αναλυτικών μεθόδων, με βάση τη Φαρμακοποιία των Ηνωμένων Πολιτειών (USP) [10]:

- Κατηγορία I: Αναλυτικές μέθοδοι για τον ποσοτικό προσδιορισμό των κύριων συστατικών χύδην φαρμακευτικών ουσιών ή δραστικών συστατικών (συμπεριλαμβανομένων των API, συντηρητικών) σε τελικά φαρμακευτικά προϊόντα
- Κατηγορία II: Αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό προσμίξεων σε χύμα φαρμακευτικές ουσίες ή ενώσεις αποδόμησης σε τελικά φαρμακευτικά προϊόντα, συμπεριλαμβανομένων ποσοτικών αναλύσεων και δοκιμών ορίων
- Κατηγορία III: Αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών απόδοσης, συμπεριλαμβανομένων δοκιμών διάλυσης ή απελευθέρωσης του φαρμάκου
- Κατηγορία IV: Δοκιμές ταυτοποίησης

2.1 Κατηγορίες ελέγχων

2.1.1 Μελέτες ταυτοποίησης

Μία από τις βασικές μεθόδους για τη διασφάλιση της ποιότητας των φαρμακευτικών προϊόντων είναι η μέθοδος ταυτοποίησης, η οποία αποσκοπεί στη διασφάλιση της ταυτότητας της δραστικής ουσίας σε ένα δείγμα. Μια ειδική μέθοδος ταυτοποίησης, όπως η φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) η οποία εφαρμόζεται συχνά σε φαρμακευτικές ουσίες, προτιμάται έναντι μιας χρωματογραφικής μεθόδου. Ειδικότερα, για τα φαρμακευτικά προϊόντα, η εκχύλιση των δραστικών ουσιών και ο επακόλουθος καθαρισμός μπορεί να είναι απαραίτητη για την τήρηση των προδιαγραφών λόγω παρεμβολής από έκδοχα. Εάν χρησιμοποιούνται μη ειδικές μέθοδοι, απαιτούνται δύο ανεξάρτητες αναλυτικές διαδικασίες. Μια μη ειδική μέθοδος, όπως η UV-Vis ή ο χρωματογραφικός χρόνος κατακράτησης με χρήση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας

(TLC) ή υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), δεν αρκεί από μόνη της για ταυτοποίηση των δραστικών ουσιών. Ωστόσο, η HPLC σε συνδυασμό με έναν συγκεκριμένο ανιχνευτή, όπως ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (DAD) ή φασματόμετρο μάζας (MS) γίνεται ένα ισχυρό αναλυτικό εργαλείο, καθώς λαμβάνει ταυτόχρονα το χρόνο κατακράτησης και τα φάσματα UV-Vis. Ως εκ τούτου, θεωρείται μια αποδεκτή μέθοδος ταυτοποίησης.

2.1.2 Μελέτες προσμίξεων (Impurities – Related substances)

Οι προσμίξεις σε φαρμακευτικές ουσίες και φαρμακευτικά προϊόντα περιλαμβάνουν οργανικές προσμίξεις, ανόργανες προσμίξεις και υπολείμματα διαλυτών. Ως οργανικές προσμίξεις ορίζονται γενικά συγγενείς ουσίες, δεδομένου ότι σχετίζονται δομικά με τη φαρμακευτική ουσία. Αυτές οι ουσίες μπορεί να είναι αναγνωρισμένα ή μη αναγνωρισμένα προϊόντα αποικοδόμησης και μπορεί να προέρχονται από πολλές πηγές, συμπεριλαμβανομένων των αντιδραστηρίων παραγωγής, των πρώτων υλών και των ενδιάμεσων προϊόντων, ενώ μπορεί να προκύψουν κατά τη διάρκεια της σύνθεσης ή και της αποθήκευσης ενός υλικού. Όσο νωρίτερα εντοπίζονται οι προσμίξεις κατά την ανάπτυξη ενός φαρμάκου, τόσο περισσότερος χρόνος υπάρχει για την αντιμετώπισή τους μέσω αλλαγών στη διαδικασία σύνθεσης. Η κατευθυντήρια γραμμή Q3B περιγράφει τα όρια αναφοράς, ταυτοποίησης και αξιολόγησης για προσμίξεις σε φαρμακευτικές ουσίες και φαρμακευτικά προϊόντα. Ο προσδιορισμός των ορίων γίνεται βάσει της μέγιστης ημερήσιας δόσης (Maximum Daily Dose – MDD) της δραστικής ουσίας του φαρμάκου, με κριτήρια που παρατίθενται στην οδηγία ICH Q3B(R2) [10-13].

2.1.3 Μελέτες διάλυτοποίησης και καταθρυμματισμού (Dissolution & Disintegration tests)

Κατά τον έλεγχο της διαλυτοποίησης, (dissolution test) μελετάται ο ρυθμός διάλυσης της δραστικής ουσίας στερεών και από στόματος λαμβανόμενων φαρμάκων συνήθως, σε υγρό μέσο γνωστής σύστασης. Προτιμώνται ρυθμιστικά διαλύματα ή διαλύματα αραιών οξέων, με ή χωρίς προσθήκη επιφανειοδραστικών ουσιών. Για τον έλεγχο αυτό, χρησιμοποιείται συσκευή με 6-8 υάλινα δοχεία, μέγιστης χωρητικότητας 1L. Προτιμάται τα δοχεία αυτά να είναι σκουρόχρωμης απόχρωσης για να μην δημιουργούν σφάλματα όταν περιέχουν ενώσεις με φωτοευαισθησία λόγω φωτοδιάσπασης. Στο κάθε δοχείο, μπορεί να τοποθετηθεί μέχρι συγκεκριμένο βάθος, ένας μεταλλικός κυλινδρικός άξονας στον οποίο προσαρτάται στο άκρο του, ανάλογα με το προϊόν, είτε καλάθι είτε πτερύγιο, συγκεκριμένων διαστάσεων. Συγκεκριμένα, αφού στο δοχείο τοποθετήσουμε τον κατάλληλο όγκο υγρού μέσου διάλυσης (συνήθως 500ml ή 900ml) θερμαίνουμε μέχρι τους 37°C ($\pm 0,5$ °C θερμοστάτηση μέσω υδατόλουτρου). Έπειτα τοποθετούμε μια μονάδα φαρμακευτικού προϊόντος στο άκρο του μεταλλικού κυλινδρικού σωλήνα, και τον τοποθετούμε μέσα στο δοχείο. Εκκινώντας την χρονομέτρηση, αρχίζουμε να περιστρέφουμε το δοχείο μας με συγκεκριμένη περιστροφική ταχύτητα μετρούμενη σε rpm. Μετά από συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα, λαμβάνουμε δείγμα υγρού από το κάθε δοχείο και μετράμε τον βαθμό απελευθέρωσης της ουσίας. Η μελέτη αυτή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για μελέτη ολικού προφίλ διάλυσης της ουσίας. Και στις δύο περιπτώσεις χρήσης της μεθόδου αυτής, τα αποτελέσματα πρέπει να συμβαδίζουν με τα αναμενόμενα, έτσι ώστε η κάθε παρτίδα να θεωρείται ποιοτικά αποδεκτή [14-15].

Είναι σημαντικό να έχουμε ικανοποιητική διακριτική ικανότητα στα αποτελέσματά μας, έτσι ώστε να μπορούμε ορθά να ξεχωρίζουμε μια καλώς παρασκευασμένη παρτίδα από μια με παρασκευαστικά ελαττώματα. Αυτό βεβαίως απαιτείται γιατί οι διαφορές αυτές θα φανούν και όταν θα χρησιμοποιηθεί το φάρμακο σε κάποιον οργανισμό. Για να μετρήσουμε την διαλυτότητα της δραστικής ουσίας λοιπόν, χρησιμοποιούμε την τιμή Q που ορίζεται ως το ποσοστό του συνόλου της κάθε ουσίας ανά μονάδα προϊόντος. Για να θεωρηθεί μια παρτίδα καλώς παρασκευασμένη, ως προς αυτό το χαρακτηριστικό, θα πρέπει η Q να έχει φτάσει στο 75%-85% σε χρόνο μεγαλύτερο των 15 λεπτών. Όσον αφορά το επιλεγόμενο είδος υγρού μέσου διάλυσης, θα πρέπει να επιλεγθεί ένα με τις κατάλληλες φυσικοχημικές ιδιότητες έτσι ώστε να είναι σε θέση να διαλύσει πλήρως την απελευθερούμενη ουσία με την εφαρμογή της ανάδευσης. Η πλήρης διάλυση, θα πρέπει να επιτευχθεί όταν ο συνολικός όγκος του διαλύματος είναι από 3 μέχρι 10 φορές μεγαλύτερος του όγκου που απαιτείται για τη δημιουργία κορεσμένου διαλύματος της ουσίας στο μέσο αυτό σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή (Ph. Eur.) και την Αμερικανική (USP) Φαρμακοποιία. Αν δεν υπάρχει πλήρης διάλυση, θα δημιουργηθούν συνθήκες κορεσμού και δημιουργία ιζήματος. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η διάλυση περαιτέρω απελευθερούμενης δραστικής ουσίας στο διάλυμα, η δειγματοληψία να μην δίνει αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα και τελικώς, ο έλεγχος να μην είναι αποτελεσματικός [14-15].

Τέλος, για την μελέτη του ρυθμού αποσάθρωσης, εξετάζεται ο χρόνος που χρειάζεται για να αποσαθρωθούν τα καψάκια και τα δισκία ενώ βρίσκονται σε συγκεκριμένο υγρό. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται 6 υάλινοι σωλήνες, που τοποθετούνται κατακόρυφοι σε

πλαστικό καλάθι που έχει στον πάτο του, ένα συρμάτινο πλέγμα. Σε κάθε ένα από τους σωλήνες τοποθετείται από μια μονάδα (δισκίο ή καψάκι) και εφόσον ορίζεται, και ένας προστατευτικός δίσκος από πάνω. Έπειτα, ενεργοποιούμε την συσκευή η οποία οδηγεί το καλάθι να εισέρχεται και να εξέρχεται σε ποτήρι ζέσεως 1L, που περιέχει υγρό (συνήθως νερό) θερμοστατούμενο στους 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), με παλινδρομικές κινήσεις σταθερής και γνωστής συχνότητας. Με αυτό τον τρόπο, εξετάζεται κατά πόσο η αποσάθρωση συμβαίνει στους αναμενόμενους χρόνους [15].

2.1.4 Μελέτες ομοιομορφίας περιεχομένου δόσης (Uniformity of dosage units)

Ο όρος ομοιομορφία περιεχομένου δόσης ορίζεται ως ο βαθμός ομοιομορφίας στην ποσότητα της φαρμακευτικής ουσίας μεταξύ των μονάδων δοσολογίας. Το εναρμονισμένο συνοπτικό κεφάλαιο για την ομοιομορφία των δοσολογικών μονάδων περιγράφει τα κριτήρια απελευθέρωσης για την εμφάνιση ομοιομορφίας. Εκτός από την ομοιομορφία κατά την απελευθέρωση, είναι σημαντικό κατά την ανάπτυξη να αποδεικνύεται η ομοιομορφία των δειγμάτων μίγματος και η ομοιομορφία των μονάδων δοσολογίας σε όλη τη διάρκεια της παραγωγής (ομοιομορφία παρτίδας). Οι αναλυτικές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε φάρμακο των δειγμάτων ομοιομορφίας. Στις περιπτώσεις όπου απαιτείται πολύπλοκη διαδικασία ή μεγάλος χρόνος εκτέλεσης HPLC για τον προσδιορισμό αλλά δεν απαιτείται για προσδιορισμούς ομοιομορφίας μίγματος/ομοιομορφίας περιεχομένου (BU/CU), μπορεί να αναπτυχθεί μια ξεχωριστή διαδικασία με συντομευμένο χρόνο ανάλυσης. Ο χρόνος ανάλυσης στις χρωματογραφικές μεθόδους BU/CU μπορεί να είναι πολύ μικρότερος από ό,τι στις μεθόδους ταυτοποίησης, επειδή δεν απαιτούνται μελέτες σταθερότητας. Η δημιουργία

δεδομένων ομοιομορφίας BU και παρτίδας είναι το κλειδί για την κατανόηση της διαδικασίας παραγωγής κατά τις φάσεις ανάπτυξης των προϊόντων. Οι διαδικασίες για την απόδειξη της επάρκειας ανάμειξης για μίγματα σκόνης απαιτούν την χρήση στρωματοποιημένης δειγματοληψίας [16].

2.2 Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου

Η αναλυτική μέθοδος πρέπει να επικυρωθεί για την προβλεπόμενη χρήση της ουσίας, ενώ μετά την επικύρωση της, θα χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της ποιότητας ενός προϊόντος κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του. Ωστόσο, η απόδοση της μεθόδου θα πρέπει να αξιολογείται ως προς την καταλληλότητά της ανά διαστήματα. Η μέθοδος μπορεί να χρειαστεί να βελτιστοποιηθεί με προσαρμογή και επανεπικύρωση των συνθηκών λειτουργίας. Νέες μέθοδοι μπορεί να αναπτυχθούν και να επικυρωθούν χρησιμοποιώντας νέες τεχνολογίες, λόγω κόστους, αποτελεσματικότητας και ευαισθησίας, ή να απαιτηθεί λόγω της εμφάνισης μιας νέας ακαθαρσίας. Επομένως, η ανάπτυξη και η επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου θεωρούνται μέρος της διαχείρισης του κύκλου ζωής ενός προϊόντος.

2.2.1 Παράμετροι επικύρωσης μεθόδου για χρωματογραφικές μεθόδους

Τα βήματα για την επικύρωση της μεθόδου είναι τα εξής:

- Τα πρωτόκολλα για την περιγραφή των παραμέτρων επικύρωσης της μεθόδου
- Εκτέλεση του πρωτοκόλλου στο εργαστήριο
- Εκ νέου ανάπτυξη και επικύρωση εάν παρατηρηθεί απόκλιση ή αστοχία κατά την επικύρωση που αποδίδεται στην αναλυτική μέθοδο

- Έκθεση επικύρωσης

Οι παράμετροι επικύρωσης περιλαμβάνουν την ακρίβεια, την πιστότητα, την εξειδίκευση/εκλεκτικότητα, το όριο ανίχνευσης, το όριο ποσοτικοποίησης, την γραμμικότητα και την ανθεκτικότητα της αναλυτικής μεθόδου. Οι αναλυτικές παράμετροι όπως η καταλληλότητα του συστήματος και του φίλτρου θα πρέπει να αξιολογούνται για τη χρωματογραφική μέθοδο κατά την επικύρωση της μεθόδου [17-18].

Καταλληλότητα φίλτρου

Στις σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές, η ανάλυση πραγματοποιείται συνήθως με φασματοσκοπία (UV-vis) χρησιμοποιώντας μια χρωματογραφική μέθοδο, είτε HPLC είτε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (UPLC). Συχνά χρησιμοποιείται φίλτρο ή φυγόκεντρος για την αφαίρεση σωματιδίων που μπορεί να φράξουν τη στήλη ή να επηρεάσουν τις μετρήσεις απορρόφησης. Οι διάφοροι τύποι φίλτρων σύριγγας, όπως αυτά από νάιλον ή πολυτετραφθοροαιθυλένιο (PTFE), με μέγεθος που κυμαίνεται από 0,45 έως 0,2 μm, θα πρέπει να διερευνώνται ανάλογα με τα δείγματα. Το φίλτρο πρέπει να είναι επικυρώνεται διηθώντας ένα τμήμα του προτύπου διαλύματος εργασίας ή διαλύματος δείγματος μέσω κάθε φίλτρου σύριγγας, απορρίπτοντας τα πρώτα 2 έως 3 mL και συλλέγοντας το διήθημα για ανάλυση. Το αποτέλεσμα από το φιλτραρισμένο διάλυμα θα πρέπει να είναι συγκρίσιμο με αυτό του μη φιλτραρισμένου διαλύματος.

Καταλληλότητα συστήματος

Η καταλληλότητα του συστήματος δείχνει ότι το σύστημα λειτουργεί σωστά τη στιγμή της ανάλυσης. Για τις χρωματογραφικές μεθόδους, η καταλληλότητα του συστήματος θα πρέπει

να περιλαμβάνει την επαναληψιμότητα της έγχυσης που εκφράζεται ως η σχετική τυπική απόκλιση (RSD) των δεδομένων που λαμβάνονται από πέντε ή έξι διαδοχικές εγχύσεις ενός τυπικού διαλύματος εργασίας, τον παράγοντα συμμετρίας (symmetry factor ή tailing factor), τον αριθμό των θεωρητικών πλακών (N), την διαχωριστική ικανότητα (R) και τον σχετικό χρόνο κατακράτησης (RRT). Επιπλέον, σε συγκεκριμένες περιπτώσεις μπορεί να απαιτούνται άλλες παράμετροι για τον έλεγχο της καταλληλότητας του συστήματος, όπως ο λόγος σήματος/θορύβου για την μελέτη των προσμίξεων [18].

Επαναληψιμότητα έγχυσης: Το πρότυπο διάλυμα εργασίας θα εγχυθεί πέντε ή έξι φορές στη χρωματογραφική στήλη. Η μέση τιμή και το RSD υπολογίζεται ως εξής:

$$\bar{X}(\text{mean}) = \sum_{i=1}^n X_i / n$$

$$\%RSD = \frac{100}{\bar{X}(\text{mean})} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Όπου,

X_i η μέγιστη απόκριση μεμονωμένης έγχυσης

n ο αριθμός επαναλαμβανόμενων εγχύσεων

Γενικά, τα κριτήρια αποδοχής είναι τα εξής: Το RSD για την περιοχή ενδιαφέροντος από πέντε ή έξι εγχύσεις του τυπικού διαλύματος εργασίας πρέπει να είναι $\leq 2,0\%$ για το potency assay, $\leq 10\%$ για τη μελέτη προσμίξεων και το cleaning validation test και $\leq 3,0\%$ για την μελέτη διαλυτοποίησης. Εάν το προϊόν έχει χαμηλή αντοχή ή το S/N της ενεργού κορυφής είναι μικρότερο από 50, RSD $\leq 3,0\%$ από έξι συνεχόμενες εγχύσεις μπορεί να είναι αποδεκτό για το potency assay.

Έλεγχος πρότυπου διαλύματος: Ένα πρότυπο διάλυμα ελέγχου θεωρείται συχνά ως μέρος της καταλληλότητας του ολοκληρωμένου συστήματος για ένα potency assay ή τον προσδιορισμό διαλυτοποίησης. Η εκατοστιαία ανάκτηση (%Recovery) γνωστής ποσότητας ουσίας που προστέθηκε στο δείγμα υπολογίζεται ως εξής:

$$\% \text{ Recovery} = \frac{A_{CK}}{W_{tCK}} \times \frac{W_{tWSTD}}{A_{WSTD}} \times 100$$

Όπου,

A_{CK} η περιοχή της κορυφής της ενεργού δραστικής από το πρότυπο διάλυμα ελέγχου

A_{WSTD} η μέση περιοχή κορυφής της ενεργού δραστικής από τις έξι εγχύσεις του προτύπου διαλύματος ελέγχου

W_{tCK} το βάρος (mg) της ενεργού δραστικής που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του προτύπου διαλύματος ελέγχου

W_{tWSTD} το βάρος της δραστικής ουσίας που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του προτύπου διαλύματος εργασίας

Είναι αποδεκτό ότι το ποσοστό ανάκτησης για το πρότυπο διάλυμα ελέγχου είναι στην περιοχή 100.0 ± 2.0 . Για χαμηλή δόση/ισχύ του φαρμακευτικού προϊόντος, μια διαφορά 3,0% μπορεί να είναι αποδεκτή. Σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως στις μελέτη προσμίξεων, μπορεί να χρειαστούν πρόσθετα τυπικά διαλύματα, όπως ένα διάλυμα με όριο ανίχνευσης (DL) ή ποσοτικοποίησης (QL) για να διασφαλιστεί ότι η μέθοδος είναι αρκετά ευαίσθητη ώστε να ανιχνεύει προσμίξεις στην απαιτούμενη συγκέντρωση. Η ευαισθησία μπορεί να ποικίλλει λόγω διαφορετικών εργαστηρίων, θερμοκρασιών, στηλών και ανιχνευτών.

Συντελεστής συμμετρίας (T): Το T της ενεργού κορυφής από το πρότυπο διάλυμα εργασίας υπολογίζεται ως εξής:

$$T = \frac{W_{0,05}}{2f}$$

Όπου,

$W_{0,05}$ είναι το πλάτος κορυφής στο 5% του ενεργού ύψους της κορυφής από τη γραμμή βάσης

f η απόσταση από το μέγιστο σημείο της κορυφής μέχρι το άκρο της κορυφής

Η κορυφή είναι συμμετρική εάν T ισούται με 1.0 ενώ γενικά θεωρείται λογικό εάν το T δεν είναι μεγαλύτερο από 2,0. Ωστόσο το αποδεκτό όριο T θα πρέπει να επιβεβαιώνεται κατά τη διάρκεια πειραμάτων ανθεκτικότητας, καθώς η ασυμμετρία των κορυφών δύναται να επηρεάσει την διαχωριστική ικανότητα της μεθόδου.

Θεωρητικός πλάκες (N): Ο θεωρητικός αριθμός πλακών ανά στήλη για την κορυφή μπορεί να υπολογιστεί από την πρώτη έγχυση του προτύπου διαλύματος εργασίας ως εξής:

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

Όπου,

t ο χρόνος συγκράτησης της ενεργού κορυφής

w το πλάτος κορυφής της κορυφής

Διαχωριστική ικανότητα: Ο συντελεστής διαχωριστικής ικανότητας (R) θα πρέπει να υπολογιστεί για να αποδειχθεί ότι τα κρίσιμα ζεύγη γειτονικών κορυφών διαχωρίζονται

επαρκώς και επομένως μπορούν να μελετηθούν ανεξάρτητα. Η τιμή του R από την πρώτη έγχυση του προτύπου διαλύματος ελέγχου υπολογίζεται ως εξής:

$$R = \frac{2(t_{n+1} - t_n)}{W_{n+1} + W_n}$$

Όπου,

t_n ο χρόνος κατακράτησης της κορυφής n

t_{n+1} ο χρόνος κατακράτησης της κορυφής n+1

W_n το πλάτος της κορυφής n

W_{n+1} το πλάτος της κορυφής n+1

Η ελάχιστη διαχωριστική ικανότητα μεταξύ κάθε προσδιορισμένου κρίσιμου ζεύγους γειτονικών κορυφών θα πρέπει να είναι ≥ 1.5 , καθώς αυτό αντιπροσωπεύει τον διαχωρισμό της γραμμής βάσης δύο γειτονικών κορυφών κατά Gauss. Η ανάλυση μπορεί επίσης να έχει ένα ανώτερο όριο για να διασφαλιστεί ότι οι κορυφές δεν έχουν απομακρυνθεί πολύ, ελαχιστοποιώντας τον κίνδυνο σημαντικών αλλαγών στις ιδιότητες κατακράτησης μιας χρωματογραφικής στήλης [19].

2.2.2.1 Ακρίβεια (Accuracy)

Η ακρίβεια της μεθόδου μπορεί να προσδιοριστεί με την προσθήκη γνωστών συγκεντρώσεων της δραστικής ουσίας, που είναι αντίστοιχη σε συγκέντρωση με την συγκέντρωση του εικονικού φαρμάκου, ενώ στη συνέχεια υπολογίζεται το ποσοστό ανάκτησης της ενεργού δραστικής ουσίας. Απαιτείται η χρήση εμβολιασμένων διαλυμάτων σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων που καλύπτουν όλο το εύρος της γραμμικότητας.

Το ποσοστό ανάκτησης υπολογίζεται από την πειραματική τιμή της αναλυόμενης ποσότητας διαιρεμένη με τη ονομαστική τιμή της αναλυόμενης ουσίας που εντοπίζεται στο δείγμα. Τυπικά κριτήρια αποδοχής παρέχονται επίσης στον Πίνακα. Το ποσοστό ανάκτησης, η μέση ανάκτηση από κάθε επίπεδο και τα συνολικά επίπεδα και τα διαστήματα εμπιστοσύνης θα πρέπει να αξιολογούνται περαιτέρω [20]. Στα potency assay, το RSD για κάθε επίπεδο δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 2,0%. Για χαμηλής συγκέντρωσης φαρμακευτικά προϊόντα, ≤ 1 mg, μπορεί να εφαρμοστεί ένα ευρύτερο φάσμα όπως 3,0% για το potency assay και 5,0% για τον έλεγχο διαλυτοποίησης. Τα διαλύματα φαρμακευτικών ουσιών με υψηλές συγκεντρώσεις πρέπει να παρασκευάζονται με διάλυση σε οργανικό διαλύτη ή μέσο διάλυσης. Εάν το μέσο δεν είναι κατάλληλο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν οργανικοί διαλύτες, αλλά ο όγκος του διαλύτη που έχει εμποτιστεί δεν πρέπει να υπερβαίνει το 5% του συνολικού όγκου του μέσου. Για μελέτες ανάκτησης σε ελέγχους προσμίξεων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα δείγμα API που ενσωματώνεται σε εικονικό φάρμακο για να αποδειχθεί η ανάκτηση προσμίξεων στο δείγμα όταν τα πρότυπα προσμίξεων δεν είναι διαθέσιμα.

2.2.2.2 Πιστότητα (Precision)

Η πιστότητα θα πρέπει να αξιολογείται μέσω της επαναληψιμότητας, της ενδιάμεσης ακρίβειας ή της αναπαραγωγιμότητας.

Επαναληψιμότητα (Repeatability)

Η επαναληψιμότητα εκφράζει την πιστότητα στις ίδιες συνθήκες σε ένα σύντομο χρονικό διάστημα. 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. Στα αρχικά στάδια ανάπτυξης, λίγα μπορεί να είναι γνωστά σχετικά με τις προσμίξεις, επομένως ενδέχεται να δημιουργηθούν ελάχιστα δεδομένα επαναληψιμότητας.
- 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 [19, 21].

Ενδιάμεση ακρίβεια (Intermediate precision)

Η ενδιάμεση ακρίβεια είναι ένα μέτρο της ευαισθησίας της μεθόδου σε μικρές αλλαγές στην απόδοση του εξοπλισμού και σε διακυμάνσεις στην τεχνική του χειριστή σε μια δεδομένη ημέρα. Ένας δεύτερος αναλυτής θα πρέπει να εκτελέσει την ανάλυση χρησιμοποιώντας διαφορετικό εξοπλισμό και σε διαφορετική ημέρα για να επιβεβαιώσει ότι μπορούν να ληφθούν αποδεκτά αποτελέσματα στις ενδοεργαστηριακές μεταβολές. Η απόλυτη διαφορά μεταξύ του μέσου όρου % LC της ενεργού δραστικής που παράγεται από τη διακύμανση αυτών των παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των αναλυτών, του χρόνου, και του εξοπλισμού, θα πρέπει να είναι $\leq 3,0\%$, αλλά τα ακριβή κριτήρια βασίζονται στον τύπο της δοκιμής και στις προδιαγραφές του προϊόντος. Στην περίπτωση που οι ανακτήσεις της φαρμακευτικής ουσίας κυμαίνονται από 98,0% έως 102,0%, τότε η

διαφορά μεταξύ των ενδοεργαστηριακών μεταβολών θα πρέπει να είναι $\leq 1,5\%$, αλλά για ένα φαρμακευτικό προϊόν με ανακτήσεις από 90,0% έως 110,0%, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ευρύτερο κριτήριο όπως το $\leq 3,0\%$ [19,22].

Αναπαραγωγιμότητα (Reproducibility)

Η αναπαραγωγιμότητα είναι ένα μέτρο της ευαισθησίας της μεθόδου στις εργαστηριακές αλλαγές. Θα μπορούσε να είναι μεταβολές στην απόδοση του εξοπλισμού ή διακύμανση στην τεχνική του χειριστή και στο εργαστηριακό περιβάλλον. Η αναπαραγωγιμότητα ως τιμή δημιουργείται από δύο ξεχωριστά εργαστήρια που εκτελούν τη δοκιμή και επομένως ονομάζεται επίσης και διεργαστηριακή ακρίβεια. Η απόλυτη διαφορά μεταξύ του μέσου όρου % LC της δραστικής ουσίας που παράγεται από τα δύο εργαστήρια θα πρέπει να είναι $\leq 3,0\%$, αλλά τα ακριβή κριτήρια βασίζονται στον τύπο της δοκιμής και στις προδιαγραφές του προϊόντος.

Τα αποτελέσματα, όπως ο μέσος όρος, η τυπική απόκλιση, το RSD και το διάστημα εμπιστοσύνης, θα πρέπει να αξιολογούνται και να αναφέρονται για κάθε τύπο ακρίβειας [19, 22].

2.2.2.3 Γραμμικότητα (Linearity)

Είναι η ικανότητά της μεθόδου να εξάγει αποτελέσματα ανάλογα (γραμμικά) με την ποσότητα (συγκέντρωση) της προσδιοριζόμενης ουσίας στο δείγμα, σε μια συγκεκριμένη περιοχή συγκεντρώσεων. Η γραμμικότητα εξετάζεται μετρώντας την απόκριση (response) σε σχέση με τη συγκέντρωση σε όλο το εύρος της περιοχής συγκεντρώσεων της αναλυτικής μεθόδου.

Πρέπει να παρασκευαστούν τουλάχιστον πέντε πρότυπα διαλύματα με συγκεκριμένο εύρος γραμμικότητας. Το εμβαδόν κορυφής της ενεργού δραστικής θα μετρηθεί σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και θα αποτυπωθεί γραφικά έναντι των αντίστοιχων συγκεντρώσεων. Ο συντελεστής συσχέτισης (r), η τομή στον άξονα των y , η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης και το άθροισμα των τετραγώνων θα υπολογιστούν με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων και θα πρέπει να αποτυπωθούν τα δεδομένα σε γραφική παράσταση. Ο συντελεστής συσχέτισης δεν πρέπει να είναι μικρότερος από 0,999 για τα potency assay και όχι μικρότερος από 0,99 για άλλες δοκιμές. Είναι πολύ χρήσιμο να αξιολογηθεί η διαφορά μεταξύ της εκτιμώμενης τιμής από τη γραμμή παλινδρόμησης και της πραγματικής τιμής. Το διάγραμμα απόκρισης - συγκέντρωσης πρέπει να είναι ευθεία γραμμή με συντελεστή συσχέτισης (r) εντός των ορίων που αναφέρονται στα κριτήρια της γραμμικότητας. Εάν η καμπύλη δεν είναι γραμμική περιορίζεται η περιοχή έως ότου η απόκριση είναι γραμμική με τη συγκέντρωση [19, 21, 23].

2.2.2.4 Εξειδίκευση (Specificity)

Η εξειδίκευση της μεθόδου πρέπει να διερευνηθεί προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι μια αναλυτική διαδικασία είναι ειδική για την αναλυόμενη ουσία που μας ενδιαφέρει παρουσία συστατικών όπως έκδοχα ή/ και με προϊόντα αποδόμησης/ διάσπασης και προσμίξεις. Για χρωματογραφικές μεθόδους, η εξειδίκευση μπορεί να αποδειχθεί με τον διαχωρισμό του κρίσιμου ζεύγους συστατικών. Σε τέτοιες περιπτώσεις, ένας ανιχνευτής DAD είναι χρήσιμος για την ανίχνευση των κορυφών της δραστικής και των προσμίξεων. Για τις χρωματογραφικές μεθόδους, συνιστάται ο διπλασιασμός του ισοκρατικού χρόνου εκτέλεσης ή του χρόνου του τελευταίου σταδίου ενός προγράμματος βαθμιδωτής

έκλουσης για την ανίχνευση τυχόν προσμίξεων και προϊόντων αποικοδόμησης στο εικονικό φάρμακο ή στα δείγματα [19].

2.2.2.5 Σταθερότητα προτύπων διαλυμάτων και δειγμάτων

Είναι σημαντικό το δείγμα και τα τυπικά διαλύματα να είναι σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια της προετοιμασίας και της ανάλυσης του δείγματος. Η απόδειξη της σταθερότητας των προτύπων θα πρέπει να αποτελεί μέρος της διαδικασίας επικύρωσης.

Τα πρότυπα διαλύματα πρέπει να παρασκευάζονται πρόσφατα και η συγκέντρωση του πρότυπου διαλύματος χρησιμοποιείται ως αρχική τιμή. Μέρη των τυποποιημένων προτύπων διαλυμάτων αποθηκεύονται σε ψυγείο ($5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$) ή σε ελεγχόμενη και παρακολουθούμενη θερμοκρασία δωματίου. Αυτά τα αποθηκευμένα τμήματα του πρότυπου προσδιορίζονται σε διάφορα χρονικά σημεία (όπως 1 ημέρα, 3 ημέρες, κ.λπ.) για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας χρησιμοποιώντας ως σημείο αναφοράς το πρόσφατα παρασκευασμένο πρότυπο διάλυμα.

Για rotency assay, το πρότυπο και το δείγμα διαλύματος θεωρούνται σταθερά εάν η ποσοστιαία διαφορά μεταξύ των αρχικών τιμών και εκείνων σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή δεν είναι μεγαλύτερη από 2,0%, αλλά οποιαδήποτε πτωτική τάση στα δεδομένα θα πρέπει επίσης να αξιολογούνται για πιθανή επίπτωση στην ανάλυση.

Για τα δείγματα διαλυτοποίησης, η σταθερότητα των δειγμάτων είναι μια άλλη παράμετρος που πρέπει να επικυρωθεί επιπλέον της σταθερότητας του πρότυπου και των διαλυμάτων δειγμάτων. Το δείγμα στο υάλινο δοχείο πρέπει να είναι σταθερό τουλάχιστον μέχρι τον τελικό χρόνο δειγματοληψίας.

Για την ανάλυση των προσμίξεων, το διάλυμα του δείγματος θεωρείται σταθερό εάν πληρούνται οι ακόλουθες προϋποθέσεις:

- Εάν % μεμονωμένης σχετικής ουσίας είναι $\geq 0,50\%$, η ποσοστιαία διαφορά μεταξύ της αρχικής και της τιμής του χρόνου t-time θα πρέπει να είναι $\leq 20,0\%$.
- Δεν θα πρέπει να ανιχνευθεί νέο προϊόν αποικοδόμησης $\geq QL$ της αναλυόμενης ουσίας ενδιαφέροντος.

Εάν αυτές οι προϋποθέσεις δεν μπορούν να εκπληρωθούν σε οποιοδήποτε από τα χρονικά σημεία της ανάλυσης και τις συνθήκες αποθήκευσης, τότε το δείγμα και το πρότυπο διάλυμα πρέπει να αναλυθούν εντός της χρονικής περιόδου κατά την οποία ισχύουν αυτές οι συνθήκες. Στη χειρότερη περίπτωση, το διάλυμα δείγματος πρέπει να παρασκευάζεται πρόσφατα πριν από κάθε έγχυση για να ληφθούν σταθερά αποτελέσματα του προφίλ προσμίξεων [19].

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

Όπως ορίζεται στο ICH Q2 (R1), το DL μιας μεμονωμένης αναλυτικής διαδικασίας είναι η χαμηλότερη ποσότητα αναλυόμενης ουσίας σε ένα δείγμα που μπορεί να ανιχνευθεί, αλλά όχι απαραίτητα ποσοτικά ως ακριβής τιμή. Το QL είναι η χαμηλότερη ποσότητα αναλυόμενης ουσίας σε ένα δείγμα που μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με την κατάλληλη πιστότητα και ακρίβεια. Το DL και το QL είναι κρίσιμες παράμετροι για την επικύρωση της αναλυτικής διαδικασίας για τον προσδιορισμό υπολειμματικών διαλυτών και προσμίξεων.

Υπάρχουν διάφορες προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό της DL και της QL, οι οποίες περιγράφονται στο ICH Q2 (R1) και συζητούνται στις επόμενες ενότητες.

- Οπτική αξιολόγηση

Η οπτική αξιολόγηση είναι πολύ πιθανό να χρησιμοποιηθεί ως μία μη ενόργανη μέθοδο. Μπορούν να προσδιοριστούν με την ανάλυση δειγμάτων με γνωστές ποσότητες αναλυόμενης ουσίας και με τον καθορισμό του ελάχιστου επιπέδου αναλυόμενης ουσίας που μπορεί να ανιχνευθεί (DL) ή να ποσοτικοποιηθεί (QL) με πιστότητα και ακρίβεια. Για τον προσδιορισμό της QL, απαιτείται η προετοιμασία και η δοκιμή έξι επαναληπτικών δειγμάτων.

- Αναλογία σήματος προς θόρυβο

Η αναλογία σήματος προς θόρυβο της κορυφής της αναλυόμενης ουσίας που μας ενδιαφέρει στο δείγμα πρέπει να είναι τουλάχιστον 3:1 από το διάλυμα DL και 10:1 από το διάλυμα QL. Για χρωματογραφικές τεχνικές, το σήμα της κορυφής και ο θόρυβος της γραμμής βάσης μπορούν να μετρηθούν χειροκίνητα ή χρησιμοποιώντας το ενσωματωμένο λογισμικό στα όργανα.

Για HPLC και GC, η DL και η QL μιας αναλυόμενης ουσίας μπορούν να προσδιοριστούν με τη διαδοχική αραίωση ενός τυπικού διαλύματος και με έγχυση στο χρωματογραφικό σύστημα. Στη συνέχεια, τα QL και DL καθορίζονται από την αναλογία σήματος προς θόρυβο [24].

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 της αραιότερου προτύπου της καμπύλης βαθμονόμησης

S η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης

Σε αυτήν την περίπτωση, 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 [19].

2.2.2.7 Ανθεκτικότητα (Robustness)

Η ανθεκτικότητα μιας αναλυτικής μεθόδου είναι κρίσιμης σημασίας για την αποτελεσματική επικύρωση της μεθόδου και ορίζεται ως το μέτρο της ικανότητας να παραμένει ανεπηρέαστη από μικρές αλλαγές των παραμέτρων κατά την διάρκεια της αναλυτικής διαδικασίας. Ειδικότερα, για τον έλεγχο διάλυσης μιας ουσίας, οι παράμετροι των οποίων η μεταβολή πρέπει να αξιολογηθεί περιλαμβάνουν τη σύνθεση του μέσου, το pH, τον όγκο, το ρυθμό ανάδευσης ή την θερμοκρασία [23]. Αντίστοιχα, σε μια ανάλυση με HPLC, πρέπει να αξιολογηθούν η επίδραση της στατικής φάσης, μικρές αλλαγές στη σύσταση της κινητής φάσης, η ταχύτητα ροής ή μικρές αλλαγές στις συνθήκες ανίχνευσης του σήματος.

Η ανθεκτικότητα των χρωματογραφικών συνθηκών θα πρέπει εκτελεστεί σε ένα διάλυμα δείγματος, όπως ένα διάλυμα δείγματος επαναληψιμότητας με εγχύσεις εις τριπλούν, μεταβάλλοντας τις εξής παραμέτρους:

- Σύνθεση κινητής φάσης
- pH κινητής φάσης
- Γραμμομοριακότητα κατόγκο του ρυθμιστικού διαλύματος
- Θερμοκρασία στήλης
- Μήκος κύματος
- Ροή κινητής φάσης

Μόνο μια παράμετρος κάθε φορά αλλάζει, ενώ οι υπόλοιπες παράμετροι παραμένουν αμετάβλητες. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται τριπλές ενέσεις του διαλύματος δείγματος υπό κάθε συνθήκη. Ακολούθως, αξιολογούνται οι μέσες τιμές και το RSD τριών εγχύσεων για κάθε πείραμα ανθεκτικότητας. Το ποσοστό της τιμής στόχου υπολογίζεται για κάθε συνθήκη δοκιμής ανθεκτικότητας και πρέπει να είναι 98,0-102,0%. Εάν κάποια από αυτές τις παραμέτρους δεν πληροί τα κριτήρια αποδοχής, θα πρέπει να συμπεριληφθεί μια δήλωση προφύλαξης στη μέθοδο που καθορίζει τους περιορισμούς [19].

Κεφάλαιο 3: Αναλυτικές τεχνικές

Η διάσπαση, το πορώδες, η πυκνότητα, η παρουσία ή η απουσία δομικών ανωμαλιών και οι ιξωδοελαστικές ιδιότητες είναι φυσικομηχανικά ποιοτικά χαρακτηριστικά των δισκίων που βοηθούν στον έλεγχο της ποιότητας των φαρμακευτικών προϊόντων. Η πλειονότητα των συμβατικών αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό των δειγμάτων είναι επεμβατικές στα δείγματα, και παρέχουν μετρήσεις off/at-line, οι οποίες δεν πραγματοποιούνται σε πραγματικό χρόνο και επομένως δεν πραγματοποιούνται κρίσιμες διορθώσεις, ενώ υπάρχουν σφάλματα τόσο κατά τις μετρήσεις όσο και για την δειγματοληψία. Οι πρόσφατες εξελίξεις που σχετίζονται με το λογισμικό, την τεχνολογία, τα όργανα και το σχεδιασμό έχουν οδηγήσει στην εμφάνιση νέων μη επεμβατικών αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος για την αξιολόγηση των φαρμακευτικών προϊόντων [25].

Οι διεργασίες αναλυτικής τεχνολογίας (Process Analytical Technology, PAT) αναφέρονται στον σχεδιασμό, την ανάλυση και τον έλεγχο της παραγωγικής διαδικασίας μέσω αξιολόγησης κρίσιμων ποιοτικών χαρακτηριστικών των πρώτων υλών, των ενδιάμεσων προϊόντων και των τελικών προϊόντων. Ο όρος PAT χρησιμοποιήθηκε από τον FDA για πρώτη φορά το 2004 για να ενθαρρύνει τη φαρμακοβιομηχανία να ενσωματώσει στον ποιοτικό έλεγχο μεθόδους ανάλυσης σε πραγματικό χρόνο. Οι PAT μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του φαρμακευτικού σκευάσματος, ενώ χρησιμοποιείται κυρίως σε τμήματα Έρευνας και Ανάπτυξης (R&D) τόσο στο κομμάτι της παρασκευής όσο και στον έλεγχο ποιότητας. Άλλα πλεονεκτήματα που σχετίζονται με τις PAT περιλαμβάνουν καλύτερη κατανόηση και έλεγχο της διαδικασίας, ταχύτερη

βελτιστοποίηση της διαδικασίας, ασφάλεια της διαδικασίας και η δυνατότητα έγκαιρης διόρθωσης οποιουδήποτε λάθους χωρίς απομάκρυνση του τελικού προϊόντος από τις γραμμές παραγωγής [26-27].

Ειδικότερα, ο FDA όρισε ως PAT «ένα σύστημα για το σχεδιασμό, την ανάλυση και τον έλεγχο της παραγωγικής διαδικασίας μέσω έγκαιρων μετρήσεων των κρίσιμων χαρακτηριστικών ποιότητας των πρώτων υλών και των διεργασιών, με στόχο τη διασφάλιση της ποιότητας του τελικού προϊόντος. Κατά συνέπεια, η ταχύτητα ανάλυσης είναι ένα χαρακτηριστικό που απαιτείται για τα εργαλεία PAT προκειμένου να επιτρέπεται ο έλεγχος σε πραγματικό χρόνο. Η οικονομική προσιτότητα και η μη καταστροφή, ή τουλάχιστον η ελάχιστη καταστροφή των δειγμάτων, αν και όχι υποχρεωτικά, είναι σημαντικά χαρακτηριστικά των PAT [28].

Τα ευρέως χρησιμοποιούμενα εργαλεία PAT περιλαμβάνουν φασματοσκοπικές τεχνικές, μεταξύ των οποίων η φασματοσκοπία εγγύς υπέρυθρου, η φασματοσκοπία υπέρυθρης ακτινοβολίας, η φασματοσκοπία Raman, η φασματοσκοπία Terahertz και η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR, καθώς και η μέθοδος ακουστικών εκπομπών και ο φθορισμός ακτινών Χ. Διάφορες μελέτες έχουν αναφέρει την εφαρμογή αυτών των εργαλείων PAT για την in-line, on-line και at-line παρακολούθηση των διεργασιών, όπως η ανάμειξη, η κοκκοποίηση και η επίστρωση, καθώς η μέτρηση/ανάλυση του βάρους, της υφής του δισκίου, το χρώμα, η σκληρότητα, η πυκνότητα, η αντοχή σε εφελκυσμό και το πορώδες [25, 29-30].

3.1 Flash sizer

Η τραχύτητα της επιφάνειας μπορεί να χρησιμεύσει ως πολύτιμη παράμετρος για την πρόβλεψη της αντοχής στον εφελκυσμό των δισκίων. Οι Halenius et al. χρησιμοποίησαν την συγκεκριμένη μέθοδο, η οποία αποτελεί μία μέθοδο τρισδιάστατης απεικόνισης, για την εκτίμηση της τραχύτητας της επιφάνειας των δισκίων και συνέκρινε τα αποτελέσματα με συστήματα προφίλομέτρησης που χρησιμοποιούν μόνο μία δέσμη laser. Τα δισκία τοποθετήθηκαν σε ένα επίπεδο μέτρησης κάτω από ένα μικροσκόπιο, στη συνέχεια αναλύθηκαν από τέσσερις διαφορετικές κατευθύνσεις χρησιμοποιώντας πηγές φωτός LED και καταγράφηκαν οι εικόνες, εκ των οποίων υπολογίστηκε η τιμή τραχύτητας για την επιφάνεια του δισκίου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέθοδος flash sizer ήταν περίπου χίλιες φορές ταχύτερη στην εκτίμηση της τραχύτητας της επιφάνειας σε σύγκριση με τα συστήματα προφίλομέτρησης που χρησιμοποιούν μόνο μία δέσμη laser. Επομένως, η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να χρησιμεύσει ως ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο PAT για την πρόβλεψη μηχανικών χαρακτηριστικών των δισκίων υπό ανάπτυξη [31].

3.2 Απεικόνιση κηλίδων με laser (ILS)

Η απεικόνιση κηλίδων με laser (ILS) είναι μια πολύ γνωστή μέθοδος και χρησιμοποιείται ευρέως σε εφαρμογές ανάλυσης της επιφάνειας των υλικών, ανάλυση μεταφοράς θερμότητας και επίσης σε πεδία βιοαπεικόνισης. Το φαινόμενο κηλίδων laser βασίζεται σε ένα φυσικό φαινόμενο όπου το συνεκτικό φως, όπως μια πηγή laser, ανακλάται διάχυτα και διαθλάται από μια συλλογή τυχαία κατανεμημένων σωματιδίων για να δημιουργήσει ένα χαρακτηριστικό, τυχαίο μοτίβο παρεμβολής, το οποίο ονομάζεται μοτίβο κηλίδων laser [32].

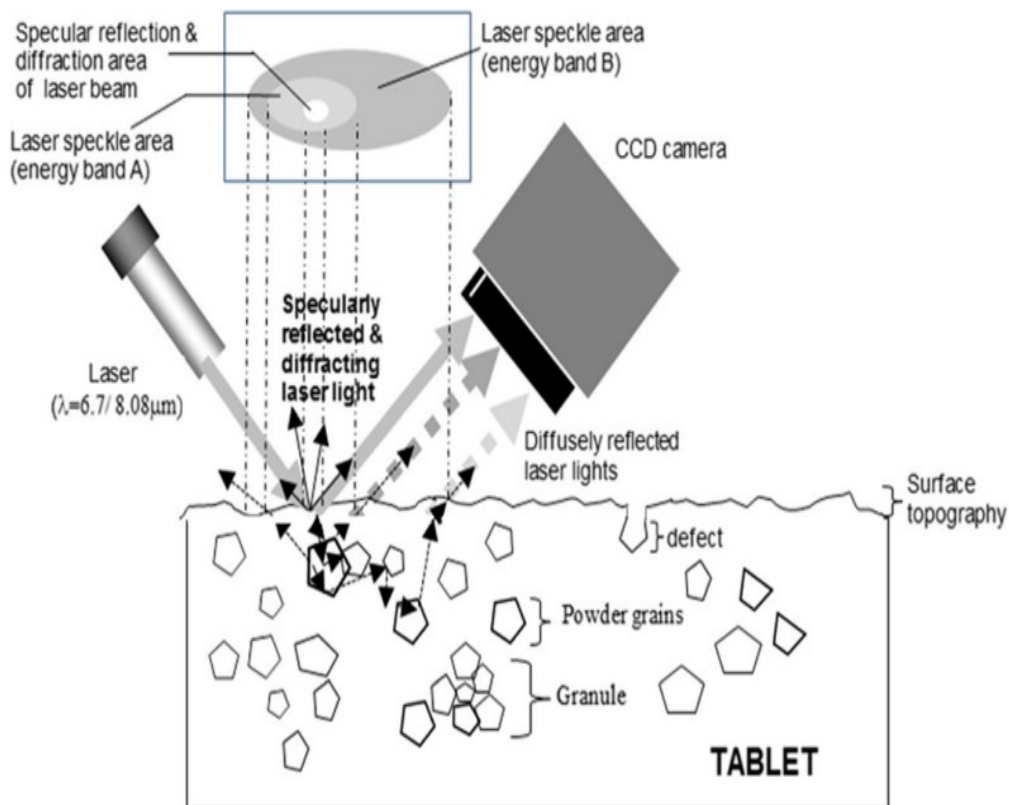
Οι Briers και Webster όρισαν το μοτίβο κηλίδων λέιζερ ως:

$$K = \frac{\sigma S}{I}$$

Όπου,

K η αντίθεση των κηλίδων ($0 < K < 1$), με ιδανική τιμή 1, σ η τυπική απόκλιση των διακυμάνσεων της χωρικής έντασης στο μοτίβο των κηλίδων και I το μοτίβο των κηλίδων.

Ο βαθμός διείσδυσης του φωτός laser στην επιφάνεια του δισκίου θα εξαρτηθεί αναπόφευκτα από την ένταση (ενέργεια) και το μήκος κύματος (λ) της πηγής. Η Εικόνα 3.1 αναπαριστά σχηματικά την εφαρμογή της μεθόδου στην αξιολόγηση των διαφορών στην τοπογραφία του δισκίου και στην υποεπιφανειακή μικροδομή των φαρμακευτικών δισκίων [32].

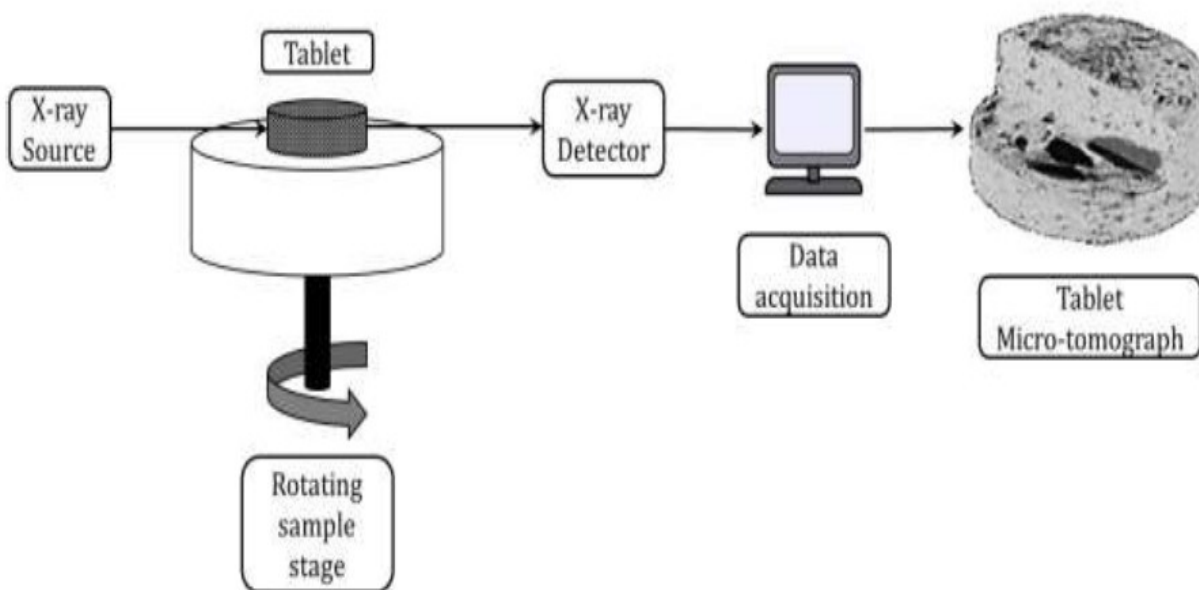


Εικόνα 3.1: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου ILS. Τύποι ακτινοβολίας φωτός laser: (α) περίθλαση & κατοπτρική ανάκλαση και (β) διάχυτη ανάκλαση [32]

Οι Orun και Smith πρότειναν ένα σύστημα χαμηλού κόστους ILS, που βασίζεται σε μεθόδους οπτικής και τεχνητής νοημοσύνης για τη δομική ανάλυση των επιφανειακών στρωμάτων δισκίων μεφαιναμικού οξέος. Η λειτουργικότητα της τεχνικής που αναπτύχθηκε βασίστηκε στην ανάλυση του μοτίβου κηλίδων laser, ακολουθούμενη από τη βελτιστοποίηση των χαρακτηριστικών με τη χρήση του θεωρήματος Bayes. Το σύστημα που αναπτύχθηκε χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση επιφανειακών ελαττωμάτων καθώς και για τη μελέτη της μικροδομής των κόκκων [32].

3.3 Τομογραφία

Δύο προσεγγίσεις τομογραφίας, συμπεριλαμβανομένης της οπτικής τομογραφίας συνοχής (OCT) και της μικροτομογραφίας ακτίνων Χ/μικροϋπολογιστικής τομογραφίας ακτίνων Χ, χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση των δισκίων. Το OCT επιτρέπει την ανάλυση των χαρακτηριστικών της επικάλυψης, δηλαδή του πάχους ή της ομοιογένειας του εξωτερικού στρώματος, ανεξάρτητα από τις αλλαγές στον πυρήνα του δισκίου [33]. Η αναλυτική τεχνική περιλαμβάνει την ακτινοβολία του δείγματος με ακτίνες Χ που παράγονται από μια πηγή υψηλής ισχύος, ακολουθούμενη από ανίχνευση της μεταδιδόμενης ακτίνας Χ (Εικόνα 3.2) [25].



Εικόνα 3.2: Σχηματική αναπαράσταση της μικροτομογραφίας ακτίνων Χ για την ανάλυση φαρμακευτικών δισκίων [25].

Τρεις τύποι τεχνικών OCT, συμπεριλαμβανομένης της φασματικής οπτικής τομογραφίας συνοχής (Spectral Domain OCT, S-OCT), της οπτικής τομογραφίας συνοχής με Χρονικού

Πεδίου Ανίχνευση (Time Domain OCT, T-OCT) και της οπτικής τομογραφίας συνοχής σάρωσης πηγής (swept source OCT, SS-OCT), έχουν χρησιμοποιηθεί για την απεικόνιση της επικάλυψης των δισκίων [34]. Οι Koller et al. χρησιμοποίησαν το OCT, κατά τη διάρκεια μιας βιομηχανικής διαδικασίας επικάλυψης με ψεκασμό, για την μέτρηση πάχους και της ομοιογένειας των επικαλύψεων [33]. Ωστόσο, η σωστή τοποθέτηση του αισθητήρα και το μειωμένο βάθος διείσδυσης λόγω της ισχυρής διασποράς ορισμένων συνθέσεων επικάλυψης είναι μερικές από τις προκλήσεις που σχετίζονται με αυτήν την προσέγγιση [34].

Στη μικροτομογραφία ακτινών Χ, λαμβάνονται 2D εικόνες οι οποίες μπορούν να συνδυαστούν με κατάλληλους αλγόριθμους για τη δημιουργία ενός τρισδιάστατου χάρτη του δείγματος. Η μικροτομογραφία ακτινών Χ έχει χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της μικροδομής των δισκίων που χορηγούνται από το στόμα, να ανιχνεύσει εσωτερικά/εξωτερικά ελαττώματα ή την παρουσία ξένων ουσιών στα δισκία [25, 35]. Επιπλέον, αυτή η τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των αλλαγών στην πυκνότητα του δισκίου με την παραγωγή ενός χάρτη πυκνότητας, μέσω της χρήσης κατευθυντήρα (collimators) και την εφαρμογή μαθηματικών αλγορίθμων [36]. Οι εξελίξεις στους ανιχνευτές επιτρέπουν ταχύτερη απόκτηση δεδομένων με υψηλότερη ένταση και ισχυρή ευθυγράμμιση. Ωστόσο, απαιτείται μια καμπύλη βαθμονόμησης για τη συσχέτιση των πειραματικών δεδομένων. Επιπλέον, η ακριβής αξιολόγηση των δειγμάτων αποτελεί πρόκληση λόγω της πυκνότητας του υλικού καθώς και του ατομικού αριθμού των συστατικών [25].

επικαλύψεις των δισκίων [38]. Τα πλεονεκτήματα της φασματοσκοπίας LIB ως αναλυτικού εργαλείου περιλαμβάνουν τη μη επεμβατική μέτρηση του περιεχομένου του πυρήνα και την επιτόπια ανάλυση. Τα μειονεκτήματα αυτής της προσέγγισης περιλαμβάνουν την πολυπλοκότητα, το υψηλό κόστος εγκατάστασης και την ανάγκη για εξειδικευμένη τεχνογνωσία [25].

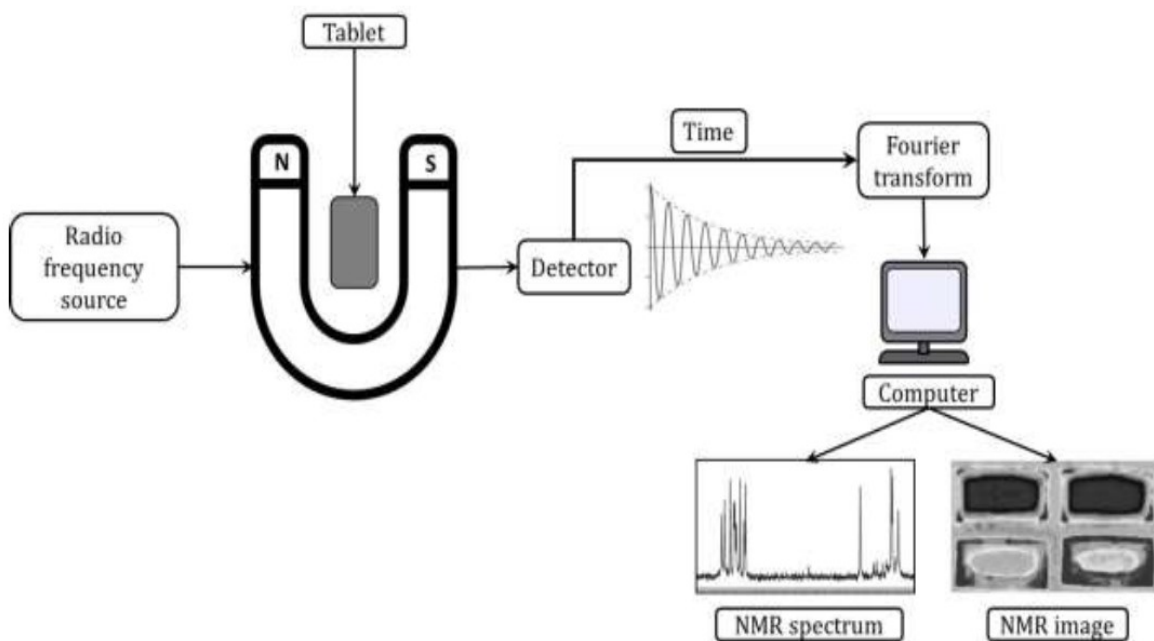
3.5 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Η θεωρητική βάση για την φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) παρουσιάστηκε από τον W. Pauli το 1924, ο οποίος πρότεινε ότι ορισμένοι ατομικοί πυρήνες έχουν ιδιότητες αυτοστροφορμής και μαγνητικής ροπής και επομένως η έκθεσή τους σε μαγνητικό πεδίο οδηγεί στον διαχωρισμό των ενεργειακών τους επιπέδων. Είναι μια τεχνική με πολύ μεγάλο εύρος δυνατοτήτων με πολύ λεπτομερή αποτελέσματα, ενώ διακρίνονται δύο γενικές τύποι οργάνων NMR, τα παλμικά φασματοφωτόμετρα ή φασματοφωτόμετρα μετασχηματισμού Fourier (FT-NMR) και τα φασματοφωτόμετρα συνεχούς κύματος (continuous wave, CW). Από το 1970 άρχισε η διάθεση των οργάνων στο εμπόριο ενώ πλέον κυριαρχούν τα όργανα FT-NMR [23].

Σε πειράματα NMR, οι πυρήνες υπό την επίδραση ισχυρού μαγνητικού πεδίου υπόκεινται περιοδικά σε παλμούς ισχυρής ακτινοβολίας RF. Το εύρος των παλμών τ είναι συνήθως μικρότερο από 10 μ s και η συχνότητα της ακτινοβολίας είναι της τάξης των 10² και 10³ MHz. Κατά την διέγερση των πυρήνων, αλλάζει προσανατολισμό το spin τους και μετά από κάποιο χρονικό διάστημα αυτοί αποδιεγείρονται, παράγοντας ένα μετρήσιμο σήμα,

το οποίο διαφοροποιείται στη συχνότητα του ανάλογα με το χημικό περιβάλλον του πυρήνα. Με αυτό τον τρόπο, μελετώντας το καταγραφόμενο σήμα από τους πυρήνες, μπορούμε να επιβεβαιώσουμε την ύπαρξη αλκυλικών πρωτονίων, την ύπαρξη διπλών και τριπλών δεσμών καθώς και την ύπαρξη αρωματικών δακτυλίων μεταξύ άλλων [23].

Ένα τυπικό όργανο απεικόνισης NMR αποτελείται από έναν υπεραγώγιμο μαγνήτη, έναν πομπό ραδιοσυχνοτήτων, έναν δέκτη των σημάτων NMR, έναν μετατροπέα και ένα σύστημα απόκτησης δεδομένων για επεξεργασία του σήματος (Εικόνα 3.4). Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία φασματογράφων NMR που προσφέρονται από διαφορετικούς κατασκευαστές. Ωστόσο, τα βασικά χαρακτηριστικά είναι κοινά μεταξύ διαφορετικών συστημάτων [25].



Εικόνα 3.4: Σχηματική απεικόνιση φασματογράφου NMR [25].

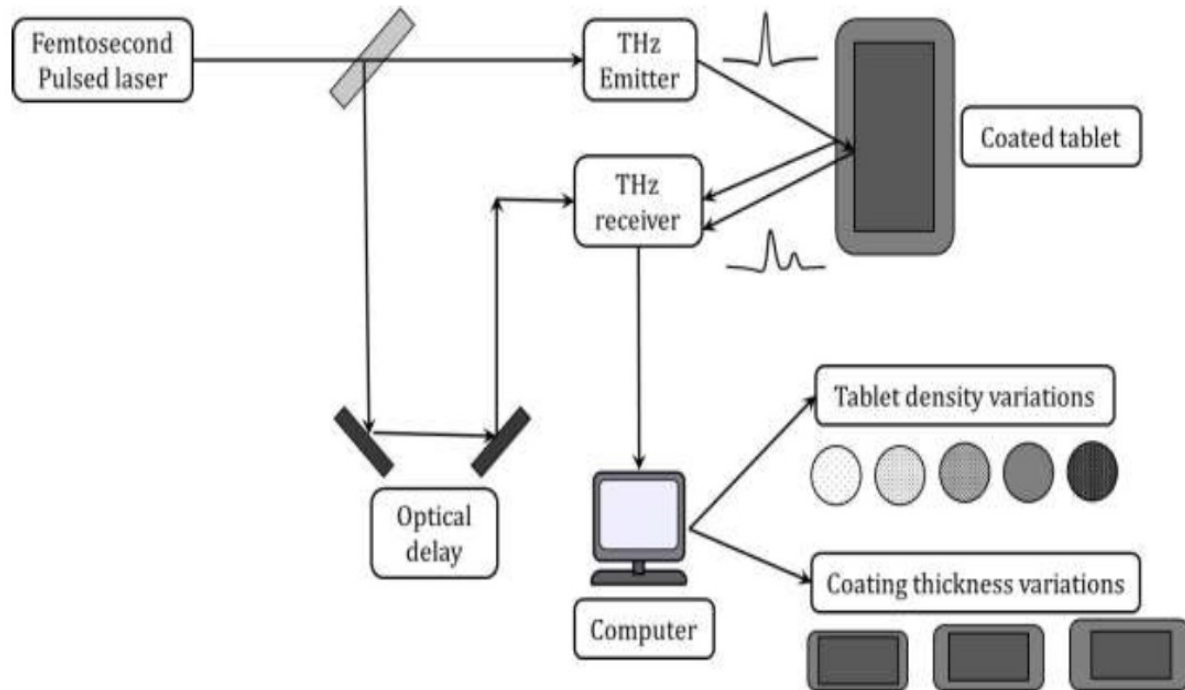
Η εφαρμογή της απεικόνισης πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ως PAT είναι σπάνια. Ωστόσο, μελέτες αναφέρουν τη χρησιμότητα της μεθόδου NMR για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε δραστική ουσία και της ακριβούς δομής των πρώτων υλών σε ένα δισκίο [39] καθώς και τον προσδιορισμό των προσμίξεων και των εναντιομερών. Επιπλέον, έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της κατανομής των στοιχείων πάνω ή γύρω από τη μήτρα του δισκίου, και τη μικροδομή των δισκίων κατά την απελευθέρωση του δραστικού συστατικού, προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών απελευθέρωσης [40].

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου NMR περιλαμβάνουν την αναλυτική ακρίβεια, την ευαισθησία στα δομικά, φυσικά ή χημικά χαρακτηριστικά του δείγματος. Επιπλέον, η ανάλυση NMR δεν απαιτεί χημικά πρόσθετα, παρέχει σημαντικές λεπτομέρειες για τα εσωτερικά χαρακτηριστικά του δείγματος και πολλαπλές μετρήσεις από ένα μόνο δείγμα. Ωστόσο, αυτή η τεχνική είναι δαπανηρή και απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό για την εφαρμογή της μεθόδου καθώς και την ανάλυση δεδομένων [40].

3.6 Φασματοσκοπία Terahertz

Η περιοχή μήκους κύματος στην περιοχή συχνοτήτων από 300 GHz έως 10 terahertz στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα αποτελεί την περιοχή terahertz [23]. Η φασματοσκοπία Terahertz χρησιμοποιεί μη ionίζουσες ακτινοβολίες για την καταγραφή του δείκτη διάθλασης και των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών της μάζας του δισκίου χωρίς να προκαλείται θερμική καταπόνηση στο δείγμα. Η βασική διαμόρφωση των οργάνων φασματογράφων Terahertz φαίνεται στην Εικόνα 3.5 [25].

Συγκεκριμένα, έχει χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της κρυσταλλικότητας, του πολυμορφισμού, της πυκνότητας, της σκληρότητας, του πορώδους, της περιεκτικότητας σε δραστική ουσία και της μικροδομής των δισκίων [25, 40-42].



Εικόνα 3.5: Σχηματική απεικόνιση φασματογράφου Terahertz [25].

Επιπλέον, η φασματοσκοπία terahertz έχει χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση του πάχους επικάλυψης του δισκίου [43]. Αν και η τεχνική είναι μη επεμβατική, η παρουσία υγρασίας στο δείγμα διακυβεύει την αποτελεσματικότητά της μεθόδου. Επιπλέον, η ανάλυση δειγμάτων μεγάλου μεγέθους απαιτεί χειροκίνητη ανάλυση δεδομένων, η οποία είναι χρονοβόρα και απαιτεί βέλτιστες τεχνικές δεξιότητες [25].

3.7 Φασματοσκοπία Raman

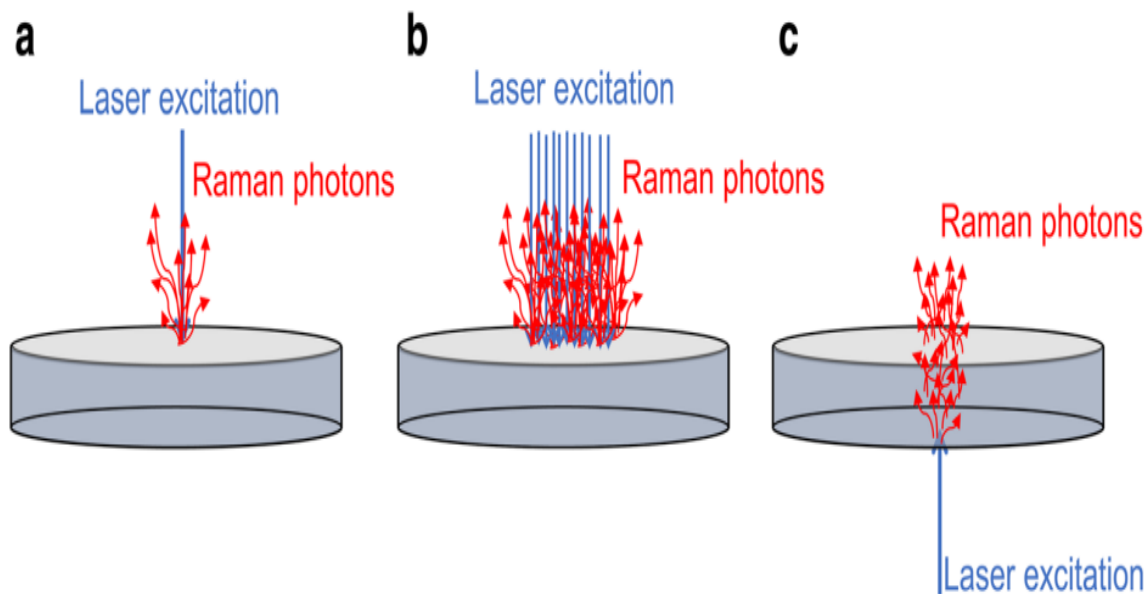
Στην φασματοσκοπία Raman, η φασματική διέγερση προκαλείται με ακτινοβολία του δείγματος με μια ισχυρή πηγή laser ορατής ή εγγύς υπερύθρου μονοχρωματικής ακτινοβολίας. Κατά την διάρκεια της ακτινοβολήσης το φάσμα σκεδαζόμενης ακτινοβολίας μετρείται υπό γωνία, συνήθως 90° , με ένα κατάλληλο φασματοφωτόμετρο. Για την αποφυγή φθορισμού, το μήκος κύματος διέγερσης απομακρύνεται αρκετά από την ζώνη διέγερσης του αναλύτη [23].

Μια τυπική διάταξη φασματόμετρου Raman περιλαμβάνει μια πηγή φωτός, οπτικά στοιχεία (κάτοπτρα) για την καθοδήγηση και εστίαση της δέσμης (φακοί εστίασης), έναν φασματογράφο και έναν ανιχνευτή. Τα προκύπτοντα φάσματα συλλέγονται είτε από έναν ανιχνευτή Raman διασποράς (ορατή περιοχή), είτε από έναν ανιχνευτή Raman μετασχηματισμού Fourier (περιοχή NIR), και διαχωρίζονται για ανάλυση των δεδομένων [25].

Σε κάθε φάσμα Raman λοιπόν, καταγράφεται η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας συναρτήσει της συχνότητας και αποδίδεται σε μονάδες κυματαριθμών (wavenumbers), δηλαδή στον αριθμό των κυμάτων ανά cm. Κατά συνέπεια η μορφή του φάσματος διαμορφώνεται ως εξής: Στην περιοχή του φάσματος όπου η συχνότητα είναι χαμηλότερη από αυτή της αρχικής ακτινοβολίας (θετική μετατόπιση) εμφανίζονται οι γραμμές Stokes, οι οποίες αποτελούν και το αντικατοπτρικό είδωλο της μορφής του φάσματος που εμφανίζεται στην άλλη πλευρά της γραμμής Rayleigh όπου το $\Delta\nu$ είναι θετικό και εμφανίζονται οι γραμμές anti-Stokes (αρνητική μετατόπιση). Κάθε υλικό έχει μια χαρακτηριστική μετατόπιση που εξαρτάται από τη χημική του σύσταση, με το πλάτος της

κορυφής σε ένα φάσμα Raman να καθορίζει την ποιότητα του δείγματος ενώ η ένταση δηλώνει την ποσότητα του δείγματος [25, 44].

Έχουν αναπτυχθεί πολλοί ανιχνευτές Raman ώστε να γίνεται η διαδικασία όσο το δυνατόν ευκολότερη και να αποφεύγονται οι δυσκολίες που αναπτύσσονται κατά την εφαρμογή της μεθόδου. Ειδικότερα, στον παραδοσιακή φασματοσκοπία Raman προκύπτουν προβλήματα με την λήψη φάσματός ειδικά στην περίπτωση που τα δείγματα είναι ετερογενή. Η οπισθοσκέδαση που προκαλείται με αυτήν την μέθοδο οδηγεί στην απώλεια σημαντικού μέρους της ενέργειας και απώλεια σήματος από τα κατώτερα στρώματα του δείγματος. Μία τεχνική, για την αποφυγή προβλημάτων, είναι ο φωτισμός ευρείας περιοχής (WAI) κατά την οποία μία εστιασμένη πηγή ακτινοβολίας προσπίπτει στο δείγμα και λαμβάνεται σήμα από τα Raman φωτόνια. Με αυτό τον τρόπο σχηματίζονται πιο αντιπροσωπευτικά φάσματα με σήματα τα οποία έχουν ληφθεί από τα βαθύτερα εσωτερικά στρώματα του δείγματος. Μία επιπλέον μέθοδος Raman για την βελτίωση του προβλήματος της υποδειγματοληψίας είναι η φασματοσκοπία Raman Transmission, κατά την οποία διαχωρίζεται το σήμα της ακτινοβολίας και της συλλογής φωτονίων. Στο παρακάτω σχήμα φαίνονται οι διαφορετικοί τρόποι δειγματοληψίας και συσσώρευσης του σήματος ανάλογα με τη μέθοδο (Εικόνα 3.6) [44].



Εικόνα 3.6: Διαφορετικές διαμορφώσεις δειγματοληψίας για την λήψη φασμάτων Raman a) περίπτωση εμφανίζεται ο απλός τρόπος φασματοσκοπίας Raman, στη b) η μέθοδος φωτισμού ευρείας περιοχής (WAI) και στην c) η φασματοσκοπία ενισχυμένης ανάκλασης (Raman transmission) [44].

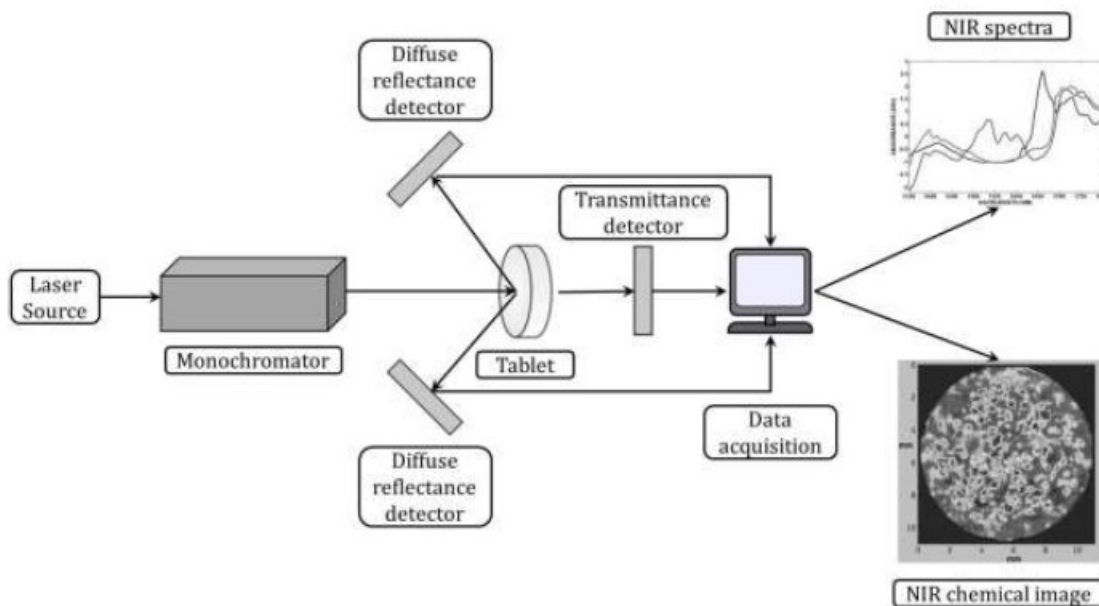
Η φασματοσκοπία Raman έχει χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση των επιμέρους τμημάτων της φαρμακοβιομηχανίας συμπεριλαμβανομένης των τμημάτων της ανάμειξης, της κοκκοποίησης, της ξήρανσης, της συμπίεσης και της επικάλυψης. Επιπλέον, διαφορετικά χαρακτηριστικά των δισκίων, συμπεριλαμβανομένης της περιεκτικότητας σε δραστική ουσία, της πυκνότητας, της περιεκτικότητας σε υγρασία, της αντοχής στη σύνθλιψη και της χωρικής κατανομής των συστατικών μελετώνται επίσης με αυτήν την τεχνική με μη επεμβατικό τρόπο [25].

Τα πλεονεκτήματα της φασματοσκοπίας Raman περιλαμβάνουν το μικρό μέγεθος δείγματος, την μη απαίτηση για εξειδικευμένες τεχνικές δεξιότητες, την καλή αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων και ικανότητα ανάλυσης δειγμάτων εντός του

υλικού συσκευασίας τους. Ωστόσο, αυτή η προσέγγιση παρουσιάζει ορισμένες προκλήσεις, όπως η παρεμβολή στο φάσμα λόγω εγγενούς ή σχετιζόμενης με ακαθαρσίες φθορισμό, η οποία μπορεί να παρακαμφθεί μετατοπίζοντας το μήκος κύματος στην NIR περιοχή, και η θερμική αποσύνθεση του δείγματος σε υψηλότερες εντάσεις διέγερσης. Επιπλέον, αυτή η αναλυτική τεχνική μπορεί να είναι απαγορευτική λόγω κόστους για αναλύσεις ρουτίνας [25, 45].

3.8 Φασματοφωτομετρία Εγγύς Υπέρυθρου (NIR)

Η περιοχή του εγγύς υπέρυθρου (NIR) ορίζεται ως το τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος μεταξύ 780 και 2526 nm. Σε αυτή τη φασματική περιοχή, οι θεμελιώδεις δονήσεις συγκεκριμένων λειτουργικών ομάδων, μεταξύ των οποίων –CH, -NH, -OH, SH, στα μόρια αλληλεπιδρούν με την ακτινοβολία για να παράγουν συγκεκριμένες φασματικές ζώνες. Αυτές οι ζώνες είναι επίσης πολύ ευαίσθητες και ανταποκρίνονται στα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά της αναλυόμενης ουσίας. Αυτές οι ιδιότητες καθιστούν την φασματοφωτομετρία εγγύς υπέρυθρου χρήσιμο εργαλείο για την αναλυτική διερεύνηση δειγμάτων με ιδιότητες υψηλής απορρόφησης ή/και σκέδασης, όπως τα στερεά. Τυπικά, οι αναλυτές NIR αποτελούνται από μια πηγή ακτινοβολίας, μια μονάδα επεξεργασίας της ακτινοβολίας, μια μονάδα τοποθέτησης δείγματος και μια μονάδα λήψης/επεξεργασίας σήματος (Εικόνα 3.7) [25].



Εικόνα 3.7: Βασική διαμόρφωση φασματομέτρου NIR [25].

Ως μη επεμβατική μέθοδος, η φασματοσκοπία NIR χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της περιεκτικότητας σε υγρασία και την τρισδιάστατη χαρτογράφηση των συστατικών της σύνθεσης. Επιπλέον, πολυάριθμες μελέτες έχουν διερευνήσει την πιθανή χρήση της φασματοσκοπίας NIR για την ανάλυση του ρυθμού διάλυσης, της επικάλυψης, της πυκνότητας, της αντοχής σε εφελκυσμό, της σκληρότητας, του πορώδους, του μεγέθους σωματιδίων, της συμπίεσης και της ανίχνευσης πλαστών δισκίων και προϊόντων αποδόμησης σε άθικτα δισκία [25, 46].

Τα πλεονεκτήματα της φασματοσκοπίας NIR έναντι των παραδοσιακών προσεγγίσεων χαρακτηρισμού περιλαμβάνουν ευελιξία μεταξύ χρήσεων in-line, at-line και off-line, μεγαλύτερη ταχύτητα ανάλυσης δεδομένων, ευκαιρία ανάλυσης συσκευασμένων δειγμάτων μέσω του υλικού συσκευασίας. Επιπλέον, τα περισσότερα από τα όργανα NIR

και μπορούν να λειτουργήσουν με ελάχιστη εκπαίδευση και τεχνικές δεξιότητες. Ωστόσο, πολλές προκλήσεις σχετίζονται επίσης με αυτήν την τεχνική, όπως υψηλή αναλογία σήματος προς θόρυβο, περίπλοκη επεξεργασία ή ερμηνεία δεδομένων μετά τη σάρωση, η οποία απαιτεί χημειομετρικές τεχνικές για την εξαγωγή των απαραίτητων πληροφοριών από τα φάσματα NIR όταν εμφανίζουν ευρείες, επικαλυπτόμενες και συγχωνευμένες κορυφές, και χαμηλή ευαισθησία [25].

3.9 Φωσφορισμός

Στην φασματοσκοπία φωτοφωταύγειας μετρείται η εκπομπή φωτονίων μετά την απορρόφηση. Συγκεκριμένα, ο φωσφορισμός συνοδεύεται από μεταβολή του ηλεκτρονιακού spin, η οποία προκαλεί ακτινοβολία, εύκολα ανιχνεύσιμη, για χρόνο που μπορεί να φθάσει μερικά δευτερόλεπτα ή και περισσότερο, μετά την διακοπή της ακτινοβολίας [23]. Σύμφωνα με διάφορες μελέτες, το ~ 60% των δραστικών ουσιών των φαρμακευτικών σκευασμάτων μπορούν να υποστούν φωσφορισμό, γεγονός που επιτρέπει την ανάλυση των δραστικών ουσιών εντός ενός δισκίου [25]. Οι Lai et al. κατέδειξαν την χρησιμότητα της μεθόδου του φωσφορισμού για ποιοτική ανάλυση του περιεχομένου των φαρμακευτικών δισκίων που θα μπορούσε να εφαρμοστεί κατά τη διαδικασία παραγωγής στην φαρμακοβιομηχανία [47].

Η προσέγγιση του φωσφορισμού επιτρέπει την ανάλυση φαρμακευτικών σκευασμάτων με υψηλή ευαισθησία, ταχύτερο ρυθμό, υψηλή ακρίβεια και συγκριτικά χαμηλό κόστος. Σε αντίθεση με τη φασματοσκοπία UV και NIR, η αύξηση της έντασης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας στην προσέγγιση του φωσφορισμού ενισχύει την ένταση του φωσφορισμού, γεγονός που οδηγεί σε καλύτερη ανίχνευση. Οι περιορισμοί που σχετίζονται με αυτήν την

προσέγγιση περιλαμβάνουν την δυναμική απόσβεση, μη γραμμική απόκριση του ανιχνευτή λόγω κορεσμού, στην περίπτωση υψηλής συγκέντρωσης φθοροφόρου, και την ευαισθησία της μεθόδου στη θερμοκρασία και τις διακυμάνσεις του pH που μπορούν να επηρεάσουν την ένταση του φθορισμού [25].

3.10 Ακουστικές μέθοδοι

Τα υλικά επιτρέπουν τη διάδοση των ηχητικών κυμάτων ως συνάρτηση της συμπιεστότητάς τους. Αυτή η διακύμανση στην ταχύτητα διάδοσης των ηχητικών κυμάτων χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό και την παρακολούθηση των διαφορετικών τμημάτων της φαρμακοβιομηχανίας για την κατασκευή δισκίων. Διάφορες ακουστικές τεχνικές όπως η ακουστική εκπομπή (AE), η μέθοδος απεικόνισης υπερήχων (CU), η φωτοακουστική απεικόνιση (PA) και ακουστική φασματοσκοπία συντονισμού (AR) έχουν χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση των δισκίων. Συγκεκριμένα, αυτή η αναλυτική μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση/ανάλυση της πυκνότητας, του πάχους επικάλυψης, του μεγέθους των σωματιδίων, των μηχανικών ελαττωμάτων και δομικών ελαττωμάτων [25].

Ένας άλλος τύπος ακουστικής τεχνικής η φασματοσκοπία BARD (broadband acoustic resonance dissolution spectroscopy) έχει αναφερθεί για την παρακολούθηση της διαδικασίας διάλυσης ενός επικαλυμμένου δισκίου παντοπραζόλης. Εν συντομία, το φασματόμετρο BARD περιλάμβανε έναν θάλαμο που περιείχε ένα δοχείο διάλυσης, μια ράβδο ανάδευσης, έναν μαγνητικό αναδευτήρα και ένα ανιχνευτή των ηχητικών κυμάτων. Οι ακουστικοί συντονισμοί καταγράφονται και μετατρέπονται σε φάσμα χρησιμοποιώντας ένα σύστημα υπολογιστή και ένα γενικό λογισμικό [48].

Οι ακουστικές τεχνικές πλεονεκτούν λόγω του χαμηλού τους κόστους, της αποδοτικότητας, της ευκολίας χειρισμού και την αποτελεσματικότητα της μεθόδου σε δυσμενείς συνθήκες επεξεργασίας, δηλαδή υψηλές θερμοκρασίες, πιέσεις ή παρουσία διαβρωτικών υλικών/μέσου. Οι προκλήσεις της χρήσης των ακουστικών τεχνικών περιλαμβάνουν τη χαμηλή απόδοση, την αργή ταχύτητα, όπως στην περίπτωση φασματοσκοπίας ακουστικού συντονισμού, τα σφάλματα που σχετίζονται με το θόρυβο, την ανάγκη για μοντελοποίηση για την ακριβή ανάλυση των αποτελεσμάτων και τις πιθανότητες ψευδών αποτελεσμάτων [25].

3.11 Φασματομετρία Μαζών (MS)

Η φασματομετρία μαζών είναι ένα εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο PAT για την ποιοτική ανάλυση φαρμάκων, ενώσεων και δραστικών ουσιών. Χαρακτηρίζεται από υψηλή αναλυτική ακριβεία, γεγονός που το καθιστά χρήσιμο εργαλείο στην ποιοτική ανάλυση μικρών μορίων ενώ συχνά επιλέγεται και χρησιμοποιείται σε βιολογικές διεργασίες, όπως στην ανάλυση ετερογενών βιομορίων. Το φάσμα μάζας χρησιμοποιείται συνήθως για την απόκτηση της ταυτότητας δύο ενώσεων ή για τη δημιουργία της δομής μιας νέας ένωσης και παρέχει το ακριβές μοριακό βάρος ή τον μοριακό τύπο για να υποδείξει την ύπαρξη μιας συγκεκριμένης δομικής μονάδας σε ένα μόριο. Το κύριο πλεονέκτημα του MS είναι η ικανότητά του να μετράει πολλούς τύπους ενώσεων με εξαιρετική διακριτική ικανότητα σε πολύ σύντομο χρόνο ανάλυσης. Επιπλέον, χρησιμοποιείται για την ποσοτική ανάλυση γνωστών ουσιών ή τον εντοπισμό άγνωστων ενώσεων σε ένα δείγμα και για την αποκάλυψη της δομής και των χημικών τους ιδιοτήτων [49-51].

Η τεχνική βασίζεται στον ιοντισμό του δείγματος με ποικίλες μεθόδους σε υψηλό κενό, με σκοπό την παραγωγή φορτισμένων μορίων και θραυσμάτων σε αέρια φάση και την καταγραφή της έντασης του σήματος των ιόντων συναρτήσει του λόγου μάζας προς φορτίο. Το υψηλό κενό είναι απαραίτητο, ώστε τα φορτισμένα σωματίδια να μην αλληλεπιδράσουν με την ατμόσφαιρα και καταστραφούν, επομένως το μειονέκτημα του MS είναι ότι ένα δείγμα δεν μπορεί να αναλυθεί εάν δεν μπορεί να υποστεί εξάτμιση. Οι τυπικές εφαρμογές του MS περιλαμβάνουν τον έλεγχο σε πραγματικό χρόνο της διαδικασίας ξήρανσης, ιδιαίτερα την παρακολούθηση των ιχνοποσοτήτων οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή των ενδιάμεσων και τελικών προϊόντων [23, 52].

3.12 Φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X (XRF)

Το XRF είναι μια τεχνική ατομικής ανάλυσης που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της δραστικής ουσίας μιας ποικιλίας τύπων δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένων στερεών, υγρών και σκονών, παρόμοια με τη Φασματομετρία Ατομικής Εκπομπής με Επαγωγικά Συζευγμένο Πλάσμα (ICP-AES) και τη Φασματοσκοπία ατομικής Απορρόφησης (AAS) [53]. Το XRF είναι μια μέθοδος χημικής ανάλυσης που βασίζεται στη μεταφορά εσωτερικών ηλεκτρονίων και στην αλληλεπίδραση ακτινοβολίας ακτίνων X και ατόμων. Οι ακτίνες X υψηλής ενέργειας προσβάλλουν ηλεκτρόνια σε άτομα υψηλής ενέργειας, οδηγώντας στην απελευθέρωσή τους [54]. Ως εκ τούτου, δημιουργείται ένα κενό στην εσωτερική τροχιά και τα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τροχιά μετακινούνται για να καλύψουν το κενό, δημιουργώντας έτσι φθορίζουσες ακτίνες X λόγω της διαφοράς ενέργειας μεταξύ των δύο τροχιών. Η στοιχειακή ανάλυση είναι δυνατή ως αποτέλεσμα

της μοναδικής ενεργειακής διαφοράς που προκύπτει από τη χαρακτηριστική ακτινοβολία ακτίνων X [55].

Το XRF πλεονεκτεί ως μέθοδος, καθώς τα φάσματα που λαμβάνονται είναι σχετικά απλά και οι φασματικές παρεμποδίσεις είναι σπάνιες. Επιπλέον είναι μια μη καταστροφική, ταχύτατη και απλή μέθοδος που δεν απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό, η οποία επιτρέπει τον προσδιορισμό πολλών στοιχείων σε μερικά λεπτά. Τέλος, υπερτερεί σε ακρίβεια και β επαναληψιμότητα ως προς τις άλλες αναλυτικές μεθόδους. Ωστόσο, η μέθοδος XRF δεν είναι τόσο ευαίσθητη, ενώ εφαρμόζεται σε συγκεντρώσεις μερικών ppm. Επιπλέον, οι δυσκολίες στην ανίχνευση και στην μέτρηση αυξάνουν προοδευτικά, καθώς ο ατομικός αριθμός του προσδιοριζόμενου στοιχείου γίνεται μικρότερος, επειδή εμφανίζεται ο ανταγωνιστικός μηχανισμός της εκπομπής Auger [23].

Κεφάλαιο 4: Εφαρμογή των PAT στην παραγωγική διαδικασία

Όπως προαναφέρθηκε, οι PAT δυνητικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, εντός μίας φαρμακευτικής μονάδας, με σκοπό να διασφαλίσει τη σωστή ολοκλήρωση της. Οι μετρήσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν με διαφορετικούς τρόπους, με την At-line, την on-line, την in-line και την off-line μέθοδος, οι οποίες επιλέγονται εκάστοτε για να είναι πιο αξιόπιστη και ακριβής η μέτρηση [56].

Ειδικότερα, η πρώτη μέθοδος η At-line μέτρηση, χρησιμοποιείται για να αναλύσει το δείγμα απομακρυσμένα από την παραγωγική διαδικασία. Η δεύτερη μέθοδος αφορά την on-line μέτρηση κατά την οποία το δείγμα προς μελέτη εκτρέπεται από την αναλυτική διαδικασία και έχει τη δυνατότητα να επιστρέψει στην ροή της διαδικασίας. Η τρίτη μέθοδος είναι η in-line μέτρηση, όπου το δείγμα προς ανάλυση παραμένει εντός της παραγωγικής ροής και χρησιμοποιείται ένας ανιχνευτής δειγματοληψίας. Τέλος, κατά την off-line το δείγμα απομακρύνεται και αναλύεται σε διαφορετικό πιστοποιημένο εργαστήριο [57].

4.1 Ανάμειξη

Η ανάμειξη (blending) αποτελεί μία καίρια διαδικασία για την παρασκευή όλων των σκευασμάτων, συμπεριλαμβανομένων των γαλακτωμάτων, των εναιωρημάτων και των ενέσεων, καθώς και των στερεών μορφών, όπως τα δισκία και οι κάψουλες. Ο κύριος σκοπός της συγκεκριμένης παραγωγικής διαδικασίας είναι η δημιουργία ενός ομοιογενούς μίγματος του API και των εκδόχων [58].

Η περιττή ανάμειξη για μεγάλες χρονικές περιόδους μπορεί να αλλάξει το μέγεθος των σωματιδίων και την κατανομή μεγέθους λόγω φθοράς. Τέτοιες αλλαγές στις ιδιότητες των

ενδιάμεσων προϊόντων μπορούν να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα των τελικών προϊόντων. Επομένως, κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της ανάμειξης, είναι απαραίτητο να επιθεωρούνται τα ενδιάμεσα χαρακτηριστικά ποιότητας (Intermediate Quality Attributes, IQA), συμπεριλαμβανομένης της ομοιομορφίας της ανάμειξης, του μεγέθους των σωματιδίων και της κατανομής μεγέθους σωματιδίων. Επιπλέον, σε αυτή τη διαδικασία, τα κρίσιμα σημεία ελέγχου (Critical Control Point, CCP), όπως η ταχύτητα και ο χρόνος της ανάμειξης, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη μέσω παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο. Η υπάρχουσα αναλυτική διαδικασία off-line για την αξιολόγηση της ομοιομορφίας της ανάμειξης εκτελείται μέσω δειγματοληψίας σταματώντας τη διαδικασία. Έτσι, στη διαδικασία ανάμειξης, τα εργαλεία PAT μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μη καταστροφική μέτρηση των IQA και της απόδοσης της διαδικασίας σε πραγματικό χρόνο και για τον έλεγχο των CCP για τη διασφάλιση των κρίσιμων χαρακτηριστικών ποιότητας (Critical Quality Attributes; CQAs) [59-60].

Συγκεκριμένα, οι El-Hagrasy et al., εγκατέστησαν ανιχνευτές NIR σε έξι διαφορετικές θέσεις σε ένα blender για να μετρήσουν την ομοιομορφία ανάμειξης της σκόνης και να παρακολουθήσουν τη διαδικασία ανάμειξης χρησιμοποιώντας μια κάμερα απεικόνισης. Αυτό πραγματοποιήθηκε με προσαρμογή του χρόνου ανάμειξης για τη μέτρηση της ομοιομορφίας ανάμειξης και χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα μετρήσεων off-line NIRS και UV-VIS ως μέθοδος αναφοράς [61]. Επίσης, οι Shi et al. χρησιμοποίησαν την φασματοσκοπία NIR σε διάφορες θέσεις εντός ενός blender για την παρακολούθηση της περιεκτικότητας της δραστικής ουσίας του φαρμάκου [62]. Οι συγκεκριμένες μελέτες δείχνουν ότι η παρακολούθηση σε πολλαπλές θέσεις δειγματοληψίας με χρήση ανιχνευτή

είναι απαραίτητη για την ακριβή εκτίμηση της ομοιομορφίας της ανάμειξης. Επιπλέον, εφόσον η ανάμειξη για μεγάλο χρονικό διάστημα επηρεάζει το μέγεθος των σωματιδίων, την περιεκτικότητα της δραστικής ουσίας του φαρμάκου και την κατανομή μεγέθους των σωματιδίων μειώνοντας την ομοιομορφία ανάμειξης, επιβεβαιώθηκε η αναγκαιότητα παρακολούθησης της διαδικασίας της ανάμειξης μέσω των PAT.

Οι Lee et al. προέβλεψαν την κατανομή μεγέθους σωματιδίων των εκδόχων μέσω παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο χρησιμοποιώντας ενσωματωμένα NIRS κατά τη διαδικασία ανάμειξης [63-64]. Οι Nagy et al. έδειξαν ότι, κατά τη διάρκεια της διαδικασίας συνεχούς ανάμειξης, η φασματοσκοπία Raman είναι αποτελεσματική στην παρακολούθηση και τον έλεγχο της διαδικασίας της ανάμειξης σε πραγματικό χρόνο. Αυτή η μελέτη δείχνει ότι, με την προτεινόμενη στρατηγική PAT, τα IQA μπορούν να μετρηθούν και να προβλεφθούν μέσω φασματοσκοπίας Raman και μπορούν να εντοπιστούν έγκαιρα τεχνικές δυσλειτουργίες [44]. Επιπλέον, οι De Beer et al. χρησιμοποίησαν φασματοσκοπία Raman και NIR ταυτόχρονα σε αναμίκτη υψηλής διάτμησης, σε μια μέθοδο in-line, για τον προσδιορισμό του τελικού σημείου της διαδικασίας ανάμειξης. Αυτή η μελέτη κατέδειξε ότι, όταν δύο εργαλεία PAT χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα, μπορούν να επαληθευτούν αμοιβαία, και ως εκ τούτου, η διαδικασία χαρακτηρίζεται από υψηλή ακρίβεια [65].

4.2 Κοκκοποίηση

Η κοκκοποίηση (granulation) περιλαμβάνει τη μεγέθυνση των σωματιδίων της σκόνης μέσω της τεχνολογίας της συσσωμάτωσης, η οποία επιτρέπει τα σωματίδια να κολλήσουν πιο σταθερά αποτρέπεται τον διαχωρισμό και βελτιώνει τη συμπίεση της σκόνης κατά τη δημιουργία δισκίων [66]. Μπορεί να ταξινομηθεί σε ξηρή κοκκοποίηση και υγρή

κοκκοποίηση, με την υγρή κοκκοποίηση να πραγματοποιείται με ψεκασμό ενός υγρού συνδετικού πάνω στα σωματίδια ενώ αναμιγνύονται σε αναμικτήρα υψηλής διάτμησης η κοκκοποιητή ρευστοποιημένης κλίνης [67]. Σε αντίθεση με την υγρή κοκκοποίηση, η ξηρή κοκκοποίηση δεν χρησιμοποιεί νερό ή οργανικούς διαλύτες. Ως εκ τούτου, είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για φάρμακα που είναι ευαίσθητα στην υγρασία ή τη θερμότητα [68]. Επειδή η διαδικασία κοκκοποίησης περιλαμβάνει έναν περίπλοκο μηχανισμό, είναι δύσκολο να ελέγχεται και να διαχειρίζεται η ποιότητα της διαδικασίας επομένως, είναι σημαντικό να χρησιμοποιούνται οι PAT για τον έλεγχο των CCP.

Στη διαδικασία της υγρής κοκκοποίησης, το μέγεθος των σωματιδίων και η κατανομή μεγέθους των κόκκων επηρεάζουν στα CQA του τελικού προϊόντος, όπως η ομοιομορφία περιεχομένου, η αντοχή σε εφελκυσμό και η ευθρυπτότητα. Επομένως, είναι απαραίτητος ο έλεγχος της συσσωμάτωσης των κόκκων [66-67]. Επιπλέον, η περιεκτικότητα σε υγρασία επηρεάζει τα CQA, συμπεριλαμβανομένης της ρευστότητας, της σταθερότητας και της συμπιεστότητας του τελικού προϊόντος. Επομένως, είναι απαραίτητο να ελέγχεται κατάλληλα η περιεκτικότητα σε υγρασία κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.

Οι Reddy et al. χρησιμοποίησαν φασματοσκοπία Raman για τον έλεγχο της περιεκτικότητας σε υγρασία και της θερμοκρασίας του ενδιάμεσου προϊόντος χρησιμοποιώντας on-line παρακολούθηση. Σχηματίστηκε ένα μοντέλο βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας το PLS ως πολυμεταβλητό εργαλείο. Ως αποτέλεσμα, επιβεβαιώθηκε ότι η αλλαγή του σχήματος των σωματιδίων ανάλογα με το CCP επηρεάζει τη απευλευθέρωση της δραστικής ουσίας του φαρμάκου. Αυτό υποδηλώνει ότι η παρακολούθηση των υγρών κόκκων είναι ένας ουσιαστικός παράγοντας στο κλινικό

στάδιο και ο έλεγχός της χρησιμοποιώντας ένα εργαλείο PAT είναι μια αποτελεσματική μέθοδος ποιοτικού ελέγχου [69]. Οι Shikata et al., κατά τη διάρκεια της υγρής κοκκοποίησης, χρησιμοποίησαν το NIR για να εκτελέσουν την εν σειρά παρακολούθηση των ιδιοτήτων κοκκοποίησης, όπως το μέγεθος σωματιδίων, τη πυκνότητα και τη ρευστότητα. Για να αποφευχθεί η μόλυνση του ανιχνευτή και να διατηρηθεί η ομοιογένεια του δείγματος, αναπτύχθηκε μια μη επεμβατική μέθοδος παρακολούθησης παρουσία πεπιεσμένου αέρα και τα φάσματα συλλέχθηκαν στην περιοχή των 1100-2150 nm. Το φάσμα δεδομένων υποβλήθηκε σε προεπεξεργασία και χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του τελικού σημείου της διαδικασίας κοκκοποίησης [70].

Οι Hansult et al. χρησιμοποίησαν την ακουστική εκπομπή (AE) ως εργαλείο PAT για τη μέτρηση της πυκνότητας και της κατανομής μεγέθους σωματιδίων μέσω της on-line παρακολούθησης των αλλαγών των ιδιοτήτων των σωματιδίων κατά τη διάρκεια της υγρής κοκκοποίησης. Μετά τη διαδικασία ανάμειξης με τη χρήση του κοκκοποιητή υψηλής διάτμησης, πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση της διαδικασίας ελέγχοντας παραμέτρους όπως η ταχύτητα του στροφείου, η ποσότητα και ο ρυθμός ψεκασμού συνδετικού υλικού. Οι συγγραφείς αξιολόγησαν τη συσχέτιση μεταξύ της ταχύτητας του στροφείου, της ποσότητας συνδετικού υλικού και του τελικού σημείου. Επιπλέον, έδειξαν ότι η παρακολούθηση μέσω AAE θα μπορούσε να ανιχνεύσει τα τελικά σημεία της διαδικασίας κοκκοποίησης, υποδηλώνοντας ότι ο χρόνος ανάπτυξης του φαρμάκου θα μπορούσε να συντομευτεί πιο εύκολα [71].

4.3 Ξήρανση

Η διαδικασία της ξήρανσης σε στερεά φαρμακευτικά σκευάσματα γίνεται συνήθως ταυτόχρονα με τη διαδικασία κοκκοποίησης ή μετά τη διαδικασία κοκκοποίησης για την εξάτμιση του ψεκασμένου υγρού, και χρησιμοποιείται για τη διασφάλιση της μακροχρόνιας διατήρησης του προϊόντος [72]. Στην διαδικασία ξήρανσης υπάρχει ανάγκη να εισαχθούν συγκεκριμένα εργαλεία PAT, όπως η φασματοσκοπία και συστήματα απεικόνισης, για γρήγορη παροχή πληροφοριών σχετικά με τα CQAs, συμπεριλαμβανομένης της μετατροπής νερού σε πάγο, της κρυστάλλωσης του προϊόντος και του προσδιορισμού της υπολειπόμενης υγρασίας [73].

Οι Räsänen et al. διεξήγαγαν on-line παρακολούθηση χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία NIR για το φαινόμενο της σταδιακής αφυδάτωσης που εμφανίζεται κατά τη διαδικασία ξήρανσης σε ξηραντήρα ρευστοποιημένης κλίνης. Έδειξαν ότι η διαδικασία μπορεί να ελεγχθεί παρατηρώντας μεταβολές στη στερεά κατάσταση που επηρεάζουν τη σταθερότητα του προϊόντος και κατανοώντας την επίδραση των μεταβλητών της διαδικασίας για την παραγωγή των τελικών προϊόντων [74]. Οι Peters et al. χρησιμοποίησαν φασματοσκοπία NIR και MRT για την παρακολούθηση της περιεκτικότητας σε υγρασία των κόκκων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ξήρανσης χρησιμοποιώντας στεγνωτήρα ρευστοποιημένης κλίνης. Ανέλυσαν τα δεδομένα που ελήφθησαν από το PLS ως μοντέλο ποσοτικής βαθμονόμησης, επιβεβαιώνοντας τη διαφορά μεταξύ των δύο οργάνων. Σε αντίθεση με την φασματοσκοπία NIR, η παρακολούθηση μεγάλων ποσοτήτων υγρασίας με MRT ήταν δύσκολη, υποδεικνύοντας

ότι ο εξοπλισμός NIRS είναι κατάλληλος για συνεχή παρακολούθηση και έλεγχο της διαδικασίας [75].

4.4 Επικάλυψη

Η διαδικασία της επικάλυψης είναι μια βασική διαδικασία της παραγωγής φαρμακευτικών προϊόντων, η οποία χρησιμοποιείται για την προστασία των φαρμάκων από τα γαστρικά οξέα γενικά, για την κάλυψη οσμών ή γεύσεων ή για την πρόληψη αλληλεπιδράσεων φαρμάκων ή για την παρατεταμένη απελευθέρωση των δραστικών ουσιών [76]. Σε μια συνεχή διαδικασία, οι αλλαγές εξοπλισμού και κλίμακας μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την ποιότητα του τελικού προϊόντος, συμπεριλαμβανομένου του πάχους επικάλυψης και της περιεκτικότητας σε δραστική [77].

Επί του παρόντος, στη φαρμακευτική βιομηχανία, οι καταστροφικές μέθοδοι, όπως η κοπή, είναι πιο συνηθισμένες για την άμεση μέτρηση του πάχους της επίστρωσης. Ωστόσο, υπάρχει ανάγκη να εισαχθούν μη επεμβατικά εργαλεία PAT για την αποφυγή πρόσθετων αναλυτικών σφαλμάτων [78]. Τέτοια εργαλεία περιλαμβάνουν φασματοσκοπικές τεχνικές, όπως η φασματοσκοπία NIR και Raman, καθώς και τεχνικές απεικόνισης, συμπεριλαμβανομένου του TPI [79]. Οι El Hagrasy et al. χρησιμοποίησαν η φασματοσκοπία Raman, για την παρακολούθηση της διαδικασίας επίστρωσης. Η ένταση των γραμμών του φάσματος που συλλέγονται από αυτό το φασματόμετρο αυξήθηκε στο υλικό επικάλυψης καθώς αυξανόταν ο χρόνος επικάλυψης. Επιπλέον, για τη δημιουργία ενός μοντέλου βαθμονόμησης της συσχέτισης μεταξύ του αποκτηθέντος φάσματος και των τιμών πάχους επικάλυψης, μετρήθηκε η αύξηση βάρους του δισκίου με την πάροδο του χρόνου και χρησιμοποιήθηκε ως τιμή αναφοράς. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η

φασματοσκοπία Raman μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ομοιομορφίας της επικάλυψης [80]. Οι Knop et al. κατέδειξαν ότι κύματα Terahertz ακτινοβολούνται στην επιφάνεια επικάλυψης του δισκίου, η ακτινοβολία ανακλάται ή διεισδύει εν μέρει στην επικάλυψη. Οι συγγραφείς χρησιμοποίησαν in-line NIRS και TPI και ανέλυσαν τα δεδομένα χρησιμοποιώντας μοντέλα βαθμονόμηση PCA. Οι υπολογισθείσες τιμές που προέκυψαν από το φάσμα ήταν παρόμοιες με την πραγματική μάζα του υλικού επικάλυψης που μετρήθηκε με τη μέθοδο αναφοράς [76]. Οι Ho et al. χρησιμοποίησαν την φασματοσκοπία Terahertz στην ανάλυση επικάλυψης για να προβλέψουν την απελευθέρωση των δραστικών ουσιών από τα δισκία παρατεταμένης αποδέσμευσης. Οι συγγραφείς διαπίστωσαν ότι τα αποτελέσματα TPI συσχετίζονται με την απόδοση του πραγματικού προϊόντος και μπορούν να προβλέψουν τη συμπεριφορά απελευθέρωσης των δραστικών ουσιών από τα δισκία παρατεταμένης αποδέσμευσης [81].

4.5 Δισκιοποίηση

Στη διαδικασία της δισκιοποίησης, η πίεση συμπίεσης που χρησιμοποιείται στην πρέσα δισκιοποίησης μετράται μέσω ενός εσωτερικού αισθητήρα ως κύρια παράμετρος, επειδή μπορεί να έχει τεράστιο αντίκτυπο σε ορισμένα IQA και τις ιδιότητες του τελικού προϊόντος. Ωστόσο, υπάρχουν λίγα εμπορικά εργαλεία που μπορούν να αξιολογήσουν τα IQA, όπως το βάρος και η σκληρότητα του δισκίου, σε πραγματικό χρόνο. Συνήθως χρησιμοποιείται μια καταστροφική μέθοδος για τον προσδιορισμό της σκληρότητας και της περιεκτικότητας σε δραστική ουσία. Αντίθετα, η NIR, η φασματοσκοπία Raman και η χημική απεικόνιση

είναι μη καταστροφικές τεχνικές που παρέχουν την ταυτόχρονη μέτρηση των χημικών και φυσικών ιδιοτήτων κατά τη διαδικασία της δισκιοποίησης [82].

Συγκεκριμένα, οι Wahl et al. ανέλυσαν την ομοιομορφία της περιεκτικότητας σε δραστική ουσία η χρησιμοποιώντας έναν ανιχνευτή NIRS τοποθετημένο στην πρέσα δισκιοποίησης, χρησιμοποίησαν ως μέθοδος αναφοράς την UV-VIS. Η συγκεκριμένη μελέτη επιβεβαίωσε τη συμφωνία μεταξύ των δεδομένων NIRS και των δεδομένων UV-VIS [83]. Οι Li et al. χρησιμοποίησαν έναν ανιχνευτή φασματοσκοπίας Raman για την ποσοτική αξιολόγηση σε πραγματικό χρόνο μιας πρέσας δισκιοποίησης. Οι συγγραφείς ανέπτυξαν και επικύρωσαν στρατηγικές βαθμονόμησης τόσο on-line όσο και off-line για τον προσδιορισμό του περιεχομένου του δισκίου κατά τη συμπίεση του [84].

Κεφάλαιο 5: Συζήτηση

Στην σύγχρονη εποχή οι φαρμακοβιομηχανίες έρχονται αντιμέτωπές με την ανάγκη ανάπτυξης καινοτόμων αναλυτικών μεθόδων, καθώς η ανάπτυξη τους είναι ραγδαία. Για την ασφάλεια των φαρμακευτικών προϊόντων είναι απαραίτητο να ακολουθούνται αυστηρά οι κατευθυντήριες οδηγίες 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). Η απαίτηση για ελαχιστοποίηση των διαφορών 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 οποίο 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.

Ο σκοπός της ανάπτυξης και επικύρωσης μιας αναλυτικής μεθόδου είναι η απόδειξη καταλληλότητας της μεθόδου για τον σκοπό τον οποίο εξυπηρετεί. Μεταξύ των παραμέτρων οι οποίοι ελέγχονται για την επικύρωση της αξιοπιστίας και της αποτελεσματικότητας της μεθόδου είναι η ακρίβεια, η πιστότητα, η ευαισθησία, η γραμμικότητα, η επαναληψιμότητα, η αναπαραγωγιμότητα, η ανθεκτικότητα, η ειδικότητα, και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης.

Σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο για την Εναρμόνιση των Τεχνικών Απαιτήσεων για Φάρμακα για Ανθρώπινη Χρήση (ICH) οι αναλυτικές μέθοδοι, για τις απαιτήσεις της επικύρωσης, ταξινομούνται σε διακριτές κατηγορίες, μεταξύ των οποίων μελέτες ταυτοποίησης, μελέτες περιεκτικότητας προσμίξεων, μελέτες ποσοτικών προσδιορισμών δραστικών ουσιών, μελέτες διάλυτοποίησης και καταθρυμματισμού και μελέτες ομοιομορφίας περιεχομένου-δόσης.

Σημαντικό ρόλο στον ποιοτικό έλεγχο διαδραματίζει το κόστος και ο χρόνος καθώς πρέπει οι τεχνικές που επιλέγονται να μπορούν να πραγματοποιηθούν σε πραγματικό χρόνο με το ελάχιστο δυνατό κόστος, επομένως η ενσωμάτωση των PAT από μικρής κλίμακας πειράματα στην βιομηχανική κλίμακα αποτελεί η πρόκληση του μέλλοντος στο τομέα της φαρμακευτικής ανάλυσης. Τα βήματα που ακολουθούνται για το σχεδιασμό της PAT επηρεάζονται από παραμέτρους όπως η ακρίβεια, η ευαισθησία και η ειδικότητα. Οι μετρήσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν με διαφορετικούς τρόπους At-line, την on-line, την in-line και την off-line και επιλέγεται η καταλληλότερη μέθοδος ανάλογα με το δείγμα, το εργαστηριακό περιβάλλον και τον εργαστηριακό εξοπλισμό.

Μεταξύ των μεθόδων οι οποίες αναλύθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία το NMR αποτελεί μία μη επεμβατική μέθοδο η οποία βασίζεται στη μελέτη των μεταπτώσεων του πυρηνικού spin. Είναι μία μέθοδος που πραγματοποιεί ποσοτική και ποιοτική ανάλυση σε πραγματικό χρόνο, ωστόσο το υψηλό κόστος που την χαρακτηρίζει καθώς και η απαίτηση για εξειδικευμένο προσωπικό καθιστούν την συγκεκριμένη μέθοδο από τις λιγότερο χρησιμοποιούμενες στην φαρμακοβιομηχανία.

Η Φασματοσκοπία Raman είναι μία μη καταστροφική μέθοδος για το δείγμα, για ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο που πραγματοποιείται σε πραγματικό χρόνο. Η Raman είναι μία φασματοσκοπία συντονισμού που βασίζεται στις σκεδάσεις Stokes-Anti Stokes. Η φασματοσκοπία Raman είναι ένα πολύτιμο εργαλείο PAT στην ανάπτυξη φαρμακευτικών προϊόντων. Εκτός του ότι ως μέθοδος είναι ευαίσθητη, ακριβής και μη επεμβατική, η φασματοσκοπία Raman είναι σχετικά πιο εύκολη στη λειτουργία, καθώς απαιτεί ελάχιστη εκπαίδευση, από τις παραδοσιακές αναλυτικές μεθόδους. Απαιτεί ελάχιστη προετοιμασία του δείγματος και μπορούν να αναλυθούν δείγματα εντός των υλικών συσκευασίας τους. Άλλα πλεονεκτήματα της φασματοσκοπίας Raman περιλαμβάνουν την καλή αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων, το μικρό μέγεθος του απαιτούμενου δείγματος και την ελάχιστη ευαισθησία έναντι παρεμβολών από το νερό. Ωστόσο, εμφανίζει ορισμένους περιορισμούς, καθώς είναι απαγορευτική από πλευράς κόστους για αναλύσεις ρουτίνας. Μια άλλη πρόκληση με τις μετρήσεις Raman είναι η παρεμβολή στα φάσματα από τον ενδογενή φθορισμό ή τον φθορισμό που προκαλείται από προσμίξεις. Ωστόσο, η μετατόπιση του μήκους κύματος στην περιοχή NIR μπορεί να ξεπεράσει αυτή την πρόκληση. Τέλος, είναι γνωστό ότι, όταν χρησιμοποιούνται υψηλότερες εντάσεις διέγερσης, παρατηρείται θερμική αποσύνθεση του δείγματος.

Η φασματοσκοπία NIR είναι μία μη καταστροφική μέθοδος για το δείγμα, που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της περιεκτικότητας σε υγρασία και την τρισδιάστατη χαρτογράφηση των συστατικών της σύνθεσης σε πραγματικό χρόνο. Βασίζεται στην μεταβολή ενεργειακής κατάστασης των μορίων εξαιτίας των δονήσεων. Είναι μία από τις κυριότερες τεχνικές ανάλυσης PAT μαζί με τη φασματοσκοπία Raman. Μεταξύ των

πλεονεκτημάτων που χαρακτηρίζουν την NIR είναι η αυτοματοποίηση της μεθόδου καθώς δεν απαιτεί προετοιμασία του δείγματος. Επιπλέον, οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται μπορούν σε μία ανάλυση να ανιχνεύσουν πολλά μήκη κύματος, ενώ αποτελεί και μία μέθοδο χαμηλού κόστους που μπορεί να ενσωματωθεί σε in-line διαδικασίες.

Η NIR δύναται να χρησιμοποιηθεί σε όλες τις διαδικασίες της παραγωγής των φαρμακευτικών προϊόντων καθώς μπορούν να ελέγχουν την συγκέντρωση και την πυκνότητα του φαρμάκου, την ομοιομορφία του φαρμάκου, την υγρασία επομένως και την σταθερότητα των φαρμακευτικών προϊόντων. Επιπλέον, μέσω της NIR το δείγμα δεν αλλοιώνεται και επομένως μπορεί να ενσωματωθεί σε μία συνεχή παραγωγή παρασκευής προϊόντος.

Οι προοπτικές ενσωμάτωσης των PAT στην βιομηχανική κλίμακα, και ειδικότερα της NIR και της φασματοσκοπίας Raman, έχει πολλές προοπτικές για το μέλλον και εμφανίζονται όλο και περισσότερες όσο αυξάνεται η τεχνολογία τους. Η εισαγωγή και η συνεχής εξέλιξη των αισθητήρων δύναται να εγκατασταθούν σε γραμμές παραγωγής ώστε να ελέγχεται όσο το δυνατόν καλύτερα όλη η διαδικασία της παραγωγής και να αποφεύγεται οποιοδήποτε σφάλμα, σε πραγματικό χρόνο καθώς υπάρχει η ανάγκη για πολυμεταβλητές αναλύσεις.

Εκτενής σύνοψη

Ο έλεγχος της ποιότητας των φαρμακευτικών προϊόντων αποτελεί ένα αναπόσπαστο κομμάτι της σύγχρονης φαρμακοβιομηχανίας, με καθοριστικό ρόλο να διαδραματίζουν οι Ορθές Παρασκευαστικές Πρακτικές (GMPs). Ειδικότερα, 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 των φαρμάκων/φαρμακευτικών προϊόντων.

Η ποιότητα, η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα των φαρμάκων πρέπει να ελέγχονται σε κάθε στάδιο της παραγωγής ενός φαρμακευτικού προϊόντος, με την κάθε φαρμακοτεχνική μορφή να περιλαμβάνει διαφορετικές προδιαγραφές και οδηγίες για όλη τη διαδικασία, οι οποίες ορίζονται από τις κατευθυντήριες οδηγίες για την ασφάλεια των φαρμάκων. Οι 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), συμμετέχουν στο Διεθνές Συμβούλιο για την Εναρμόνιση των Τεχνικών Απαιτήσεων για τα Φαρμακευτικά Προϊόντα Ανθρώπινης Χρήσης (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH). Το ICH αποτελεί ένα έργο που έχει συγκεντρώσει τις ρυθμιστικές αρχές φαρμάκων και αποτέλεσμα αυτού είναι η εφαρμογή ενός εκτεταμένου συνόλου κατευθυντήριων γραμμών, καθώς και η εναρμόνιση

των βασικών κριτηρίων για την έγκριση και τη χορήγηση άδειας κυκλοφορίας σε νέα φαρμακευτικά προϊόντα.

Η «διασφάλιση ποιότητας» αφορά 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.

Συγκεκριμένα, το σύστημα διασφάλισης ποιότητας που είναι κατάλληλο για την παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων θα πρέπει να διασφαλίζει ότι 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). Επιπλέον, θα πρέπει να προσδιορίζονται σαφώς οι διαδικασίες παραγωγής και ελέγχου, να καθορίζονται οι συνθήκες για την κατασκευή, την προμήθεια και τη χρήση των σωστών πρώτων υλών και των συσκευασιών και να διενεργούνται όλοι οι απαραίτητοι έλεγχοι στις πρώτες ύλες, στα ενδιάμεσα προϊόντα και στα τελικά προϊόντα. Τέλος, απαραίτητο βήμα για την διασφάλιση ποιότητα είναι να υπάρχουν εξουσιοδοτημένα άτομα που πιστοποιούν 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, καθώς και να επικυρώνουν ότι διενεργούνται τακτικές αξιολογήσεις της ποιότητας των φαρμακευτικών προϊόντων με στόχο την

επαλήθευση της συνέπειας της διαδικασίας και τη διασφάλιση της συνεχούς βελτίωσής της.

Ο κατασκευαστής πρέπει να αναλάβει την ευθύνη για την ποιότητα των φαρμακευτικών προϊόντων για να διασφαλίσει ότι είναι κατάλληλα για την προβλεπόμενη χρήση τους, ότι συμμορφώνονται με τις απαιτήσεις της άδειας κυκλοφορίας και δεν θέτει σε κίνδυνο τους ασθενείς λόγω ανεπαρκούς ασφάλειας, ποιότητας ή αποτελεσματικότητας. Η επίτευξη αυτού του ποιοτικού στόχου είναι ευθύνη της ανώτερης διοίκησης και απαιτεί τη συμμετοχή και τη δέσμευση του προσωπικού σε πολλά διαφορετικά τμήματα και σε όλα τα επίπεδα εντός της εταιρείας, των προμηθευτών της εταιρείας και των διανομέων. Για την αξιόπιστη επίτευξη του ποιοτικού στόχου πρέπει να υπάρχει ένα ολοκληρωμένα σχεδιασμένο και σωστά εφαρμοσμένο σύστημα διασφάλισης ποιότητας που να ενσωματώνει GMP και ποιοτικό έλεγχο, το οποίο θα πρέπει να τεκμηριώνεται πλήρως και να παρακολουθείται η αποτελεσματικότητά του. Όλα τα μέρη του συστήματος διασφάλισης ποιότητας θα πρέπει να είναι επαρκώς στελεχωμένα με ικανό προσωπικό και να διαθέτουν κατάλληλους και επαρκείς χώρους, εξοπλισμό και εγκαταστάσεις.

Κατά την ανάπτυξη ενός φαρμακευτικού προϊόντος, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες, απαραίτητο βήμα είναι η επικύρωση των χαρακτηριστικών ποιότητας μίας αναλυτικής μεθόδου όπως η γραμμικότητα, η πιστότητα, η ακρίβεια, η ανθεκτικότητα και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης. Η αξιολόγηση των σχετικών χαρακτηριστικών για κάθε μέθοδο, είναι απαραίτητο να πραγματοποιείται ακολουθώντας τις διεθνείς οδηγίες του Διεθνούς Συμβουλίου για την Εναρμόνιση των Τεχνικών Απαιτήσεων για Φάρμακα για Ανθρώπινη Χρήση [ICH Guidelines Q2(R1) και Q3B(R2)]. Ακολούθως αναλύονται οι

έλεγχοι που πραγματοποιούνται στα τελικά προϊόντα, μεταξύ των οποίων μελέτες ομοιομορφίας, διαλυτοποίησης και προσμίξεων.

Ειδικότερα, η ακρίβεια εκφράζει το βαθμό συμφωνίας της πειραματικής τιμής της παραμέτρου με την πραγματική τιμή (ή την τιμή αναφοράς). Η πιστότητα εκφράζει το βαθμό συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων πειραμάτων που έγιναν σε ένα συγκεκριμένο δείγμα πολλαπλές φορές και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, ενώ εξετάζονται τρεις παράμετροι, η επαναληψιμότητα (repeatability), η ενδιάμεση πιστότητα (intermediate precision) και η αναπαραγωγιμότητα (reproducibility). Η εκλεκτικότητα (selectivity), είναι η ικανότητα της μεθόδου να προσδιορίσει με ακρίβεια την προς μελέτη ουσία, ενώ η εξειδίκευση (specificity) μιας μεθόδου εξασφαλίζει ότι το σήμα προέρχεται μόνο από την ουσία που πρόκειται να προσδιορίσουμε και δεν υπάρχει αλληλεπίδραση με έκδοχα ή προϊόντα αποδόμησης και προσμίξεις. Τέλος, ως όριο ανίχνευσης (Detection limit, LOD) ορίζεται η χαμηλότερη ποσότητα μιας ουσίας που μπορεί να ανιχνευτεί σε ένα δείγμα, ενώ ως όριο ποσοτικοποίησης (Quantitation limit, LOQ) ορίζεται η χαμηλότερη ποσότητα μιας ένωσης που μπορεί να προσδιοριστεί αξιόπιστα.

Παράλληλα, έλεγχοι που πρέπει να πραγματοποιούνται στα φαρμακευτικά σκευάσματα είναι ο έλεγχος των ποιοτικών χαρακτηριστικών, όπως η σκληρότητα των δισκίων, ο έλεγχος ρυθμού αποδέσμευσης και διαλυτοποίησής τους και ο έλεγχος διάλυσης και καταθρυμματισμού (dissolution & disintegration test). Ειδικότερα, κατά τον έλεγχο της διαλυτοποίησης, (dissolution test) μελετάται ο ρυθμός διάλυσης της δραστικής ουσίας στερεών και από στόματος λαμβανόμενων φαρμάκων συνήθως, σε υγρό μέσο γνωστής σύστασης. Στην μελέτη του ρυθμού καταθρυμματισμού (disintegration test), εξετάζεται ο

χρόνος που χρειάζεται για να αποσαθρωθούν τα καψάκια και τα δισκία ενώ βρίσκονται σε συγκεκριμένο υγρό.

Επιπλέον των όσων προαναφέρθηκαν απαραίτητες αναλυτικές παράμετροι κατά την επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου είναι η καταλληλότητα του φίλτρου και η καταλληλότητα του συστήματος. Ειδικότερα, για την καταλληλότητα ενός φίλτρου που χρησιμοποιείται σε σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές, όταν η ανάλυση πραγματοποιείται με φασματοσκοπία (UV-vis) χρησιμοποιώντας μια χρωματογραφική μέθοδο, είτε HPLC είτε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (UPLC), απαιτείται το αποτέλεσμα από το φιλτραρισμένο διάλυμα θα πρέπει να είναι συγκρίσιμο με αυτό του μη φιλτραρισμένου διαλύματος. Η καταλληλότητα συστήματος δείχνει ότι το σύστημα λειτουργεί σωστά τη στιγμή της ανάλυσης. Για τις χρωματογραφικές μεθόδους, η καταλληλότητα του συστήματος θα πρέπει να περιλαμβάνει την επαναληψιμότητα της έγχυσης που εκφράζεται ως η σχετική τυπική απόκλιση (RSD) των δεδομένων που λαμβάνονται από πέντε ή έξι διαδοχικές εγχύσεις ενός τυπικού διαλύματος εργασίας, τον παράγοντα συμμετρίας (symmetry factor ή tailing factor), τον αριθμό των θεωρητικών πλακών (N), την διαχωριστική ικανότητα (R) και τον σχετικό χρόνο κατακράτησης (RRT). Επιπλέον, σε συγκεκριμένες περιπτώσεις μπορεί να απαιτούνται άλλες παράμετροι για τον έλεγχο της καταλληλότητας του συστήματος, όπως ο λόγος σήματος/θορύβου για την μελέτη των προσμίξεων.

Οι διεργασίες αναλυτικής τεχνολογίας (Process Analytical Technology, PAT), οι οποίες ορίζονται ως ένας μηχανισμός σχεδιασμού, ανάλυσης και ελέγχου των διεργασιών παραγωγής φαρμακευτικών προϊόντων μέσω της μέτρησης των κρίσιμων σημείων

ελέγχου (Critical Control Point, CCP) που επηρεάζουν τα κρίσιμα ποιοτικά χαρακτηριστικά (CQA), αποτελούν χρήσιμο εργαλείο το οποίο δύναται να εφαρμοστεί κατά την διάρκεια της παραγωγής, σε πραγματικό χρόνο. Η επιλογή των κατάλληλων μεθόδων βασίζεται αρχικά στη διαθεσιμότητα εργαστηριακού εξοπλισμού, στην ύπαρξη κατάλληλα καταρτισμένου επιστημονικού δυναμικού και το κόστος. Οι κυριότερες φασματοσκοπικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην PAT είναι η φασματοσκοπία υπέρυθρης ακτινοβολίας, η φασματοσκοπία Raman, η φασματοσκοπία Terahertz, η φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X (XRF) και σε ελάχιστες περιπτώσεις ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός, οι οποίες αποτελούν μη επεμβατικές και μη καταστρεπτικές τεχνικές.

Ειδικότερα, στην φασματοφωτομετρία NIR τα μόρια αλληλεπιδρούν με την ακτινοβολία για να παράγουν συγκεκριμένες φασματικές ζώνες. Αυτές οι ζώνες είναι επίσης πολύ ευαίσθητες και ανταποκρίνονται στα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά της αναλυόμενης ουσίας. Αυτές οι ιδιότητες καθιστούν την φασματοφωτομετρία εγγύς υπέρυθρου χρήσιμο εργαλείο για την αναλυτική διερεύνηση δειγμάτων με ιδιότητες υψηλής απορρόφησης ή/και σκέδασης, όπως τα στερεά. Στην φασματοσκοπία Raman οι δονήσεις προκύπτουν από το φαινόμενο Raman, με αποτέλεσμα τα φωτόνια να σκεδάζονται σε ενέργεια υψηλότερη ή χαμηλότερη και να μετατοπίζονται αντίστοιχα και μελετώνται οι μοριακές δονήσεις και οι περιστροφές. Το σήμα που προκύπτει από την μετατόπιση του φωτονίου είναι μοναδική για κάθε άτομο, ανάλογα με τον τρόπο δόνησης και την μεταβολή της πόλωσης προκύπτει και το φάσμα, το οποίο δίνει και ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες για το δείγμα που αναλύεται σε μοριακό επίπεδο.

Συγκεκριμένα, σύμφωνα με την παρούσα διπλωματική υπάρχει πληθώρα μελετών που εξετάζουν την εφαρμογή της φασματοσκοπίας NIR και Raman σε διαδικασίες όπως η ανάμειξη, η κοκκοποίηση, η ξήρανση, η επικάλυψη και η δισκιοποίηση. Τα αποτελέσματα των μελετών είναι πολλά υποσχόμενα, με τις διεργασίες αναλυτικής τεχνολογίας να προσφέρουν πληθώρα πλεονεκτημάτων όπως το μικρότερο κόστος και χρόνος, η μη απαίτηση εξειδικευμένου προσωπικού και κυρίως η αποφυγή σφαλμάτων σε πραγματικό χρόνο.

Βιβλιογραφία

1. 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
2. Lexicon of alcohol and drug terms. (1994). World Health Organisation: www.who.int/substance_abuse/terminology/who_ladt/en/
3. 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
4. FDA. Promoting Safe and Effective Drugs for 100Years. FDA Consumer Magazine. 2006.
5. 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
6. Patel KT, Chotai NP. Pharmaceutical GMP: past, present, and future--a review. *Pharmazie.* 2008 Apr;63(4):251-5. PMID: 18468382.
7. 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>

8. Higby, G. J. (2006). Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 21st Edition. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
9. 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>
10. USP 37, General Chapter ,1225. Validation of compendial methods.
11. International Conference on Harmonization, ICH Q3A(R2). Impurities in new drug substances; 2006.
12. International Conference on Harmonization, ICH Q3B(R2). Impurities in new drug products; 2006.
13. International Conference on Harmonization Q3C(R3). Impurities: guideline for residual solvents; 2005.
14. DONAUER, N., & LOBENBERG, R. (2007). *A mini review of scientific and pharmacopeial requirements for the disintegration test. International Journal of Pharmaceutics*, 345(1-2), 2–8. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.08.045
15. European Pharmacopoeia, (2021) 2.9.1. *Disintegration of tablets and capsules*, v.10.
16. Khan MA, Kumar S, Jayachandran J, Vartak SV, Bhartiya A, Sinha S. Validation of a stability indicating LC method for aminodarone HCl and related substances. *Chromatographia* 2005;61 (11/12):599_607.

17. US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry: analytical procedures and methods validation for drugs and biologics; July 2015.
18. US Food Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Reviewer guidance: validation of chromatographic methods; 1994
19. 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
20. USP 35, 1010. Analytical data-interpretation and treatment.
21. G. Shabir, (2004) *Step-by step Analytical methods validation and protocol in the quality system compliance industry*.
22. International Conference on Harmonization (ICH), Harmonized Tripartite Guideline (2006) *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*, 4η έκδοση, EMEA.
23. Skoog, D., Holler, J., & Crouch, S. (2007). *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης* (6η εκδ.).
24. 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.

25. V.S. Dave, H.I. Shahin, S.R. Youngren-Ortiz, M.B. Chougule, R.V. Haware, Emerging technologies for the non-invasive characterization of physical/mechanical properties of tablets, *Int. J. Pharm.* 532 (2017) 299–312.
26. A. Chanda, A.M. Daly, D.A. Foley, M.A. LaPack, S. Mukherjee, J.D. Orr, G.L. Reid III, D.R. Thompson, H.W. Ward, Industry perspectives on process analytical technology: Tools and applications in API development, *Org. Process Res. Dev.* 19 (2015) 63–83.
27. L.L. Simon, H. Pataki, G.r. Marosi, F. Meemken, K. Hungerbühler, A. Baiker, S. Tummala, B. Glennon, M. Kuentz, G. Steele, Assessment of recent process analytical technology (PAT) trends: A multi-author review, *Organic Process Research and Development* 19 (2015) 3-62
28. Henriques, J., Cardoso, C., & Vitorino, C. (2019). On demand for new process analytical technologies applied to injectable drug products. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104975. doi:10.1016/j.ejps.2019.104975
29. L. Zhong, L. Gao, L. Li, H. Zang, Trends-process analytical technology in solid oral dosage manufacturing, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 153 (2020) 187–199.
30. M. Fonteyne, J. Vercruyssen, F. De Leersnyder, B. Van Snick, C. Vervaet, J.P. Remon, T. De Beer, Process analytical technology for continuous manufacturing of solid-dosage forms, *Trends Analyt. Chem.* 67 (2015) 159–166.

31. A. Halenius, S. Lakio, O. Antikainen, J. Hatara, J. Yliruusi, Fast tablet tensile strength prediction based on non-invasive analytics, *AAPS PharmSciTech* 15 (2014) 781–791.
32. A. Orun, G. Smith, Micro-structural analysis of tablet surface layers by intelligent laser speckle classification (ILSC) technique: An application in the study of both surface defects and subsurface granule structures, *J. Pharm. Innov.* 12 (2017) 296–308.
33. D.M. Koller, G. Hanneschläger, M. Leitner, J. Khinast, Non-destructive analysis of tablet coatings with optical coherence tomography, *Eur. J. Pharm. Sci.* 44 (2011) 142–148.
34. H. Lin, Z. Zhang, D. Markl, J.A. Zeitler, Y. Shen, A review of the applications of OCT for analysing pharmaceutical film coatings, *Appl. Sci.* 8 (2018) 1–12.
35. E. Yost, P. Chalus, S. Zhang, S. Peter, A.S. Narang, Quantitative X-ray microcomputed tomography assessment of internal tablet defects, *J. Pharm. Sci.* 108 (2019) 1818–1830.
36. I. Sinka, S. Burch, J. Tweed, J. Cunningham, Measurement of density variations in tablets using X-ray computed tomography, *Int. J. Pharm.* 271 (2004) 215–224.
37. M.C. Madamba, W.M. Mullett, S. Debnath, E. Kwong, Characterization of tablet film coatings using a laser-induced breakdown spectroscopic technique, *AAPS PharmSciTech* 8 (2007) 184–190.

38. L. Zou, B. Kassim, J.P. Smith, J.D. Ormes, Y. Liu, Q. Tu, X. Bu, In situ analytical characterization and chemical imaging of tablet coatings using laser induced breakdown spectroscopy, *LIBS, Analyst* 143 (2018) 5000–5007.
39. A. Djemai, I. Sinka, NMR imaging of density distributions in tablets, *Int. J. Pharm.* 319 (2006) 55–62.
40. J. Ornik, D. Knoth, M. Koch, C.M. Keck, Terahertz-spectroscopy for nondestructive determination of crystallinity of L-tartaric acid in smartFilms_ and tablets made from paper, *Int. J. Pharm.* 119253 (2020).
41. R.K. May, K. Su, L. Han, S. Zhong, J.A. Elliott, L.F. Gladden, M. Evans, Y. Shen, J. A. Zeitler, Hardness and density distributions of pharmaceutical tablets measured by terahertz pulsed imaging, *J. Pharm. Sci.* 102 (2013) 2179–2186.
42. L. Ho, R. Müller, M. Römer, K. Gordon, J. Heinämäki, P. Kleinebudde, M. Pepper, T. Rades, Y. Shen, C. Strachan, Analysis of sustained-release tablet film coats using terahertz pulsed imaging, *J. Control. Release* 119 (2007) 253–261.
43. I.-S. Russe, D. Brock, K. Knop, P. Kleinebudde, J.A. Zeitler, Validation of terahertz coating thickness measurements using X-ray microtomography, *Mol. Pharm.* 9 (2012) 3551–3559
44. Nagy B, Farkas A, Borbás E, Vass P, Nagy ZK, Marosi G. Raman Spectroscopy for Process Analytical Technologies of Pharmaceutical Secondary Manufacturing. *AAPS PharmSciTech.* 2018 Dec 17;20(1):1. doi: 10.1208/s12249-018-1201-2. PMID: 30560395.

45. R. Takeshima, Y. Hattori, S. Managaki, M. Otsuka, Analysis of the dehydration process of caffeine using backscattering and transmission Raman spectroscopy, *Int. J. Pharm.* 530 (2017) 256–262.
46. J. Luybaert, D. Massart, Y. Vander Heyden, Near-infrared spectroscopy applications in pharmaceutical analysis, *Talanta* 72 (2007) 865–883.
47. C.K. Lai, A. Zahari, B. Miller, W.E. Katstra, M.J. Cima, C.L. Cooney, Nondestructive and on-line monitoring of tablets using light-induced fluorescence technology, *AAPS PharmSciTech* 5 (2004) 1–10.
48. N. O'Mahoney, J.J. Keating, S. McSweeney, S. Hill, S. Lawrence, D. Fitzpatrick, The sound of tablets during coating erosion, disintegration, deaggregation and dissolution, *Int. J. Pharm.* 119216 (2020).
49. Zeng, S.; Wang, L.; Chen, T.; Wang, Y.; Mo, H.; Qu, H. Direct analysis in real time mass spectrometry and multivariate data analysis: A novel approach to rapid identification of analytical markers for quality control of traditional Chinese medicine preparation. *Anal. Chim. Acta* 2012, 733, 38–47. [CrossRef] [PubMed]
50. Ganguly, A.; Stewart, J.; Rhoden, A.; Volny, M.; Saad, N. Mass spectrometry in freeze-drying: Motivations for using a bespoke PAT for laboratory and production environment. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2018, 127, 298–308. [CrossRef]
51. De Beer, T.; Allesø, M.; Goethals, F.; Coppens, A.; Vander Heyden, Y.; Lopez De Diego, H.; Rantanen, J.; Verpoort, F.; Vervaet, C.; Remon, J.P. Implementation of

- a process analytical technology system in a freeze-drying process using Raman spectroscopy for in-line process monitoring. *Anal. Chem.* 2007, 79, 7992–8003.
52. Loos Glenn, A. V. (2016). Quantitative mass spectrometry methods for pharmaceutical analysis. *Philosophical Transactions A*, 374(2079).
53. Antosz, F.J.; Xiang, Y.; Diaz, A.R.; Jensen, A.J. The use of total reflectance X-ray fluorescence (TXRF) for the determination of metals in the pharmaceutical industry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012, 62, 17–22.
54. Panchuk, V.; Yaroshenko, I.; Legin, A.; Semenov, V.; Kirsanov, D. Application of chemometric methods to XRF-data—A tutorial review. *Anal. Chim. Acta* 2018, 1040, 19–32.
55. Uo, M.; Wada, T.; Sugiyama, T. Applications of X-ray fluorescence analysis (XRF) to dental and medical specimens. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* 2015, 51, 2–9.
56. Challa, S., & Potumarthi, R. (2012). Chemometrics-Based Process Analytical Technology (PAT) Tools: Applications and Adaptation in Pharmaceutical and Biopharmaceutical Industries. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(1), 66–76. doi:10.1007/s12010-012-9950-y
57. Watson, D. S., Kerchner, K. R., Gant, S. S., Pedersen, J. W., Hamburger, J. B., Ortigosa, A. D., & Potgieter, T. I. (2015). At-line process analytical technology (PAT) for more efficient scale up of biopharmaceutical microfiltration unit operations. *Biotechnology Progress*, 32(1), 108–115. doi:10.1002/btpr.2193

58. Skibsted, E.; Boelens, H.; Westerhuis, J.; Witte, D.; Smilde, A. Simple assessment of homogeneity in pharmaceutical mixing processes using a near-infrared reflectance probe and control charts. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 41, 26–35.
59. Reich, G. Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005, 57, 1109–1143.
60. US Food and Drug Administration. Guidance for industry, PAT-A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing and Quality Assurance. 2004. Available online: <http://www.fda.gov/cder/guidance/published.html>
61. Davies, T. The history of near infrared spectroscopic analysis: Past, present and future “From sleeping technique to the morning star of spectroscopy”. *Analisis* 1998, 26, 17–19.
62. Shi, Z.; Cogdill, R.P.; Short, S.M.; Anderson, C.A. Process characterization of powder blending by near-infrared spectroscopy: Blend end-points and beyond. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, 47, 738–745.
63. Lee, M.-J.; Seo, D.-Y.; Lee, H.-E.; Wang, I.-C.; Kim, W.-S.; Jeong, M.-Y.; Choi, G.J. In line NIR quantification of film thickness on pharmaceutical pellets during a fluid bed coating process. *Int. J. Pharm.* 2011, 403, 66–72.
64. Sun, C.C. Dependence of ejection force on tableting speed—A compaction simulation study. *Powder Technol.* 2015, 279, 123–126.

65. Lourenço, V.; Lochmann, D.; Reich, G.; Menezes, J.C.; Herdling, T.; Schewitz, J. A quality by design study applied to an industrial pharmaceutical fluid bed granulation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2012, 81, 438–447. [
66. Augsburger, L.L.; Vuppala, M.K. Theory of granulation. In *Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology*; Marcel Dekker: New York, NY, USA, 1997; pp. 7–24.
67. Iveson, S.M.; Litster, J.D.; Hapgood, K.; Ennis, B.J. Nucleation, growth and breakage phenomena in agitated wet granulation processes: A review. *Powder Technol.* 2001, 117, 3–39.
68. Kleinebudde, P. Roll compaction/dry granulation: Pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004, 58, 317–326.
69. Reddy, J.P.; Jones, J.W.; Wray, P.S.; Dennis, A.B.; Brown, J.; Timmins, P. Monitoring of multiple solvent induced form changes during high shear wet granulation and drying processes using online Raman spectroscopy. *Int. J. Pharm.* 2018, 541, 253–260.
70. Shikata, F.; Kimura, S.; Hattori, Y.; Otsuka, M. Real-time monitoring of granule properties during high shear wet granulation by near-infrared spectroscopy with a chemometrics approach. *RSC Adv.* 2017, 7, 38307–38317.
71. Hansuld, E.M.; Briens, L.; Sayani, A.; McCann, J.A. The effect of process parameters on audible acoustic emissions from high-shear granulation. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2013, 39, 331–341.

72. Ganguly, A.; Stewart, J.; Rhoden, A.; Volny, M.; Saad, N. Mass spectrometry in freeze-drying: Motivations for using a bespoke PAT for laboratory and production environment. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2018, 127, 298–308.
73. Roggo, Y.; Pauli, V.; Jelsch, M.; Pellegatti, L.; Elbaz, F.; Ensslin, S.; Kleinebudde, P.; Krumme, M. Continuous manufacturing process monitoring of pharmaceutical solid dosage form: A case study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2020, 179, 112971
74. Rantanen, J.; Räsänen, E.; Antikainen, O.; Mannermaa, J.-P.; Yliruusi, J. In-line moisture measurement during granulation with a four-wavelength near-infrared sensor: An evaluation of process-related variables and a development of non-linear calibration model. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2001, 56, 51–58.
75. Peters, J.; Teske, A.; Taute, W.; Döscher, C.; Höft, M.; Knöchel, R.; Breitzkreutz, J. Real-time process monitoring in a semi-continuous fluid-bed dryer–microwave resonance technology versus near-infrared spectroscopy. *Int. J. Pharm.* 2018, 537, 193–201.
76. Knop, K.; Kleinebudde, P. PAT-tools for process control in pharmaceutical film coating applications. *Int. J. Pharm.* 2013, 457, 527–536.
77. Wirges, M.; Funke, A.; Serno, P.; Knop, K.; Kleinebudde, P. Development and in-line validation of a Process Analytical Technology to facilitate the scale up of coating processes. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2013, 78, 57–64.
78. De Beer, T.; Allesø, M.; Goethals, F.; Coppens, A.; Vander Heyden, Y.; Lopez De Diego, H.; Rantanen, J.; Verpoort, F.; Vervaet, C.; Remon, J.P. Implementation of

- a process analytical technology system in a freeze-drying process using Raman spectroscopy for in-line process monitoring. *Anal. Chem.* 2007, 79, 7992–8003.
79. Peng, T.; Huang, Y.; Mei, L.; Wu, L.; Chen, L.; Pan, X.; Wu, C. Study progression in application of process analytical technologies on film coating. *Asian J. Pharm. Sci.* 2015, 10, 176–185.
80. El Hagrasy, A.S.; Chang, S.-Y.; Desai, D.; Kiang, S. Raman spectroscopy for the determination of coating uniformity of tablets: Assessment of product quality and coating pan mixing efficiency during scale-up. *J. Pharm. Innov.* 2006, 1, 37–42.
81. Ho, L.; Müller, R.; Gordon, K.C.; Kleinebudde, P.; Pepper, M.; Rades, T.; Shen, Y.; Taday, P.F.; Zeitler, J.A. Applications of terahertz pulsed imaging to sustained-release tablet film coating quality assessment and dissolution performance. *J. Controll. Release* 2008, 127, 79–87.
82. Dalvi, H.; Langlet, A.; Colbert, M.-J.; Cournoyer, A.; Guay, J.-M.; Abatzoglou, N.; Gosselin, R. In-line monitoring of Ibuprofen during and after tablet compression using near-infrared spectroscopy. *Talanta* 2019, 195, 87–96.
83. Wahl, P.R.; Fruhmann, G.; Sacher, S.; Straka, G.; Sowinski, S.; Khinast, J.G. PAT for tableting: Inline monitoring of API and excipients via NIR spectroscopy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2014, 87, 271–278.
84. Li, Y.; Anderson, C.A.; Drennen, J.K., III; Airiau, C.; Igne, B. Method development and validation of an inline process analytical technology method for blend

monitoring in the tablet feed frame using Raman spectroscopy. *Anal. Chem.* 2018, 90, 8436–8444.