



DIPARTIMENTO DI FARMACIA
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE

SVILUPPO E CONVALIDA DI UN METODO HPLC
PER LA DETERMINAZIONE DI PROCLORPERAZINA BASE
E CLEANING VALIDATION

CANDIDATO:

Alessandro Signorini

RELATORI:

Prof.ssa Sabrina Taliani

Dott. Giuseppe Ceramelli
Operations Manager
Life Science Services
presso SGS Sertec S.r.l.

ANNO ACCADEMICO 2014/2015

INDICE

1. INTRODUZIONE	5
2. CLEANING VALIDATION.....	6
2.1. DEFINIZIONE	6
2.2. NORMATIVA	8
2.3. PERMITTED DAILY EXPOSURE (PDE).....	11
3. CONVALIDA DI PROCEDURE ANALITICHE	13
3.1. DEFINIZIONE	13
3.2. NORMATIVA	14
3.3. SPECIFICITÀ	16
3.4. LINEARITÀ	19
3.5. RANGE	20
3.6. ACCURATEZZA	21
3.7. PRECISIONE.....	22
3.8. DETECTION LIMIT (LOD).....	23
3.9. QUANTIFICATION LIMIT (LOQ)	25
3.10. ROBUSTEZZA.....	27
4. HPLC	28
4.1. INFORMAZIONI GENERALI	28
4.2. COMPONENTI	29
4.3. PARAMETRI CROMATOGRAFICI	32
4.4. FUNZIONAMENTO.....	36
4.5. STRUMENTAZIONE	37
5. SVILUPPO E CONVALIDA METODO DI ANALISI	39
5.1. SCOPO.....	39
5.2. SPECIFICITÀ	44
5.3. LOD E LOQ	47
5.4. LINEARITÀ	50
5.5. ACCURATEZZA/RECUPERO	55
5.6. PRECISIONE.....	59
5.7. RANGE	61

5.8. STABILITÀ	62
5.9. ROBUSTEZZA.....	64
6. CONCLUSIONI	69
BIBLIOGRAFIA	71

Glossario

ICH : INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION

GMP : GOOD MANUFACTURING PRACTICE

LOAEL : LOWEST OBSERVED ADVERSE EFFECT LEVEL

PDE : PERMITTED DAILY EXPOSURE

HPLC : HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

SST : SYSTEM SUITABILITY TEST

LSS : LIFE SCIENCE SERVICES

QA : QUALITY ASSURANCE

CAPA: CORRECTIVE ACTIONS AND PREVECTIVE ACTIONS

LC : LIQUID CHROMATOGRAPHY

USP : UNITED STATES PHARMACOPEIA

FDA : FOOD AND DRUG ADMINISTRATION

EMA : EUROPEAN MEDICINES AGENCY

1. INTRODUZIONE

Il presente lavoro di tesi è stato svolto all'interno del laboratorio Life Science Services di SGS Sertec.

Per quanto riguarda l'accesso al laboratorio, essendo questo autorizzato per l'immissione in commercio di medicinali da parte dell'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA), vi si applicano le norme di buona produzione (Good Manufacturing Practices, GMP) e le connesse rigidità per l'organizzazione del lavoro.

Per le attività di laboratorio significa operare secondo procedure operative standard (SOP), concordate e supervisionate dall'Assicurazione Qualità (Quality Assurance, QA).

Tutte le deviazioni, pianificate e non, dalle procedure devono essere documentate ed investigate e relative azioni correttive e preventive (CAPA) devono essere aggiunte per evitare il ripetersi di tali deviazioni.

Nel presente lavoro, si intende sviluppare e convalidare, un metodo per la determinazione, tramite tecnica HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), dell'eventuale residuo di Proclorperazina Maleato dopo le attività di pulizia delle attrezzature dedicate alla produzione farmaceutica.

Da principio sarà eseguito lo sviluppo e la convalida del metodo di analisi e successivamente si condurranno opportuni studi di recupero (*recovery*).



Figura 1. Sede SGS Sertec.

2. CLEANING VALIDATION

2.1. Definizione

La *cleaning validation* nell'ambito della produzione di principi attivi farmaceutici può essere definita come il processo che fornisce prove documentate relative all'efficacia dei metodi di pulizia impiegati all'interno di un impianto [2].

La convalida delle attività di pulizia deve dimostrare l'efficacia di una determinata procedura operativa ad ottenere un'idonea pulizia, ovvero fino a che non si raggiunge un residuo di prodotto inferiore ai livelli predeterminati.

Durante la produzione di specialità medicinali si può verificare contaminazione accidentale dovuta ad incontrollato rilascio di polvere, gas, vapore, o microorganismi di sostanze attive, altri materiali di produzione, così come da residui di attrezzature, e dall'abbigliamento degli operatori [3].

Quando differenti medicinali sono prodotti in impianti condivisi, la potenziale contaminazione non assicura alcun beneficio al paziente, ma bensì potrebbe esporlo ad un rischio.

Il rischio è definito come il prodotto fra la probabilità che si verifichi un evento ed il danno dell'evento stesso [9]. Spesso, nell'ambito sicurezza sul lavoro, sentiamo parlare di come si possa eliminare in modo completo il rischio di infortuni ed incidenti per i lavoratori ma ciò è una visione utopistica, in quanto non esiste il «rischio zero». Possiamo agire riducendo la probabilità che un evento si verifichi, facendo una corretta prevenzione (ad esempio, formazione su sicurezza nei luoghi di lavoro), oppure possiamo ridurre l'effetto di un danno, lavorando con idonea protezione (ad esempio, lavorando con dispositivi di protezione individuale, DPI). Quando effettuiamo una corretta pulizia facciamo prevenzione, e questa procedura riduce il rischio.

I metodi analitici impiegati dovranno avere elevata sensibilità e limiti di quantificazione adeguati per un'accurata determinazione del residuo.

Tramite un'idonea modalità di campionamento si potrà garantire un recupero dell'analita riproducibile e rappresentativo della reale quantità presente sulla superficie. Gli studi di *recovery* su superfici campione saranno poi parte integrante

della convalida del metodo, che sarà condotta secondo le modalità descritte dalla linea guida ICH Q2(R1).

2.2. Normativa

È appropriato iniziare con il dare una breve introduzione su come il concetto di *cleaning validation* dovrebbe essere accolto da un impianto farmaceutico.

Vecchi standard di pulizia frequentemente applicati e accettati, ma privi di fondamento scientifico, si basavano su:

- pulizia visiva
- presenza di non più di 10 ppm di ogni prodotto
- presenza di non più di 1/1000 della dose terapeutica di ogni prodotto

Attualmente le cose sono cambiate, tali parametri non sono più adeguati e l'agenzia europea dei medicinali (EMA) pretende che i limiti siano scientificamente giustificati [3]. L'approccio delineato dalle linee guida dell'EMA è di utilizzare un valore soglia, *permitted daily exposure* (PDE), derivato da una valutazione rigorosa costituita da tutti i dati farmacologici e tossicologici disponibili, sia non clinici che clinici.

Il livello di pulizia e la convalida richiesta per i processi di produzione dei principi attivi farmaceutici dipende in gran parte dal tipo di attrezzatura usata (dedicata o meno), dallo stadio della produzione (iniziale, intermedio, finale) e dalla natura dei potenziali contaminanti (tossicità, solubilità, etc).

A seconda delle esigenze di produzione le procedure di pulizia per uno stesso prodotto possono essere differenti; avremo procedure diverse se cambiamo lotto di produzione o se cambiamo prodotto.

La presenza di contaminanti deve essere gestita correlando il rischio ai livelli che possono essere considerati sicuri per tutte le persone. Per questo scopo dovrebbero essere usati limiti sanitari, derivanti da un valore soglia, per identificare i rischi.

Una varietà di approcci possono essere presi in considerazione per stabilire i limiti, tenendo conto dei dati farmacologici e tossicologici disponibili in letteratura.

Lo scopo è garantire la sicurezza dei pazienti umani e degli animali bersaglio esposti a sostanze attive residue attraverso i medicinali, nonché i consumatori potenzialmente esposti a sostanze attive residue presenti in alimenti di origine

animale in seguito al trattamento degli animali da produzione alimentare con prodotti medicinali veterinari in cui sono presenti sostanze attive residue.

Un valido approccio alla gestione del rischio fornisce un mezzo utile per identificare e controllare i problemi di qualità, e può assicurare al paziente una più elevata qualità e sicurezza del medicinale prodotto. Fornisce agli enti regolatori una maggiore assicurazione che l'azienda produttrice sia in grado di gestire rischi potenziali, andando così a velocizzare gli aspetti regolativi.

La FDA stabilisce che devono essere scritte procedure operative standard (SOP), nelle quali vengono spiegati dettagliatamente i processi di pulizia usati per le varie parti delle attrezzature [12].

Per gli impianti produttivi di principi attivi farmaceutici è consigliabile redigere un protocollo ufficiale di *cleaning validation*. Questo protocollo dovrebbe servire a fornire una linea guida generale per la direzione del personale aziendale, per le autorità e per i clienti su come l'azienda si occupi di *cleaning validation*. Le responsabilità specifiche di reparto dovrebbero essere delineate dall'Assicurazione di Qualità (*Quality Assurance, QA*) ed approvate da parte della direzione.

Uno studio di *cleaning validation* comprende i seguenti elementi:

- istituzione dei criteri di accettazione (*permitted daily exposure, PDE*)
- procedura di *cleaning* (caratterizzazione attrezzature, caratterizzazione prodotti, determinazione e caratterizzazione agenti di pulizia)
- metodo analitico e sua convalida
- campionamento e convalida dello stesso (swab e/o risciacquo)
- protocollo di convalida
- report di convalida

Il protocollo dovrebbe incorporare i seguenti punti:

- determinazione delle condizioni impiegate durante la convalida
- politica aziendale sulla convalida delle procedure di pulizia relative alle attrezzature e ai processi
- politica di validazione analitica
- politica di accettazione dei criteri

- politica rinnovo convalida

2.3. Permitted Daily Exposure (PDE)

La relazione dose effetto era già nota ai tempi di Paracelso: «Dosi facit venenum»; ogni sostanza è veleno, la dose decide se una sostanza non è veleno.

La gestione del rischio deriva dalla valutazione della pericolosità, stabilendo valori limite sulla base dei dati degli studi e dell'esposizione.

La determinazione dei limiti di esposizione per la salute rispetto a una sostanza attiva residua si fonda sul metodo per stabilire la cosiddetta esposizione giornaliera ammessa (PDE).

La PDE rappresenta una dose sostanza specifica che è improbabile causa di effetti avversi in un individuo esposto a tale o minore dose ogni giorno della sua vita [3].

La determinazione di una PDE comporta:

- l'identificazione del pericolo esaminando tutti i dati rilevanti
- l'identificazione degli effetti critici
- la determinazione del livello senza visibili effetti avversi (*no observed adverse effect level*, NOEL) sulla base dei risultati che sono considerati essere effetti critici
- l'uso di diversi fattori di aggiustamento per tenere conto di varie incertezze

$$PDE = \frac{NOAEL \times \text{correzione per peso corporeo}}{F1 \times F2 \times F3 \times F4 \times F5}$$

dove:

F1 = differenze animale/uomo

F2 = variabilità uomo/uomo

F3 = lunghezza dello studio

F4 = severità dell'effetto

F5 = correzione per la dose riferimento

In relazione alla costituzione dei limiti di esposizione per la salute che possono essere accettati per medicinali veterinari, potrebbe essere possibile usare l'approccio PDE per stabilire differenti limiti per le differenti specie bersaglio; ma ciò non è molto pratico.

Di conseguenza, si ritiene pragmatico che PDE dovrebbe essere derivata assumendo l'esposizione umana. Il livello di contaminazione che può essere accettato è poi calcolato dal PDE umano anche quando il prodotto è un medicinale veterinario.

L'identificazione del pericolo è una valutazione qualitativa della proprietà intrinseca di una sostanza di produrre effetti negativi; deve essere eseguita una revisione di tutti i dati disponibili relativi agli animali ed agli uomini. I dati dovrebbero includere i dati farmacodinamici non clinici, studi di tossicità, studi di carcinogenicità, studi di genotossicità in vitro e in vivo, studi di riproduzione e sviluppata tossicità così come dati clinici (effetti terapeutici ed avversi).

La disponibilità dei dati per un principio attivo dipende dallo stadio di sviluppo e dall'indicazione.

Gli effetti critici dovrebbero includere gli indicatori più sensibili di effetti avversi visti in studi di tossicità pre-clinici, a meno che non ci sia chiara evidenza (ad esempio studi farmacodinamici) che tali risultati non siano rilevanti per l'uomo.

Il valore NOEL basato su effetti clinici farmacodinamici corrisponde alla più alta dose testata che è considerata terapeuticamente inefficace.

La PDE è derivata dalla divisione della NOEL con i vari fattori di aggiustamento per tenere conto di varie incertezze e per permettere l'estrapolazione di un livello senza effetto affidabile e robusto nell'uomo e nel bersaglio animale.

3. CONVALIDA DI PROCEDURE ANALITICHE

3.1. Definizione

La convalida è un'azione consistente nel provare, conformemente alle norme di buona fabbricazione, che una procedura, un determinato processo, un'attrezzatura, un materiale, un'attività o un sistema producono effettivamente i risultati specificati [7].

Le attività di convalida in ambito farmaceutico includono diversi aspetti:

- Convalida di operazioni di supporto e controllo: esempi sono la qualificazione di impianti, macchine, servizi, convalida di metodi analitici;
- Convalida di processi di produzione specifici per un prodotto: si differenzia dal gruppo precedente perché prevede variabili di processo (ad esempio miscele, granulazioni);
- Convalida basata su lotti di produzione: attività associata a nuovi prodotti, metodi di produzione o servizi; è anche chiamata convalida su tre lotti che non dovrebbero essere immessi sul mercato prima che tutte le attività inerenti la convalida non siano state espletate.

L'obiettivo della convalida di un metodo è dimostrare l'adeguatezza della procedura in esame e fornire dati utili per la verifica del rispetto dei parametri di qualità.

Le procedure analitiche standardizzate, come quelle presenti in Farmacopea, non devono essere validate, mentre per quelle sviluppate ed ottimizzate "ad hoc" per una particolare molecola è richiesta la convalida, come verifica della effettiva capacità del laboratorio di applicare il metodo in oggetto.

3.2. Normativa

In accordo con le linee guida ICH Q2(R1) “Current Step 4 version” (*International Conference on Harmonisation of Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*), che definiscono le procedure e i criteri d'accettazione per la qualità dei prodotti farmaceutici e i metodi atti alla determinazione delle impurezze, il produttore in fase di registrazione deve procedere secondo norme estremamente restrittive.

La discussione sulla convalida delle procedure analitiche è indirizzata alle quattro più comuni tipologie di procedure analitiche:

- test identificativi
- test quantitativi per contenuto impurità
- test limite per controllo impurità
- saggi di composti attivi presenti nei campioni di farmaco o prodotti di degradazione o altri componenti selezionati nel farmaco prodotto

I test identificativi assicurano l'identità di un'analita nel campione. Viene di solito ricercata dal confronto delle proprietà del campione (spettro, comportamento cromatografico, reattività chimica) con uno standard di riferimento.

I test per le impurità possono essere test quantitativi o test limite per le impurità presenti nel campione. Ogni test deve mirare a riflettere la purezza caratteristica del campione.

I saggi sono destinati a misurare l'analita presente nel campione; rappresentano una misura quantitativa per il componente principale.

In tabella 1 sono elencate le caratteristiche di convalida considerate come le più importanti per le differenti procedure analitiche [1].

Queste si considerano tipiche per le procedure analitiche citate, mentre occasionali eccezioni devono essere valutate caso per caso.

La robustezza non è inserita in tabella ma si considera un passaggio fondamentale per lo sviluppo del metodo analitico.

Tipo di procedura analitica	Test identificativi	Test per le impurità		Saggi
caratteristiche		quantitat.	limite	
Accuratezza	-	+	-	+
Precisione				
Ripetibilità	-	+	-	+
Precisione intermedia	-	+(1)	-	+(1)
Specificità (2)	+	+	+	+
Limite rilevabilità	-	-(3)	+	-
Limite quantificazione	-	+	-	-
Linearità	-	+	-	+
Range	-	+	-	+

Tabella 1. Caratteristiche convalida per differenti procedure analitiche

- significa che questa caratteristica non è normalmente valutata
- + significa che questa caratteristica è normalmente valutata
- (1) nei casi in cui la riproducibilità è stata eseguita, la precisione intermedia non è necessaria
- (2) la mancanza di specificità di una procedura analitica può essere compensata dal supporto di un'altra procedura analitica
- (3) può essere necessaria in alcuni casi

3.3. Specificità

La specificità è l'abilità di riconoscere inequivocabilmente l'analita in presenza di componenti che potrebbero essere presenti, come impurità, degradanti, matrice.

Una ricerca della specificità deve essere condotta durante la convalida dei test di identificazione, la determinazione delle impurità e dei saggi.

Le procedure usate per dimostrare la specificità dipenderanno dall'obiettivo stabilito della procedura analitica.

Adatti saggi di identificazione devono essere capaci di discriminare fra composti di simile struttura che siano probabilmente presenti. La discriminazione di una procedura può essere confermata dall'ottenimento di risultati positivi da campioni contenenti l'analita, accoppiati a risultati negativi per campioni privi di analita.

In aggiunta, i test di identificazione possono essere applicati a materie strutturalmente simili o strettamente correlate all'analita per confermare che non si ottenga un risultato positivo.

Per le procedure cromatografiche, cromatogrammi rappresentativi devono essere usati per dimostrare la specificità e i singoli componenti devono essere adeguatamente classificati.

La specificità può essere dimostrata dalla risoluzione di due componenti che eluiscono in tempi di ritenzione vicini.

Per i saggi con impurità libere, si deve dimostrare la discriminazione dell'analita in presenza di impurità e/o eccipienti; nella pratica è possibile fare ciò grazie a *spiking* di sostanza pura con appropriati livelli di impurità e/o eccipienti e dimostrare che il risultato del saggio non è influenzato dalla presenza di questi materiali (si confrontano con i risultati di saggi su campioni *unspiked*).

La tecnica di *spiking* consiste nell'aggiungere una quantità nota di sostanza di riferimento alla matrice del campione, al fine di confermare l'identità di uno dei picchi componenti il campione [8].

Il materiale di riferimento è *spiked* alla stessa concentrazione del campione: se uno dei picchi nel cromatogramma diventa più grande, potrebbe essere presente nel campione analizzato. Se invece compare un nuovo picco, oppure se abbiamo

una deformazione sul picco del campione, molto inverosimilmente sarà presente materiale di riferimento nel nostro campione.

Una metodica chiara per attribuire un picco in un cromatogramma di soluzione campione è iniettare soluzioni standard nelle identiche condizioni analitiche.

Dal confronto dei fattori di ritenzione (k) e della risposta del picco nel cromatogramma della soluzione standard con il cromatogramma del campione, è possibile tentare di attribuire i picchi. È importante che la concentrazione della soluzione standard sia abbinata il più possibile alla soluzione campione. Questo evita l'assegnazione sbagliata del picco a causa degli effetti di forma del picco.

Per un più rigoroso abbinamento del picco è importante eseguire l'analisi in condizioni differenti; usando una colonna e una fase mobile differente e comparando il fattore di ritenzione e la risposta. Se è presente ancora un abbinamento, aumenta la fiducia nell'identificazione del picco.

Se invece le impurità non sono libere, la specificità può essere dimostrata dal confronto dei risultati di test su campioni contenenti impurità o prodotti di degradazione per una seconda procedura ben caratterizzata (ad esempio un metodo riportato in farmacopea o una procedura analitica convalidata).

Il test per la purezza del picco può essere utile per mostrare che il picco cromatografico dell'analita non sia attribuibile a più di un componente.

La purezza del picco può essere stabilita prendendo in considerazione il rapporto di due segnali (lunghezza d'onda) da un lato all'altro del picco di interesse.

Se il picco è puro, il rapporto dei due segnali sarà costante da un lato all'altro del picco. Invece se è impuro, il rapporto fra i due segnali cambierà da un lato all'altro del picco come differenze spettrali causate dal picco di interferenza.

Se il campione è completamente sconosciuto bisogna tentare di caratterizzarlo.

Può essere necessario impiegare rivelatori che possono essere utilizzati per facilitare l'identificazione, come la spettrometria di massa.

Può anche essere necessario raccogliere la frazione eluente contenente il picco di interesse per la caratterizzazione utilizzando la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR).

3.4. Linearità

La linearità di una procedura analitica è l'abilità, all'interno di un range stabilito, di ottenere risultati direttamente proporzionali alla concentrazione dell'analita presente nel campione.

Deve essere dimostrata direttamente sul principio attivo (tramite diluizioni della soluzione standard) e/o pesate separate di miscele sintetiche del principio attivo, utilizzando la procedura proposta.

L'ultimo aspetto può essere studiato durante l'investigazione del range.

La linearità deve essere valutata dall'ispezione visiva di un gruppo di segnali rappresentativi della concentrazione o del contenuto dell'analita. Se è presente una relazione lineare, i risultati del test devono essere valutati da un appropriato metodo statistico, come ad esempio il calcolo di regressione lineare con il metodo dei minimi quadrati. In alcuni casi, per ottenere la linearità fra le concentrazioni del saggio e del campione, i dati del test devono essere soggetti di una trasformazione matematica prima dell'analisi di regressione.

I dati della regressione lineare stessa possono essere utili per fornire una stima matematica del grado di linearità. Devono essere presentati il coefficiente di correlazione, l'intercetta sull'asse y, la curva di regressione lineare e la somma residua dei quadrati.

Inoltre un'analisi della deviazione degli attuali punti dalla linea di regressione può essere utile per valutare la linearità. Per stabilire la linearità, è raccomandato un minimo di cinque concentrazioni; altri approcci devono essere giustificati.

3.5. Range

Il range di una procedura analitica è l'intervallo, fra la maggiore e la minore concentrazione di analita presente nel campione, nel quale sia stato dimostrato un adatto livello di precisione, accuratezza e linearità.

Il range normalmente è derivato dagli studi di linearità.

I seguenti minimi specifici ranges devono essere considerati:

- per i saggi di un principio attivo o di un prodotto finito: normalmente dall'80% al 100% della concentrazione del test;
- per l'uniformità dei contenuti è giustificato coprire da un minimo di 70% fino a 130% della concentrazione del test, a meno di un più ampio e più appropriato range, basato sulla natura della forma di dosaggio;
- per il test di dissoluzione: +/- 20% al di sopra del range specifico;
- per la determinazione di un'impurità: dal livello riportato dell'impurità fino al 120% dello specificato;
- per impurità note per essere inusualmente potenti o per produrre effetti tossici e farmacologici inaspettati, il limite di rilevabilità/quantificazione deve essere commisurato con il livello nel quale le impurità devono essere controllate;
- se il saggio e la purezza sono eseguiti insieme come un unico test e solo lo standard 100% è usato, la linearità deve coprire il range dal livello riportato delle impurità fino al 120% della specifica del saggio.

3.6. Accuratezza

L'accuratezza è la capacità del metodo analitico di ottenere valori prossimi al valore reale su campioni a concentrazione nota di analita.

Deve essere stabilita nello specifico range della procedura analitica.

Sono disponibili alcuni metodi per la determinazione dell'accuratezza:

- applicazione di una procedura analitica per un analita di purezza nota (materiale di riferimento);
- comparazione fra i risultati della procedura analitica proposta e quelli di una seconda procedura ben caratterizzata, per la quale sia stabilita e/o definita l'accuratezza;
- può essere dedotta una volta che sono stabilite precisione, linearità e specificità.

L'accuratezza deve essere valutata su spike di campioni con ammontare noto di impurità.

Nei casi in cui non sia possibile ottenere campioni di impurità nota e/o prodotti di degradazione, è considerato accettabile confrontare i risultati ottenuti con una procedura indipendente.

Deve essere chiaro in che modo è determinata l'impurità (per esempio p/p % o area %), in ogni caso in considerazione dell'analita presente in contenuto maggiore.

L'accuratezza deve essere valutata usando un minimo di 9 determinazioni su un minimo di 3 livelli di concentrazione all'interno del range specificato (ad esempio 3 concentrazioni/3 repliche ognuna).

L'accuratezza deve essere riportata come percentuale di recupero dal saggio di un ammontare noto di analita aggiunto nel campione oppure come differenza fra il valore intermedio e quello vero accettato con insieme gli intervalli di confidenza.

3.7. Precisione

La precisione di una procedura analitica esprime la vicinanza dei risultati fra una serie di misure ottenute da campionamenti multipli dello stesso campione omogeneo sotto le medesime condizioni.

La precisione può essere considerata a tre livelli: ripetibilità, precisione intermedia e riproducibilità.

Viene espressa in una procedura analitica come varianza, deviazione standard o coefficiente di variazione di una serie di misure.

La ripetibilità esprime la precisione sotto le stesse condizioni operative in un piccolo intervallo di tempo. Deve essere valutata usando un minimo di 9 determinazioni incluse nel range specifico della procedura (ad esempio 3 concentrazioni/3 repliche ognuna) oppure un minimo di 6 determinazioni al 100% della concentrazione del test.

La precisione intermedia esprime le variazioni intra-laboratorio: giorni differenti, analisti differenti, materiale differente. Non è considerato necessario studiare questi effetti singolarmente. La misura in cui deve essere stabilita dipende dalle condizioni sotto le quali la procedura è destinata ad essere usata. L'analista deve stabilire gli effetti di eventi casuali sulla precisione della procedura analitica.

La riproducibilità esprime la precisione inter-laboratorio, ovvero fra laboratori diversi. Deve essere considerata per standardizzare una procedura analitica, ad esempio, per l'inclusione nelle procedure presenti nelle Farmacopee. Tali dati non fanno parte del dossier per l'immissione in commercio.

Deviazione standard, deviazione standard relativa (coefficiente di variazione) e intervallo di confidenza devono essere riportate per ogni tipo di precisione investigata.

3.8. Detection Limit (LoD)

Il limite di rivelazione di una procedura analitica è la più piccola quantità di analita nel campione che può essere rivelata, ma non necessariamente quantificata con un valore esatto.

Sono possibili diversi approcci per la determinazione di tale limite, a seconda che la procedura sia strumentale o meno.

La valutazione visiva può essere usata per metodi non strumentali, ma può essere usata anche per metodi strumentali.

Il limite di rivelazione è determinato tramite analisi dei campioni con concentrazioni note di analita ed istituzione del livello minimo al quale l'analita può essere rivelato in modo accettabile.

L'approccio basato sul rapporto segnale-rumore può essere applicato solo alle procedure analitiche che mostrano una linea base di rumore.

La determinazione del rapporto segnale rumore è eseguita confrontando i segnali misurati dai campioni a concentrazioni note basse dell'analita con campioni di bianco ed istituendo la concentrazione minima alla quale l'analita può essere rivelato in modo accettabile.

Un rapporto segnale rumore tra 3 oppure 2:1 è generalmente considerato accettabile per la stima del limite di rivelazione.

Un ulteriore approccio è quello basato sulla deviazione standard di risposta e sulla pendenza della curva di calibrazione.

Il limite di rilevazione (LoD) può essere espresso come:

$$LoD = \frac{3.3 \sigma}{S} \quad \left\{ \begin{array}{l} \sigma = \text{deviazione standard della risposta} \\ S = \text{pendenza della curva di calibrazione} \end{array} \right.$$

La pendenza S può essere stimata dalla curva di calibrazione dell'analita.

La stima di σ può essere eseguita in diversi modi, tra cui:

- deviazione standard del bianco: la misurazione della grandezza della risposta analitica di fondo è eseguita analizzando un appropriato numero di campioni di bianco e calcolando la deviazione standard della risposta;

- curva di calibrazione: una specifica curva di calibrazione deve essere studiata usando campioni contenenti l'analita nell'intervallo del LoD. La deviazione standard residua della linea di regressione o la deviazione standard dell'intercetta y possono essere usate come deviazione standard.

Se il LoD è determinato basandosi sulla valutazione visiva o sul rapporto segnale rumore, la presentazione dei cromatogrammi rilevanti è considerata accettabile come giustificazione.

Nei casi in cui uno stimato valore per il limite di rilevabilità è ottenuto per calcolo o estrapolazione, questa stima deve essere conseguentemente convalidata da un'analisi indipendente di un numero adatto di campioni di concentrazione nota vicina al LoD.

3.9. Quantification Limit (LoQ)

Il limite di quantificazione per una procedura analitica è la più bassa quantità di analita in un campione che può essere determinata quantitativamente con adatta precisione ed accuratezza.

Sono possibili diversi approcci per la determinazione di tale limite, a seconda che la procedura sia strumentale o meno.

La valutazione visiva può essere usata per metodi non strumentali, ma può essere usata anche per metodi strumentali.

Il limite di quantificazione è determinato tramite analisi dei campioni con concentrazioni note di analita ed istituzione del livello minimo al quale l'analita può essere quantificato in modo accettabile.

L'approccio basato sul rapporto segnale-rumore può essere applicato solo alle procedure analitiche che mostrano una linea base di rumore.

La determinazione del rapporto segnale rumore è eseguita confrontando i segnali misurati dai campioni a concentrazioni note basse dell'analita con campioni di bianco ed istituendo la concentrazione minima alla quale l'analita può essere quantificato in modo accettabile.

Un tipico rapporto segnale rumore è 10:1.

Un ulteriore approccio è quello basato sulla deviazione standard di risposta e sulla pendenza della curva di calibrazione.

Il limite di quantificazione (LoQ) può essere espresso come:

$$LoQ = \frac{10 \sigma}{S} \quad \left\{ \begin{array}{l} \sigma = \text{deviazione standard della risposta} \\ S = \text{pendenza della curva di calibrazione} \end{array} \right.$$

La stima di σ può essere eseguita in diversi modi, tra cui:

- deviazione standard del bianco: la misurazione della grandezza della risposta analitica di fondo è eseguita analizzando un appropriato numero di campioni di bianco e calcolando la deviazione standard della risposta
- curva di calibrazione: una specifica curva di calibrazione deve essere studiata usando campioni contenenti l'analita nell'intervallo del LoQ. La

deviazione standard residua della linea di regressione o la deviazione standard della intercetta y possono essere usate come deviazione standard. Il limite deve essere conseguentemente convalidato con l'analisi di un adatto numero di campioni di concentrazione nota vicina al limite di quantificazione.

3.10. Robustezza

La robustezza di una procedura analitica è una misura della capacità di non essere influenzata da piccole, ma volontarie variazioni nei parametri del metodo, e fornisce un'indicazione della sua affidabilità durante il normale uso.

La valutazione della robustezza deve essere considerata durante la fase di sviluppo e dipende dal tipo di procedura sotto studio. Se le misurazioni sono suscettibili alle variazioni delle condizioni analitiche, le condizioni analitiche devono essere controllate in modo adatto o una dichiarazione precauzionale deve essere inclusa nella procedura.

Una conseguenza della valutazione della robustezza è l'istituzione di una serie di parametri adeguati del sistema per assicurare che la validità della procedura analitica sia mantenuta ogni volta che viene usata.

Sono esempi di tipiche variazioni:

- stabilità delle soluzioni analitiche;
- tempo di estrazione.

Nel caso della cromatografia liquida, alcune variazioni sono:

- influenza delle variazioni di pH della fase mobile;
- influenza delle variazioni nella composizione della fase mobile;
- colonne differenti (differenti lotti e/o fornitori);
- temperatura;
- velocità del flusso.

Nel caso della gas cromatografia, sono esempi di tipiche variazioni:

- colonne differenti (differenti lotti e/o fornitori);
- temperatura;
- velocità di flusso

4. HPLC

4.1. Informazioni Generali

L'HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*, è una tecnica di separazione cromatografica basata sulla differente distribuzione di analita fra due fasi immiscibili, in cui la fase mobile è liquida fluisce attraverso la fase stazionaria contenuta nella colonna.

Rappresenta l'evoluzione tecnologica della classica cromatografia su colonna, e trova largo impiego nel settore analitico per determinazioni quali-quantitative.

La fase mobile fornita da uno o più serbatoi fluisce attraverso la colonna, di solito a velocità costante, e successivamente arriva al rivelatore.

Il sistema di pompaggio è richiesto per immettere la fase mobile a una velocità di flusso controllata. Tubi e collegamenti sono capaci di sopportare le elevate pressioni sviluppate dal sistema di pompaggio.

Un rivelatore, che può essere di vario tipo a seconda delle differenti caratteristiche chimico fisiche del campione da analizzare, è necessario evidenziare i composti separati in bande nell'ordine con cui eluiscono dalla colonna.

Il rivelatore è collegato ad un sistema di acquisizione dati, che registra il segnale elettrico necessario per generare il cromatogramma e per identificare e quantificare la concentrazione dei costituenti del campione.

4.2. Componenti

Un apparato HPLC, come si può vedere in figura 3, è schematicamente formato da:

- riserva di fase mobile
- sistema di pompaggio
- iniettore (o autocampionatore)
- colonna
- rivelatore
- sistema acquisizione dati (o integratore o registratore grafico)

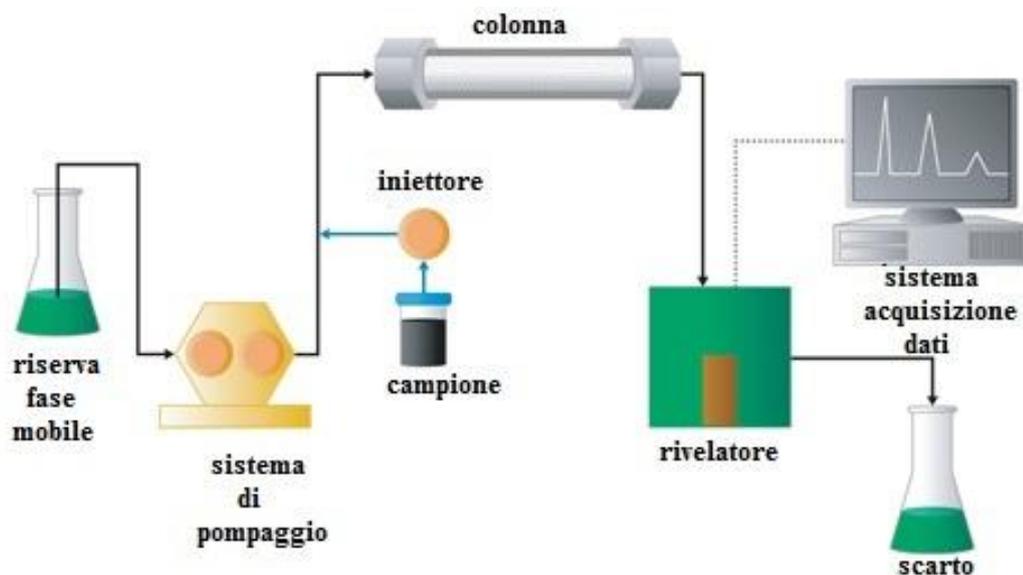


Figura 3. Schema esemplificativo apparato HPLC [13]

Le pompe per LC, *liquid chromatography*, sono capaci di applicare pressioni elevate (fino a 150 atm) e possono essere dotate di strumenti per eliminare le bolle d'aria intrappolate nel sistema [5]. Un microprocessore è in grado di garantire che il sistema di pompaggio inietti fase mobile a composizione costante (eluizione isocratica) o variabile secondo un programma definito (eluizione a gradiente).

Bleeding o sanguinamento, è definito come la perdita di fase stazionaria causata dal flusso di gas e dall'alta temperatura; è il normale segnale di fondo generato dalla fase stazionaria della colonna. Un basso sanguinamento della colonna è un fattore significativo per rendere più facile la quantificazione; il sanguinamento

aumenta esponenzialmente con l'aumentare della temperatura.

Le colonne sono solitamente dotate di precolonne, che funzionano da filtro per evitare che si danneggi la colonna saturandosi di fase mobile.

La maggior parte delle separazioni sono basate su meccanismi di partizione utilizzando silice modificata chimicamente come fase stazionaria e solventi polari come fase mobile; in tal caso si parla di cromatografia a fase inversa.

La superficie del supporto, ad esempio i gruppi silanoli della silice, viene fatta reagire con vari reagenti per produrre derivati silanici legati covalentemente che coprono un numero variabile di siti attivi sulla superficie di supporto.

La natura della fase legante è un parametro importante per determinare le proprietà di separazione del sistema cromatografico.

Si-(CH ₂) ₇ -CH ₃	fase legante C ₈	} fasi leganti più usate
Si-(CH ₂) ₁₇ -CH ₃	fase legante C ₁₈	

Se non diversamente dichiarato dal produttore, le colonne a fase inversa a base di silice sono considerate stabili nella fase mobile nel range di pH da 2.0 a 8.0.

Colonne contenenti pori di grafite o particelle di materiale polimerico come copolimeri di stirene o divinilbenzene sono stabili in un range di pH più ampio.

Per separazioni analitiche, la grandezza della maggior parte delle particelle comunemente usate per la fase stazionaria varia fra 2 µm e 10 µm.

Le particelle possono essere sferiche o irregolari, di varia porosità e specifica area superficiale, e queste proprietà contribuiscono al comportamento cromatografico di una particolare fase stazionaria.

In caso di fasi inverse, altri fattori determinanti sono la natura della fase stazionaria, la lunghezza dei legami, ad esempio espressa come il carbonio di carico, e se la fase stazionaria è *end capped*.

Quando sono presenti gruppi silanici residui, a causa della loro polarità, si può verificare lo scodamento dei picchi (*tailing of peaks*), in particolare di sostanze basiche [14]. Mediante trattamento *end capping* con reagenti costituiti da molecole di dimensioni ridotte, come il trimetilclorosilano (CH₃)₃SiCl, si possono neutralizzare i gruppi silanici liberi.

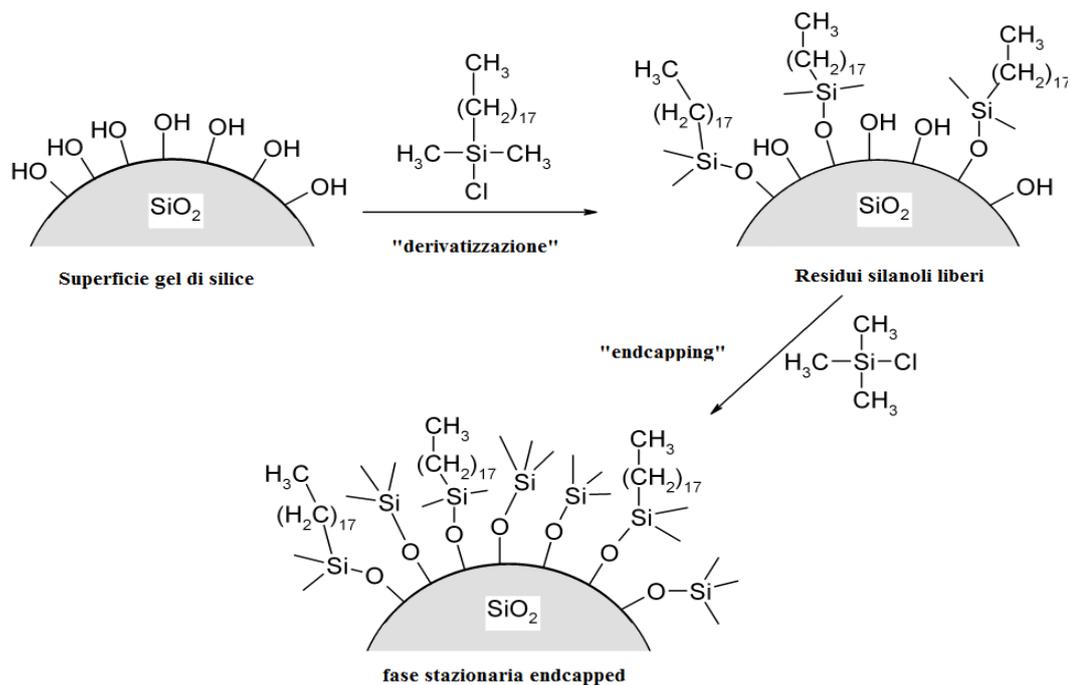


Figura 4. Schema trattamento endcapping.

I componenti della fase mobile sono di solito filtrati per rimuovere particelle più grandi di $0.45 \mu\text{m}$ (o $0.20 \mu\text{m}$ quando la fase stazionaria è fatta di particelle sub $0.20 \mu\text{m}$).

Fasi mobili multicomponenti sono preparate misurando il volume richiesto dei singoli componenti e poi miscelati. In alternativa i solventi possono essere iniettati da pompe individuali controllate da valvole dosatrici che assicurano una miscelazione in accordo con la proporzione desiderata.

I solventi sono normalmente degassati prima di essere inseriti nella pompa tramite *sparging* con elio (processo in cui un gas chimicamente inerte viene fatto gorgogliare attraverso un liquido), sonicazione o utilizzando moduli di membrana/vuoto per evitare la creazione di bolle di gas nella cella rivelatrice.

Il rivelatore per HPLC può essere di varia natura, con caratteristiche differenti di specificità e di selettività. I più usati sono spettrofotometri UV-Vis a lunghezza d'onda (λ) variabile. Nel rivelatore a serie di diodi il monocromatore, collocato a valle della cella campione, invia le radiazioni su una batteria di diodi che insieme

effettuano la misura su tutto il campo delle lunghezze d'onda, consentendo la registrazione istantanea dello spettro durante l'uscita di un picco cromatografico.

4.3. Parametri cromatografici

Il cromatogramma è la rappresentazione grafica della risposta del rivelatore, e riporta la concentrazione eluente o altra quantità utilizzata come misura della concentrazione dell'eluente in funzione del tempo o del volume [4].

Cromatogrammi ideali sono rappresentati come una sequenza di picchi gaussiani su una linea di base. Il picco rappresenta la porzione di cromatogramma registrato della risposta del rivelatore quando un singolo componente (o due o più componenti irrisolti) viene eluito dalla colonna. Un picco può essere definito dall'area, dall'altezza (h), dalla larghezza a metà altezza (w_h), oppure dall'altezza (h_i) e dalla larghezza (w_i) fra i punti di flesso (vedi figura 5).

Il numero di piatti varia con i componenti, con la colonna, con la temperatura della colonna, con la fase mobile e con il tempo di eluizione. Un valore elevato è un indice di una buona efficienza della colonna.

$$\text{Fattore di ritenzione } (k) = \frac{t_r - t_m}{t_m} \quad \left\{ \begin{array}{l} t_r = \text{tempo ritenzione componente} \\ t_m = \text{tempo ritenzione fase mobile} \end{array} \right.$$

$$\text{Numero di piatti } (N) = 5.54 \left(\frac{t_r}{w_h} \right)^2$$

$$\text{Risoluzione } (R_s) = \frac{1.18 (t_{r2} - t_{r1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

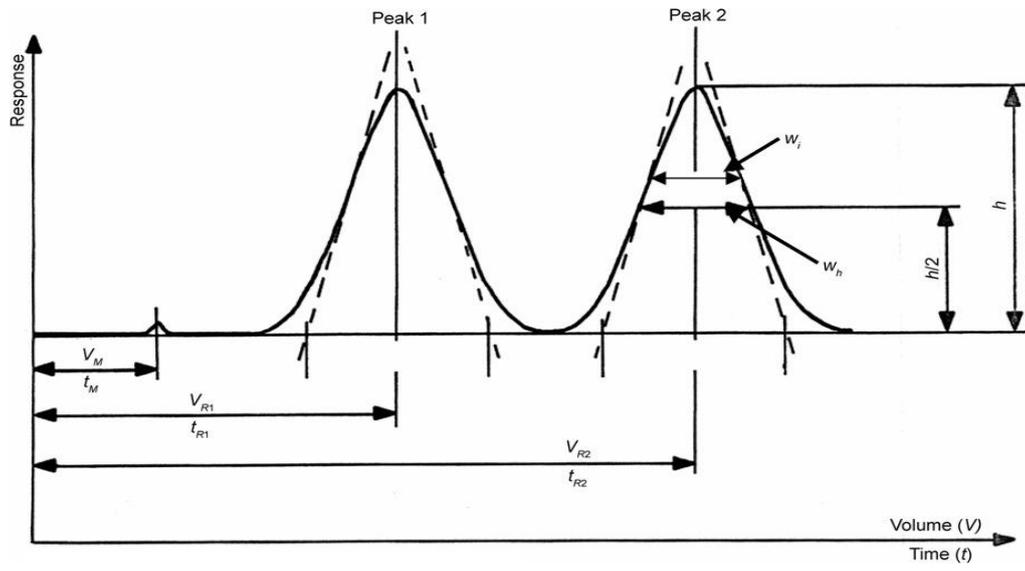


Figura 5. Esempio cromatogramma

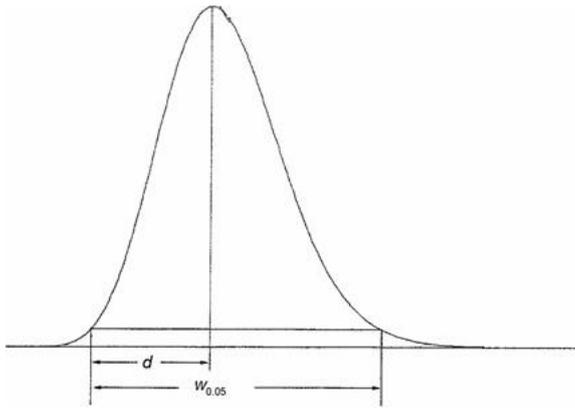


Figura 6. Fattore di simmetria

$$\text{Fattore di simmetria } (A_s) = \frac{w_{0.05}}{2d}$$

$w_{0.05}$ = larghezza del picco ad un ventesimo di altezza

d = distanza fra la discesa perpendicolare dal massimo del picco e bordo principale ad un ventesimo di altezza

- { Se $A_s > 1.0$, *tailing* del picco
- { Se $A_s < 1.0$, *fronting* del picco

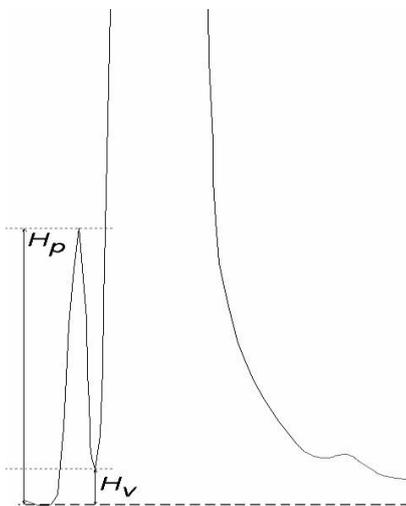


Figura 7. Rapporto picco valle

$$\text{Rapporto picco/valle} = \frac{H_p}{H_v}$$

H_p = altezza al di sopra della linea base estrapolata dal picco minore

H_v = altezza al di sopra della linea base estrapolata al più basso punto della curva che separa il picco minore dal maggiore

Può essere impiegato come criterio system suitability in un test per sostanze correlate quando la separazione di due picchi non viene raggiunta.

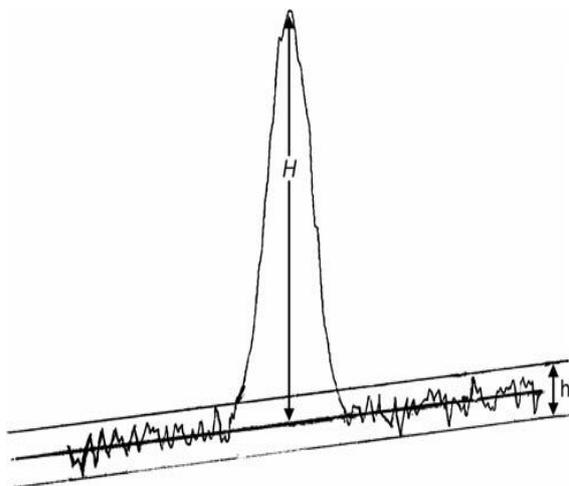


Figura 8. Rapporto segnale rumore

$$\text{Rapporto segnale/rumore} = \frac{2H}{h}$$

H = altezza del picco corrispondente al composto di interesse

h = range del rumore situato a distanza uguale intorno alla posizione del picco

Influenza la precisione della quantificazione.

L'integrazione di un picco cromatografico è definita come un'operazione in cui si misura l'area sotto il picco [8]. La misura è basata sulla tecnica integrale di dividere il picco in un grande numero di rettangoli, che sono sommati per fornire una stima dell'area totale sotto il picco, cioè una misura cumulativa del segnale assorbanza in relazione al tempo (vedi figura 9).

Affinchè il software di gestione dati possa fornire un calcolo è necessario definire l'inizio e la fine del picco, che sono determinati utilizzando le impostazioni soglia e la larghezza del picco del sistema.

Il metodo deve essere riproducibile e deve fornire una robusta integrazione.

La linea base è poi disegnata dal software fra i punti di inizio e fine creati per il picco. L'altezza del picco è misurata fra l'apice e l'intersezione con la linea base.

$$Area = \int Abs \times dt$$

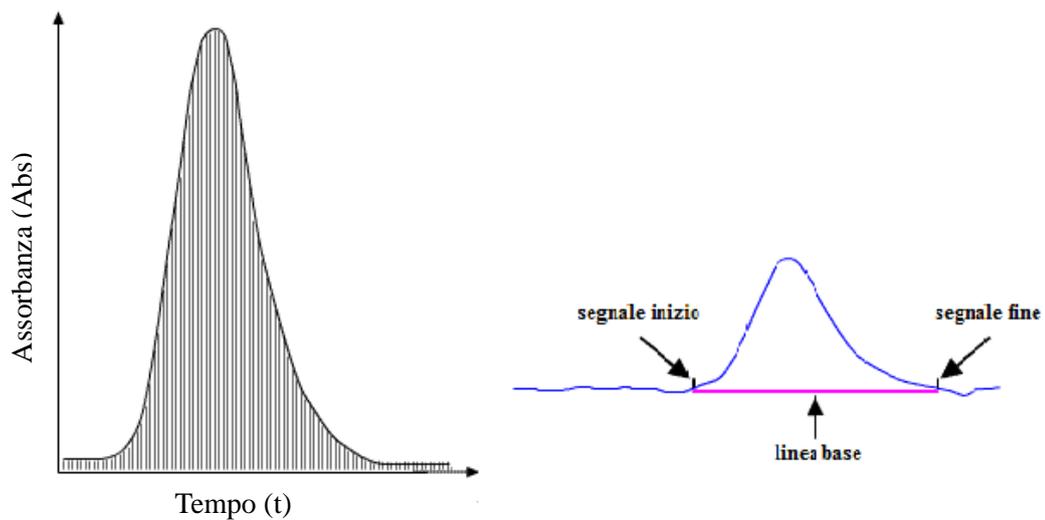


Figura 9. Metodo di integrazione

4.4.Funzionamento

Prima di iniziare l'analisi è necessario equilibrare la colonna con la fase mobile e alla velocità di flusso prescritta a temperatura ambiente o alla temperatura specificata nella monografia, fino ad ottenere una linea base stabile.

Si deve inoltre preparare la soluzione di sostanza da analizzare, priva di particelle solide, e la soluzione di riferimento richiesta.

Il test per l'idoneità del sistema (System Suitability Test, SST) e i criteri di accettazione presenti nelle monografie devono essere stabiliti usando specifici parametri, come visto in precedenza.

Con alcune attrezzature, alcuni parametri come il rapporto segnale/rumore e la risoluzione, possono essere calcolati usando software forniti dal produttore.

È responsabilità dell'utente assicurare che i metodi di calcolo usati nel software siano equivalenti ai requisiti della Farmacopea Europea, e, nel caso non lo fossero, fare le correzioni necessarie [4].

Al termine dell'analisi bisogna procedere ad una serie di lavaggi, con opportuna fase mobile, per preservare l'utilizzo della fase stazionaria contenuta nella colonna.

4.5.Strumentazione

Sistema analitico HPLC Waters Alliance 2695 (vedi figura 10), presente presso il laboratorio LSS di SGS Sertec, dotato di rivelatore *photo diode array* (PDA) 2996. Lo strumento è idoneo ad eseguire analisi quantitative con la tecnica della cromatografia liquida ad alte prestazioni su campioni di varia natura.

Prima dell'analisi è necessario effettuare un *System Suitability Test* (SST) della colonna e dello strumento, che consente di verificare l'adeguatezza del sistema stesso a verificare che siano soddisfatti i criteri di accettazione riportati nel metodo di analisi e nella procedura di gestione delle colonne.

Le esatte modalità di esecuzione del SST, insieme alle formule da usare e ai relativi criteri di accettazione sono definite nei vari metodi di analisi.

Ulteriori operazioni preliminari che si devono eseguire sono la degassazione e la filtrazione della fase mobile, per evitare formazione di bolle d'aria nel circuito.

Il sistema di gestione dati di analisi è Empower 3, in conformità alle GMP.



Figura 10. HPLC in uso.

Il rivelatore UV-Vis è uno strumento a serie di diodi a lunghezza d'onda variabile, capace di convertire il segnale dal formato ottico a quello elettrico, che consente di effettuare l'analisi dalla regione dell'ultravioletto alla regione del visibile (190-800 nm) [16]. Questo rivelatore misura la trasmittanza della luce attraverso una cella contenente una soluzione di composti chimici. Il sistema di rivelazione UV-Vis raccoglie la luce che passa attraverso la cella e la converte in corrente elettrica, successivamente in tensione. La trasmittanza può essere convertita matematicamente in assorbanza, che secondo la legge di Lambert-Beer risulta proporzionale alla concentrazione del soluto presente in soluzione.

$$A = -\log T = \varepsilon c l$$

Dove:

A = assorbanza

T = trasmittanza = I/I_0

I = intensità luce alla fonte luminosa

I_0 = intensità luce misurata dal rivelatore

ε = coefficiente di estinzione molare (L/mol·cm)

l = lunghezza del cammino ottico (cm)

c = concentrazione molare (mol/L)

Parametro	Valore
Massima pressione operativa	5000 psi (345 bar)
Canali fase mobile	4
Flusso	0.010–10.000 mL/min
Temperatura colonna	20–60 °C
Temperatura comparto campioni	4–40 °C
Volume di iniezione	0.1-100 µL
Detector (λ)	190-800 nm
Massimo campioni caricabili	120 vials

Tabella 2. Specifiche HPLC in uso[15]

5. SVILUPPO E CONVALIDA METODO DI ANALISI

5.1.Scopo

Lo scopo del progetto è sviluppare e convalidare un metodo analitico per valutare il contenuto di proclorperazina maleato su superfici tramite campionamento con swab.

Mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) si determina la proclorperazina.

Per le cleaning validation delle attrezzature il *maximum acceptance limit* (MAC) è 32,36 µg/cm² (relativo ad un'area della superficie di 25 cm²). Tale limite è stato calcolato tenendo in considerazione la superficie dell'impianto a contatto con il prodotto e le dimensioni del lotto successivo.

Tale limite nell'intervallo corrispondente ad 80-120% vale per la tecnica di recupero swab dalla superficie coinvolta (acciaio).

La convalida di pulizia è eseguita solo dopo il completamento della fase di sviluppo e convalida del metodo di analisi e recovery oggetto del presente documento.

Il risultato dello studio, la valutazione di ciascun parametro e le conclusioni sono raccolti e documentati nel report di convalida.

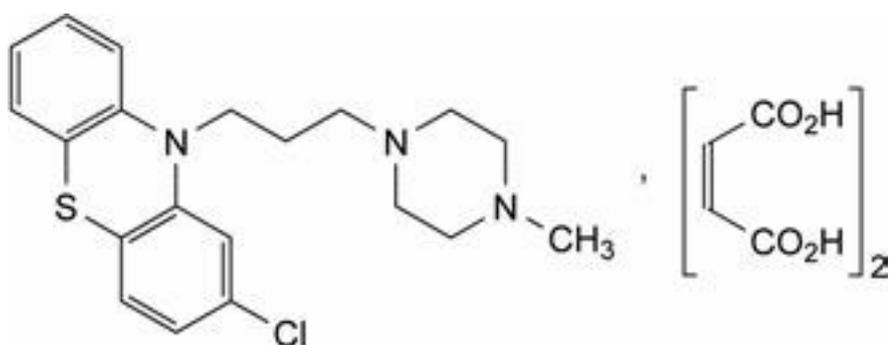


Figura 11. Proclorperazina maleato



Proclorperazina maleato, principio attivo impiegato in terapia antiemetica.

Aspetto: polvere cristallina bianca o giallo chiaro.

Solubilità: molto scarsamente solubile in acqua e in etanolo 96° [6].

Soluzioni

Proclorperazina base Stock Solution 1000 µg/ml (SS): pesare accuratamente su bilancia analitica 100 mg di proclorperazina base standard 100% m/m e portare a volume con acetonitrile in un matraccio tarato da 100 ml.

Proclorperazina base Working Standard 1 µg/mL (WS): prelevare 5 mL di soluzione SS con pipetta in vetro tarata e portare a volume con acetonitrile in un matraccio tarato da 50 ml (soluzione A).

Prelevare dalla soluzione A 1 mL con pipetta di vetro tarata e portare a volume con acetonitrile in un matraccio tarato da 100 ml.

Proclorperazina base Standard Check Solution 1 µg/mL (CHECK): ripetere la preparazione come per il Working Standard.

Condizioni Operative

Parametro	Valore
Colonna cromatografica	Colonna C8, 250 x 4.6 mm, 5 µm
Flusso	1 mL/min
Temperatura colonna	30 °C
Temperatura comparto campioni	25 °C
Volume di iniezione	50 µL
Detector (λ)	258 nm
Corsa cromatografica	15 min
Composizione fase mobile	Acetonitrile/acqua 80:20 (con 0,1 % dietilammina)

Tabella 3. Condizioni operative HPLC

System Suitability Test (SST)

Il test di idoneità del sistema rappresenta una parte indispensabile del metodo, ed è usato per assicurare un'adeguata performance del sistema cromatografico.

I test sono basati sul concetto che le attrezzature, i dispositivi elettronici, le procedure analitiche e i campioni da analizzare costituiscono parte integrante del sistema che deve essere valutato come tale.

Ogni test di convalida sarà eseguito come descritto e valutato secondo i criteri stabiliti per la singola determinazione, ma sarà considerato valido solo se sarà soddisfatto il System Suitability.

Nel nostro caso, prima di effettuare l'analisi si procede come segue:

- Iniettare bianco
- Iniettare CHECK
- Iniettare 5 volte WS

Calcolare per le 5 iniezioni consecutive di WS la deviazione standard delle aree e del tempo di ritenzione (t.r.) del picco e la relativa RSD% con le formule descritte di seguito:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad s = SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad RSD\% = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

dove:

\bar{x} = media dei valori delle 5 iniezioni

x_i = valore dell'iniezione i-esima

s = deviazione standard

n = numero delle determinazioni

Parametro	Criterio di accettazione
RSD area WS	≤ 2 (calcolato su 5 iniezioni consecutive)
RSD tempo di ritenzione WS	≤ 5 (calcolato su 5 iniezioni consecutive)

Tabella 4. Criteri di accettazione SST

Analisi dei campioni

Dopo la verifica del SST, eseguire la sequenza analitica, iniettando i campioni nell'ordine di seguito elencato:

- Bianco (fase mobile)
- WS
- Campione 1
- Campione 2
- Campione 3
- WS
- ...
- Campione n-2
- Campione n-1
- Campione n

Swab: rompere la testa di uno swab e posizionarla all'interno di una vial da 20 mL. Aggiungere 5 mL di acetonitrile, chiudere la vial ed agitare meccanicamente per 5 minuti. Trasferire 1 mL dell'estratto in una vial da 2 mL ed analizzare.

Calcoli

La concentrazione di proclorperazina base, per ciascun campione è stata calcolata con la seguente formula:

$$\text{Concentrazione } (\mu\text{g/mL}) = \frac{(\text{Area}_{\text{campione}})(\text{Conc. SS}_{\mu\text{g/mL}})}{\text{Area}_{\text{ws}}} * \frac{P_{\text{SS}}}{100} * \frac{A_{\%}}{100} * \frac{1}{1000}$$

dove:

Conc.SS = concentrazione ($\mu\text{g/mL}$) della Proclorperazina base Stock Solution

A% = titolo (%m/m) del materiale di riferimento

Pss = quantità pesata (mg) della Proclorperazina base per ottenere una stock solution avente una concentrazione pari a 1000 $\mu\text{g/mL}$

1/1000 = fattore di diluizione per ottenere la concentrazione di Proclorperazina a 1 $\mu\text{g/mL}$ partendo dalla soluzione stock solution.

Il quantitativo in μg di ciascun campione può essere calcolato come segue:

○ Concentrazione ($\mu\text{g/mL}$) x 5

Dove 5 sono i mL di acetonitrile utilizzati per estrarre gli swab.

Calcolare, per ogni campione, il recovery factor (%) con la seguente formula:

$$R_{xi} (\%) = \frac{C_{xi}}{C_{x \text{ teor.}}} \times 100$$

Dove:

C_{xi} = Concentrazione i-esima della soluzione misurata

$C_{x \text{ teor.}}$ = Concentrazione della relativa comparative solution

5.2. Specificità

Nella nostra analisi qualitativa i componenti del campione sono noti e nel cromatogramma i picchi devono essere attribuiti a componenti noti.

È possibile iniettare standard del composto puro, e attribuire i picchi del cromatogramma sulla base dei tempi di ritenzione dello standard.

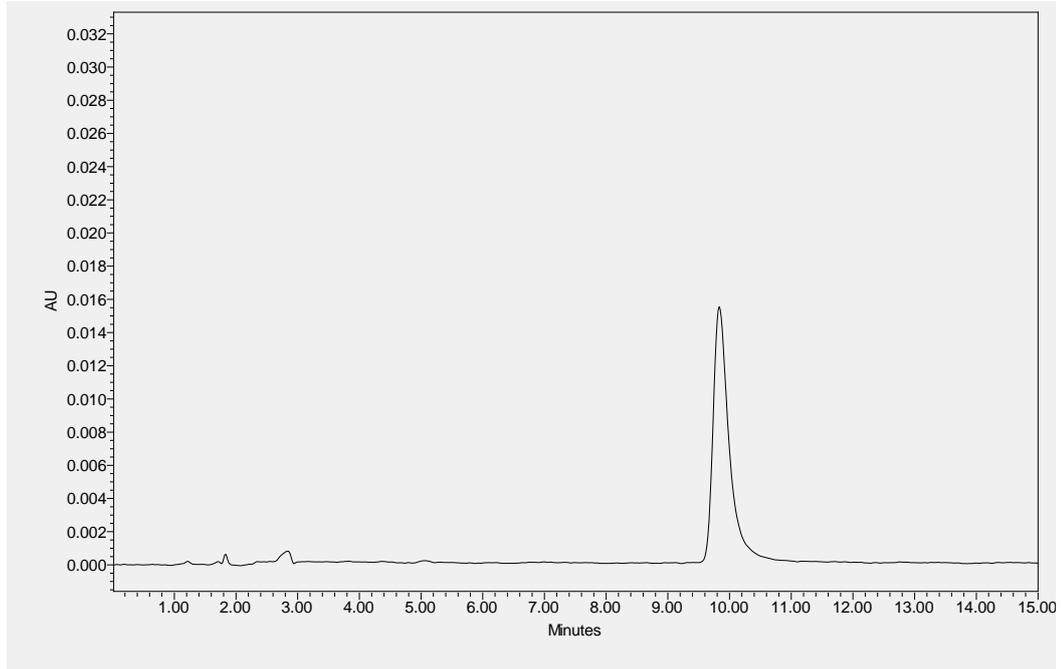
Avere un rivelatore selettivo, come la serie di diodi UV-Vis che assiste nell'identificazione producendo spettri specifici, può aiutare nell'attribuzione dei picchi.

Per il test della specificità, al fine di valutare eventuali interferenze, sono state analizzate le seguenti soluzioni:

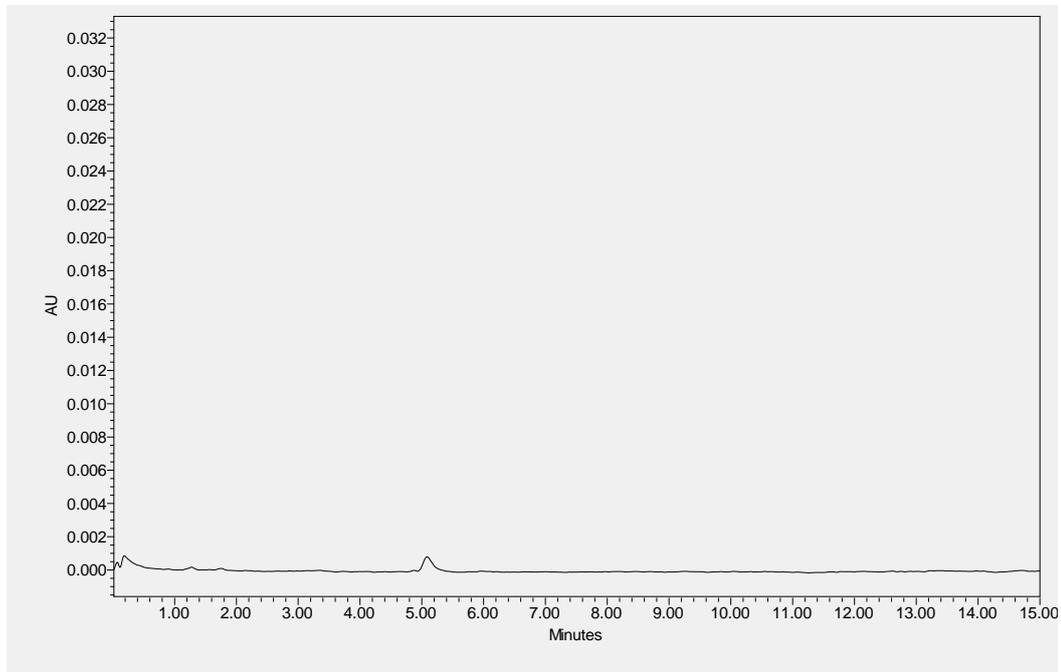
- working standard (WS)
- fase mobile
- bianco swab
- gliceridi semisintetici.

I gliceridi semisintetici sono utilizzati come eccipienti per la produzione della specialità medicinale. La soluzione di gliceridi semisintetici è preparata pesando 100 mg di eccipienti, sciolti in 100 mL di acetonitrile e diluendola allo stesso modo della soluzione WS, come descritto in precedenza, per ottenere una concentrazione finale di 1 µg/mL.

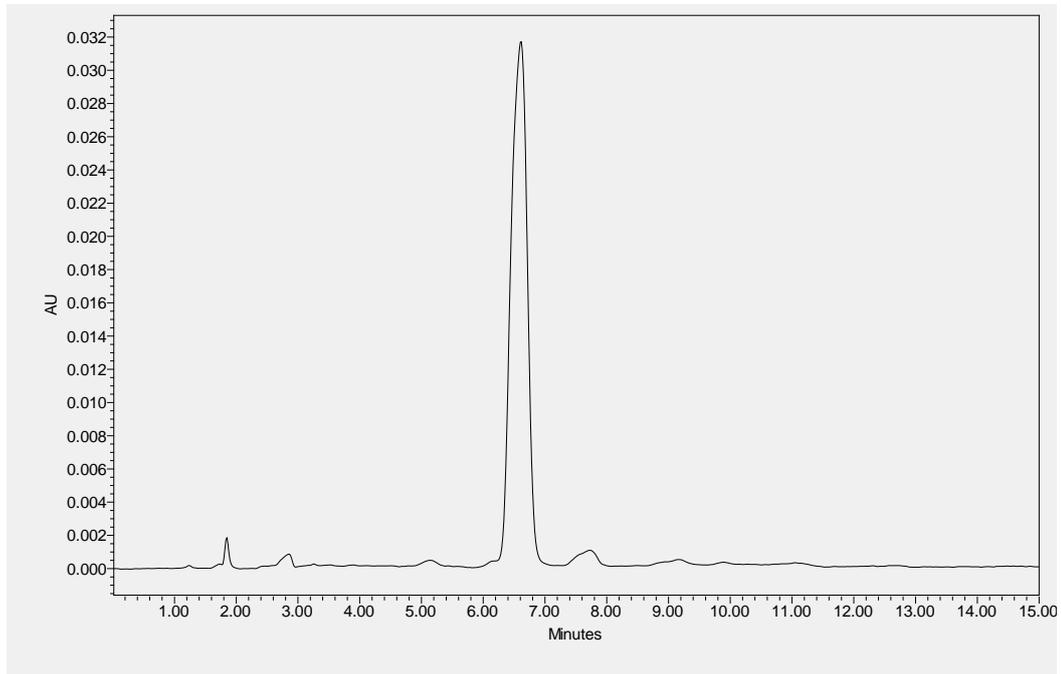
Il profilo cromatografico delle soluzioni analizzate non presenta picchi potenzialmente interferenti con l'analita di interesse. E' comunque da notare la presenza di un picco, non identificato, nel profilo cromatografico dello swab, dopo estrazione con acetonitrile. L'utilizzo di tale solvente, in grado di solubilizzare anche sostanze organiche, ad esempio collanti, utilizzate nella fabbricazione dello swab, si rende necessario a causa della bassa solubilità dell'analita in solventi acquosi.



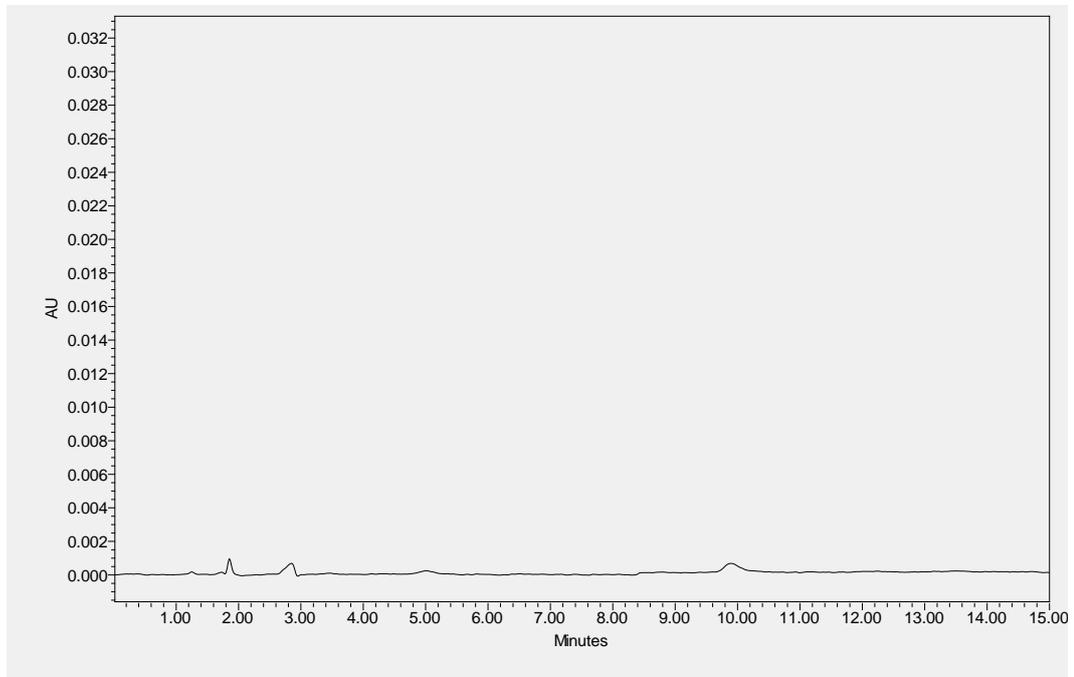
Cromatogramma 1. Working standard



Cromatogramma 2. Fase mobile



Cromatogramma 3. Bianco swab



Cromatogramma 4. Gliceridi semisintetici

5.3.LoD e LoQ

Il limite di rilevabilità (LoD) è la più bassa concentrazione di analita che può essere rilevata dallo strumento, mentre il limite di quantificazione (LoQ) è la concentrazione più bassa di analita che può essere misurata con una data precisione ed accuratezza.

Il valore di LoQ è stato impostato come il punto più basso per il quale è stata valutata la linearità del metodo (0,5 µg/ml) e verificato mediante l'analisi in triplicato di soluzioni standard a titolo noto.

Dopo aver calcolato la concentrazione di proclorperazina (µg/mL) di queste soluzioni, è stata calcolata per ciascuna la percentuale di recupero relativamente alla concentrazione attesa della proclorperazina a 0,5 µg/ml.

Il valore di LoD è stato posto pari ad 1/3 del valore di LoQ e verificato tramite l'analisi di una soluzione standard avente concentrazione prossima a quella impostata (0,1 µg/mL).

	Standard	0,5 prova 1	0,5 prova 2	0,5 prova 3
Pesata	103,8 mg	107,6 mg	107,6 mg	107,6 mg
Concentrazione	0,519 µg/mL	0,512 µg/mL	0,573 µg/mL	0,501 µg/mL
Area	370309	176159	197051	172322
Recovery	-	98,6%	110,3%	96,5%

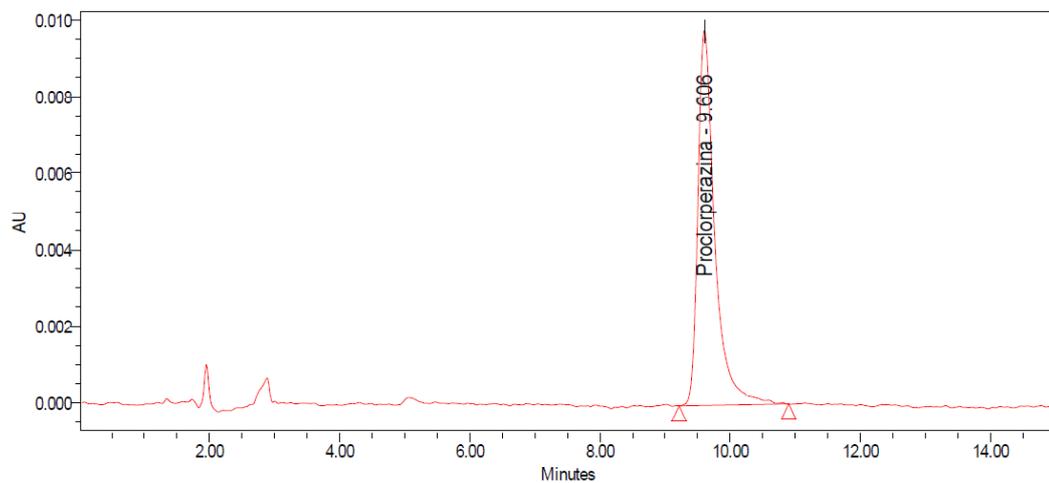
Tabella 5. Dati sperimentali LoD e LoQ

Recovery medio%	101,8
RSD%	7,3

Tabella 6. Risultati LoD e LoQ

Parametro	Criterio di accettazione
LoQ	recovery medio nell'intervallo 90-110% RSD ≤ 10
LoD	il picco relativo all'analita di interesse deve essere apprezzabile

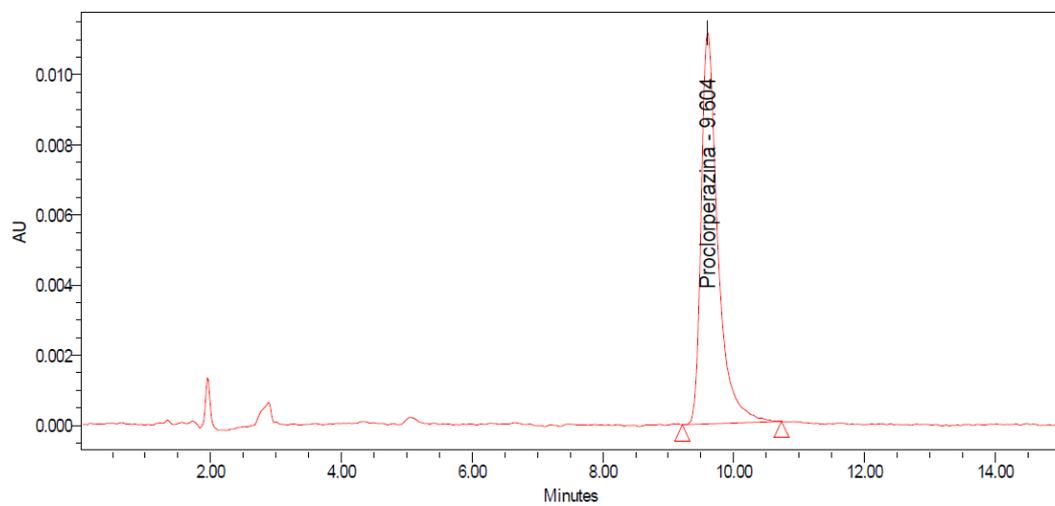
Tabella 7. Criteri di accettazione LoD e LoQ



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Proclorperazina	9.606	176159	9798		

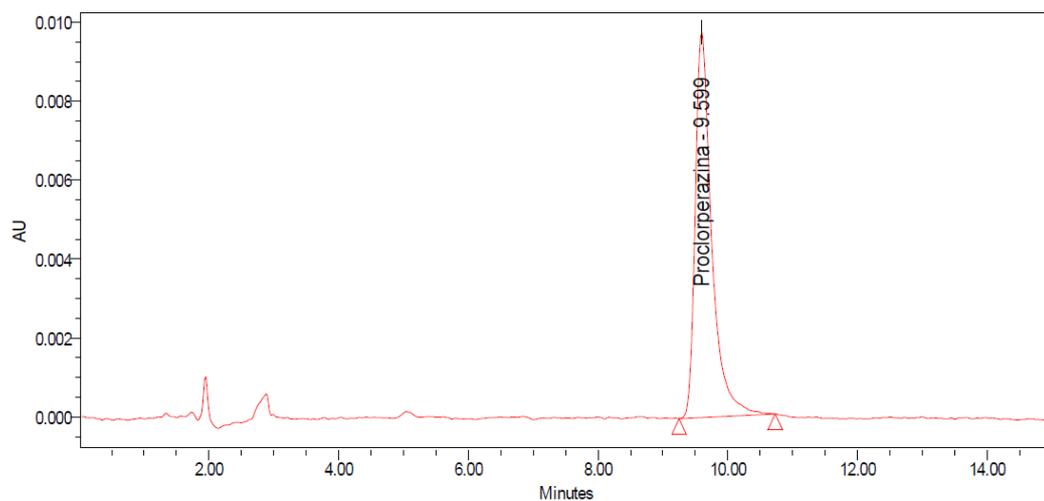
Cromatogramma 5. Livello 0.5 (Prova 1)



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Proclorperazina	9.604	197051	11181		

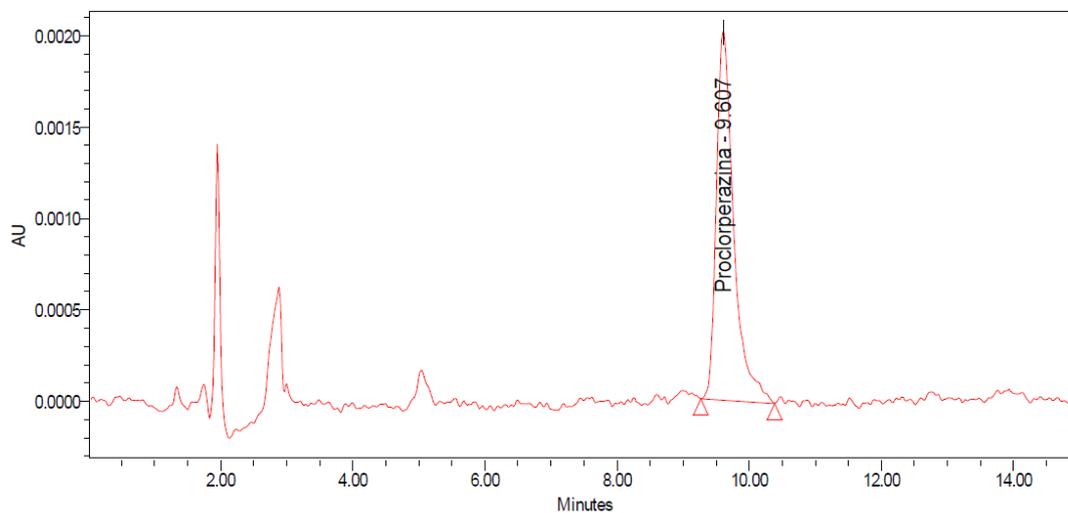
Cromatogramma 6. Livello 0.5 (Prova 2)



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Proclorperazina	9.599	172322	9756		

Cromatogramma 7. Livello 0.5 (Prova 3)



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Proclorperazina	9.607	36737	2021		

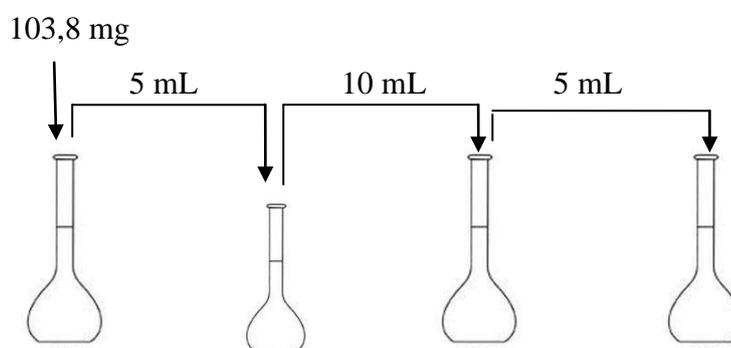
Cromatogramma 8. Livello 0.1

5.4.Linearità

La linearità è la capacità del metodo analitico di ottenere dei risultati analitici proporzionali, mediante una ben definita relazione matematica, alla quantità di analita presente nei campioni in analisi, all'interno di un determinato intervallo di concentrazione.

La linearità è stata verificata su 5 punti di concentrazione, dalla concentrazione di 10 µg/mL fino al LoQ stimato (circa 0,5 µg/mL). Ciascun livello di concentrazione è stato analizzato in triplo.

Le concentrazioni sono state calcolate per pesata a partire da proclorperazina base e sono state ottenute tramite diluizioni in serie, come da schema.



matraccio	100 mL	50 mL	100 mL	100 mL
porto a volume con	acetoneitrile	acetoneitrile	acetoneitrile	acetoneitrile
diluizione	1:100	1:10	1:10	1:20
concentrazione	1038 µg/mL	103,8 µg/mL	10,38 µg/mL	0,519 µg/mL

Per ottenere gli altri livelli di concentrazione si parte dalla soluzione a 103,8 µg/mL e si porta a volume con acetoneitrile in differenti matracci da 100 ml.

volume prelevato	1 mL	5 mL	7,5 mL	10 mL
diluizione	1:100	1:20	1:13,3	1:10
concentrazione	1,038 µg/mL	5,19 µg/mL	7,785 µg/mL	10,38 µg/mL

Trasferire 1 mL delle soluzioni ottenute in vial da 2 mL ed analizzare.

Dopo aver calcolato la concentrazione di proclorperazina, a ciascun livello di concentrazione, i dati ottenuti sono stati utilizzati per la costruzione di tre rette di

calibrazione e per l'analisi di regressione per il calcolo del coefficiente di determinazione (R^2).

$$R^2 = \left(\frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 \sum(y_i - \bar{y})^2}} \right)^2$$

Dove:

x_i = concentrazione (mg/L) del campione i-esimo

y_i = risposta (area) del campione i-esimo

\bar{x} = valore x medio per n-campioni

\bar{y} = valore y medio per n-campioni

Parametro	Criterio di accettazione
Coefficiente di determinazione (R^2)	$\geq 0,99$

Tabella 8. Criteri di accettazione linearità

Livello	Concentrazione	Area
1	0,5	169608
2	1,0	384577
3	5,2	1630837
4	7,8	2527899
5	10,4	3283610

Tabella 9. Dati sperimentali linearità (Prova 1)

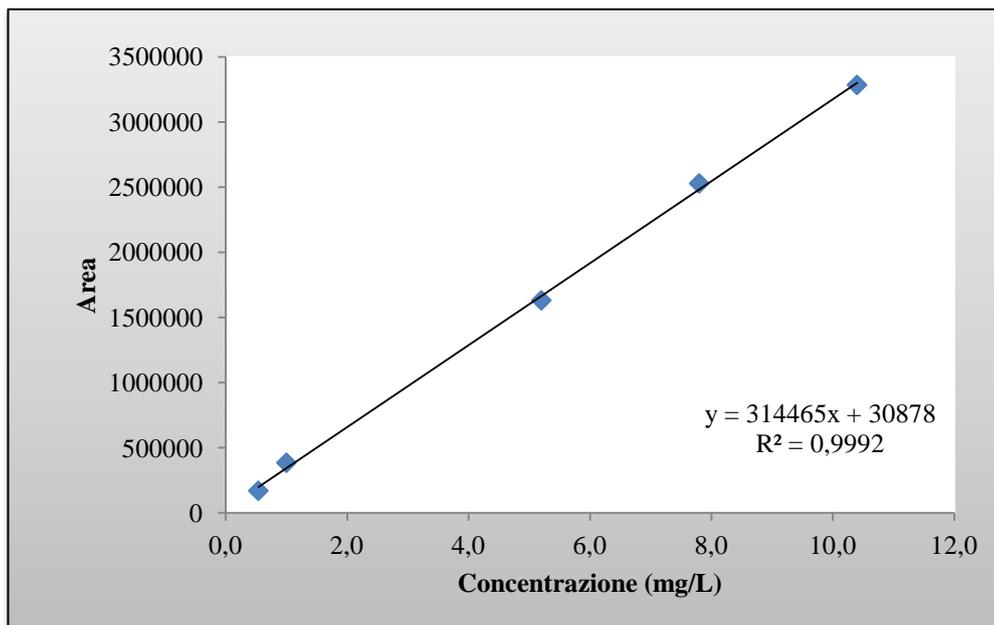


Figura 12. Grafico linearità (Prova 1)

Livello	Concentrazione	Area
1	0,5	172945
2	1,0	421883
3	5,2	1647877
4	7,8	2841635
5	10,4	3412293

Tabella 10. Dati sperimentali linearità (Prova 2)

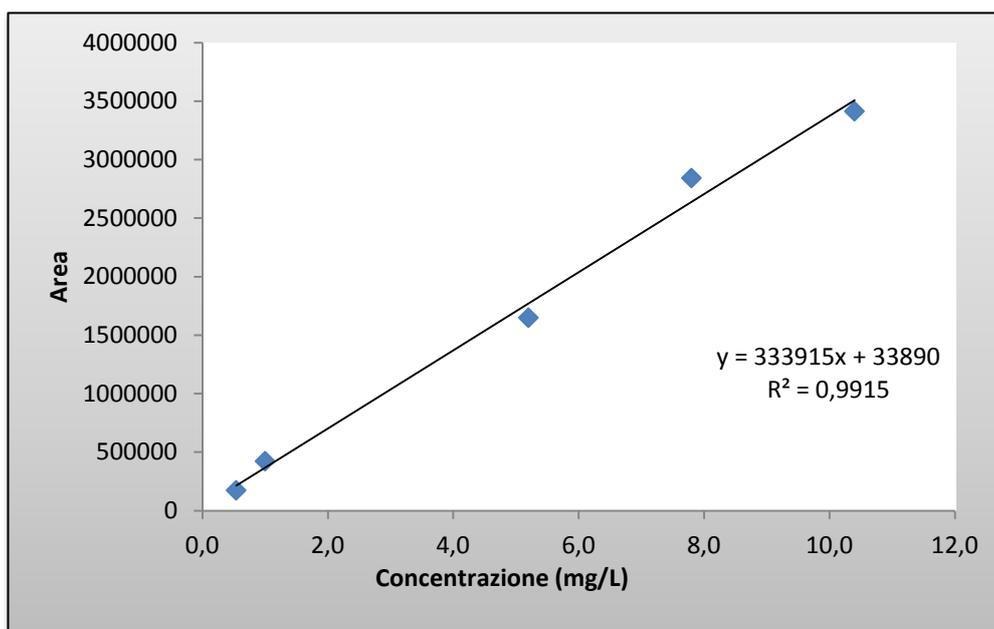


Figura 13. Grafico linearità (Prova 2)

Livello	Concentrazione	Area
1	0,5	164794
2	1,0	376860
3	5,2	1636559
4	7,8	2509282
5	10,4	3278050

Tabella 11. Dati sperimentali linearità (Prova 3)

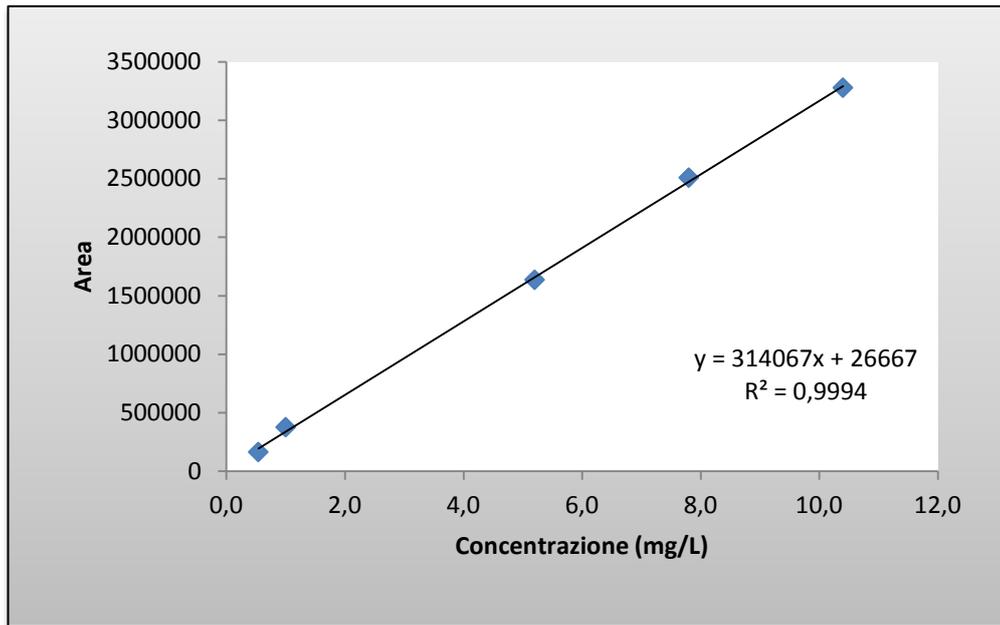


Figura 14. Grafico linearità (Prova 3)

5.5.Accuratezza/Recupero

L'accuratezza è la capacità del metodo analitico di ottenere risultati prossimi al valore vero su campioni a contenuto di analita noto. Nel metodo in studio è stata calcolata mediante lo svolgimento delle prove di recupero da superficie (acciaio), tenendo quindi in considerazione anche l'influenza della procedura di campionamento.

La verifica dell'accuratezza è stata svolta effettuando 3 repliche dell'analisi per ciascuno dei 3 livelli di concentrazione di proclorperazina corrispondenti al 80%, 100% e 120% del valore di MAC.

Dopo aver calcolato la concentrazione di proclorperazina in $\mu\text{g/ml}$ è stata calcolata la percentuale di recupero sulla superficie testata relativamente alla comparative solution (ovvero la stessa soluzione depositata sulla superficie).

Soluzioni

Soluzione proclorperazina base a 100 $\mu\text{g/mL}$. Pesare accuratamente 100 mg di proclorperazina base in un matraccio da 100 mL. Portare a volume con acetonitrile. Dalla soluzione risultante, prelevare 5 mL con una pipetta tarata e metterli in un matraccio da 50 mL, portando a volume con acetonitrile.

Dalla precedente soluzione prelevare:

- 250 μL (80% MAC)
- 300 μL (100% MAC)
- 390 μL (120% MAC).

Depositare ciascuno dei quantitativi sopra indicati su coupon di acciaio definiti.

Comparative solution: dalla soluzione proclorperazina base a 100 $\mu\text{g/mL}$ prelevare:

- 250 μL (80% MAC)
- 300 μL (100% MAC)
- 390 μL (120% MAC).

Ciascuno dei volumi sopra indicati sarà trasferito in una vial da 20 mL, aggiungendo acetonitrile in modo da ottenere un volume finale di 5 mL.

Recupero da superficie

Un sistema tra i più utilizzati per il campionamento delle superfici è il tampone (o swab), formato da un manico rigido e una testa morbida. Nel nostro caso la testa è costituita da 100% poliestere (modello Texwipe TX714A Large Alpha Swab), materiale comunemente utilizzato in ambito farmaceutico per questo tipo di campionamenti.

La seguente procedura è stata applicata ai coupons sui quali sono state eseguite le prove di recupero:

1. Lavare la superficie oggetto del recupero con acqua HPLC e lasciare asciugare;
2. Ottenere 10 coupons idonei, delimitando per ciascuno un'area di 5 x 5 cm;
3. Prelevare i volumi della soluzione proclorperazina base a 100 µg/mL e distribuirli sui coupons;
4. Quindi, per ogni coupon strisciare la superficie come descritto sotto:
5. Pretrattare 1 swab in acetonitrile e eliminare il liquido in eccesso premendo contro le pareti di una vial da 20 mL (eliminare la vial);
6. Strisciare la superficie del coupon in modo uniforme con un lato dello swab in direzione orizzontale, e con l'altro lato in direzione verticale per coprire l'intera area (vedi figura 16);
7. Rompere la testa dello swab all'interno della vial da 20 mL;
8. Aggiungere 5 mL di acetonitrile e chiudere la vial;
9. Agitare meccanicamente la vial per 5 minuti;
10. Aprire la vial e trasferire un'aliquota pari a 1 mL dell'estratto in una vial da 2 mL;
11. Preparare, per ogni livello di recupero, una comparative solution come suddetto;
12. Ottenere un bianco swab estraendo 1 swab come descritto al punto 4, ma strsciandolo sulla superficie di un coupon pulito;
13. Analizzare i campioni ottenuti secondo il metodo descritto.



Figura 15. Swab

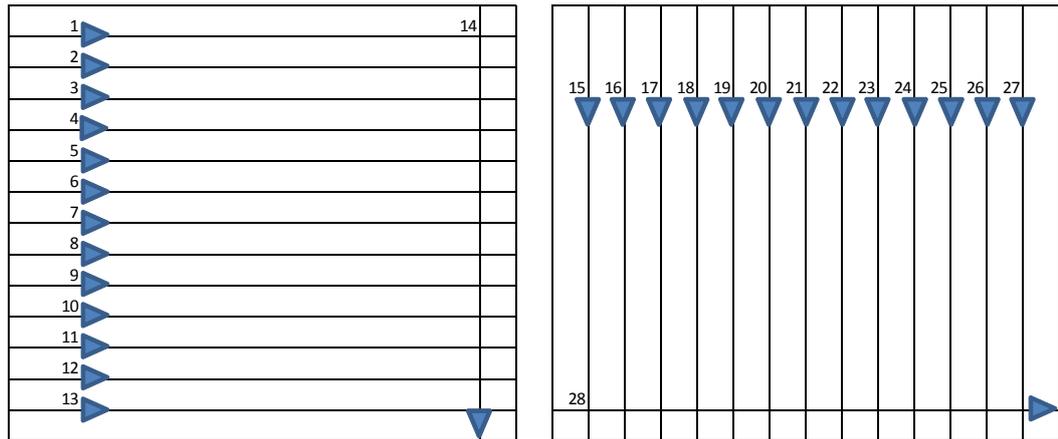


Figura 16. Schema dello striscio della superficie dei coupon

Soluzione Proclorperazina	Quantità Proclorperazina recuperata (µg)			Recovery %		
	Giorno 1 Op. A	Giorno 2 Op. A	Giorno 3 Op. B	Giorno 1 Op. A	Giorno 2 Op. A	Giorno 3 Op. B
Accuratezza Livello 1 (80%)	18,90	19,97	16,96	73,70	81,21	69,87
	17,96	19,13	17,10	70,03	77,80	70,42
	17,89	19,01	17,00	69,74	77,30	70,01
Quantità Proclorperazina di riferimento (µg)	25,65	24,59	24,28	Media Recovery %	Media Recovery %	Media Recovery %
				71,16	78,77	70,10
Accuratezza Livello 2 (100%)	24,36	22,28	20,66	75,48	77,00	70,85
	22,98	22,32	19,05	71,18	77,13	65,33
	22,80	23,44	22,36	70,62	81,00	76,68
Quantità Proclorperazina di riferimento (µg)	32,28	28,94	29,16	Media Recovery %	Media Recovery %	Media Recovery %
				72,43	78,37	70,96
Accuratezza Livello 3 (120%)	33,25	30,03	26,07	83,17	81,93	68,91
	32,64	29,15	27,58	81,64	79,54	72,90
	32,90	30,66	26,37	82,28	83,66	69,71
Quantità Proclorperazina di riferimento (µg)	39,98	36,65	37,83	Media Recovery %	Media Recovery %	Media Recovery %
				82,37	81,71	70,52
Media recovery globale %	75,16					

Tabella 12. Dati sperimentali e risultati accuratezza

Parametro	Criterio di accettazione
Accuratezza (%)	≥ 70

Tabella 13. Criteri di accettazione accuratezza

5.6.Precisione

La precisione del metodo viene considerata come ripetibilità e precisione intermedia.

La ripetibilità esprime il grado di precisione dei risultati analitici, quando la procedura analitica in esame è applicata ripetutamente su uno stesso campione omogeneo in un breve periodo di tempo.

La precisione intermedia esprime il grado di precisione dei risultati analitici, quando la procedura analitica in esame è applicata ripetutamente su uno stesso campione omogeneo eseguita in un periodo differente, da un'analista differente e/o utilizzando uno strumento differente.

La verifica della ripetibilità è stata effettuata, con 3 sessioni di analisi (3 repliche per ciascuno dei 3 livelli di concentrazione di proclorperazina corrispondenti al 80%, 100% e 120% del valore di specifica) per 3 giorni differenti. Per ciascuna delle 3 sessioni è stata eseguita la media dei recuperi ottenuti delle 3 repliche e la deviazione standard percentuale.

Le tre sessioni di analisi sono state svolte da due operatori diversi per la stima della precisione intermedia. E' stata eseguita la media dei recuperi sulle 9 repliche complessive effettuate per ciascuno dei tre livelli di concentrazione e la deviazione standard percentuale.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad s = SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad RSD\% = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

dove:

\bar{x} = media dei valori delle iniezioni

x_i = valore dell'iniezione i-esima

s = deviazione standard

n = numero delle determinazioni

	Recovery % e ripetibilità			Precisione intermedia
	Giorno 1 (A)	Giorno 2 (A)	Giorno 3 (B)	
Accuratezza livello 1 (80%)	73,71	81,21	69,87	-
	70,03	77,81	70,41	
	69,74	77,33	70,00	
Media recovery %	71,16	78,78	70,09	73,35
Deviazione Standard	2,21	2,12	0,28	4,38
RSD%	3,11	2,69	0,41	5,98
Accuratezza livello 2 (100%)	75,49	77,01	70,88	-
	71,18	77,14	65,33	
	70,63	81,03	76,68	
Media recovery %	72,43	78,39	70,96	73,93
Deviazione Standard	2,66	2,28	5,68	4,77
RSD%	3,67	2,91	8,00	6,45
Accuratezza livello 3 (120%)	83,18	81,95	68,93	-
	81,65	79,55	72,90	
	82,29	83,67	69,71	
Media recovery %	82,37	81,72	70,52	78,20
Deviazione Standard	0,77	2,07	2,11	5,97
RSD%	0,93	2,53	2,99	7,64
Media recovery globale %	75,16			
Deviazione Standard	5,36			
RSD%	7,13			

Tabella 14. Dati sperimentali ripetibilità e precisione intermedia

Parametro	Criterio di accettazione
Recovery (%)	≥ 70
RSD (%)	≤ 30

Tabella 15. Criteri di accettazione precisione

5.7.Range

Il range di una procedura analitica è l'intervallo fra la più bassa e la più alta concentrazione di analita nel campione in cui è stato dimostrato che la procedura analitica abbia un livello accettabile di precisione, accuratezza e linearità.

Il range specifico è stato derivato da studi di linearità del metodo verificando che, nel range di linearità, il metodo oggetto di validazione sia anche accurato e preciso.

5.8.Stabilità

La ricerca tende a verificare il tempo limite entro il quale le soluzioni possano essere usate. La stabilità è stata svolta sugli swab utilizzati per la prova del recupero e sullo standard (working standard, WS).

Per la stabilità sugli swab, le prove sono state eseguite determinando la concentrazione della proclorperazina dopo recupero con swab dalla superficie testata (il quantitativo depositato di proclorperazina è pari al 100% del valore di specifica).

L'aggiunta del solvente di estrazione (acetonitrile) è stata effettuata dopo aver atteso rispettivamente 7 ore, 24 ore e 72 ore dal recupero della proclorperazina con swab. Per gli swab sono state perciò effettuate 4 prove a differenti timepoints. Per la valutazione della stabilità degli swab, per il calcolo del recovery, è stata confrontata la quantità di proclorperazina (μg) misurata dopo il recupero con swab con la quantità nota di proclorperazina depositata (μg) sulla superficie.

Per la verifica della stabilità dello standard è stata misurata la concentrazione di proclorperazina in uno standard (WS) ad intervalli di circa 8 ore dalla preparazione.

Per la verifica della stabilità della soluzione standard (working standard), è stato calcolato il valore di RSD sulla soluzione, relativo ad iniezioni consecutive.

Time point	Proclorperazina (μg)	Recovery %
T = 0	22,37	75,10
T = 7 h dopo il recupero con swab	23,44	78,69
T = 24 h dopo il recupero con swab	23,33	78,32
T = 72 h dopo il recupero con swab	24,72	82,97

Tabella 16. Risultati stabilità degli Swab

Time point	Area	RSD%
0.0	352486	1.7
1.0	339947	
2.0	336268	
3.0	342916	
4.0	340442	
5.5	333690	
7.0	339610	
8.0	332383	
9.0	337712	

Tabella 17. Risultati stabilità della soluzione standard.

$$R_{xi} (\%) = \frac{amount_{xi}}{amount_{x teor.}} \times 100$$

Dove:

Amount_{xi} = quantità in µg i-esima della soluzione misurata, della soluzione in esame

Amount_{x teor} = quantità teorica in µg della soluzione.

Parametro	Criterio di accettazione
Recovery (%)	≥ 70
RSD (%)	≤ 5

Tabella 18. Criteri di accettazione stabilità

5.9. Robustezza

La robustezza è la capacità di un metodo analitico di non essere influenzato da piccole, deliberate variazioni dei suoi parametri.

La presente tabella riassume i risultati delle prove effettuate, variando in modo opportuno le condizioni standard indicate, in modo da ottenere la serie di combinazioni specificate, per ciascuna delle quali è stata analizzata una soluzione di proclorperazina dopo recupero con swab dalla superficie testata (il quantitativo depositato di proclorperazina è pari al 100% del valore di specifica).

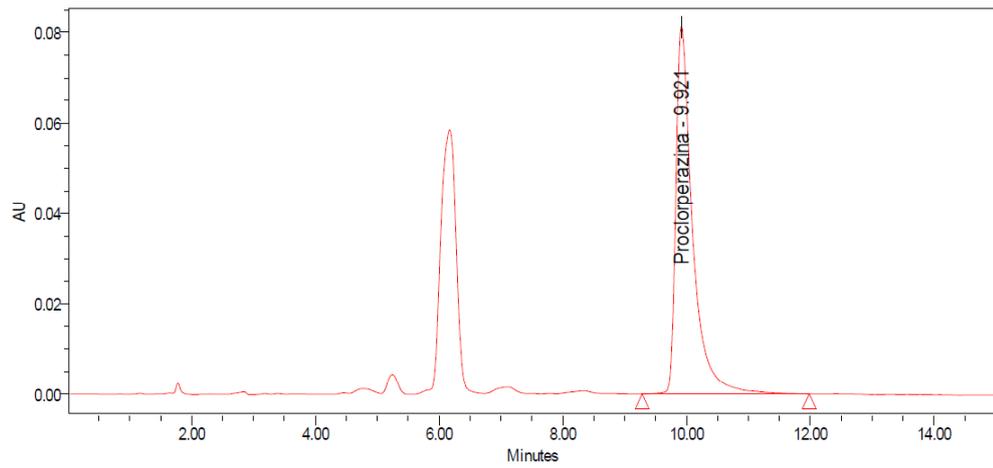
Dopo aver calcolato la quantità di proclorperazina (μg) recuperata con lo swab sulla superficie è stata calcolata la deviazione standard percentuale (RSD%) tra tutte le prove effettuate compresa quella della combinazione 0 (combinazione standard).

Parametro	Procedura standard	Modifica
Fase mobile	Acetonitrile/acqua 80:20 con aggiunta di 1 mL di dietilammina (per 1 Litro di fase mobile)	$\pm 5\%$ della percentuale di acetonitrile
Flusso (ml/min)	1 mL/min	$\pm 10\%$

Tabella 19. Condizioni standard, variazioni della fase mobile e del flusso

Combinazione parametri	Composizione fase mobile (ACN/H ₂ O)	Flusso (ml/min)
Combinazione 0 (standard)	ACN/H ₂ O 80:20	1
Combinazione A	ACN/H ₂ O 85:15	1,1
Combinazione B	ACN/H ₂ O 85:15	0,9
Combinazione C	ACN/H ₂ O 75:25	1,1
Combinazione D	ACN/H ₂ O 75:25	0,9

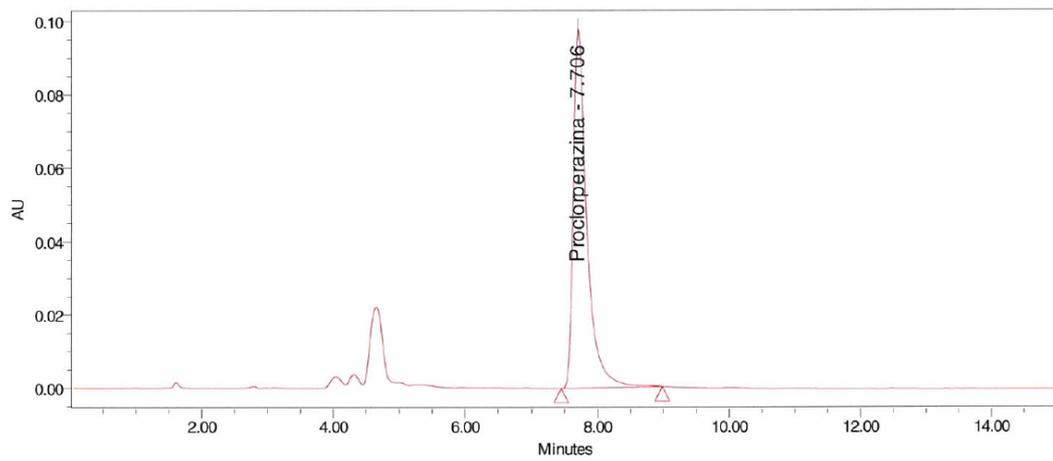
Tabella 20. Combinazione parametri per prove di robustezza.



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Proclorperazina	9.921	1527936	81351		

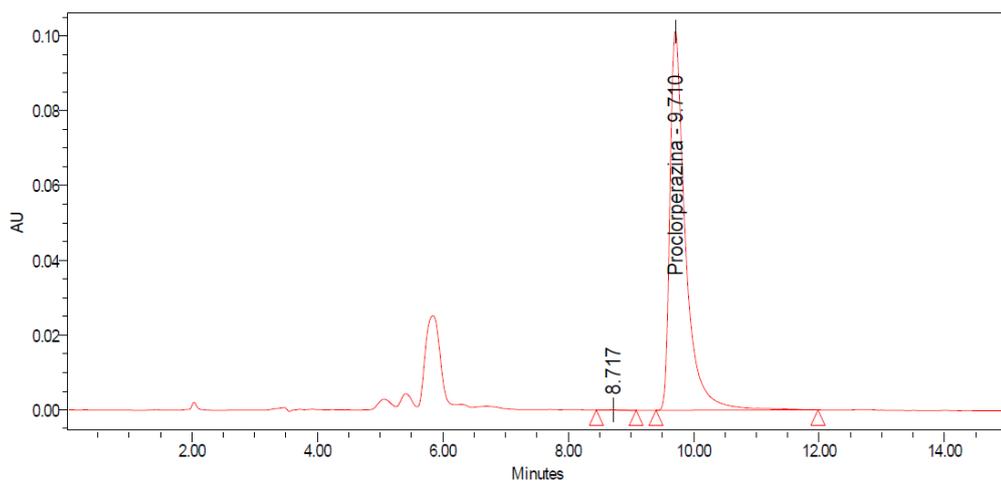
Cromatogramma 9. Combinazione 0



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Proclorperazina	7.706	1390618	98350		

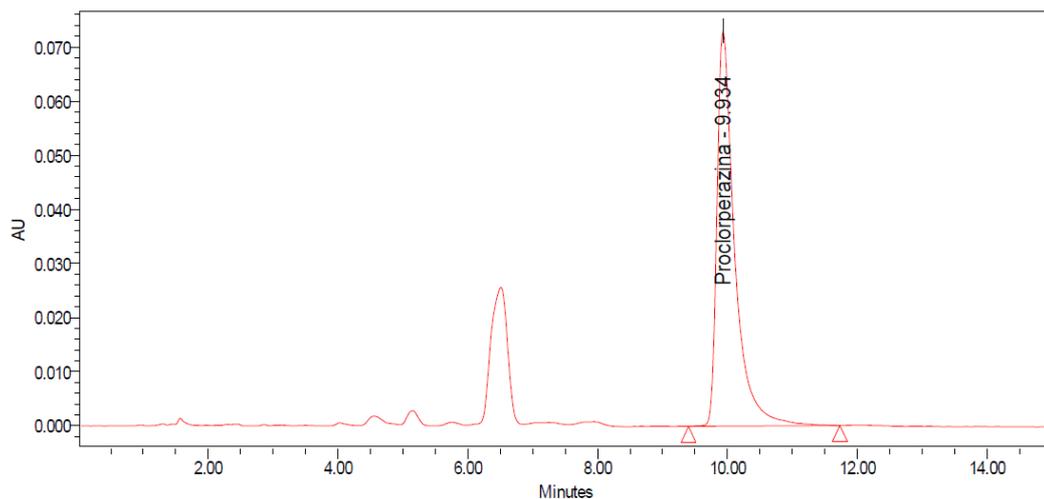
Cromatogramma 10. Combinazione A



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		8.717	2123	113		
2	Proclorperazina	9.710	1748756	101399		

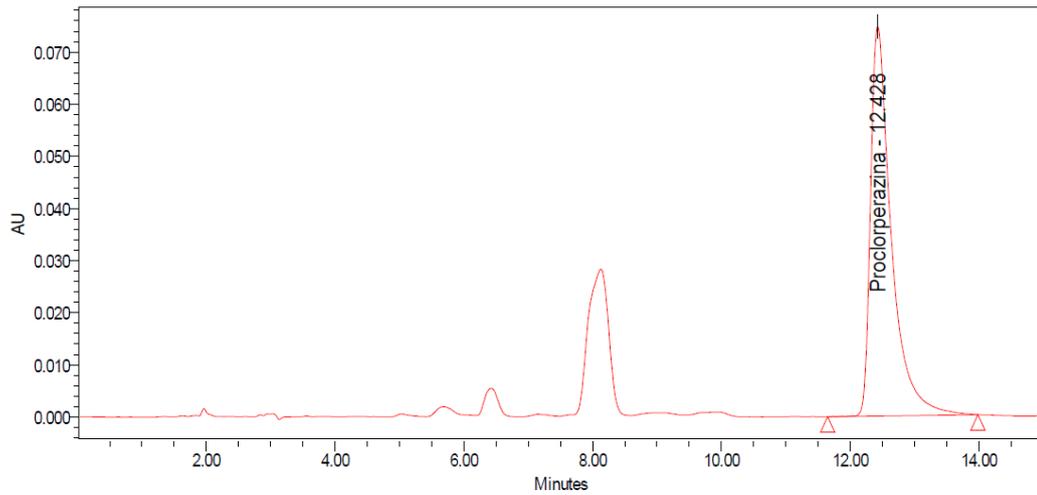
Cromatogramma 11. Combinazione B



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Proclorperazina	9.934	1382098	73053		

Cromatogramma 12. Combinazione C



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Proclorperazina	12.428	1670306	74759		

Cromatogramma 13. Combinazione D

In tutti i cromatogrammi, nel profilo cromatografico dello swab, non sono stati osservati picchi interferenti con l'analita di interesse, ne` variazioni rilevanti nella quantificazione dello stesso.

Combinazione	Combinazione parametri	Quantità proclorperazina trovata (µg)
0 (standard)	ACN/H2O 80:20	24,14
	Flusso 1 mL/min	
A	ACN/H2O 85:15	24,88
	Flusso 1,1 mL/min	
B	ACN/H2O 85:15	24,72
	Flusso 0,9 mL/min	
C	ACN/H2O 75:25	25,16
	Flusso 1,1 mL/min	
D	ACN/H2O 75:25	24,41
	Flusso 0,9 mL/min	
Media	24,7	
Dev.std	0,40	
RSD%	1,61	

Tabella 21. Risultati robustezza

Parametro	Criteri di accettazione
RSD Swab (100%)	≤ 30
Swab (bianco)	Assenza picchi interferenti con l'analita nel profilo cromatografico

Tabella 22. Criteri di accettazione robustezza

6. CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati ottenuti, è possibile affermare che il metodo analitico oggetto della convalida, i cui dati sono riassunti nel sommario di seguito (vedi tabella 23), risulta essere lineare, accurato e preciso nell'intervallo 0,5–10 µg/ml (corrispondente a 2,5–50 µg/swab).

Le prove di stabilità relative agli swab e alla soluzione standard (working standard) hanno evidenziato che questi ultimi sono stabili rispettivamente per 72 ore e 9 ore. Di particolare interesse risulta la stabilità del campione (swab) per 72 ore, che permette di eseguire il campionamento sull'impianto in qualunque giorno, potendo comunque lasciar trascorrere il fine settimana per eseguire l'analisi.

La stabilità dello standard è invece tale da consentirne l'utilizzo dello stesso per l'intera giornata lavorativa senza che si renda necessario prepararlo nuovamente.

Le prove di robustezza hanno dimostrato che il metodo è robusto rispetto alle variazioni indotte dei parametri: composizione fase mobile ($\pm 5\%$ nella fase organica) e flusso ($\pm 10\%$).

Descrizione	Risultati	Criterio di accettazione
Specificità	Il profilo cromatografico del bianco swab non presenta picchi potenzialmente interferenti con l'analita di interesse.	Assenza di picchi interferenti in presenza del picco dell'analita.
Linearità	$R^2 = 0,9992$ $R^2 = 0,9915$ $R^2 = 0,9994$	$R^2 \geq 0,99$
Limite di rilevabilità e Limite di quantificazione	Il valore del LoQ è stato impostato come il punto più basso per il quale è stata valutata la linearità del metodo, e verificato mediante l'analisi di soluzioni a titolo noto. Il recovery% medio ottenuto è stato di 101,8%, con un RSD di 7,3%. Il valore di LoD è stato posto pari a circa 1/3 del valore di LoQ e verificato tramite l'analisi di una soluzione standard avente concentrazione prossima a quella impostata (circa 0,1 µg/mL).	LoQ: recovery medio nell'intervallo 90-110% RSD ≤ 10 LoD: il picco relativo all'analita di interesse deve essere apprezzabile
Accuratezza	I valori di recovery% relativi alle prove in triplo eseguite sui 3 livelli, per tre diverse sessioni analitiche, sono stati in tutti i casi superiori al 70%. Il valore medio riscontrato è stato 75,16%.	Recovery% ≥ 70%
Precisione (Ripetibilità e Precisione Intermedia)	I valori di RSD% relativi alle prove in triplo eseguite sui 3 livelli, per tre diverse sessioni analitiche, sono stati in tutti i casi inferiori al 30%. Il valore massimo riscontrato è stato 7,64%, il valore di RSD complessivo sui 3 giorni e 2 operatori è di 5,36%.	RSD% ≤ 30%
Stabilità delle soluzioni	Campioni di Swab al livello 100% sono stati analizzati dopo 7, 24, 72 ore. Il valore di Recovery dopo 72 ore è stato di 82,97%, pertanto il campione su swab è da ritenersi stabile per almeno 72 ore.	Il recovery% deve soddisfare i requisiti previsti per l'accuratezza (≥ 70%).
	Una soluzione di Working Standard (circa 1 µg/mL) è stata analizzata immediatamente dopo la preparazione e ad intervalli per circa 8 ore.	Il valore di RSD, calcolato sulla'area di una soluzione di Working Standard, relativo ad iniezioni consecutive deve essere ≤ 5%.
Robustezza	La robustezza è stata valutata relativamente a composizione fase mobile e flusso, sottoponendo ad analisi campioni di swab (bianco) e swab al livello 100%. In tutti i casi non sono stati osservati picchi interferenti. Il valore di RSD% calcolato è stato 1,6.	Non devono essere presenti picchi interferenti con quello dell'analita di interesse nel profilo cromatografico swab. Il valore di RSD% calcolato su tutte le prove eseguite deve essere ≤ 30 %.

Tabella 23. Sommario dei risultati ottenuti.

Bibliografia

- [1] ICH Q2(R1), Validation of analytical procedures, Current Step 4 version.
- [2] EUDRALEX - Volume 4 Good manufacturing practice (GMP) Guidelines, Annex 15, Luglio 2001.
- [3] EMA/CHMP/CVMP/SWP/169430/2012, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP), Guideline on setting health based exposure limits for use in risk identification in the manufacture of different medicinal products in shared facilities.
- [4] European Pharmacopoeia 8.0, Chromatographic separation techniques, 2.2.46.
- [5] European Pharmacopoeia 8.0, Liquid chromatography, 2.2.29.
- [6] European Pharmacopoeia 8.0, Prochlorperazine maleate, 07/2010:0244.
- [7] Rigamonti A., Fabris. L., La Fabbricazione Industriale Dei Medicinali, Ed. Esculapio II edizione, 2008.
- [8] Chromacademy, Theory Of Quantitative and Qualitative HPLC.
- [9] Walsh A., Cleaning Validation for the 21st Century: Overview of New ISPE Cleaning Guide, Pharmaceutical Engineering, November/December 2011, Vol. 31 No.6;
- [10] Walsh A., Ovais M., Altmann T., Sargent E., Cleaning Validation for the 21st Century: Acceptance Limits for Agredients (APIs), Pharmaceutical Engineering, July/August 2011.
- [11] Active Pharmaceutical Ingedients Committee, Guide to Cleaning Validation in API plants, Settembre 1999.
- [12] FDA, Guide To Inspections Of Validation Of Cleaning Processes, Luglio 1993.
- [13] www.waters.com
- [14] John W. Dolan, Why Do Peaks Tail, LC GC Europe September 2003.
- [15] Waters 2695 Separations Module, Operator's Guide.
- [16] Waters 2996 PDA Detector, Operator's Guide.

Desidero ringraziare i miei relatori, la professoressa Sabrina Taliani e il dottor Giuseppe Ceramelli, senza le cui guide questa tesi non esisterebbe.

Ringrazio il dottor Marco Benvenuti, Business Manager presso SGS Sertec, per avermi permesso di vivere l'esperienza della tesi in azienda.

Ringrazio il professore Federico Da Settimo, per la disponibilità e la collaborazione fornite.

Ringrazio gli analisti del laboratorio in cui ho svolto la tesi, per l'accoglienza e l'aiuto che mi hanno dato.