

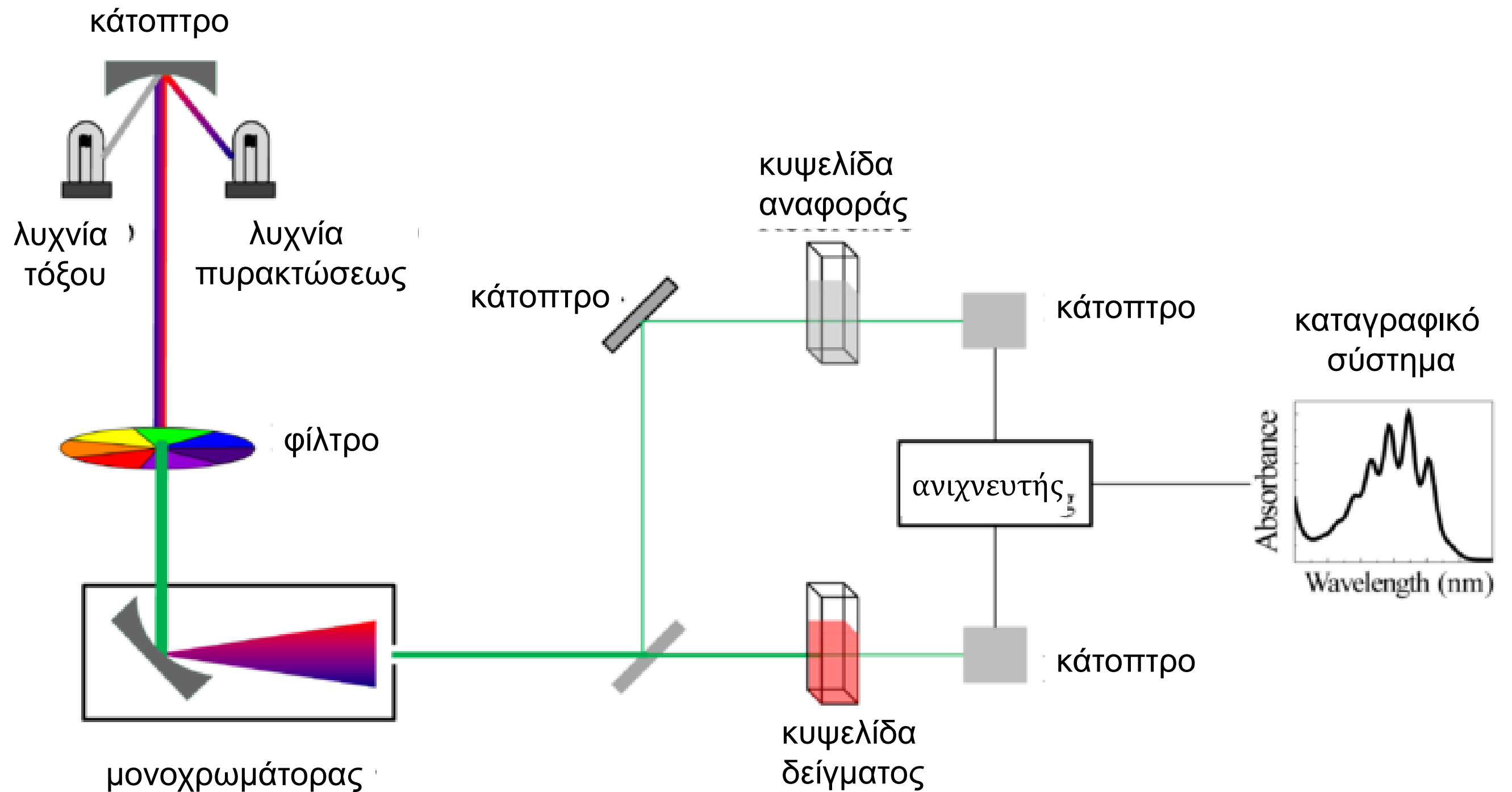


Ποσοτικοί προσδιορισμοί

- ο Αναλύσεις βασισμένες σε βαθμονόμηση με τουλάχιστον 5 std (εύρος $\pm 20\%$, $r > 0.95$)
- ο Ανάλυση με 1 std
- ο Ανάλυση με 1std και εσωτερικό πρότυπο



Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης



ΑΡΧΗ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑΣ

$$A_{std,\lambda i} = \varepsilon_{std,\lambda i} C_{std}$$

Νόμος Beer:

$$A = \log \frac{I_o}{I_1} = abc_{g/L} = \varepsilon bc_{mol/L} = A_{1cm}^{1\%} bc_{g/100mL}$$

A = απορρόφηση

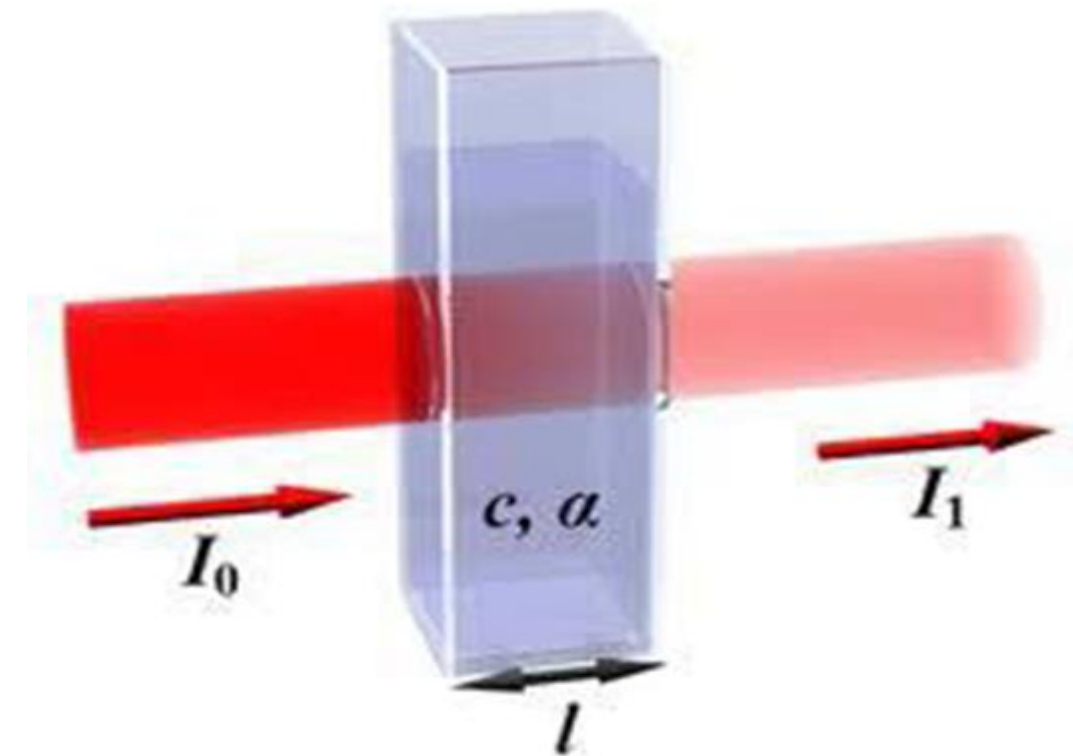
I_o = ισχύς προσπίπτουσας ακτινοβολίας

I_1 = ισχύς εξερχόμενης ακτινοβολίας

a = απορροφητικότητα (absorptivity)

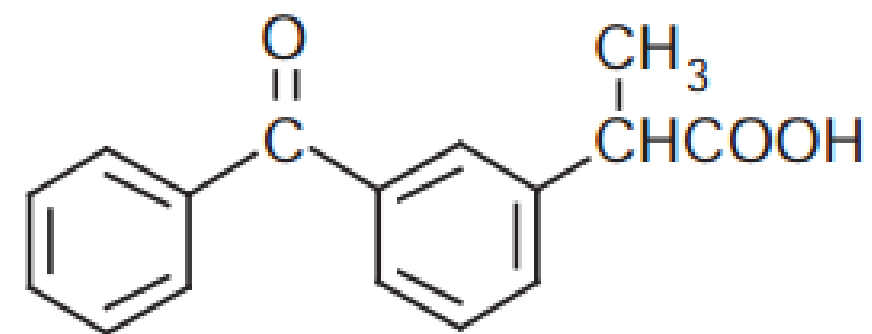
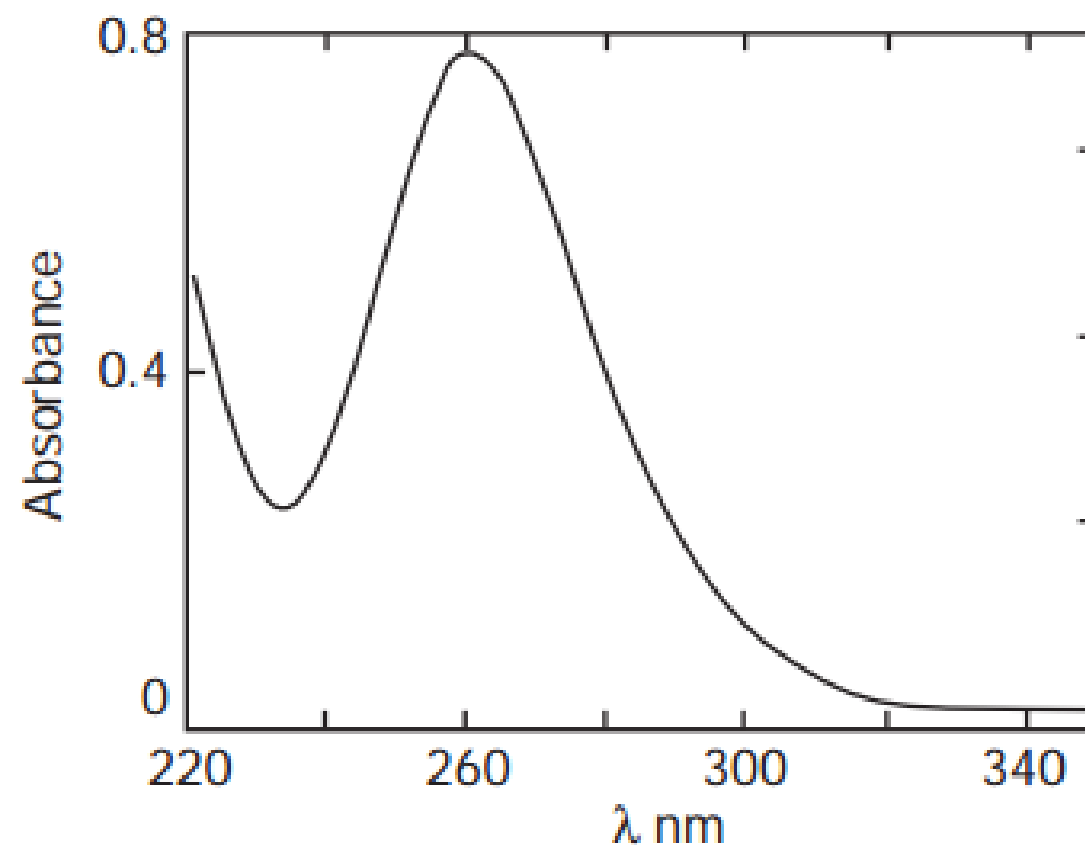
ε = μοριακή απορροφητικότητα

$E_{1cm}^{1\%}$ = Ειδικός συντελεστής απορρόφησης (1% w/v)



Τι καθορίζει την απορρόφηση στο UV;

Φάσμα απορρόφησης είναι η απεικόνιση της απορρόφησης (A) μιας ουσίας σε συνάρτηση με το μήκος κύματος (λ)



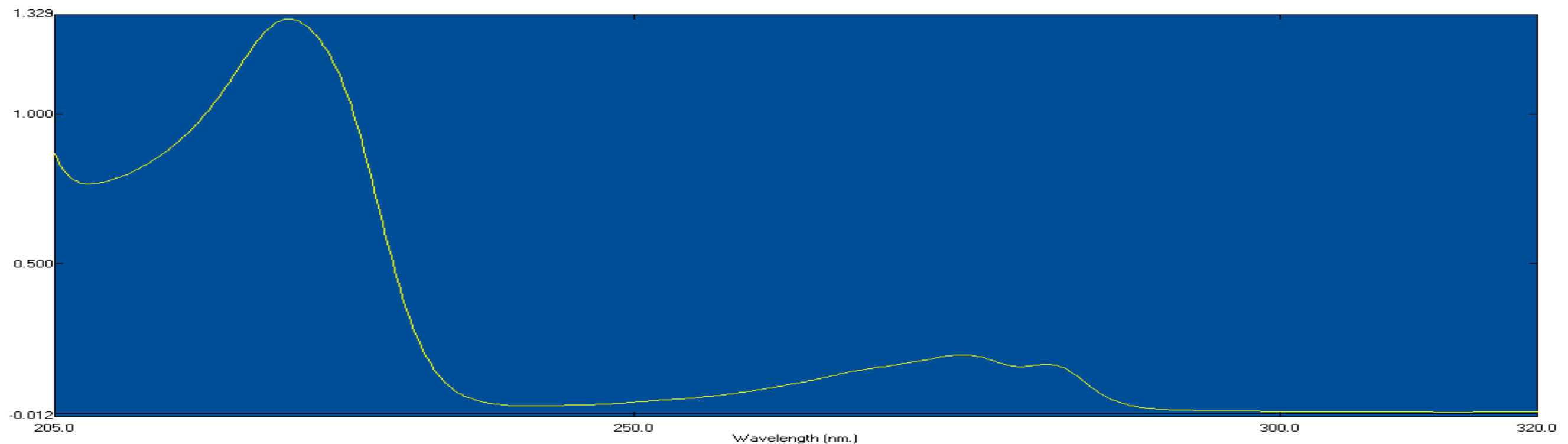
Ketoprofen

Φάσμα απορροφησης



ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ UV-VIS

Για μετρήσεις ενός προτύπου (Std), και ενός αγνώστου δείγματος (Sm), σε μήκος κύματος λ_i ($b=1\text{cm}$) ισχύει:



$$A_{std,\lambda_i} = \varepsilon_{std,\lambda_i} C_{std}$$



$$A_{Sm,\lambda_i} = \varepsilon_{Sm,\lambda_i} C_{Sm}$$

Διαίρεση κατά μέλη

$$\frac{A_{std}}{A_{sm}} = \frac{C_{std}}{C_{sm}} \rightarrow C_{sm} = \frac{A_{sm}}{A_{std}} \times C_{std}$$



Πράξεις στον υπολογισμό συγκέντρωσης αρχικού δείγματος χρησιμοποιώντας 1std

Τελική (C_{sm}) μετά την αραίωση

$$\frac{A_{std}}{A_{sm}} = \frac{C_{std}}{C_{sm}} \rightarrow C_{sm} = \frac{A_{sm}}{A_{std}} \times C_{std}$$

$$C_{sm} = C_{arx} \times \frac{(ml) \text{σιφωνιου}}{(ml) \text{τελικης φιαλης}} \quad (C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2)$$

Αρχική C



2ml



NaOH 0.1N

Τελική (C_{sm}) μετά την αραίωση

$$\Sigma.A. = \frac{\text{αρχική συγκέντρωση δείγματος}}{\text{τελική συγκέντρωση δείγματος}} = \frac{\text{όγκος (τελικής) φιάλης (ml)}}{\text{ml σιφωνίου}}$$



Εφαρμογές HPLC σε ποσοτικές αναλύσεις φαρμάκων

- ο Αναλύσεις βασισμένες σε βαθμονόμηση με τουλάχιστον 5 std (εύρος $\pm 20\%$, $r > 0.95$)
- ο Ανάλυση με 1 std
- ο Ανάλυση με 1std και εσωτερικό πρότυπο



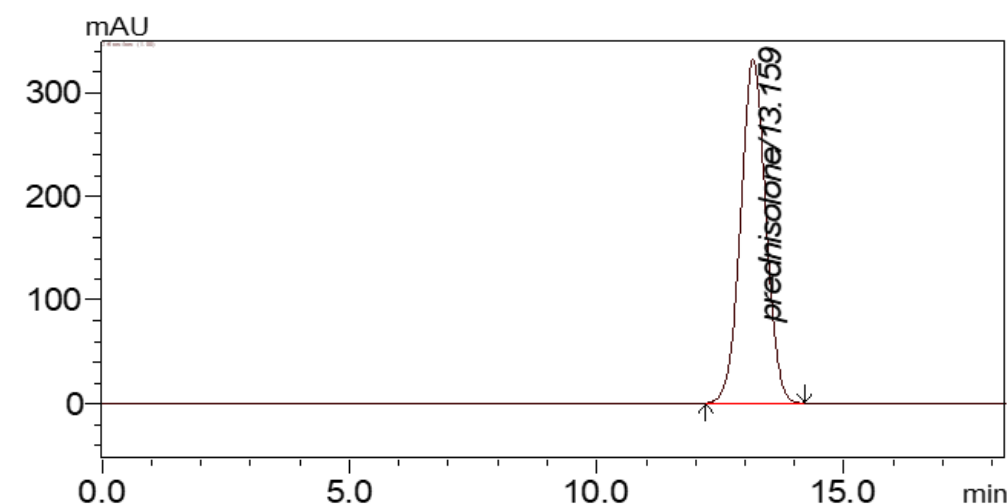
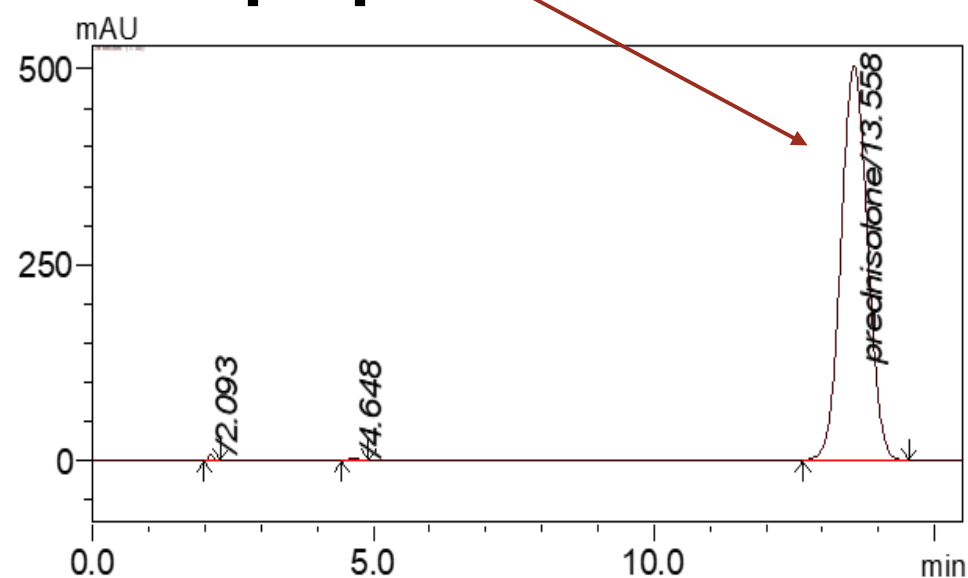
HPLC-UV

Για μετρήσεις ενός προτύπου (Std), και ενός αγνώστου δείγματος (Sm), σε μήκος κύματος λ_i ($b=1\text{cm}$) ισχύει :

$$A_{std,\lambda_i} = \varepsilon_{std,\lambda_i} C_{std}$$

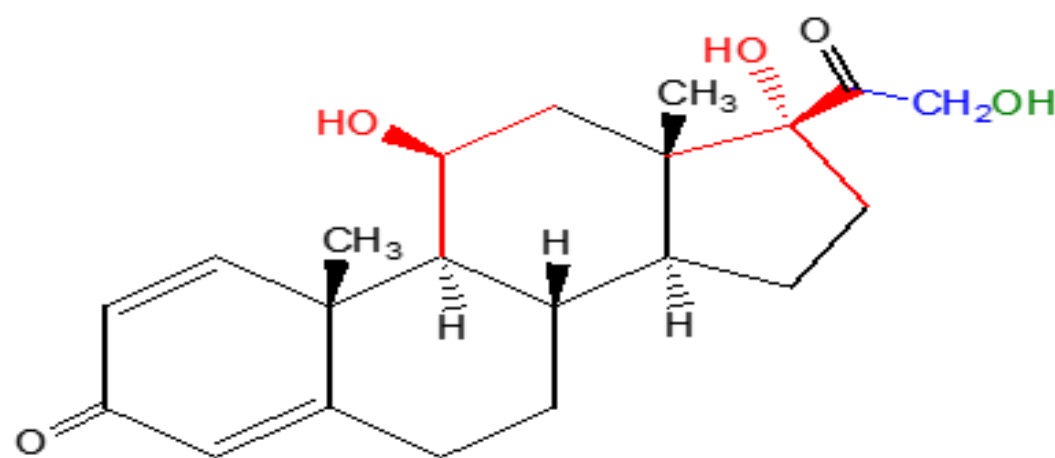
$$A_{Sm,\lambda_i} = \varepsilon_{Sm,\lambda_i} C_{Sm}$$

A:Εμβαδά κορυφών



Διαίρεση κατά μέλη

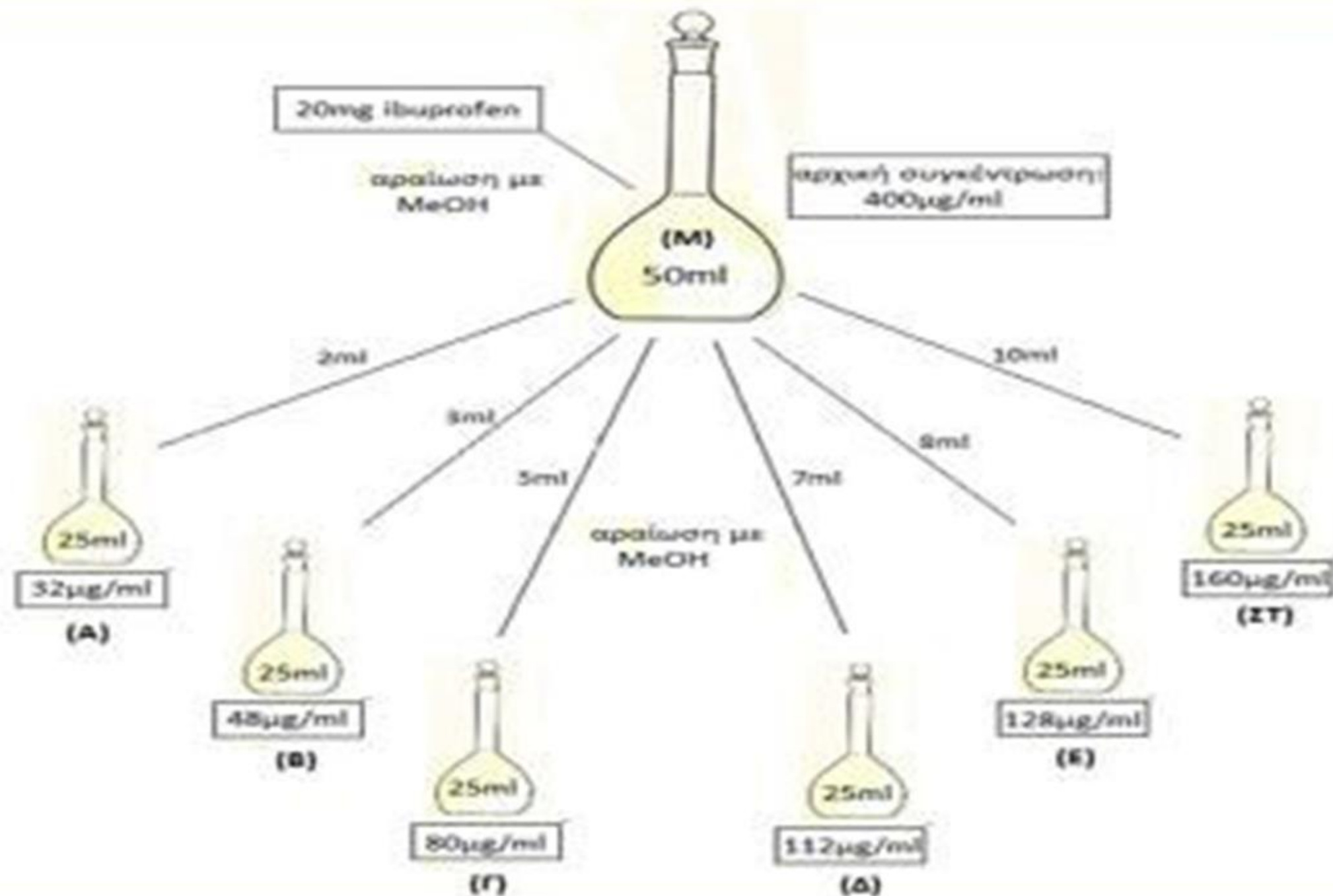
$$\frac{A_{std}}{A_{Sm}} = \frac{C_{std}}{C_{Sm}} \rightarrow C_{Sm} = \frac{A_{Sm}}{A_{std}} \times C_{std}$$



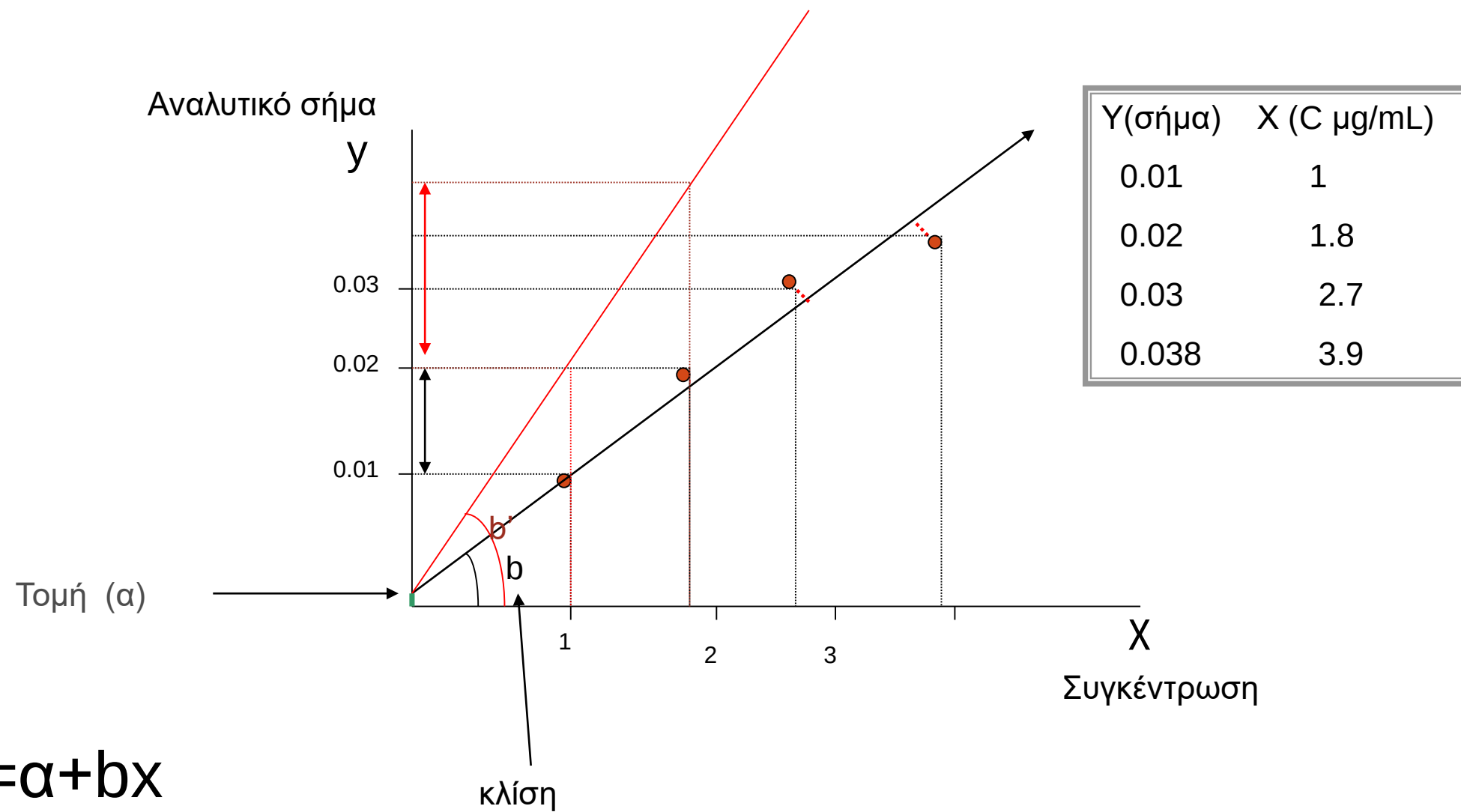
prednisolone



Πρότυπα διαλύματα καμπύλης αναφοράς



ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ



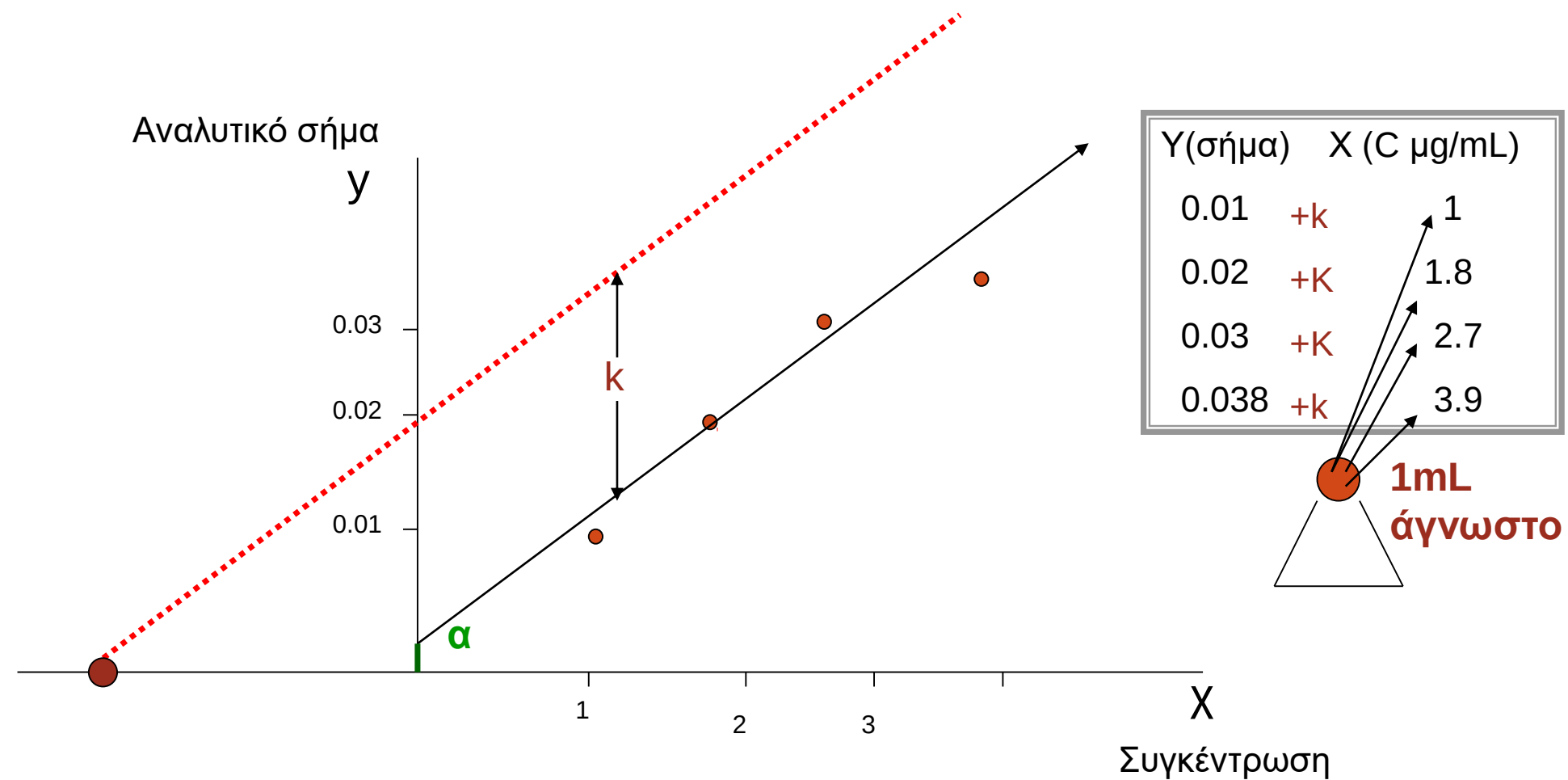
$$y = \alpha + bx$$

Όπου το α δηλώνει το σφάλμα της μεθόδου

Το b δηλώνει την ευαισθησία



ΠΡΟΣΘΕΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ



$y = \alpha + bx$ (κανονική καμπύλη αναφοράς που περιέχει το σφάλμα μεθόδου)

$y = k + \alpha + bx$ (καμπύλη προσθετικής που περιέχει και το σφάλμα της μεθόδου)

$y = k + bx$ (καμπύλη προσθετικής δίχως το σφάλμα) για $y=0$ έχουμε $0 = k + bx$ ή $x = -k/\beta$





Πρότυπα διαλύματα



Διάλ. παρακαταθήκης

100mg κορτιζόλης



5 ml

25 ml

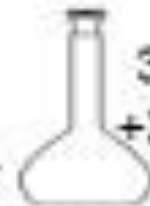


100 ml

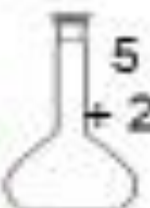
Τελικά διαλύματα



2 ml κορτιζόλης
+2ml IS



3 ml κορτιζόλης
+2ml IS



5 ml κορτιζόλης
+2ml IS



10 ml κορτιζόλης
+2ml IS

50 mg
Εσωτερικού προτύπου



3 ml

25 ml



50 ml

2ml



Πράξεις

$$\frac{A_{std}/A_{int.std}}{A_{sm}/A_{int.std}} = \frac{C_{std}}{C_{sm}}$$



Concentration determination from Calibration Curve

참고

: A fixed amount of the internal standard species is added to all samples, standards, and blanks.

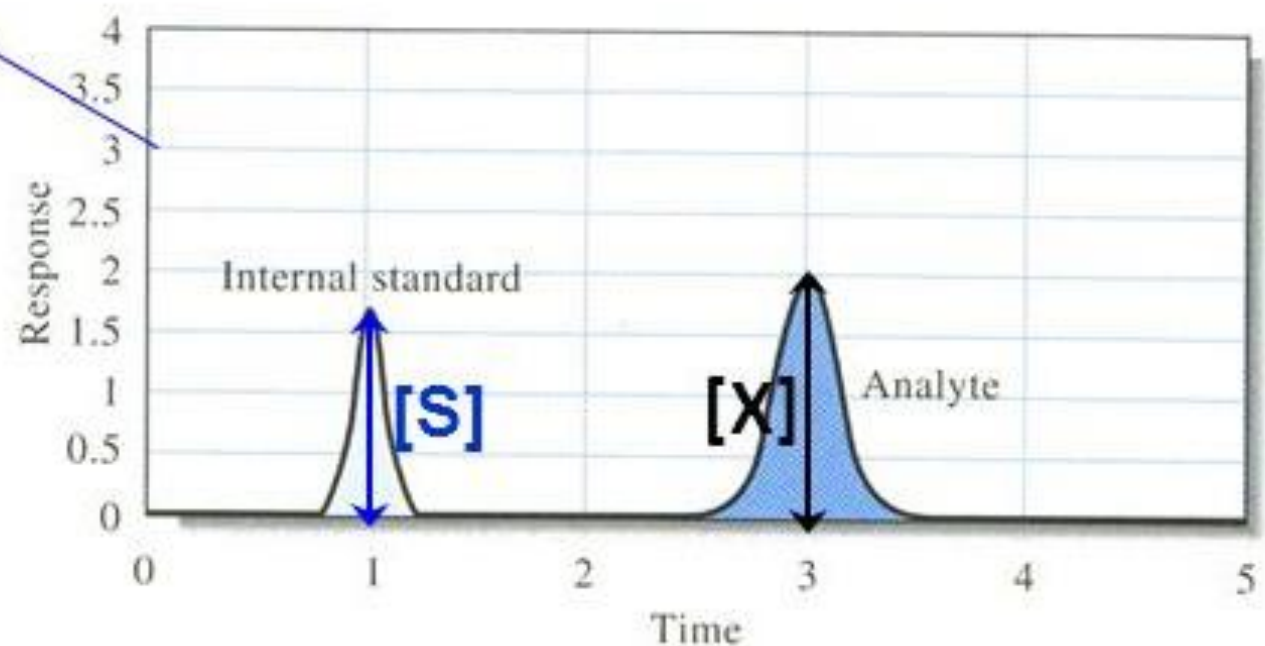
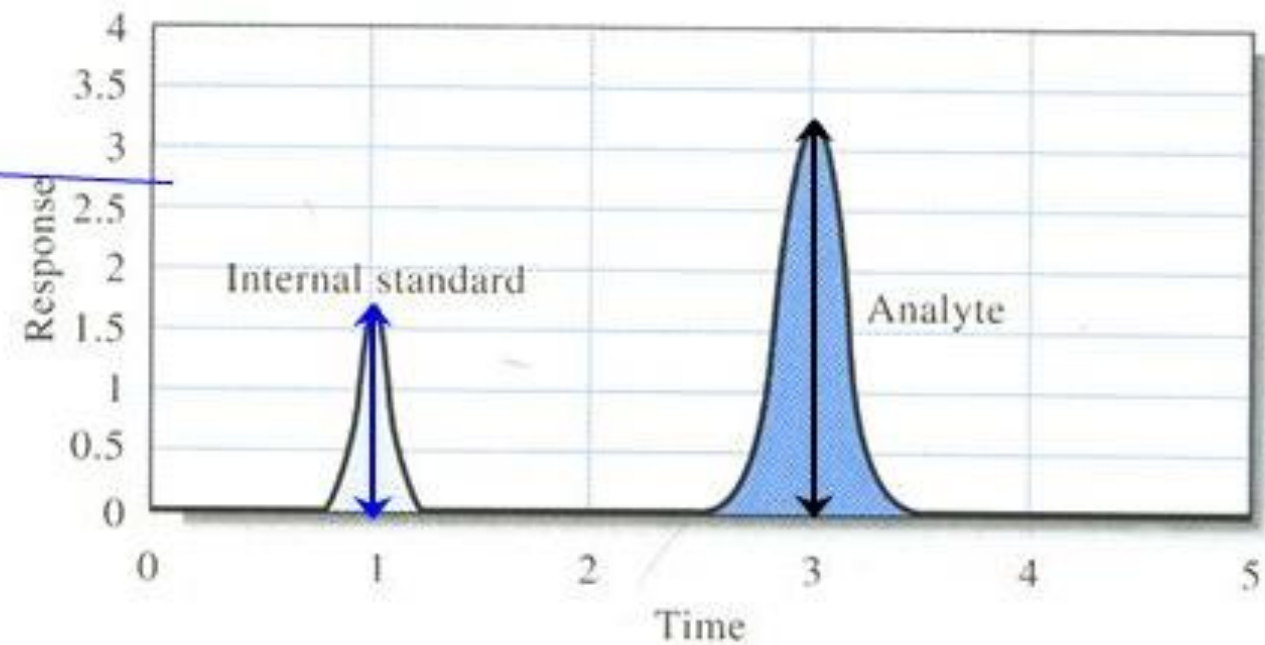
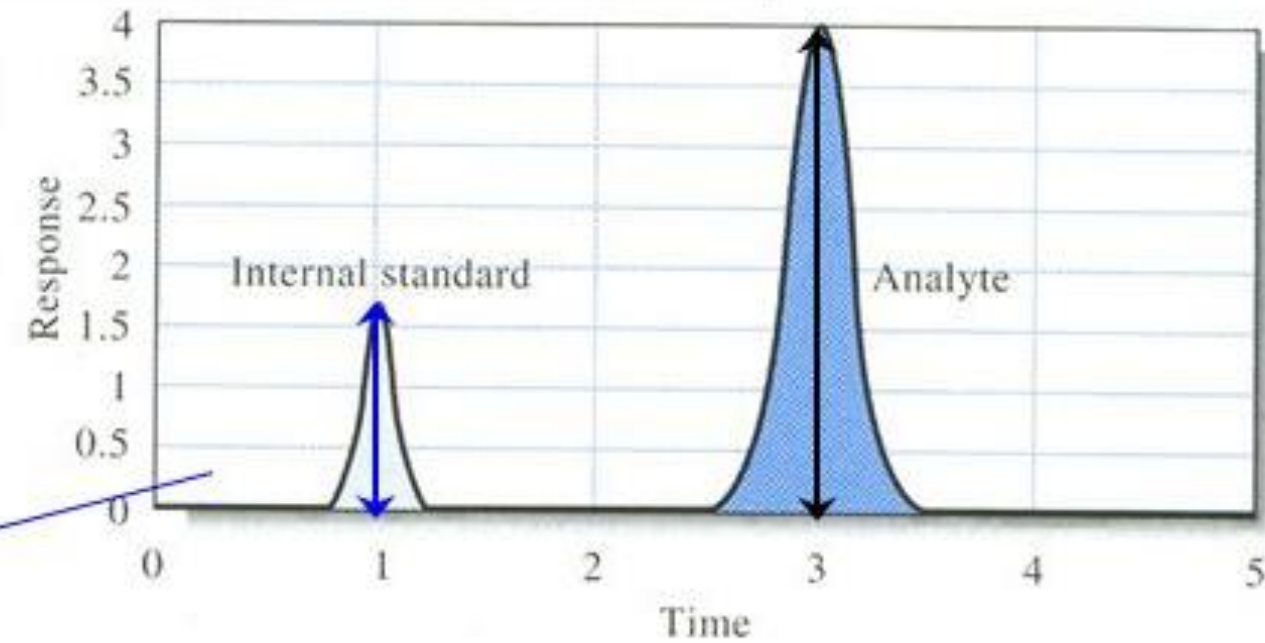
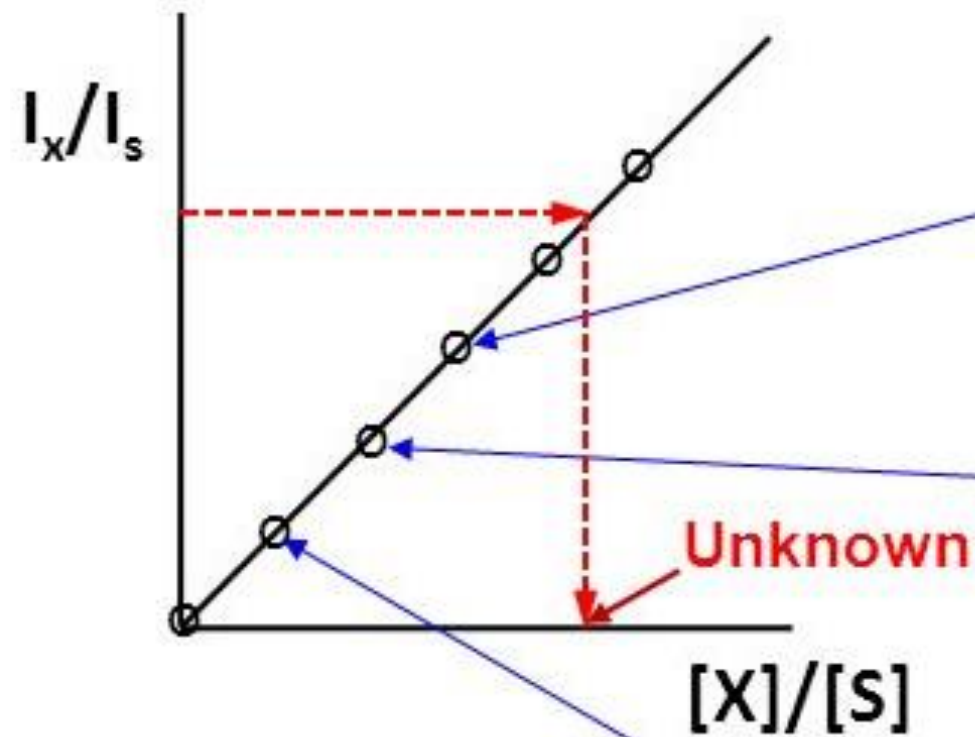


Figure 8-12 Illustration of the internal standard method. A fixed amount of the internal standard species is added to all samples, standards, and blanks. The calibration curve plots the ratio of the analyte signal to the internal standard signal against the concentration of the analyte.



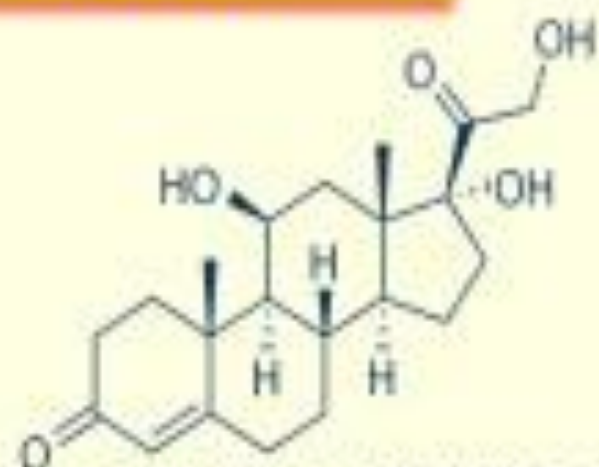
100% Εμβαδόν κορτιζόλης =100
 Εμβαδ. Εωτερ. Πρότυπης =50 $100/50=2$

80% Εμβαδόν κορτιζόλης =80
 Εμβαδ. Εωτερ. Πρότυπης =40 $80/40=2$

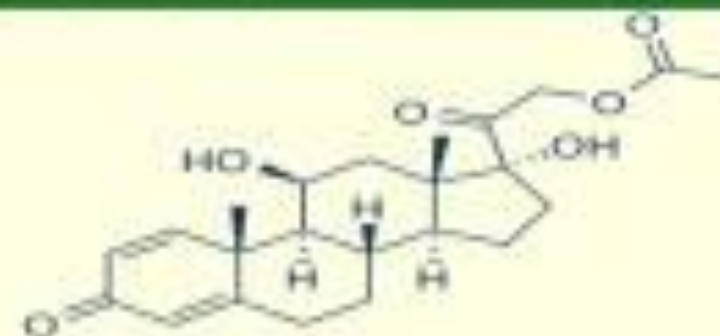


Εσωτερική πρότυπος ουσία

Κορτιζόλη



Οξική πρεδνισολόνη:



- ανήκει στην κατηγορία των κορτικοστεροειδών ορμονών.
- έχει ανάλογη χημική δομή.
- παρουσιάζει παραπλήσιες φυσικοχημικές ιδιότητες.
- παρουσιάζει παρόμοια χρωματογραφική συμπεριφορά.
- δεν εκλύεται σε χρόνο πολύ διαφορετικό από αυτόν της προσδιοριζόμενης ουσίας.
- δεν βρίσκεται στα προς ανάλυση δείγματα.



ΜΟΝΑΔΕΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ

- %v/v, 30:70 (mL)
- %w/w 30:70 (gA/100g B)

π.χ $10\text{mg/g} = 0.01\text{g/g} = 1\text{g}/100\text{g} = 1\%\text{w/w}$

- %w/v (g/100mL)
- ppm 1μέρος A/1000000μέρη B

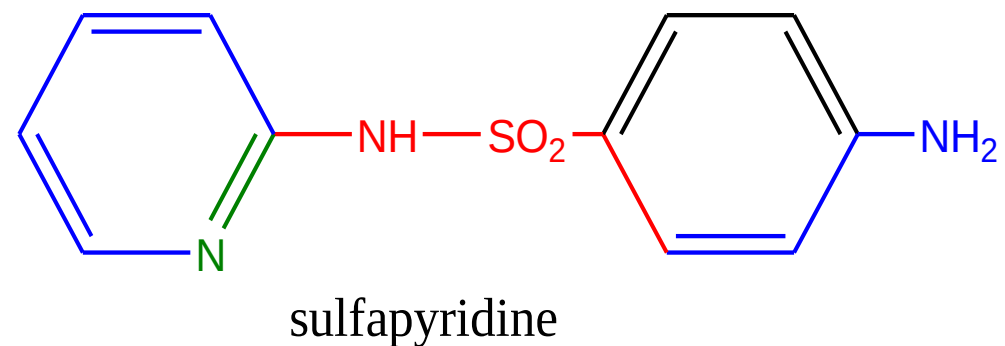
π.χ $2\mu\text{g στα } 3\text{g} = 2\mu\text{g στα } 3.000.000\mu\text{g} = 2/3\mu\text{g στα } 1000000\mu\text{g} = 2/3\text{ppm}$

*π.χ $1\text{ppm} = 1\text{g στα } 1000000\text{g} = 1/10000\text{g στα } 100\text{g}$
 $= 0.0001\text{g}/100\text{g} = 0.0001\%\text{w/w}$*

- Molarity Molar ή M = MBg/L
mMolar ή mM = MBmg/L ή MBμg/mL
μMolar ή μM = MBμg/L ή MBng/mL



ΕΚΧΥΛΙΣΗ



(βάση) $pK_a = 5$

➤ Σε δισκίο (στερεού-υγρού)

Συνήθως η ουσία ιονίζεται στο κατάλληλο pH (όξινο) και παραλαμβάνεται με υδατικό διαλύτη

➤ Σε υδρόφιλο σιρόπι (στερεού-υγρού)

Συνήθως η ουσία διατηρείται σε μη ιονιζόμενη μορφή pH (αλκαλικό) και παραλαμβάνεται με οργανικό μη πολικό διαλύτη διαλύτη που δεν αναμιγνύεται με το σιρόπι

➤ Σε αλοιφή (στερεού-υγρού)

Συνήθως η ουσία ιονίζεται στο κατάλληλο pH (όξινο) και παραλαμβάνεται με πολικό οργανικό ή υδατικό διαλύτη



Έλεγχος καταλληλότητας αναλυτικού συστήματος(system suitability)

Σχετίζεται με τον έλεγχο καλής απόδοσης του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται κατά την διάρκεια μιας ανάλυσης π.χ έλεγχος καλής λειτουργίας του HPLC ή έλεγχος καλής λειτουργίας μιας χρωματογραφικής στήλης :

- Με υπολογισμό της %RSD με 5 ή 6 επαναλήψεις
- Με έλεγχο των τιμών ορισμένων χρωματογραφικών παραμέτρων

Διαδικασίες που απαιτούνται κατά την επικύρωση (validation) μιας μεθόδου

- Έλεγχος Αξιοπιστίας της μεθόδου
- Καθορισμός ορίου ανίχνευσης/ποσοτικοποίησης
- Καθορισμός της περιοχής συγκ. που έγινε οι ανάλυση
- Στοιχεία για την γραμμικότητα (κλίση, τομή, συντ. συσχέτισης)
- Έλεγχος ανθεκτικότητας
- Έλεγχος εκλεκτικότητας

Βαθμονόμηση αναλυτικών οργάνων

Περιεχόμενο Αναλυτικής Διαδικασίας

- Την ποιότητα και προέλευση του προτύπου αναφοράς (standard)
- Την ποιότητα /προετοιμασία αντιδραστηρίων και διαλυτών
- Την πορεία παρασκευής των προτύπων διαλυμάτων
- Την οργανολογία
- Την μεθοδολογία, διαδικασία ανάλυση



Χρήση Αναλυτικής Διαδικασίας

- Ελέγχους ρυθμού διάλυσης/διαλυτοποίησης
- Ελέγχους οπιομορφίας δόσης
- Ελέγχους ποιοτικού ποσοτικού προσδιορισμού δραστικής στο σκεύασμα



- **USP 23 <621>**

- **System Suitability Requirements**

<u>Parameters</u>	<u>Recommendations</u>
K'	In general $k' \geq 2.0$
R	$R > 2$, between the peak of interest and the closest potential interferent (degradant, internal STD, impurity, excipient, etc.....)
T	$T \leq 2$
N	In general $N > 2000$
Repeatability	$RSD \leq 2.0\%$ ($n \geq 5$)





Published Validation Guidelines

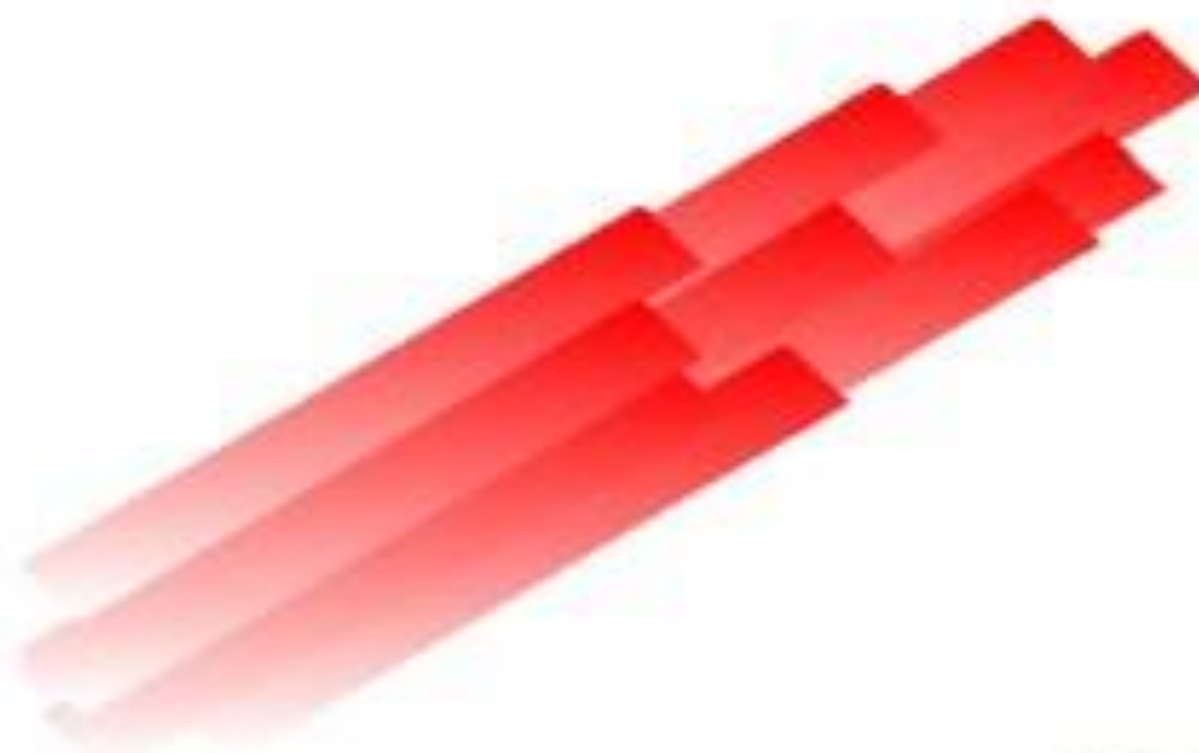
- 1978 Current Good Manufacturing Practices (cGMPs)
- 1987 FDA Validation Guideline
- 1989 Supplement 9 to USP XXI
- 1994 Center of Drug Evaluation and Research CDeR, Reviewer Guidance:
Validation of Chromatographic Method
- 1995 ICH Validation Definitions:
Q2A, Text on Validation of Analytical procedures
- 1997 ICH Validation Methodology:
Q2B, Validation of Analytical Procedures: Methodology
- 1999 Supplement 10 to USP 23 <1225>: Validation of Compendial Methods
- 1999 CDER "Bioanalytical Method Validation for Human Studies"
- 2000 CDER Draft "Analytical Procedures and Method Validation"





Guidance for Industry

ICH Q1,2A Validation of Analytical Procedures: Methodology



November 1996
ICH



Επικύρωση Αναλυτικής μεθόδου

➤ Αξιοπιστία μεθόδου (ακρίβεια , πιστότητα)

➤ Αναλυτικό λευκό (Blank)

➤ Όριο ανίχνευσης, LOD(Limit of Detection) ➡

$$\chi - \chi_b = 3S_b$$

➤ Όριο ανίχνευσης, LOQ(Limit of Quantitation) ➡

$$\chi - \chi_b = 10S_b$$

➤ Ανθεκτικότητα: *Ελέγχει την αξιοπιστία σε διακυμάνσεις της μεθόδου* (Robustness)

➤ Εκλεκτικότητα (Selectivity): *εκφράζει την μέγιστη συγκ. παρουσίας προσμίξεων (σφάλμα 5%)*

➤ Αναλυτική περιοχή συγκεντρώσεων(Range) *70-130% της δηλούμενης περιεκτικότητας*

➤ Ευαισθησία μεθόδου

➤ Γραμμικότητα



TABLE

TYPE OF ANALYTICAL PROCEDURE; CHARACTERISTICS	IDENTIFICATION	TESTING FOR IMPURITIES		ASSAY; dissolution (measurement only); content/potency
		Quantitation	Limit	
Accuracy	-	+	-	+
Precision				
Repeatability	-	+	-	+
Intermediate Precision	-	+ ¹	-	+ ¹
Specificity ²	+	+	+	+
Detection Limit	-	- ³	+	-
Quantitation Limit	-	+	-	-
Linearity	-	+	-	+
Range	-	+	-	+

NOTE: - signifies that this characteristic is not normally evaluated; + signifies that this characteristic is normally evaluated.

¹ In cases where reproducibility (see Glossary) has been performed, intermediate precision is not needed.

² Lack of specificity of one analytical procedure could be compensated by other supporting analytical procedure(s).

³ May be needed in some cases.



Έλεγχος Αξιοπιστίας Αναλυτικής διαδικασίας

- Πιστότητα /επαναληπτικότητα (precision)



- Ακρίβεια (Accuracy)



ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΙΣΤΟΤΗΤΑΣ

- ❖ *Επαναληψιμότητα (Repeatability or intra assay)*
Ίδιο άτομο, όργανο και συνθήκες, σε βραχύ διάστημα
 - *Απόδοση οργάνου $<\pm 1\%$,*
 - *Απόδοση μεθόδου επεξεργασίας δειγμάτων*
π.χ. πρώτη ύλη (5 X 5 μετρήσεις), βιολογικά υγρά
- ❖ *Ενδιάμεση Πιστότητα (Intermediate Precision or inter day assay)*
διαφορετικοί αναλυτές, διαφορετικές μέρες, εξοπλισμό
- ❖ *Αναπαραγωγιμότητα (Reproducibility)*
Σε διαφορετικά εργαστήρια



Έλεγχος Αξιοπιστίας



➤ Πιστότητα ή επαναληπτικότητα

Εκφράζει την εγγύτητα συμφωνίας μια σειράς αναλύσεων που ελήφθησαν από πολλαπλή δειγματοληψία του ιδίου δείγματος

Η τυπική (σταθερή) απόκλιση (s) (standard deviation) για μικρό αριθμό μετρήσεων ορίζεται από τη σχέση:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

S^2 Διασπορά ή διακύμανση

S Τυπική απόκλιση

όπου η ποσότητα $N - 1$ ονομάζεται βαθμοί ελευθερίας.

Όμως, για μεγάλο αριθμό μετρήσεων ($N > 20$) η μέση τιμή πλησιάζει την πραγματική τιμή και η παραπάνω σχέση γράφεται ως

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2}{N}}$$



$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{N}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}}$$

Τυπική απόκλιση της μέσης τιμής ή τυπικό σφάλμα (standard error)

$$\%RSD = \frac{S}{\bar{x}} 100$$

Η % Σχετική Τυπική Απόκλιση (Relative Standard Deviation), που συνήθως συμβολίζεται ως RSD% είναι γνωστή και ως συντελεστής μεταβλητότητας (coefficient of variation, CV).



➤ Ακρίβεια (Accuracy)

$$A) E_1 = x - \mu, \quad \text{ή} \quad E_2 = (x - \mu) / \mu$$

Όπου E_1 : απόλυτο σφάλμα,

E_2 : σχετικό σφάλμα

x : μεμονωμένη τιμή, μέση τιμή (trueness) και διάμεση

μ : πραγματική τιμή

B) % Ανάκτηση (Recovery)

Π.χ σκεύασμα δηλώνεται ότι περιέχει 0.95% w/v εφεδρίνη, βρέθηκε στα 30mL ότι περιέχει 278mg και ζητείται το σφάλμα στο % της δηλούμενης περιεκτικότητας σε εφεδρίνη

$$0.95\%w/v = 0.95\text{gr}/100\text{ml} = 950\text{mg}/100\text{ml}$$

Στα 30ml σκευάσματος περιέχονται 278mg εφεδρίνης

$$x = 278 \times 100/30$$

Στα 100ml

$x?$

Το 100% είναι το 950m

x ; είναι το $(278 \times 100/30)$



Έλεγχος Σφαλμάτων Μεθόδου



Είδη: α) Χονδρικό σφάλμα (gross)

β) Συστηματικό (systematic) ή καθορισμένο

γ) Τυχαίο (random)

Συστηματικό ή καθορισμένο Σφάλμα

(μονοκατευθυνόμενο)

Είδη: 1) Σταθερά

2) Αναλογικά

3) Σύνθετα

$$x_i = \alpha \cdot \mu_i + \beta$$

Όπου: το β δηλώνει το καθορισμένο σφάλμα

το $(\alpha - 1) \times 100$ δηλώνει το % σχετικό αναλογικό σφάλμα.



ΑΙΤΙΕΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟΥ ΣΦΑΛΜΑΤΟΣ

- Σφάλματα μεθόδου

(ελλιπής αντίδραση, απώλεια δραστηκής κατά τον καθαρισμό ή εκχύλιση, συγκαθίζηση προσμίξεων με την ουσία, η μη ταύτιση αλλαγής του χρώματος με το ισοδύναμο σημείο σε μια ογκομετρική αντίδραση)

- Σφάλματα οργάνων

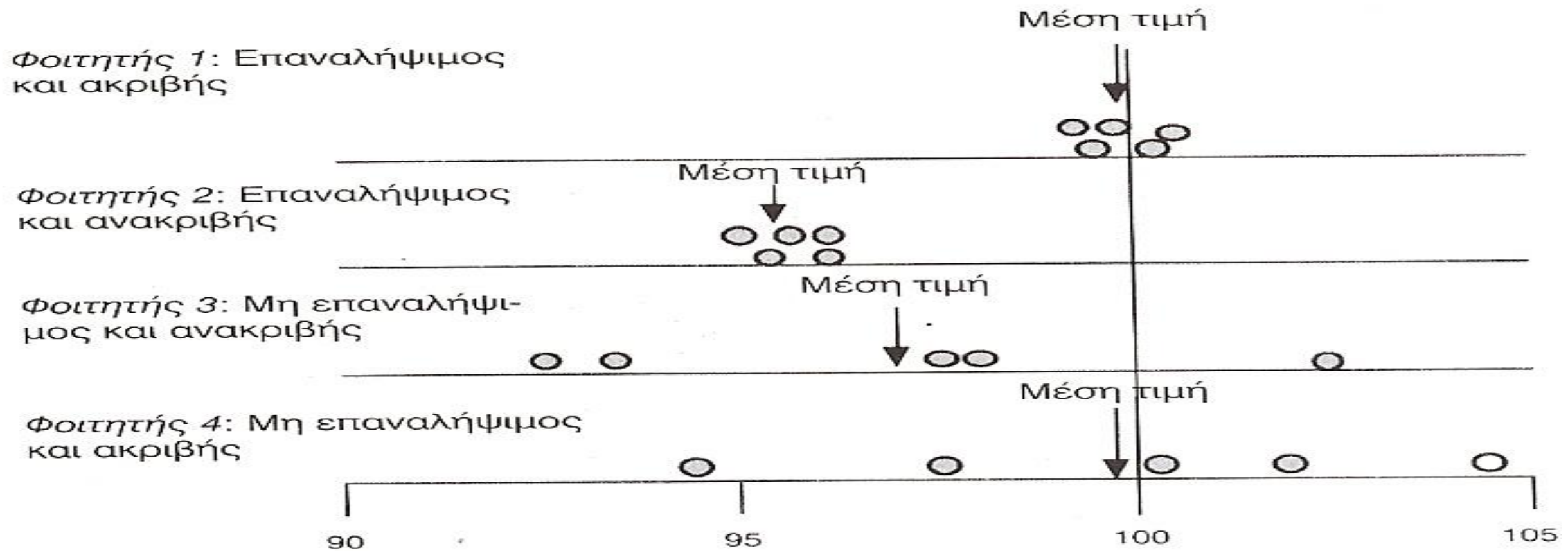
(μη σωστή ή έλλειψη βαθμονόμηση σκευών: ζυγού, πεχαμέτρων)

- Προσωπικά σφάλματα

(αχρωματοψία αναλυτή, ζύγιση θερμού χωνευτηρίου, θέση μηνίσκου προχοίδας)



Σχηματική απεικόνιση της Ακρίβειας και Επαναληπτικότητας, των Τυχαίων και Συστηματικών Σφαλμάτων



Φοιτητής 1: 99.5%, 99.9%, 100.2%, 99.4%, 100.5%

Φοιτητής 2: 95.6%, 96.1%, 95.2%, 95.1%, 96.1%

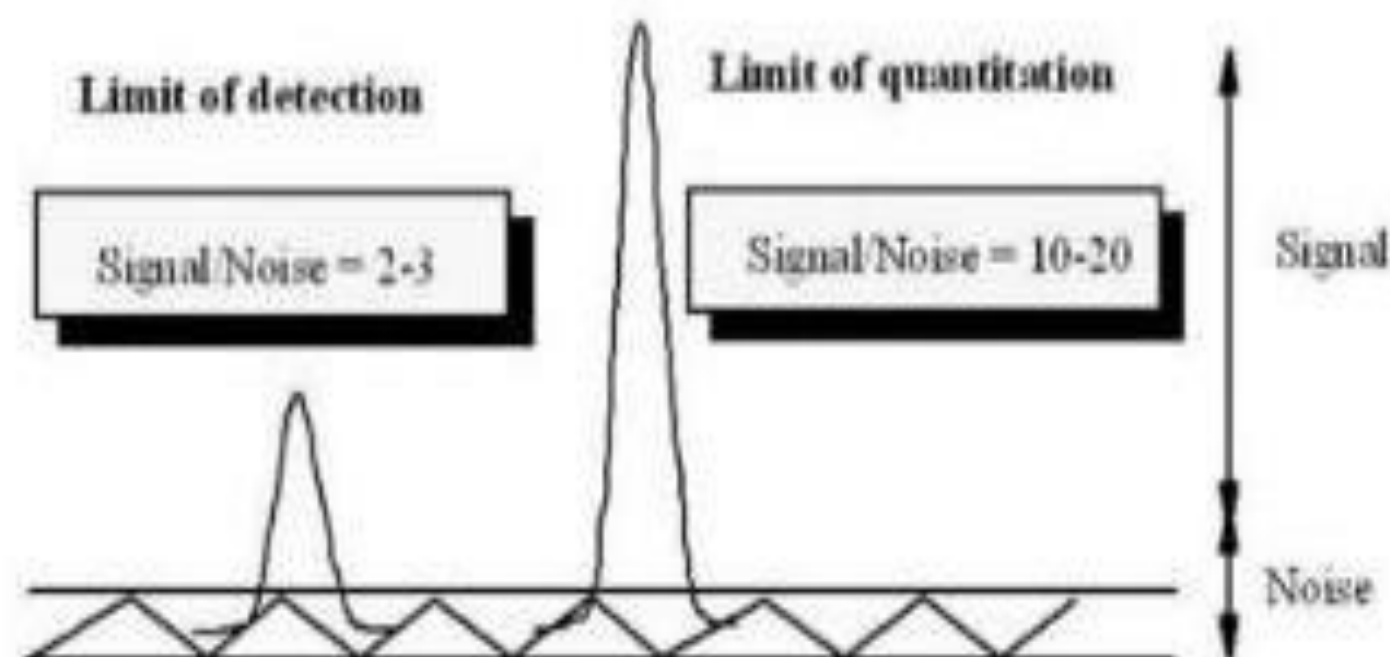
Φοιτητής 3: 93.5%, 98.3%, 102.5%, 102.5%, 97.6%

Φοιτητής 4: 94.4%, 100.2%, 104.5%, 97.4%, 102.1%



Όρια ανίχνευσης (DL), ποσοτικοποίησης (QL)

a)HPLC



$$DL = \frac{3.3s}{slope}$$

$$QL = \frac{10s}{slope}$$

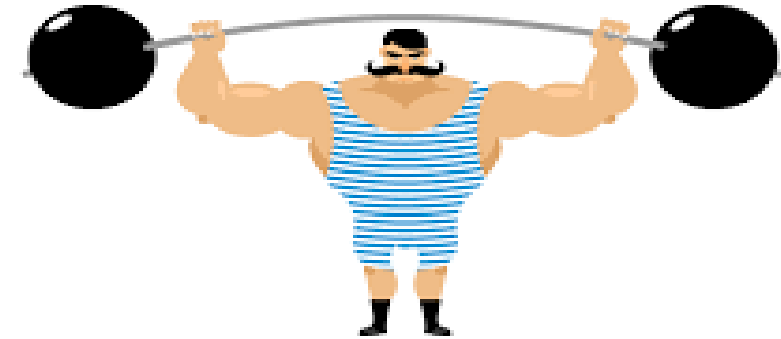
S → standard deviation του τυφλού
residual SD καμπύλης αναφοράς



➤ Ανθεκτικότητα (Robustness):

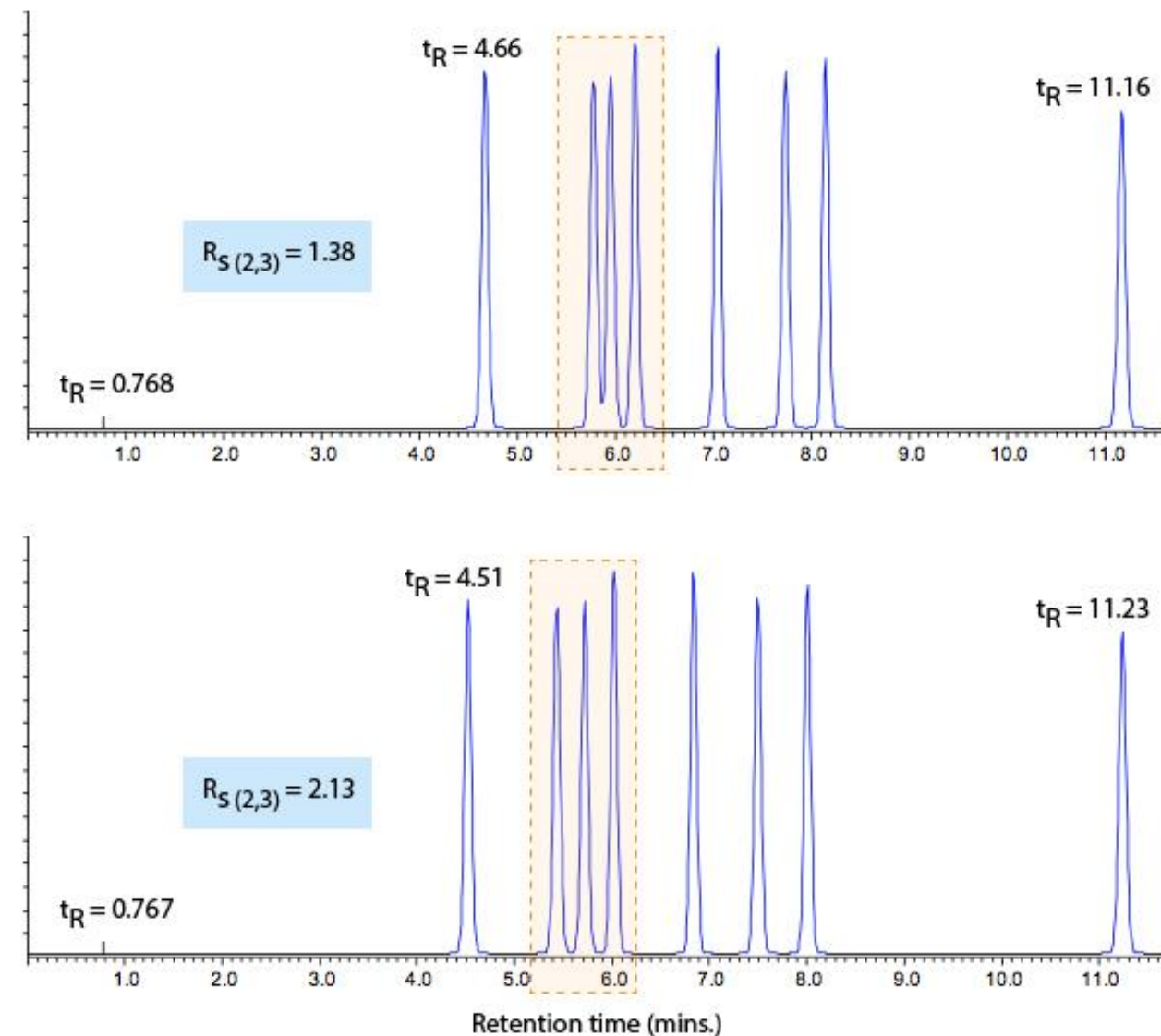
- Ελέγχει την αξιοπιστία σε διακυμάνσεις της μεθόδου.

Πχ μικρές μεταβολές στην σύσταση ή το pH κινητής φάσης



➤ Εκλεκτικότητα (Selectivity):

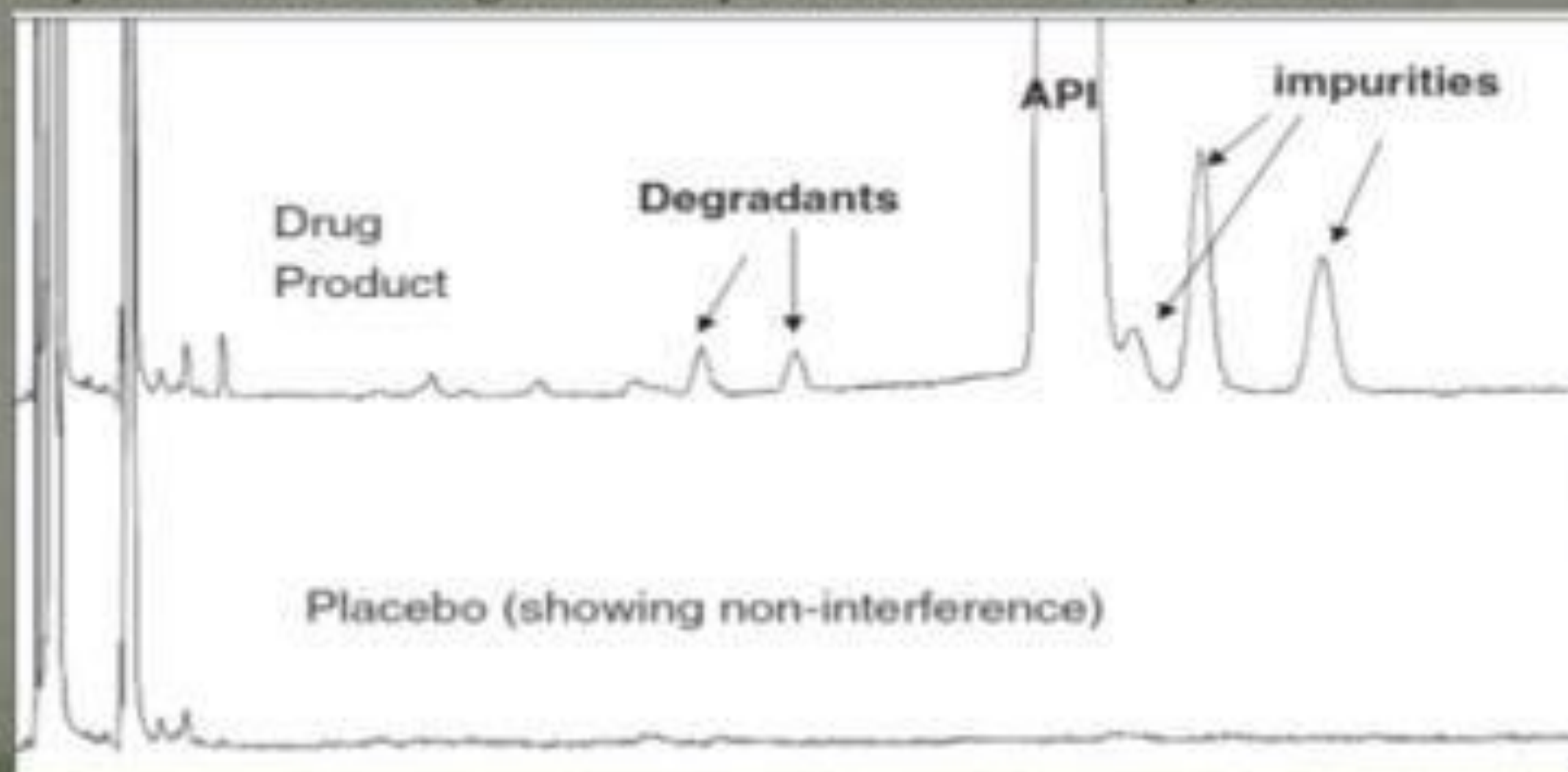
- Είναι η δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου για τη ανάλυση ενός συστατικού παρουσία άλλων.
- Εκφράζεται με την μέγιστη πιθανή συγκέντρωση Ύπαρξης πιθανών παρεμποδίσεων ή το λόγο παρεμποδιστή/*analyte* για την πρόκληση σφάλματος 5%



ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ

Selectivity and Specificity :

- *Selectivity* is the ability to measure accurately and specifically the analyte in the presence of components that may be expected to be present in the sample matrix.
- *Specificity* for an assay ensures that the signal measured comes from the substance of interest, and that there is no interference from excipients and/or degradation products and/or impurities.





Εξειδίκευση (ICH)

Δύναται να χρησιμοποιηθούν συνδυαστικά πολλές τεχνικές

➤ Γίνεται ταυτοποίηση δραστικής/προσμείξεων (HPLC)
προσδιορίζεται το Rs

α) Αν υπάρχουν impurities (spike std σε impurities και το αντίστροφο)

β) Αν δεν υπάρχουν (stress conditions)

Light
Humidity
Heat
Acid/base hydrolysis
oxidation



Forced Degradation Studies

- Temperature (50-60°C)
- Humidity (70-80%)
- Acid Hydrolysis (0.1 N HCl)
- Base Hydrolysis (0.1 N NaOH)
- Oxidation (3-30% H_2O_2)
- Light (UV/Vis/FI)



Intent is to create 10 to 30 % Degradation

