

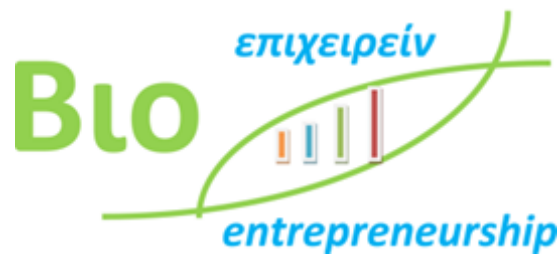


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΧΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**ΔΙΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ
ΣΕ ΧΑΠΙΑ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥΧΟΥ ΡΟΣΟΥΒΑΣΤΑΤΙΝΗΣ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΖΟΥΜΠΟΥΛΑΚΗΣ
ΤΕΧΝΙΚΟΣ ΣΥΜΒΟΥΛΟΣ: QC SENIOR MANAGER ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΣΠΕΝΤΖΑ, DEMO ΑΒΕΕ**

ΚΩΣΤΟΓΛΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

A.M. 2020

ΑΘΗΝΑ, 2022

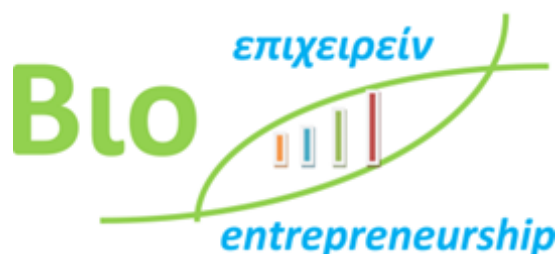


UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY



NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION
INSTITUTE OF CHEMICAL BIOLOGY

**INTERSTITUTIONAL PROGRAM OF POSTGRADUATE STUDIES IN
BIOENTREPRENEURSHIP**



MASTER THESIS

**METHOD TRANSFER AND VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURE
IN ROSUVASTATIN CALSIUM TABLETS**

**SUPERVISOR: ASSOCIATE PROFESSOR PANAGIOTIS ZOYMPOYLAKIS
TECHNICAL ADVISOR: QC SENIOR MANAGER ANASTASIA SPENTZA, DEMO SA**

KOSTOGLOU AIKATERINI

R.N. 2020

ATHENS, 2022

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στο

ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ

που απονέμει το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σε συνεργασία με την φαρμακευτική εταιρεία DEMO S.A. , στην οποία και εκπονήθηκε το πειραματικό της μέρος.

Εγκρίθηκε την από την τριμελή εξεταστική επιτροπή:

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
Ζουμπουλάκης Παναγιώτης	Αν. Καθηγητής	
Λεωνίδας Δημήτριος	Καθηγητής	
Μπαλατσός Νικόλαος	Επικ. Καθηγητής	

Η παρούσα διπλωματική εργασία αφιερώνεται στην οικογένειά μου και στη γάτα μου, η οποία ήταν συνέχεια στο πλευρό μου σε όλη τη διάρκεια της συγγραφής της.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	4
ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ.....	5
ΣΚΟΠΟΣ	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
2. ΚΥΡΙΟ ΜΕΡΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	9
2.1 Μεταφορά τεχνολογίας στην φαρμακευτική βιομηχανία	10
2.1.1 Στάδια ανάπτυξης φαρμακευτικού προϊόντος.....	10
2.1.2 Η μεταφορά τεχνολογίας στην φαρμακοβιομηχανία	11
2.1.3 Διαχείριση μεταφοράς τεχνολογίας μέσω Project Management	14
2.1.4 Λόγοι αποτυχίας μεταφοράς τεχνολογίας.....	16
2.1.5 Μεταφορά τεχνολογίας αναλυτικής μεθόδου μεταξύ εργαστηρίων	17
2.1.6 EU- Import Testing.....	19
2.2 Ροσουβαστατίνη ως φαρμακευτική αγωγή	21
2.2.1 Στατίνες	21
2.2.2 Μηχανισμός δράσης	23
2.2.3 Συμβολή τους στην υγεία	24
2.2.4 Ροσουβαστατίνη	25
2.3 Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου	27
2.3.1 Ακρίβεια	28
2.3.2 Πιστότητα.....	28
2.3.3 Ευαισθησία – Όρια Ευαισθησίας: Όριο ανίχνευσης (LOD) και όριο ποσοτικής αποτίμησης (LOQ).	29
2.3.4 Εκλεκτικότητα – Εξειδίκευση.....	29

2.3.5	Γραμμικότητα και Εύρος	30
2.3.6	Ανθεκτικότητα – Ευρωστία	30
2.4	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.....	32
2.4.1	Πεδίο εφαρμογών	32
2.4.2	Οργανολογία υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.....	33
2.3.4	Υγρή χρωματογραφία υπέρ υψηλής απόδοσης	36
2.5	Πειραματικό μέρος.....	36
2.5.1	Προδιαγραφές ημιεπίμικτου προϊόντος	37
2.5.2	Έλεγχος περιεκτικότητας, ομοιομορφίας και ταυτοποίησης.....	39
2.5.3	Προσδιορισμός συναφών ουσιών Rosuvastatin σε Rosuvastatin Calcium Tablets 5,10,20 και 40mg/tab.....	46
3	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	58
4	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	63

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι καρδιαγγειακές παθήσεις αποτελούν κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως, συνεπάγοντας το αυξημένο ενδιαφέρον των φαρμακευτικών εταιρειών για την ανάπτυξη, παραγωγή και διάθεση προϊόντων με στατίνες, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη διαχείριση και θεραπεία των παθήσεων αυτών. Οι στατίνες, μειώνουν τα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα και συνεπώς μειώνουν τον καρδιαγγειακό κίνδυνο. Πρωταγωνιστικό ρόλο έχει η Ροσουβαστατίνη, η οποία λόγω της δομής της θεωρείται η αποτελεσματικότερη στατίνη.

Η μεταφορά τεχνολογίας αποτελεί βασικό εργαλείο στον κλάδο της φαρμακευτικής βιομηχανίας, καθώς συμμετέχει στον κύκλο ζωής του φαρμακευτικού προϊόντος, είτε κατά την παραγωγή αυτού ή κάποιας δραστικής φαρμακευτικής ουσίας, είτε κατά τον ποιοτικό έλεγχο αυτών. Οι λόγοι που η βιομηχανία πραγματοποιεί μεταφορά τεχνολογίας είναι ποικίλοι., με τους σημαντικότερους εξ αυτών τη μείωση του χρόνου και του κόστους ανάπτυξης νέων φαρμακευτικών μορφών, τη μετεγκατάσταση-συγχώνευση της βιομηχανίας ή τη μεταφορά των αναλυτικών μεθόδων μεταξύ εργαστηρίων. Για την επιτυχία της είναι ιδιαίτερα σημαντική η συνεργασία των εμπλεκόμενων μερών, αλλά και η διαχείριση της μεταφερόμενης πληροφορίας, η οποία γίνεται με τη βοήθεια του project management. Εάν η μεταφορά αφορά (επικυρωμένη) αναλυτική μέθοδο, είναι απαραίτητη η μερική επικύρωσή της από την επιχείρηση δέκτη. Επιπρόσθετα, στην περίπτωση που μία βιομηχανία θέλει να εισάγει φαρμακευτικό προϊόν εντός της ΕΕ από τρίτες χώρες είναι απαραίτητο να καλύψει τα στάδια του EU Testing και QP Release, μέσω της μεταφοράς τεχνολογίας σε εργαστήριο που βρίσκεται εντός ΕΕ.

Στην παρούσα εργασία γίνεται μεταφορά τεχνολογίας της αναλυτικής μεθόδου για χάπια Ασβεστιούχου Ροσουβαστατίνης μεταξύ εργαστηρίων, όπου το εργαστήριο αναφοράς βρίσκεται εκτός ΕΕ. Η μεταφορά πραγματοποιείται μέσω επικύρωσης της μεθόδου από το εργαστήριο δέκτη, που βρίσκεται εντός ΕΕ και η μέθοδος αξιολογείται ως προς την ακρίβεια, επαναληψιμότητα, γραμμικότητα, ειδικότητα και το όριο ανίχνευσης που διαθέτει. Οι αναλύσεις που περιγράφονται λεπτομερώς αφορούν τον προσδιορισμό περιεκτικότητας και συναφών ουσιών, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν με χρήση χρωματογραφίας υπέρ υψηλής απόδοσης.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are a major cause of morbidity and mortality worldwide, leading to increased interest of pharmaceutical companies in the development, production and distribution of statin products, which are used for the management and treatment of these diseases. Statins reduce cholesterol levels in the blood and reduce cardiovascular risk. Rosuvastatin has a leading role, which due to its structure is considered the most effective statin.

Transfer of technology has a key role in a pharmaceutical industry, as it participates in the life cycle of the pharmaceutical product, either in the production of this product or some active medicinal substance, or in the quality control. The reasons why the industry transfers technology are various, with the most important the reduction of the time and the cost of development of new pharmaceutical forms, the relocation-merger of the industry or the transfer of the analytical methods between laboratories. For a successful transfer, the cooperation of the involved parties is particularly important, but also the management of the transferred information, which is done with the help of project management. If the transfer concerns a validated analytical method, its partial validation by the receiving company is necessary. In addition, in case an industry wants to import a medicinal product into the EU from third countries, it is necessary to cover the stages of EU Testing and QP Release, through the transfer of technology to a laboratory physically located in EU.

This master thesis covers an analytical method transfer of Rosuvastatin Calcium tablets, which is transferred between laboratories where the reference laboratory is located outside the EU and the parameters being evaluated in the validation are the accuracy, repeatability, linearity, specificity and detection limit of this method. The analytical techniques that described in detail concern the assay determination of the content and the related substances, which were performed using Ultra High Performance Liquid Chromatography.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ

Μεταφορά τεχνολογίας

Επικύρωση μεθόδου

Ροσουβαστατίνη

Καρδιαγγειακές παθήσεις

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι παρουσίαση της μεταφοράς τεχνολογίας μίας αναλυτικής μεθόδου μεταξύ του εργαστηρίου της φαρμακευτικής εταιρείας Arotex, που εδρεύει στον Καναδά και της φαρμακευτικής εταιρείας DEMO SA, που εδρεύει στην Αττική. Ο λόγος που πραγματοποιήθηκε η συγκεκριμένη μεταφορά τεχνολογίας αφορά την εκπλήρωση του συμβολαίου μεταξύ των δύο εταιρειών, που περιλαμβάνει τον επανέλεγχο και την επικύρωση των παρτίδων του προϊόντος Ασβεστιούχου Ροσουβαστατίνης, για την διακίνησή του εντός ΕΕ. Μέσω της εκπλήρωσης της συγκεκριμένης μεταφοράς τεχνολογίας, η εταιρεία DEMO SA θα κατέχει την άδεια κυκλοφορίας και απελευθέρωσης του προϊόντος στην ΕΕ.

Στην παρούσα εργασία αναφέρεται η σημαντικότητα της δράσης των στατινών για την υγεία, που οδήγησε στην επιχειρηματική κίνηση της εταιρείας DEMO SA για την σύναψη της συγκεκριμένης συνεργασίας. Επιπροσθέτως, καταδεικνύεται η διαχείριση ενός project μεταφοράς φαρμακευτικής τεχνολογίας, τα στάδια που πραγματοποιήθηκαν για την επικύρωση των μεθόδων που το αποτελούν καθώς και τα αποτελέσματα του εργαστηρίου δέκτη.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μια από τις κύριες αιτίες θνησιμότητας και νοσηρότητας, σε παγκόσμιο επίπεδο, αποτελούν οι καρδιαγγειακές παθήσεις, συμπεριλαμβανομένης της στεφανιαίας νόσου και των διάφορων τύπων εγκεφαλικού επεισοδίου. Ετησίως, καταγράφονται περίπου 17 εκατομμύρια θάνατοι που οφείλονται σε καρδιαγγειακές παθήσεις, με την Ευρώπη να κατέχει την πρωτιά με ποσοστό 49% , που αντιστοιχεί σε 4,3 εκατομμύρια θανάτους. Τα τεράστια αυτά ποσά θνησιμότητας συνεπάγονται και αυξημένη δαπάνη υγειονομικής περίθαλψης, συνθέτοντας ένα μεγάλο υγειονομικό και κοινωνικοοικονομικό πρόβλημα, αφού καταλαμβάνουν την πρώτη θέση στις αιτίες θανάτου ανδρών και γυναικών, αντιπροσωπεύοντας το 23% όλων των ασθενειών και θανάτων παγκοσμίως, με την Ελλάδα να συμπεριλαμβάνεται μεταξύ των χωρών με τα υψηλότερα ποσοστά.

Σύμφωνα με τα τελευταία επιδημιολογικά στοιχεία, μετά και την εξάπλωση του ιού SARS-CoV-2, ο αριθμός των κρουσμάτων και των νεκρών ανά τον κόσμο, έχει εκτοξευθεί, με την COVID-19 να προκαλεί διάφορες καρδιαγγειακές επιπλοκές όπως μυοκαρδίτιδα, αρρυθμίες και καρδιακή ανεπάρκεια. Οι ασθενείς –ιδιαίτερα οι ηλικιωμένοι- με προϋπάρχουσες παθήσεις, όπως καρδιαγγειακές, παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο νοσηλείας και αποτελούν ομάδες υψηλού κινδύνου. Έπειτα από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε άτομα που νοσηλεύτηκαν με το συγκεκριμένο κορονοϊό, φαίνεται ότι η πανδημία μπορεί να συνδέεται με την επιδείνωση προϋπάρχουσας καρδιακής πάθησης, αλλά και με την αύξηση της πιθανότητας ανάπτυξης μίας νέας καρδιαγγειακής ασθένειας ή θρομβοεμβολής. (Mansueto et al., 2020)

Βασικός παράγοντας για την μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου είναι η μείωση των υψηλών επιπέδων ολικής χοληστερόλης, λόγω της γραμμικής συσχέτισης που υπάρχει μεταξύ τους. Τα τελευταία χρόνια οι οδηγίες που αφορούν τη θεραπεία και τη διαχείριση των καρδιαγγειακών παθήσεων περιλαμβάνουν την χρήση στατινών. Οι στατίνες παρεμβαίνουν στο δεύτερο στάδιο της μεταβολικής οδού και αναστέλλουν την λειτουργία του ενζύμου HMG-CoA, ο ρόλος του οποίου είναι ιδιαίτερα σημαντικός για την σύνθεση της χοληστερόλης στο ήπαρ. Με την αναστολή της HMG-CoA αναγωγάσης επιτυγχάνεται μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης στο αίμα και κατά συνέπεια μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου. Μεταξύ των στατινών, ξεχωρίζει η ουσία Ροσουβαστατίνη, η οποία αναφέρεται ως η πιο ισχυρή διαθέσιμη στατίνη που κυκλοφορεί στο εμπόριο, με σημαντικό αντίκτυπο στην αγορά φαρμάκων για τη μείωση της χοληστερόλης.

Το ενδιαφέρον των φαρμακευτικών εταιρειών για την ανάπτυξη, την παραγωγή ή την διάθεση στην αγορά, φαρμακευτικών προϊόντων με στατίνες, είναι μεγάλο. Η ποιότητα των φαρμακευτικών προϊόντων είναι αλληλένδετη με την ανάπτυξη μεθόδων παραγωγής που επιτρέπουν τη συμμόρφωση με τους κανόνες ορθής παρασκευής (Good manufacturing practices, GMP) και την ευκολία επικύρωσης της διαδικασίας παραγωγής (Validation), ώστε να επιτυγχάνεται η συνεχής και συνεπής παραγωγή του προϊόντος. Κάθε μέθοδος παραγωγής ενός φαρμακευτικού προϊόντος περιλαμβάνει πληροφορίες, που περιγράφουν με ακρίβεια τις διεργασίες που πρέπει να ακολουθηθούν για την παραγωγή, τον έλεγχο και την αξιολόγησή του, οι οποίες συλλέγονται στα στάδια ανάπτυξης του προϊόντος και εμπλουτίζονται όσο αποκτάται περισσότερη εμπειρία. Η διαδικασία, μέσω της οποίας το σύνολο αυτών των πληροφοριών διατίθεται, όταν και όπου χρειαστεί, στους εμπλεκόμενους με την παραγωγή του προϊόντος, ονομάζεται μεταφορά τεχνολογίας.

Τα τελευταία χρόνια ο κλάδος της φαρμακευτικής βιομηχανίας υπόκειται σε σημαντική αναδιάρθρωση, που οφείλεται στον έντονο ανταγωνισμό και στην ανάγκη περιορισμού του κόστους (λειτουργικού και ανάπτυξης) νέων προϊόντων. Έχει παρατηρηθεί ότι οι παραγωγοί παλαιότερων πρωτότυπων φαρμάκων, χάνουν τις πατέντες τους, αντιμετωπίζοντας έντονο οικονομικό ανταγωνισμό από την έλευση των αντίστοιχων generics, Επιπροσθέτως μη ανταγωνιστικές παραγωγικές μονάδες πωλήθηκαν ή συγχωνεύτηκαν με μεγαλύτερες ανταγωνιστικότερες. Η μεταφορά τεχνολογίας αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι του κύκλου ζωής ενός φαρμακευτικού προϊόντος και μπορεί να αφορά την παραγωγή του ίδιου του προϊόντος, τη παραγωγή μίας δραστικής φαρμακευτικής ουσίας ή τη μέθοδο ανάλυσής τους.

Η επιτυχία της μεταφοράς φαρμακευτικής τεχνολογίας επηρεάζει όχι μόνο την φαρμακευτική επιχείρηση, αλλά ακόμη και την παγκόσμια οικονομία. Σε χώρες μικρού ή μεσαίου εισοδήματος η μεταφορά τεχνολογίας μειώνει την εξάρτηση της τοπικής αγοράς από εισαγωγές φαρμακευτικών προϊόντων και ταυτόχρονα αυξάνει την αξιοπιστία της φαρμακευτικής εφοδιαστικής αλυσίδας, βελτιώνοντας την υγεία των πολιτών, οι οποίοι θα έχουν πρόσβαση σε καινοτόμα φάρμακα και εμβόλια. Επί προσθέτως, αυξάνει τις ικανότητες του εργατικού δυναμικού, ενώ παράλληλα αποτρέπει τη μετανάστευση εξειδικευμένου προσωπικού στο εξωτερικό αναπτύσσοντας ευκαιρίες απασχόλησης σε πεδία υψηλής τεχνολογίας.

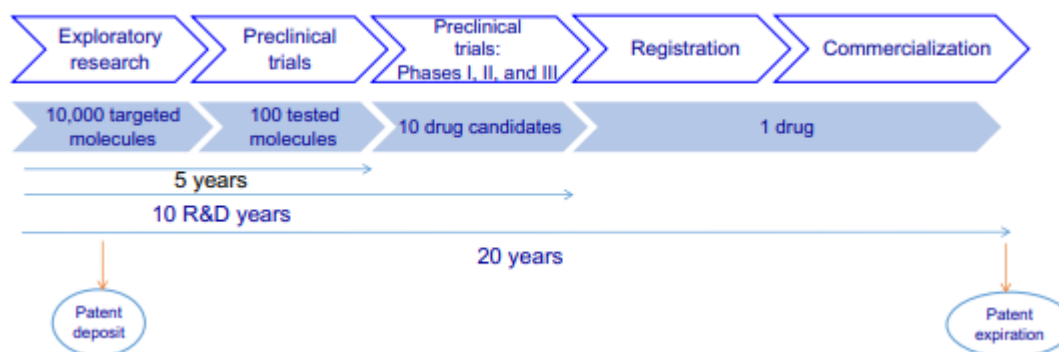
2. ΚΥΡΙΟ ΜΕΡΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ



2.1 Μεταφορά τεχνολογίας στην φαρμακευτική βιομηχανία

2.1.1 Στάδια ανάπτυξης φαρμακευτικού προϊόντος

Το σύνολο των εταιρειών που αναπτύσσουν, ανακαλύπτουν, παράγουν και εμπορεύονται φαρμακευτικά προϊόντα, αποτελούν τον κλάδο της φαρμακευτικής βιομηχανίας και η δραστηριοποίησή τους μπορεί να αφορά πρωτότυπα φάρμακα (Brand), γενόσημα (Generics) ή/και ιατροτεχνολογικά προϊόντα (Medical Devices). Μια φαρμακευτική εταιρεία μπορεί να παράγει φάρμακα πρωτοβάθμιας περίθαλψης, εξειδικευμένες θεραπείες υψηλής αξίας, είτε να παράγει γενόσημα φάρμακα (σαφώς χαμηλότερου κόστους από τα αντίστοιχα πρωτότυπα).



Σχήμα 1 Τα στάδια ανάπτυξης ενός φαρμακευτικού προϊόντος. Το υψηλό κόστος σε συνδυασμό με τα μικρά ποσοστά επιτυχίας, καθιστούν την ανάπτυξη ενός φαρμακευτικού προϊόντος μια ιδιαίτερα χρονοβόρα και κοστοβόρα διαδικασία. (Azzaro-Pantel, 2018)

Η πολυπλοκότητα των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στην φαρμακευτική βιομηχανία την διαφοροποιούν σημαντικά από τους υπόλοιπους κλάδους βιομηχανίας και την καθιστούν έναν κλάδο υψηλής έντασης κεφαλαίου που λειτουργεί υπό καθεστώς πολύπλοκου κανονιστικού πλαισίου, λόγω των υποκλάδων που την αποτελούν (παραγωγή δραστικών πρώτων υλών, παραγωγή τελικών προϊόντων, R&D, εμπορική διάθεση των προϊόντων). Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται σημαντική αναδιάρθρωση του κλάδου της φαρμακευτικής βιομηχανίας, οφειλόμενη στον έντονο ανταγωνισμό αλλά και στην ανάγκη περιορισμού του κόστους (λειτουργικού και ανάπτυξης) των νέων προϊόντων.

Για την ανάπτυξη μίας αναλυτικής μεθόδου, βασική προϋπόθεση είναι η επικύρωση της διαδικασίας παραγωγής (Validation) και η συμμόρφωση με τους κανόνες ορθής παρασκευής (Good

manufacturing practice, GMP) που επιτρέπουν τη προβλέψιμη, συνεχή και συνεπή παραγωγή ενός ποιοτικού προϊόντος. Στα στάδια ανάπτυξης του προϊόντος συλλέγονται πληροφορίες που περιγράφουν με ακρίβεια τις διεργασίες που πρέπει να ακολουθηθούν για την παραγωγή, τον έλεγχο και την αξιολόγησή του, ώστε να εξασφαλίζεται η ποιότητά του. Οι πληροφορίες αυτές μπορεί να εμπλουτιστούν όσο αποκτάται περισσότερη εμπειρία με την ανάπτυξη του εκάστοτε προϊόντος. Στην περίπτωση όπου το συγκεκριμένο προϊόν πρέπει να αναπτυχθεί ή να ελεγχθεί από κάποια άλλη μονάδα παραγωγής, είναι απαραίτητη η διαθεσιμότητα του συνόλου όλων αυτών πληροφοριών στην μονάδα δέκτη, κάτι που ονομάζεται μεταφορά τεχνολογίας.

2.1.2 Η μεταφορά τεχνολογίας στην φαρμακοβιομηχανία

Ως μεταφορά τεχνολογίας ορίζεται η λογική διαδικασία, μέσω της οποίας ελέγχεται η μεταφορά οποιασδήποτε διεργασίας, επαγγελματικής τεχνογνωσίας και των σχετικών εγγράφων τεκμηρίωσης της, από την αρχική επιχειρησιακή μονάδα που παρέχει τη τεχνολογία (Sending Unit, SE) στη μονάδα δέκτη (Receiving Unit, RU). Μέσω αυτής της συστηματικής διαδικασίας που ακολουθείται δίνεται η δυνατότητα να περάσει η καταγεγραμμένη γνώση και εμπειρία σε κάποια κατάλληλη, υπεύθυνη και εξουσιοδοτημένη επιχειρησιακή οντότητα. Η μεταφοράς τεχνολογίας θεωρείται επιτυχημένη και αποδεκτή, μόνο όταν τεκμηριώνεται η ικανότητα της μονάδας δέκτη να εκτελεί συστηματικά και αποτελεσματικά τα κρίσιμα στοιχεία της μεταφερόμενης τεχνολογίας, βάσει συγκεκριμένων προδιαγραφών που θέτουν οι κανονιστικές αρχές που επιβλέπουν την κυκλοφορία του αντίστοιχου φαρμακευτικού προϊόντος. (WHO, 2011)

Η μεταφορά τεχνολογίας μπορεί να αφορά είτε την παραγωγή ημιέτοιμου-τελικού προϊόντος (Bulk/Finished Pharmaceutical Product, FPP), είτε τη σύνθεση δραστικής ουσίας (Active Pharmaceutical Ingredient, API), είτε αποκλειστικά τη διενέργεια αναλυτικών ελέγχων του προϊόντος από το τμήμα ποιοτικού ελέγχου. (Reid, 2020) Για οποιαδήποτε επιχείρηση η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητο να είναι οικονομικά αποδοτική και βιώσιμη, αλλά και να χαρακτηρίζεται από αποτελεσματικότητα, επαναληψιμότητα και αποδοτικότητα.

SENDING UNIT	RECEIVING UNIT
READINESS ASSESSMENT IS THE METHOD VALIDATED? IS THE METHOD READY TO TRANSFER?	REVIEW TRANSFER PACKAGE
PREPARATION OF THE TRANSFER PACKAGE ANALYTICAL METHOD COMPILATION OF HISTORICAL DATA	PERFORM READINESS ASSESSMENT AND EVALUATE INTERNAL GAPS
PROVIDE TRAINING	PROVIDE APPROPRIATE RESOURCES
AUTHOR AND APPROVE THE TRANSFER PROTOCOL	REVIEW AND APPROVE TRANSFER PROTOCOL
COMPARE RU DATA AGAINST SU DATA	PERFORM TRANSFER AND EVALUATE SITE RESULTS
PREPARE AND APPROVE TRANSFER REPORT	REVIEW AND APPROVE TRANSFER REPORT

Εικόνα 1 Μεταφορά τεχνολογίας μεταξύ επιχειρήσεων. Η μεταφορά θεωρείται αποδεκτή μόνο στην περίπτωση που υπάρχει ικανοποίηση και των δύο μέρων SU και RU, άλλα και των κανονιστικών αρχών που ελέγχουν την κυκλοφορία του συγκεκριμένου προϊόντος. (Reid, 2020)

Στην φαρμακευτική βιομηχανία συχνά πραγματοποιείται η μεταφορά τεχνολογιών, μεθόδων, ή και προϊόντων, γεγονός που μπορεί να οφείλεται :

- στο γεγονός ότι η έρευνα και ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών μορφών είναι μια ιδιαίτερα χρονοβόρα και δαπανηρή διαδικασία, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλό ρίσκο
- στη συγχώνευση ή εξαγορά της φαρμακευτικής βιομηχανίας από τη μονάδα δέκτη
- στη μετεγκατάσταση της επιχειρηματικής μονάδας σε διαφορετική γεωγραφική περιοχή λόγω οικονομικών συμφερόντων ή λόγω της ανάγκης για μεγαλύτερη παραγωγική ικανότητα
- στην ανάπτυξη οργανισμών παροχής υπηρεσιών προς τρίτους
- στην αύξηση του outsourcing, που έχει ευρεία εφαρμογή στους παραγωγικούς τομείς, τόσο στην Ελλάδα, όσο και διεθνώς
- στις απαιτήσεις της εξέλιξης του κύκλου ζωής ενός προϊόντος, όταν από το ερευνητικό εργαστήριο περνάει στο στάδιο της βιομηχανικής παραγωγής (Scale-up) και της κλινικής ανάπτυξης της φαρμακοτεχνικής μορφής
- στην πίεση για σμίκρυνση του κύκλου ζωής των προϊόντων, των υπηρεσιών ή τεχνολογιών, καθώς αντικαθίστανται από μια νεότερη εκδοχή τους
- στην παγκοσμιοποίηση

- στην κακή οικονομική κατάσταση που αποτελεί αποτρεπτικό παράγοντα για μία χώρα περιορισμένου εισοδήματος , να επενδύσει και να αναπτύξει δυνατότητες παραγωγής νέων φαρμακευτικών μορφών
- στα οφέλη (εμπορικά ,υστεροφημίας) που λαμβάνει μία επιχείρηση που μεταφέρει φαρμακευτικά προϊόντα ή τεχνολογία σε τρίτες χώρες

Τα στάδια που μπορεί να ακολουθούνται είναι τα εξής :

1. ανταλλαγή πληροφορίας μεταξύ SE και RU
2. μεταφορά της αναλυτικής μεθόδου και τεχνογνωσίας στην επιχείρηση δέκτη
3. προγραμματισμός και διαχείριση των πρωτοκόλλων που μεταφέρθηκαν, με χρήση κατάλληλων εργαλείων project management
4. παραγωγή και έλεγχος μιας μικρής πιλοτικής παρτίδας για τον έλεγχο της ορθότητας των πληροφοριών που μεταφέρθηκαν
5. παραγωγή παρτίδας κανονικής κλίμακας, μέσω της οποίας θα επιβεβαιωθούν οι κρίσιμες παράμετροι της παραγωγικής διαδικασίας
6. παραγωγή και έλεγχος των GMP validation batches
7. επικύρωση μεθόδου στην επιχείρηση δέκτη



Σχήμα 2 Η πορεία που ακολουθείται, κατά την μεταφορά τεχνολογίας, στην επιχείρηση δέκτη.(Reid, 2020)

2.1.3 Διαχείριση μεταφοράς τεχνολογίας μέσω Project Management

Η διαχείριση της μεταφοράς τεχνολογίας πραγματοποιείται με τη μορφή διακριτών έργων-εγχειρημάτων. Ως έργο ορίζεται ένα προσωρινό εγχείρημα το οποίο παράγει ένα μοναδικό αποτέλεσμα, προϊόν ή υπηρεσία και έχει συγκεκριμένη αρχή και τέλος. Η προσωρινότητα ενός έργου δεν συνεπάγει την βραχεία διάρκειά του ή την παροδικότητα του αποτελέσματος του. Το τέλος του επέρχεται :

1. όταν επιτευχθούν οι στόχοι του
2. λόγω αδυναμίας επίτευξης των στόχων
3. λόγω εξάλειψης της ανάγκης ολοκλήρωσης του

Η διαχείριση ενός έργου σε μία εταιρεία αφορά τις ιδιότητες που το χαρακτηρίζουν, δηλαδή την ποιότητα, το χρόνο, το κόστος και τους διαθέσιμους πόρους (Project management). Ο λόγος ύπαρξής τους σχετίζεται άμεσα με την παραγωγή θετικής αξίας για τον οργανισμό που τα εκτελεί, προσθέτοντας

ή βελτιώνοντας προϊόντα και υπηρεσίες, ή ικανοποιώντας νομικές ή κανονιστικές εντολές και προϋποθέσεις.

Για την υλοποίηση ενός έργου μεταφοράς τεχνολογίας ενδέχεται να εμπλακούν πολλά τμήματα των SU και RU:

- το τμήμα που αναλαμβάνει την συμφωνία μεταξύ των 2 εμπλεκόμενων μερών (Business Development)
- το τμήμα έρευνας και ανάπτυξης, το οποίο αναλαμβάνει να εξετάσει εάν η επιχείρηση δέκτης έχει τις δυνατότητες (αναλυτικές και παραγωγικές) για την επίτευξη της μεταφοράς τεχνολογίας
- τα τμήματα ανάπτυξης ή παραγωγής προϊόντος, για διεργασίες παραγωγής, συσκευασίας και καθαρισμού του παραγωγικού εξοπλισμού
- το τμήμα ποιοτικού ελέγχου (Quality Control), σε περιπτώσεις μεταφοράς αναλυτικής μεθόδου
- το τμήμα διασφάλισης ποιότητας (Quality Assurance) , για την αξιολόγηση και πιστοποίηση των παραγωγικών χώρων και του εξοπλισμού
- το τμήμα που διαχειρίζεται την τεκμηρίωση των διεργασιών και καταθέσεων στις αρχές (Regulatory department)
- το τμήμα που αναλαμβάνει την αξιολόγηση και εκπαίδευση του προσωπικού
- το τμήμα οργάνωσης και διοίκησης έργων (Project management office)

Οι φαρμακευτικές εταιρείες χαρακτηρίζονται από διαρκώς μεταβαλλόμενες επιχειρηματικές στρατηγικές, οι οποίες πυροδοτούν είτε ενδο-εταιρικές είτε δια-εταιρικές μεταφορές τεχνολογίας. Στην δεύτερη περίπτωση ενδέχεται να υπάρχουν σημαντικές νομικές και οικονομικές προεκτάσεις, ιδιαίτερα σε ότι αφορά δικαιώματα εκμετάλλευσης και πνευματικής ιδιοκτησίας, ζητήματα τιμολόγησης, σύγκρουσης συμφερόντων ή εμπιστευτικότητας. Όλα αυτά τα ζητήματα πρέπει να διευθετούνται πριν την έναρξη της μεταφοράς τεχνολογίας, καθώς η έλλειψη διαφάνειας μεταξύ των συνεργατών αποτελεί βασικό παράγοντα αποτυχίας. (WHO, 2011)

Η αναγκαιότητα της ύπαρξης των διαδικασιών project management στη μεταφορά τεχνολογίας οφείλεται :

- στην πολυπλοκότητα των βιομηχανικών φαρμακευτικών λειτουργιών,

- στο πλήθος των συνεργαζόμενων δομών των SU και RU που μπορεί να εμπλέκονται στα έργα
- στην πληθώρα απαιτήσεων του κανονιστικού πλαισίου που διέπει τις φαρμακευτικές διεργασίες
- στον συντονισμό της μεταφοράς και διαχείρισης της γνώσης μεταξύ των δύο μονάδων
- στην επίτευξη της επικοινωνίας ανάμεσα στα ενδιαφερόμενα τμήματα

2.1.4 Λόγοι αποτυχίας μεταφοράς τεχνολογίας

Η συνεργασία όλων των εμπλεκόμενων μερών κατά την διενέργεια ενός έργου μεταφοράς τεχνολογίας κρίνεται απαραίτητη, καθώς η μη ύπαρξή της συνεπάγεται την αποτυχία αυτού. Το κυριότερο πρόβλημα που αντιμετωπίζεται αφορά τα κριτήρια που οδήγησαν στην λήψη της απόφασης μεταφοράς τεχνολογίας. Πολλές φορές τα κριτήρια είναι αποκλειστικά χρηματοοικονομικά ή κριτήρια marketing, παραβλέποντας έτσι τις επιπτώσεις σε λειτουργίες quality, regulatory, laboratory, supply chain. Στην περίπτωση που παραλειφθεί το στάδιο της εξέτασης από την RU ότι μπορεί να ανταπεξέλθει στις απαιτήσεις της SU, το ίδιο το project αυτό τερματίζεται.

Η αποτυχία ενός έργου μεταφοράς τεχνολογίας μπορεί να οφείλεται:

- στην έλλειψη κατανόησης της διεργασίας που πρόκειται να μεταφερθεί από την RU
- στην υποτίμηση των απαιτήσεων σε πόρους και χρόνο
- στην μηδενική κεντρική επίβλεψη και έλεγχο βάσει συγκεκριμένων δεικτών που οδηγεί στην υλοποίηση του έργου από μεμονωμένα τμήματα/εγκαταστάσεις,
- στην έλλειψη αρχικού συντονισμού μεταξύ των SU και RU
- στην απουσία καθορισμένων ρόλων και αρμοδιοτήτων
- στην ελλιπή επικοινωνία- κακή συνεννόηση για την πρόοδο, τα χρονοδιαγράμματα και τα αποτελέσματα
- στην έλλειψη αξιολόγησης ανάμεσα στις SU και RU όσον αφορά τον εξοπλισμό και το περιβάλλον
- στην αδυναμία καθορισμού και συμφωνίας για κοινά πρότυπα και διαδικασίες που θα ακολουθηθούν μεταξύ των δυο συνεργαζόμενων οργανισμών
- στην έλλειψη διαβεβαίωσης ότι η απαιτούμενη τεκμηρίωση θα ολοκληρωθεί με ακριβή, συμμορφούμενο και έγκαιρο τρόπο

Απόρροια των παραπάνω είναι η υπέρβαση του αρχικού χρονοδιαγράμματος και προϋπολογισμού που συνεπάγεται τη διαταραχή μεταξύ των συνεργαζόμενων οργανισμών και τη μη συμμόρφωση με τους κανονισμούς και τα GMPs.

2.1.5 Μεταφορά τεχνολογίας αναλυτικής μεθόδου μεταξύ εργαστηρίων

Κατά τη μεταφορά μίας μεθόδου από την SU (Μεταφέρων εργαστήριο) στην RU (Εργαστήριο αποδέκτης) είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί επικύρωση της μεταφοράς της μεθόδου. Αυτό γίνεται για να διασφαλιστεί ότι η διαδικασία ελέγχου λειτουργεί εξίσου καλά και στα δύο εργαστήρια. Η επικύρωση της μεταφοράς της μεθόδου εφαρμόζεται συνήθως σε κρίσιμους ελέγχους, όπως σε προσδιορισμούς περιεκτικότητας και ποσοτικούς προσδιορισμούς προσμίξεων και προϊόντων αποικοδόμησης. Όλες οι μέθοδοι που μεταφέρονται θα πρέπει να είναι επικυρωμένες.

Η μεταφορά μιας αναλυτικής μεθόδου διεξάγεται εφόσον διασφαλιστούν τα ακόλουθα:

- Πλήρης κατανόηση της αναλυτικής μεθόδου και από τα δύο εργαστήρια
- Εκπαίδευση του εργαστηρίου αποδέκτη, εάν κριθεί απαραίτητο
- Επαρκή έγγραφα για την πλήρη και επιτυχή μεταφορά της μεθόδου

Η μέθοδος θα πρέπει να είναι αποτελεσματική και πρακτική, καθώς και τα αντιδραστήρια, οι πρότυπες ουσίες και ο απαραίτητος εξοπλισμός θα πρέπει να είναι διαθέσιμα στο εργαστήριο δέκτη. Επιπλέον, τα έγγραφα αξιολόγησης θα πρέπει να είναι συμπληρωμένα και εγκεκριμένα.

Η διαδικασία που ακολουθείται όταν γίνεται μεταφορά τεχνολογίας μιας αναλυτικής μεθόδου είναι η εξής:

1. Ανασκόπηση της μεθόδου και από τα δύο εργαστήρια
2. Σύνταξη του πρωτοκόλλου από το μεταφέρων εργαστήριο και έγκρισή του και από τα δύο εμπλεκόμενα εργαστήρια
3. Αποστολή των γραπτών διαδικασιών και δειγμάτων από την SU και πραγματοποίηση και από τα δύο εργαστήρια, διασταυρούμενων ελέγχων
4. Εκτίμηση των αποτελεσμάτων των ελέγχων, σύμφωνα με τα κριτήρια αποδοχής, από το μεταφέρων εργαστήριο
5. Αν τα αποτελέσματα δεν είναι αποδεκτά, γίνεται διερεύνηση των αιτιών αποτυχίας και επαναλαμβάνονται οι διασταυρούμενοι έλεγχοι
6. Αν τα αποτελέσματα είναι αποδεκτά, ακολουθεί έγκριση και από τα δύο εμπλεκόμενα εργαστήρια για την έκθεση της μεταφοράς της μεθόδου

Το πρωτόκολλο που θα συνταχθεί από το μεταφέρων εργαστήριο πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα:

- Διακριτά τις αρμοδιότητες του κάθε τμήματος
- Αναφορά όλων των μεθόδων που πρόκειται να μεταφερθούν για το συγκεκριμένο προϊόν και αιτιολόγηση για τις μεθόδους που δεν περιλαμβάνονται στη μεταφορά
- Σκοπό

- Υλικά που απαιτούνται για τη μεταφορά (Τα πρότυπα πρέπει να συνοδεύονται με πιστοποιητικό ανάλυσης)
- Κριτήρια αποδοχής
- Έγγραφο για τη μεταφορά της μεθόδου
- Αντίγραφο της μεθόδου
- Απαιτήσεις και μορφή της τελικής αναφοράς

Πίνακας 1 Πιθανά πειραματικά σχέδια και κριτήρια αποδοχής τους, σε περίπτωση μεταφοράς τεχνολογίας αναλυτικής μεθόδου(WHO, 2011)

Test	Considerations for transfer	Replication of tests	Set-up	Acceptance criteria	
				Direct	Statistically derived
Assay for potency	<ul style="list-style-type: none"> – <i>Non-specific assay should not be used for stability testing.</i> – Bracketing may be appropriate for multiple strengths 	At each site: 2 analysts × 3 lots, in triplicate (= 18 per site)	Different sets of instruments and columns Independent solution preparation	Comparison of mean and variability	Two one-sided <i>t</i> -tests with intersite differences $\leq 2\%$, 95% confidence
Content uniformity	If method is equivalent to assay method, separate transfer is not usually required	At each site: 2 analysts, × 1 lot (= 2 per site)	Different sets of instruments and columns Independent solution preparation	Mean at RU within $\pm 3\%$ of mean at SU; comparison of relative st. dev.	Two one-sided <i>t</i> -tests with intersite differences $\leq 3\%$, 95% confidence
Dissolution	Bracketing may be appropriate for multiple strengths	6 units (12 if not routine at RU, and for extended release products)		Mean at RU within $\pm 5\%$ of mean at SU	Compare profile (e.g. F^2), or Compare data at Q time points as for assay
Cleaning verification (recovery of residues from surfaces)	Confirm that same swabbing material is used at sending unit (SU) and receiving unit (RU)		Use spiked samples, with levels within 3× validated st. dev. or within $\pm 10\%$ of specification (whichever is the greater)	<ul style="list-style-type: none"> – All samples spiked above specification should fail – 90% of samples spiked below specification should pass 	

2.1.6 EU- Import Testing

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι λόγοι που μία φαρμακευτική εταιρεία καταλήγει στην μεταφορά της τεχνολογίας της είναι ποικίλοι. Στην περίπτωση, όμως, που μια φαρμακευτική βιομηχανία αποφασίσει να εισάγει ένα (βιο) φαρμακευτικό προϊόν στην Ευρωπαϊκή ένωση, απαραίτητη προϋπόθεση είναι ο έλεγχος του προϊόντος να έχει γίνει από εργαστήριο που βρίσκεται εντός ΕΕ.

Το MRA (Mutual Recognition Agreements) είναι μία συμφωνία μεταξύ της ΕΕ και των χωρών που βρίσκονται εκτός ΕΕ, η οποία παρέχει τα προβλεπόμενα κριτήρια αποδοχής που αφορούν τη παρασκευή, την αποθήκευση, τον ποιοτικό έλεγχο και την μεταφορά των φαρμακευτικών προϊόντων. Όταν μια χώρα λειτουργεί βάσει MRA, αυτό συνεπάγεται ότι διασφαλίζεται η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα των εισαγόμενων προϊόντων της, αφού λειτουργεί στο πλαίσιο των GMPs της ΕΕ. Σήμερα οι χώρες που έχουν συνάψει αυτή τη συμφωνία με την ΕΕ είναι η Αυστραλία, ο Καναδάς, η Νέα Ζηλανδία και η Ελβετία. Όλες οι υπόλοιπες χώρες που δεν έχουν MRA ονομάζονται «τρίτες χώρες». Οι εταιρείες οι οποίες ανήκουν σε τρίτες χώρες, συμπεριλαμβανομένων των Ηνωμένων Πολιτειών, που ενδιαφέρονται να εισέλθουν στις αγορές της ΕΕ, πρέπει να υποβληθούν σε επανέλεγχο της παρτίδας που θέλουν να εισάγουν (Schumacher, 2011).

Ο επανέλεγχος που πρέπει υποβάλλεται η κάθε παρτίδα φαρμακευτικού προϊόντος για να εισαχθεί στην ΕΕ, ονομάζεται EU-Import Testing και είναι υποχρεωτική απαίτηση για κάθε παρτίδα που παρασκευάζεται εκτός ΕΕ. Οι υποχρεωτικές απαιτήσεις για την πιστοποίηση των παρτίδων περιγράφονται λεπτομερώς στο παράρτημα 16 του οδηγού Ορθής Παραγωγικής Πρακτικής (GMP) και περιλαμβάνουν:

- Συμμόρφωση της παρτίδας και της παραγωγής με την άδεια κυκλοφορίας της
- Διαβεβαίωση ότι η παραγωγή έχει πραγματοποιηθεί σύμφωνα με τα GMPs της ΕΕ
- Επικύρωση των διαδικασιών παραγωγής και ποιοτικού ελέγχου (Validation)
- Έλεγχος τυχόν αποκλίσεων και αλλαγών στην παραγωγή και στον ποιοτικό έλεγχο
- Έλεγχος πληρότητας, ακεραιότητας και συμμόρφωσης της παρτίδας

Το τελευταίο στάδιο για την κυκλοφορία του προϊόντος στην ΕΕ είναι η έγκριση-πιστοποίηση από εξειδικευμένο αντιπρόσωπο QP (Qualified Person), ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη διασφάλιση της ποιότητας της κάθε παρτίδας που πρόκειται να κυκλοφορήσει. Πριν την πιστοποίηση και απελευθέρωση της εκάστοτε παρτίδας, ο QP πρέπει να ελέγξει εάν πληρούνται όλες οι απαιτούμενες προδιαγραφές που καθορίζουν οι αρχές της ΕΕ, καθώς επίσης θα πρέπει να έχει πρόσβαση σε όλα τα έγγραφα τεκμηρίωσης του ελέγχου που διευκολύνουν την επανεξέταση του αποτελέσματος.

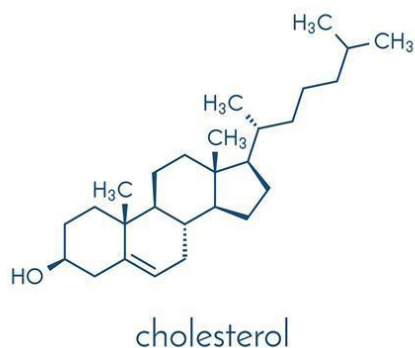
Για την συμμόρφωση με τις προηγούμενες απαιτήσεις μια βιομηχανία επιλέγει να κινηθεί μεταξύ δύο μοντέλων:

- να πραγματοποιήσει το EU-Import Testing μέσω πιστοποιημένου εργαστηρίου εντός ΕΕ, το οποίο θα εκτελεί όλες τις αναλύσεις , θα της παραδίδει το Πιστοποιητικό Ανάλυσης και στη συνέχεια θα κάνει η ίδια την απελευθέρωση του προϊόντος στην αγορά χρησιμοποιώντας δικό της QP
- να πραγματοποιήσει το EU-Import Testing μέσω πιστοποιημένου εργαστηρίου εντός ΕΕ, το οποίο πέρα από το Πιστοποιητικό Ανάλυσης θα είναι υπεύθυνο και για την απελευθέρωση του προϊόντος στην αγορά (QP release)

2.2 Ροσουβαστατίνη ως φαρμακευτική αγωγή

2.2.1 Στατίνες

I. Χοληστερόλη



Σχήμα 3 Το μόριο της χοληστερόλης (Hayley Bennett, 2012)

Η χοληστερίνη είναι μία κηρώδης στερόλη που βρίσκεται στη μεμβράνη όλων των κυττάρων των ιστών του σώματος, αναπτύσσει διαμοριακές δυνάμεις με το νερό που βρίσκεται στο κύτταρο και χρησιμεύει στην κάλυψη των αναγκών του οργανισμού για την κατασκευή κυτταρικών μεμβρανών, τη σύνθεση ορμονών και το σχηματισμό χολικών αλάτων. Η χοληστερίνη και τα τριγλυκερίδια είναι λιπίδια του αίματος και για την κυκλοφορία τους ενσωματώνονται σε ειδικά ευδιάλυτα συμπλέγματα που βρίσκονται στο πλάσμα του αίματος, τα οποία ονομάζονται λιποπρωτεΐνες. (Fielding & Fielding, 1995)

Υπάρχουν 3 βασικές κατηγορίες λιποπρωτεϊνών στην κυκλοφορία του αίματος (σε κατάσταση νηστείας):

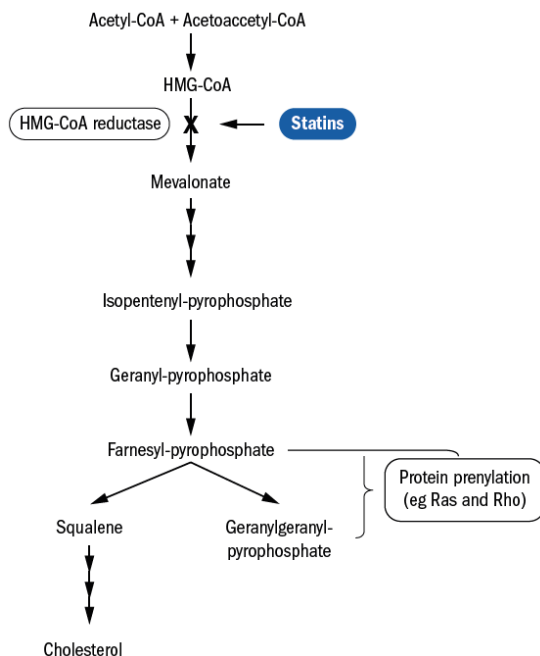
- Η υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (HDL), η οποία μεταφέρει το 20- 30% της ολικής χοληστερόλης στα διάφορα όργανα. Στην ουσία, απομακρύνει τη χοληστερίνη από τα κύτταρα των τοιχωμάτων των αρτηριών προς το συκώτι, όπου αποδομείται και απεκκρίνεται από τον οργανισμό. Με τον τρόπο αυτό προστατεύει τα αγγεία από αθηροσκλήρυνση και μειώνει τον κίνδυνο εμφράγματος.
- Η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL), η οποία μεταφέρει το 60-70% της ολικής χοληστερόλης στα διάφορα όργανα και σχηματίζει λιπαρά εναποθέματα στα κύτταρα των τοιχωμάτων των αρτηριών, προκαλώντας την δημιουργία αθηρωσκληρωτικής πλάκας. Η LDL μεταφέρει τα τριγλυκερίδια από το συκώτι στους ιστούς του σώματος. Αυξημένη χοληστερίνη στο αίμα αυξάνει τον κίνδυνο αθηροσκλήρωσης κάτι που οδηγεί σε έμφραγμα του μυοκαρδίου και σε εγκεφαλικό επεισόδιο.

- οι πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL), οι οποίες παράγονται από το ήπαρ και αποτελούν πρόδρομη ένωση της LDL. Ορισμένες μορφές των VLDL, κυρίως τα υπολείμματα VLDL, φαίνεται να προωθούν την αθηροσκλήρωση, παρόμοια με την LDL.

Μελέτες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας έδειξαν ότι το ένα τρίτο των θανάτων που σχετίζονται με ισχαιμική καρδιακή νόσο αποδίδεται σε υψηλά επίπεδα ολικής χοληστερόλης. (Robson, 2007). Τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης περιέχονται (στο μεγαλύτερο ποσοστό) στην LDL-χοληστερόλη, γνωστή και ως «κακή χοληστερόλη», στην HDL-χοληστερόλη, γνωστή ως «καλή χοληστερόλη» και στη χοληστερόλη που βρίσκεται σε άλλες λιποπρωτεΐνες. Η LDL-χοληστερόλη φαίνεται να είναι ο βασικός παράγοντας της παθολογικής διεργασίας, που σχετίζεται με το μονοπάτι της καρδιαγγειακής νόσου. (Goldman et al., 2006)

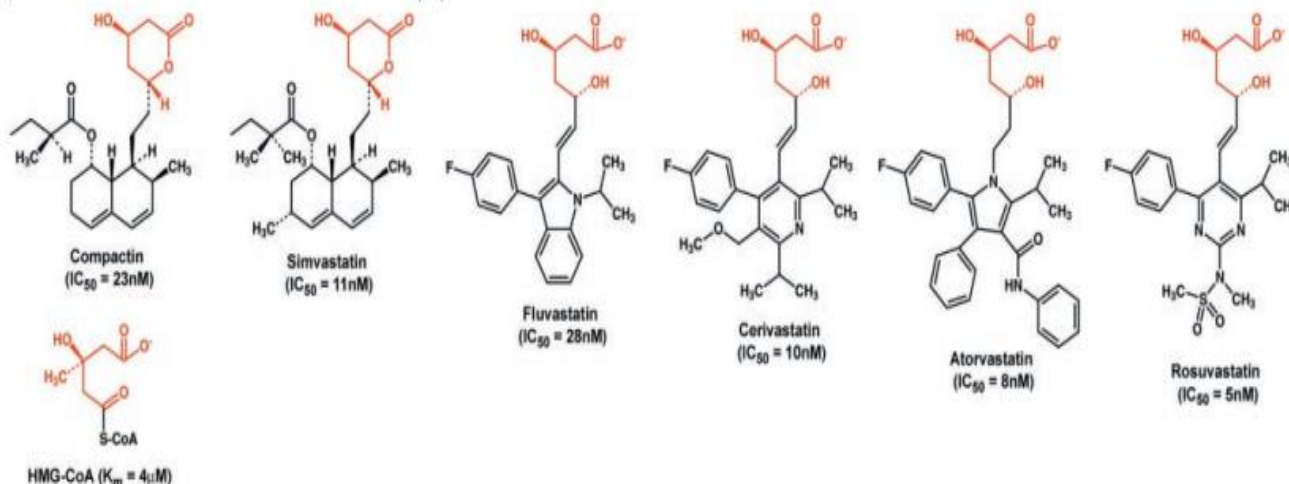
Βασικός παράγοντας για την μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου είναι η μείωση των υψηλών επιπέδων ολικής χοληστερόλης, λόγω της γραμμικής συσχέτισης που υπάρχει μεταξύ τους. Εκτός από τη μείωση της LDL-χοληστερόλης, μελέτες επικεντρώνονται στην ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων της HDL-χοληστερόλης καθώς φαίνεται να λειτουργεί ανασταλτικά στην εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου, ενώ ταυτόχρονα προστατεύει από την αθηροσκλήρωση, ρυθμίζοντας την φλεγμονή και καταστέλλοντας τη συσσώρευση των VLDL, την οξειδωση, την ενδοθηλιακή βλάβη και τη θρόμβωση. (Gordon DJ et al., 1989)

2.2.2 Μηχανισμός δράσης



Σχήμα 4 Μηχανισμός δράσης στατινών κατά τη βιοσύνθεση της χοληστερόλης- Αναστολή της λειτουργίας του ενζύμου HMG-CoA, που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή μεβαλονικού οξέος (Widomska et al., 2017)

Η κύρια δράση των στατινών αφορά την αναστολή της δράσης της αναγωγάσης του 3- μέθυλο-3- υδρόξυλο γλουτάριλο- συνενζύμου A (HMG- CoA), ενός ενζύμου που ευθύνεται για την μετατροπή του HMG- CoA σε μεβαλονικό οξύ, το οποίο και αποτελεί το πρώτο στάδιο της βιοσύνθεσης της χοληστερόλης. Λόγω της παρόμοιας χημικής τους δομής, σε μοριακό επίπεδο, με το μόριο HMG-CoA, οι στατίνες δρουν ως συναγωνιστικοί αναστολείς του ενζύμου, προσομοιάζουν στο ενεργό του κέντρο και ανταγωνίζονται με αυτό τον τρόπο το φυσικό υπόστρωμα. (Stancu & Sima, 2001)



Σχήμα 5 Χημικές δομές διαφόρων στατινών και του ενζύμου HMG-CoA. Το τμήμα των στατινών που προσομοιάζει την δομή του ενεργού κέντρου του ενζύμου φαίνεται με κόκκινο χρώμα. (Istvan, 2001)

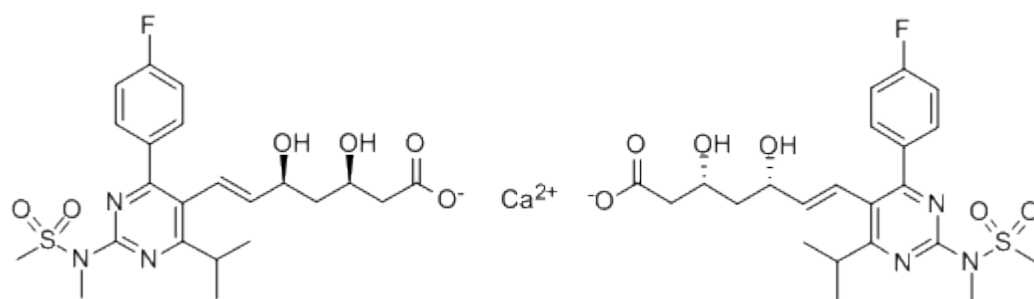
Με την αναστολή της HMG-CoA αναγωγάσης, οι στατίνες μπλοκάρουν την οδό για τη σύνθεση χοληστερόλης στο ήπαρ, με άμεση συνέπεια αυτού, την μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης στο αίμα. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι το μεγαλύτερο ποσοστό χοληστερόλης που κυκλοφορεί στο αίμα προέρχεται από την εσωτερική κατασκευή παρά τη δίαιτα (Ačimovič & Rozman, 2013). Η μείωση της ηπατικής χοληστερόλης ανιχνεύεται από τα ηπατικά κύτταρα, τα οποία επιδιώκοντας την αντιστάθμιση της μείωσης αυτής, συνθέτουν υποδοχείς LDL που αποσπούν χοληστερόλη από την κυκλοφορία του αίματος. (Lecker et al., 2011)

2.2.3 Συμβολή τους στην υγεία

Μεγάλος αριθμός στατινών, με ελαφρώς διαφορετικά φαρμακολογικά προφίλ, έχει αναπτυχθεί έως σήμερα, κατατάσσοντας τις στατίνες ως τους πιο συχνά συνταγογραφούμενους παράγοντες για την μείωση των λιπιδίων. Οι θετικές επιδράσεις αυτών για την ανθρώπινη υγεία είναι ποικίλες, με βασικότερη, την ικανότητά τους να μειώνουν την κακή χοληστερόλη- LDL κατά 20- 35%, μείωση που συνεπάγεται και την ελάττωση της συχνότητας εμφάνισης των καρδιαγγειακών συμβάντων σε δοκιμές πρωτογενούς και δευτερογενούς πρόληψης, συμπεριλαμβανομένων και ειδικών πληθυσμών ασθενών, όπως ασθενείς με ταυτόχρονη νεφρική ανεπάρκεια (Horita et al., 2014). Πέραν της υπολιπιδαιμικής τους δράσης, οι στατίνες είναι σε θέση να μειώσουν την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, καθώς όχι μόνο ελαττώνουν τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης, αλλά αυξάνουν παράλληλα την βιοδιαθεσιμότητα σε NO. (Tousoulis et al., 2008)

2.2.4 Ροσουβαστατίνη

Η ροσουβαστατίνη (rosuvastatin) είναι το έβδομο φάρμακο, που εγκρίθηκε από τον FDA τον Αύγουστο του 2003 για τη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης σε ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία και το αναφέρεται ως η πιο ισχυρή διαθέσιμη στατίνη που κυκλοφορεί στο εμπόριο, με σημαντικό αντίκτυπο στην αγορά φαρμάκων για τη μείωση της χοληστερόλης. Είναι μια συνθετική οργανική ένωση, με ένα μόνο εναντιομερές, και χορηγείται ως το άλας ασβεστίου του ενεργού υδρόξυ-οξέος. (Quirk et al., 2003). Η πατέντα της ροσουβαστατίνης καταχωρήθηκε το 1991 και εγκρίθηκε το 2003 η χρήση του στις Ηνωμένες Πολιτείες για ιατρικούς σκοπούς. Κυκλοφορεί με την εμπορική ονομασία Crestor από την φαρμακευτική εταιρεία Astra Zeneca, αλλά διατίθεται και ως γενόσημο φάρμακο. Το 2017, ήταν το 39^ο πιο συνταγογραφούμενο φάρμακο στις Ηνωμένες Πολιτείες με πάνω από 19 εκατομμύρια συνταγογραφήσεις.



Σχήμα 6 Ασβεστιούχος ροσουβαστατίνη

Στο μόριο της ροσουβαστατίνης περιέχεται μια πολική ομάδα μέθυλο-σουλφοναμιδίου, η οποία σχηματίζει μια μοναδική αλληλεπίδραση με την HMG-CoA αναγωγή, γεγονός που προσδίδει στο μόριο μεγάλη δραστηριότητα συγκριτικά με τις άλλες στατίνες, λόγω του μεγαλύτερου αριθμού αλληλεπιδράσεων σύνδεσης με το ένζυμο. Επιπρόσθετα, η ομάδα αυτή προσδίδει υδροφιλικότητα στο μόριο, μία ιδιότητα που σχετίζεται με τη σχετική ηπατοεκλεκτικότητα του φαρμάκου. Ο χρόνος ημιζωής της ροσουβαστατίνης είναι ο μεγαλύτερος μεταξύ όλων των διαθέσιμων στατινών (~ 19 ώρες), μεταβολίζεται ελάχιστα διαμέσου του κυτοχρώματος CYP450 και απεκκρίνεται σχεδόν αμετάβλητη, με τις συγκεντρώσεις των μεταβολιτών της να μένουν ανεπηρέαστες από άλλα φάρμακα που αναστέλλουν το CYP450. (Scott et al., 2004)

Η ροσουβαστατίνη αποτελεί την πιο αποτελεσματική στατίνη, όσον αφορά την μείωση των επιπέδων της LDLχοληστερόλης. Συγκεκριμένα, σε δόση 10mg/μέρα παρατηρείται μείωση της LDL-C έως και 45%, ενώ σε δόση 40mg/μέρα η μείωση μπορεί να φτάσει τα επίπεδα του 63%, με ταυτόχρονη

μείωση των τριγλυκεριδίων κατά 20-30% και αύξηση της υψηλής πυκνότητας χοληστερόλης HDL-C έως και 14%.(McTaggart, 2003)

Η δραστική ουσία ροσουβαστατίνη απαντάται στο εμπόριο σε συγκεντρώσεις 5,10,20 και 40mg/tab και ενδείκνυται (χωρίς διάκριση φύλου) στις παρακάτω περιπτώσεις:

- Πρωτογενής υπερχοληστερολαιμία, μικτή δυσλιπιδαιμία σε ηλικιωμένους 65 ετών και άνω
- Πρωτοπαθή υπερχοληστερολαιμία (τύπου IIa, συμπεριλαμβανομένης της ετερόζυγης οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας) ή μικτή δυσλιπιδαιμία (τύπου IIb), σε ενήλικες και παιδιά ηλικίας 6 ετών και άνω
- Ομόζυγη οικογενής υπερχοληστερολαιμία και ετερόζυγη οικογενής υπερχοληστερολαιμία σε παιδιά 1 έτους έως 12 ετών και εφήβους 12 έως 18 ετών
- Πρωτογενής πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων σε ενήλικες
- Πρόληψη των κύριων καρδιαγγειακών συμβάντων σε ασθενείς που εκτιμάται ότι είναι υψηλού κινδύνου να παρουσιάσουν το πρώτο καρδιαγγειακό επεισόδιο, ως συμπληρωματικό της διόρθωσης άλλων παραγόντων κινδύνου (Bajaj & Giwa, 2021)

2.3 επικύρωση αναλυτικής μεθόδου

Η επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου είναι η διαδικασία συλλογής των απαραίτητων δεδομένων που αποδεικνύουν ότι το σύστημα λειτουργεί και αποδίδει για την προτεινόμενη χρήση του με ακρίβεια, επαναληψιμότητα και αξιοπιστία σε μια συγκεκριμένη ανάλυση. Η αξιοπιστία μιας συγκεκριμένης μεθόδου αποδεικνύεται με εργαστηριακά πειράματα, χρησιμοποιώντας δείγματα ή πρότυπα, τα οποία είναι παρόμοια με τα άγνωστα δείγματα και αναλύονται σε καθημερινή βάση.

Η αναγκαιότητα για επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων σχετίζεται άμεσα με την ανάγκη συμμόρφωσης ως προς τις απαιτήσεις της Νομοθεσίας και των διάφορων Κανονιστικών Επιτροπών. Διεθνείς Οργανισμοί, όπως FDA (Food Drug Administration), ICH (International Conference on Harmonization), καθώς και Διεθνώς αναγνωρισμένες Φαρμακοποιίες, όπως η Διεθνής Φαρμακοποιία (Ph Int), η Αμερικανική Φαρμακοποιία (USP), η Ιαπωνική (JP), η Ευρωπαϊκή (EP) και η Βρετανική (BP) έχουν θεσπίσει οδηγίες για την επικύρωση των αναλυτικών και βιοαναλυτικών μεθόδων. Με τον όρο «Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου» αναφερόμαστε στις διαδικασίες, οι οποίες είναι απαραίτητες για την απόδειξη ότι η αναλυτική μέθοδος είναι κατάλληλη να εφαρμοστεί για το σκοπό που έχει αναπτυχθεί και χωρίζεται σε τρεις κατηγορίες :

1. Πλήρης επικύρωση (Full Validation), που απαιτείται κατά την ανάπτυξη μιας νέας βιοαναλυτικής μεθόδου
2. Μερική επικύρωση (Partial Validation), σε περιπτώσεις τροποποίησης μιας, ήδη, επικυρωμένης βιοαναλυτικής μεθόδου (σε περιπτώσεις μεταφοράς της μεθόδου μεταξύ εργαστηρίων, ή έπειτα από κάποια αλλαγή στο όργανο ή στο λογισμικό, καθώς και κατόπιν μικρών μεταβολών στις συνθήκες προκατεργασίας ή αποθήκευσης του δείγματος και στο υπόστρωμα ανάλυσης)
3. Διασταυρούμενη επικύρωση (Cross-Validation), για την σύγκριση των παραμέτρων σε περίπτωση που δύο ή περισσότερες βιοαναλυτικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται σε μια μελέτη.

Για την επικύρωση των βιοαναλυτικών μεθόδων έχουν οριστεί παράμετροι- κριτήρια αποδοχής, τα οποία είναι τα εξής:

1. Ακρίβεια (Accuracy)
2. Πιστότητα (Precision)
3. Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD)
4. Όριο ποσοτικής αποτίμησης (Limit of Quantitation, LOQ)

5. Εξειδίκευση (Specificity)
6. Γραμμικότητα και Εύρος (Linearity, Range)
7. Ανθεκτικότητα (Ruggedness)
8. Ευρωστία (Robustness)

2.3.1 Ακρίβεια

Ως ακρίβεια ορίζεται η προσέγγιση της προσδιοριζόμενης τιμής προς την πραγματική και συγκεκριμένα είναι ο βαθμός συμφωνίας των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τη μέθοδο με την πραγματική τιμή (ή με μια παραδεκτή ως πραγματική τιμή). Η αποδεκτή τιμή μπορεί να ληφθεί από :

- Υλικό αναφοράς γνωστής ή γενικά αποδεκτής σύνθεσης
- Ειδικά παρασκευασμένο δείγμα (spiked)
- Τα αποτελέσματα μιας άλλης μεθόδου, με γνωστή ακρίβεια και επαναληψιμότητα

2.3.2 Πιστότητα

Ο όρος πιστότητα μιας μεθόδου αναφέρεται στο βαθμό συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων, όταν η διαδικασία εφαρμόζεται κατ' επανάληψη σε πολλαπλά δείγματα και διακρίνεται στις εξής κατηγορίες:

α) Επαναληψιμότητα (Repeatability), η οποία ορίζεται ως το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων διαδοχικών ελέγχων στο ίδιο δείγμα, που εκτελούνται κάτω από τις ίδιες συνθήκες, εντός μιας μικρής χρονικής περιόδου (ίδιος αναλυτής, ίδια μέθοδος, ίδιο όργανο, ίδιο εργαστήριο, βραχύ χρονικό διάστημα).

β) Ενδιάμεση επαναληψιμότητα (Intermediate precision), η οποία αναφέρεται και ως ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα και εκφράζει τη μακροπρόθεσμη διακύμανση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων. Ο σκοπός της επικύρωσής της είναι να επιβεβαιώσει ότι στο ίδιο εργαστήριο, η μέθοδος θα δώσει τα ίδια αποτελέσματα, μετά το τέλος της ανάπτυξης της μεθόδου.

γ) Αναπαραγωγιμότητα (Reproducibility), είναι το μέτρο της διασποράς μεταξύ των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με την ίδια μέθοδο στο ίδιο δείγμα, κάτω από διαφορετικές συνθήκες (διαφορετικός αναλυτής, διαφορετικά όργανα, διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίων, διαφορετικοί χρόνοι). Η διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα εκφράζει την επαναληπτικότητα των αποτελεσμάτων μεταξύ εργαστηρίων, με αντικειμενικό σκοπό να επιβεβαιώσει ότι η μέθοδος θα δώσει τα ίδια αποτελέσματα σε διαφορετικά εργαστήρια.

2.3.3 Ευαισθησία - Όρια Ευαισθησίας: Όριο ανίχνευσης (LOD) και όριο ποσοτικής αποτίμησης (LOQ).

Ο όρος ευαισθησία μίας μεθόδου αναφέρεται στην ικανότητα αυτής να ανιχνεύει με αξιοπιστία χαμηλές συγκεντρώσεις του αναλύτη, διακρίνοντας το σήμα του από το σήμα του υποβάθρου ή θορύβου. Η ικανότητα αυτή ποσοτικοποιείται με δύο εκφράσεις:

α) το όριο ανίχνευσης (Detection Limit, DL ή LOD) που είναι το ελάχιστο παρατηρούμενο σήμα, το οποίο με αξιοπιστία μπορεί να θεωρηθεί ότι προέρχεται από τον αναλύτη. Συγκεκριμένα, είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση του συστατικού, που μπορεί να ανιχνευθεί πάνω από τη βασική γραμμή θορύβου στον ανιχνευτή.

β) το όριο ποσοτικής αποτίμησης (Quantitation Limit, QL ή LOQ) που είναι η χαμηλότερη ποσότητα εισαγόμενου συστατικού, η οποία παρέχει επαναλήψιμα εμβαδά κορυφής πάνω από τη βασική γραμμή θορύβου και μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά. Το ύψος των κορυφών απαιτείται να είναι 10 – 20 φορές ψηλότερο από το θόρυβο βασικής γραμμής.

2.3.4 Εκλεκτικότητα - Εξειδίκευση

Ως εκλεκτικότητα μιας μεθόδου ορίζεται η ικανότητα διάκρισης ανάμεσα στον αναλύτη και σε συγγενικές ουσίες (γνωστές προσμίξεις, ισομερή, προϊόντα αποικοδόμησης, μεταβολίτες, συστατικά του μητρικού υλικού του δείγματος, κλπ). Για τον έλεγχο της εκλεκτικότητας πρέπει να αποδειχθεί η έλλειψη σήματος στο λευκό βιολογικό υπόστρωμα δείγματος.

Η εξειδίκευση αναφέρεται στην ικανότητα της μεθόδου να μετρά επακριβώς ένα συστατικό παρουσία παρεμποδισμών, που αναμένεται να εμφανιστούν στο δείγμα, μ' ένα προκαθορισμένο

επίπεδο ακρίβειας και επαναληψιμότητας. Η διαφορά των δύο όρων συνοψίζεται στο ότι, μια μέθοδος είναι εξειδικευμένη όταν τα υπόλοιπα συστατικά του μείγματος, εκτός της αναλυόμενης ουσίας, δεν παράγουν κανένα αναλυτικό σήμα. Ενώ, μια μέθοδος είναι εκλεκτική όταν ακόμη και να παρουσιάζεται αναλυτικό σήμα από τα υπόλοιπα συστατικά, αυτό δεν επηρεάζει το σήμα της αναλυόμενης ουσίας.

2.3.5 Γραμμικότητα και Εύρος

Η γραμμικότητα μιας αναλυτικής μεθόδου αναφέρεται στην γραμμική εξάρτηση της μετρούμενης ιδιότητας από την συγκέντρωση του δείγματος και εξετάζεται σε όλο το εύρος περιοχής συγκεντρώσεων (range) της μεθόδου. Συγκεκριμένα, είναι η ικανότητα να υπολογίζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων άμεσα ή με προκαθορισμένες μαθηματικές μετατροπές, σε αναλογία με τη συγκέντρωση των προσδιοριζόμενων συστατικών ενός δείγματος, σε συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων.

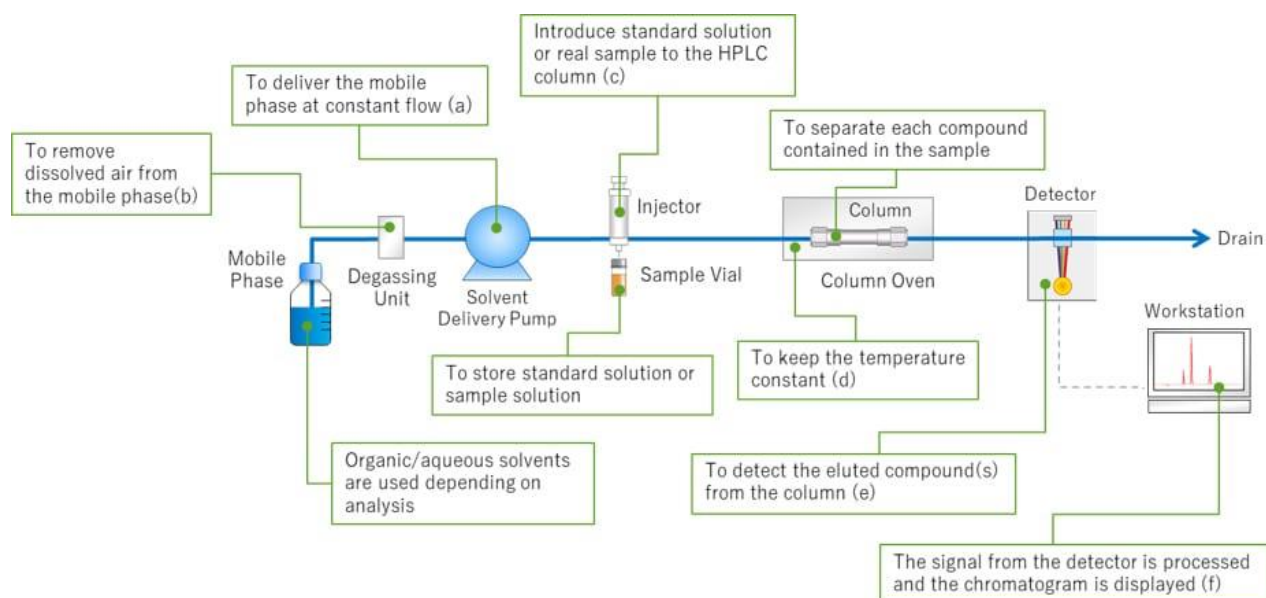
Το εύρος της μεθόδου είναι συνδεδεμένο με τη γραμμικότητά της. Είναι το διάστημα μεταξύ της χαμηλότερης και της υψηλότερης τιμής της συγκέντρωσης του συστατικού, για το οποίο έχει αποδειχθεί ότι η αναλυτική μέθοδος έχει ένα κατάλληλο επίπεδο ακρίβειας, επαναληψιμότητας και γραμμικότητας. Η περιοχή συγκεντρώσεων μιας αναλυτικής μεθόδου εκτείνεται από το όριο ποσοτικοποίησης μέχρι τη συγκέντρωση που παρατηρείται απόκλιση από τη γραμμικότητα κατά 1-2%

2.3.6 Ανθεκτικότητα - Ευρωστία

Ως ανθεκτικότητα (Ruggedness) μιας μεθόδου ορίζεται το μέτρο της ικανότητάς της να παραμένει σταθερή και ανεπηρέαστη σε προσχεδιασμένες μικρές, αλλά σκόπιμες μεταβολές των λειτουργικών της παραμέτρων. Η ανθεκτικότητα εξετάζεται στην φάση της ανάπτυξης της μεθόδου, αποτελώντας ουσιαστικά την αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων, που αποκτήθηκαν από την ανάλυση δειγμάτων κάτω από ποικίλες συνθήκες. Μια ανθεκτική μέθοδος είναι ικανή να αντέχει σε μικρές μεταβολές και να δρα ρυθμιστικά έναντι της μη σωστής τεχνικής του αναλυτή ή μη σωστής λειτουργίας του οργάνου. Με τον έλεγχο της εξετάζονται διαφορετικές τιμές κάθε λειτουργικής παραμέτρου που επηρεάζει την απόδοση της μεθόδου και από τα αποτελέσματά της διαμορφώνονται οι έλεγχοι καταλληλότητας συστήματος για να εξασφαλισθεί η αξιοπιστία της μεθόδου κατά την εφαρμογή της.

Η ευρωστία (robustness) μιας μεθόδου αναφέρεται σε τυχαίες, μη σκόπιμες μεταβολές των πειραματικών παραμέτρων, που αντιστοιχούν στον έλεγχο της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας και με τις δοκιμές της εξετάζεται η επίδραση των λειτουργικών παραμέτρων στα αποτελέσματα της ανάλυσης. Για τον προσδιορισμό της, ένας αριθμός χρωματογραφικών παραμέτρων διαφοροποιούνται εντός ρεαλιστικού εύρους και προσδιορίζεται η ποσοτική επίδραση των μεταβολών. Στην περίπτωση που η επίδραση αυτή είναι εντός προκαθορισμένης ανοχής, η μέθοδος θεωρείται εύρωστη ως προς τη συγκεκριμένη παράμετρο. Μια εύρωστη μέθοδος είναι αυτή η οποία παραμένει ανεπηρέαστη από μικρές μεταβολές των κρίσιμων λειτουργικών παραμέτρων.

2.4 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης



Σχήμα 7 Διάγραμμα ροής HPLC (Shimadzu, 2021)

2.4.1 Πεδίο εφαρμογών

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ή υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography ή High Performance Liquid Chromatography) – Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης ή Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης είναι μία ιδιαίτερα διαδεδομένη τεχνική διαχωρισμού, με ετήσιες πωλήσεις σε όργανα HPLC που φθάνουν τα δισεκατομμύρια δολάρια. Οι βασικοί λόγοι αυτής της ευρείας αποδοχής είναι η πρώτη από όλα η ευαισθησία της, η ακρίβειά που παρέχει σε ποσοτικούς προσδιορισμούς, αλλά και η καταλληλότητά της για διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών. Η εφαρμογή της αφορά προσδιορισμούς ουσιών πρωτίστου ενδιαφέροντος για τη βιομηχανία, το δημόσιο και πολλά επιστημονικά πεδία, όπως για παράδειγμα τα αμινοξέα, οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες, οι φαρμακευτικές ενώσεις, τα αντιβιοτικά, τα φυτοφάρμακα, τα νουκλεϊκά οξέα, οι υδρογονάνθρακες, οι οργανομεταλλικές ενώσεις αλλά και μια ποικιλία ανόργανων ουσιών. (Skoog D. A. et al., 2007)

2.4.2 Οργανολογία υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

Η οργανολογία της HPLC είναι πολυπλοκότερη και δαπανηρότερη από την οργανολογία άλλων ειδών χρωματογραφίας, γεγονός που οφείλεται στις υψηλές πιέσεις που δημιουργούνται για να αναπτυχθούν ικανοποιητικές ταχύτητες ροής του υγρού έκλουσης. Τα υλικά πλήρωσης που χρησιμοποιούνται αποτελούνται από σωματίδια μεγέθους 2 έως 10 μm και οι απαιτούμενες πιέσεις από τις αντλίες φθάνουν τις μερικές χιλιάδες psi.

II. 2.4.2.a Δοχεία κινητής φάσης και συστήματα επεξεργασίας διαλυτών

Τα σύγχρονα συστήματα HPLC είναι εφοδιασμένα με διατάξεις που εισάγουν διαλύτες από δύο ή περισσότερα δοχεία σε ένα θάλαμο ανάμιξης, με ρυθμούς που μεταβάλλονται συνεχώς. Ο λόγος των όγκων των διαλυτών μεταβάλλεται ως προς το χρόνο γραμμικά ή λογαριθμικά. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται ένας διαλύτης σταθερής σύστασης για τον διαχωρισμό των ουσιών, η έκλουση ονομάζεται ισοκρατική (isocratic elution), ενώ στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται δύο ή και τρία συστήματα διαλυτών-που διαφέρουν σημαντικά ως προς την πολικότητα- η έκλουση είναι βαθμιδωτή (gradient elution). Συχνά, η απόδοση διαχωρισμού ενισχύεται σημαντικά με τη βαθμιδωτή έκλουση.

III. 2.4.2.b Συστήματα άντλησης

Υπάρχουν τρεις τύποι αντλιών:

Οι παλινδρομικές αντλίες (reciprocating pumps) χρησιμοποιούνται στο 90 % των εμπορικά διαθέσιμων συστημάτων HPLC και αποτελούνται συνήθως από ένα μικρό θάλαμο, στον οποίο ο διαλύτης αντλείται παλινδρομικά με ένα μηχανικά κινούμενο έμβολο. Διαθέτουν μικρούς εσωτερικούς όγκους (35 έως 400 μL), αντέχουν υψηλές πιέσεις (μέχρι 10.000 psi), προσαρμόζονται εύκολα σε βαθμιδωτή έκλουση και σταθερές ταχύτητες ροής. Μειονεκτούν στο γεγονός ότι παράγουν παλμούς ροής, οι οποίοι πρέπει να αποσβήνονται, καθώς η παρουσία τους επηρεάζει την χρωματογραφική εικόνα (εμφανίζεται ως θόρυβος στη γραμμή βάσης του χρωματογραφήματος).

Οι αντλίες εκτόπισης (displacement pumps) αποτελούνται συνήθως από μεγάλους θαλάμους εφοδιασμένους με ένα έμβολο, που ενεργοποιείται από ένα κοχλιωτό μηχανισμό οδηγούμενο από ένα

βηματικό κινητήρα. Στα μειονεκτήματά τους περιλαμβάνονται η περιορισμένη χωρητικότητα διαλύτη (250 mL) και η σημαντική δυσκολία κατά την αλλαγή διαλυτών.

Στις –απλούστερες- πνευματικές αντλίες (pneumatic pumps) η κινητή φάση περιέχεται σε ένα πτυσσόμενο δοχείο, το οποίο βρίσκεται σε χώρο που μπορεί να συμπιέζεται με πεπιεσμένο αέριο. Οι αντλίες αυτού του τύπου είναι οι πιο οικονομικές και είναι απαλλαγμένες από παλμικές ροές. Μειονεκτούν λόγω μικρής χωρητικότητας, χαμηλής παρεχόμενης πίεσης, δεν προσαρμόζονται σε βαθμιδωτή έκλυση και περιορίζονται σε πιέσεις μικρότερες από 2000 psi. Ακόμη η ταχύτητα ροής εξαρτάται από το ιξώδες και την οπισθοπίεση της στήλης.

IV. 2.4.2.c Σύστημα έγχυσης δείγματος

Ο παλαιότερος τρόπος εισαγωγής δείγματος ήταν η έγχυση με μικροσύριγγα, μέσω ενός ελαστικού διαφράγματος, γνωστού ως septum. Ο τρόπος αυτός, ωστόσο, εμφάνιζε μικρή επαναληψιμότητα στις μετρήσεις (σπάνια είναι καλύτερη από 2 % έως 3 %), αλλά και αδυναμία έγχυσης πολύ μικρών όγκων, με αποτέλεσμα την υπερφόρτωση των στηλών, η οποία με τη σειρά της προκαλεί διεύρυνση των κορυφών στο χρωματογράφημα. Τα σύγχρονα όργανα είναι εφοδιασμένα με συστήματα αυτόματων δειγματοληπτών, τα οποία ελαχιστοποιούν τα προβλήματα αυτά και αυξάνουν στο μέγιστο δυνατό την επαναληψιμότητα των μετρήσεων.

V. 2.4.2.d Θερμοστάτες στήλης

Σε αρκετές περιπτώσεις ο αυστηρός έλεγχος της θερμοκρασίας της στήλης δεν είναι αναγκαίος και οι στήλες λειτουργούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι διατηρώντας τη θερμοκρασία της στήλης σταθερή, συχνά λαμβάνονται καλύτερα χρωματογραφήματα. Ένα σύστημα σήμερα είναι εφοδιασμένο με θερμοστάτες, που ελέγχουν τη θερμοκρασία της στήλης με ακρίβεια μερικών δέκατων του βαθμού Κελσίου.

VI. 2.4.2.e Στήλες υγρής χρωματογραφίας (HPLC Columns)

Η πλειονότητα των στηλών υγρής χρωματογραφίας έχουν μήκος από 10 έως 30 cm, έχουν εσωτερική συνήθως 4 έως 10 mm και το μέγεθος σωματιδίων του υλικού πλήρωσης είναι 5 ή 10 μm.

Συνήθως οι στήλες είναι ευθύγραμμες και στην περίπτωση που απαιτείται η επιμήκυνσή τους, αυτή επιτυγχάνεται με σύζευξη δύο ή περισσότερων στηλών μαζί.

Για να αυξηθεί ο χρόνος ζωής μίας αναλυτικής στήλης, συχνά παρεμβάλλεται μια μικρή προστατευτική στήλη (guard column) ή προστήλη (pre-column), η οποία απομακρύνει όχι μόνο τα αιωρούμενα σωματίδια και τις προσμίξεις από το διαλύτη, αλλά και συστατικά του δείγματος που συνδέονται με τη στατική φάση μη αντιστρεπτά. Το κόστος μίας προστήλης είναι σημαντικά χαμηλότερο από την αναλυτική στήλη και όταν αυτή ρυπαίνεται, αναγομώνεται ή απορρίπτεται και αντικαθίστανται με νέα του ίδιου τύπου.

VII. 2.4.2.f Ανιχνευτής (Detector)

Η ανίχνευση των ουσιών που εξέρχονται της στήλης γίνεται συνεχώς, κυρίως με φασματομετρία UV/Vis, όπου το παραγόμενο από τον ανιχνευτή φως προσπίπτει σε κυψελίδα συνεχούς ροής από χαλαζία και μετρείται η απορρόφηση του φωτός. Οι ανιχνευτές που κυρίως χρησιμοποιούνται στην HPLC είναι οι παρακάτω:

- ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους (UV/Vis Detector)
- ανιχνευτές συστοιχίας φωτοδιόδων (Diode Array Detector, DAD)
- αγωγιμομετρικοί ανιχνευτές (Conductivity Detector)
- ανιχνευτές δείκτη διάθλασης (Refractive Index Detector)
- φασματογράφοι μάζας MS (Mass Spectroscopy Detector, MS Detector)
- ανιχνευτής Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Detector, NMR Detector)
- ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές (Electrochemical Detector)
- φθορισμομετρικοί ανιχνευτές (Fluorescence Detector)

VIII. 2.3.2.g Καταγραφικό

Το μετρούμενο σήμα που καταγράφεται συνεχώς κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, στέλνεται στη συνέχεια σε κάποιον υπολογιστή που μέσω ειδικού προγράμματος παράγει το χρωματογράφημα της ανάλυσης.

IX. 2.3.2.h Δεξαμενή αποβλήτων

Είναι η δεξαμενή όπου συλλέγεται η κινητή φάση μαζί με τα περιεχόμενα συστατικά του δείγματος. Στην περίπτωση που είναι επιθυμητή η συλλογή κλασμάτων της κινητής φάσης, (όπως στην προπαρασκευαστική HPLC), χρησιμοποιείται αυτόματος κλασματοσυλλέκτης (fraction collector).

2.3.4 Υγρή χρωματογραφία υπέρ υψηλής απόδοσης

Η υγρή χρωματογραφία υπέρ υψηλής απόδοσης UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) δίνει τη δυνατότητα της απευθείας εφαρμογής της στις ήδη υπάρχουσες συνθήκες της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), αποτελώντας έτσι ένα πολύ ισχυρό εργαλείο για τον διαχωρισμό και την ποσοτικοποίηση διαφόρων ουσιών. Η βασική διαφορά μεταξύ των δύο τεχνικών είναι ότι στην UHPLC χρησιμοποιούνται πιο μικρές και στενότερης εσωτερικής διαμέτρου στήλες με πληρωτικό υλικό που έχει πορώδες μικρότερο των 2 μm. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα υπερ-υψηλές οπίσθιες πιέσεις και μεγάλες γραμμικές ταχύτητες των κινητών φάσεων, πράγμα που οδηγεί στην ταχεία και ικανοποιητική έκλουση ενός μεγάλου πλήθους αναλυτών, ακόμα και αυτών παραπλήσιας δομής. Οι κορυφές που εμφανίζονται είναι υψηλές και στενές, με πλάτος στη γραμμή βάσης μικρότερο των 10second, παρέχοντας μέγιστη χρωματογραφική ανάλυση και χωρητικότητα της κορυφής. Ταυτόχρονα ελαχιστοποιούνται οι παρεμποδίσεις λόγω συνέκλουσης κορυφών από άλλες ουσίες. Το πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής διαχωρισμού είναι η δημιουργία στενών κορυφών, χρησιμοποιώντας ελάχιστο όγκο δείγματος και μεγάλο ρυθμό απόκτησης δεδομένων, διατηρώντας ταυτόχρονα υψηλές αποδόσεις. (Wu et al., 2010)

2.5 Πειραματικό μέρος

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία παρουσιάζεται η μεταφορά τεχνολογίας μίας αναλυτικής μεθόδου μεταξύ δύο φαρμακευτικών επιχειρήσεων και συγκεκριμένα η επιχείρηση αναφοράς είναι η εταιρεία Apotex Inc. που εδρεύει στον Καναδά και η επιχείρηση δέκτης είναι η εταιρεία Demo AE, η οποία εδρεύει στην Ελλάδα. Οι αναλύσεις που θα περιγραφτούν αναφέρουν τις διαδικασίες, τα πειράματα και τα κριτήρια αποδοχής για την αναλυτική μεταφορά τεχνολογίας των μεθόδων που αναπτύχθηκαν βασισμένες στις οδηγίες εργασίας που περιγράφουν τα πρωτόκολλα

επικύρωσης-επαλήθευσης αναλυτικών μεθόδων και τη μεταφορά των αναλυτικών διαδικασιών. Όλες οι μέθοδοι που θα ακολουθήσουν αναπτύχθηκαν in house, επικυρώθηκαν από την εταιρεία Arotex Inc. και μεταφέρθηκαν μέσω μερικής επικύρωσης και επαλήθευσης στην εταιρεία Demo ΑΕ.

Η παρούσα διαδικασία αφορά το ημιέτοιμο και τελικό προϊόν 'Rosuvastatin Calcium Tablets' της εταιρείας Arotex Inc, το οποίο κυκλοφορεί σε συγκεντρώσεις των 5,10,20 και 40mg/tab.

2.5.1 Προδιαγραφές ημιετούμου προϊόντος

I. Περιγραφή

- 5 mg: κίτρινο δισκίο, με στρογγυλό σχήμα, αμφίκυρτο, επικαλυμμένο με λεπτό υμένιο. Στην μία πλευρά είναι χαραγμένο 'APO' και στην άλλη 'ROS 5'.



- 10 mg: ροζ δισκίο, με στρογγυλό σχήμα, αμφίκυρτο, επικαλυμμένο με λεπτό υμένιο. Στην μία πλευρά είναι χαραγμένο 'APO' και στην άλλη 'ROS 10'.



- 20 mg: ροζ δισκίο, με στρογγυλό σχήμα, αμφίκυρτο, επικαλυμμένο με λεπτό υμένιο. Στην μία πλευρά είναι χαραγμένο 'APO' και στην άλλη 'ROS 20'.



- 40 mg: ροζ δισκίο, με οβάλ σχήμα, αμφίκυρτο, επικαλυμμένο με λεπτό υμένιο. Στην μία πλευρά είναι χαραγμένο 'APO' και στην άλλη 'ROS 40'.



II. Ταυτοποίηση δραστικών ουσιών

1. Ταυτοποίηση με UPLC : ο χρόνος ανάσχεσης της κύριας κορυφής στο χρωματογράφημα του δείγματος αντιστοιχεί σε αυτόν της κύριας κορυφής στο χρωματογράφημα του προτύπου. Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στον ποσοτικό προσδιορισμό.
2. Ταυτοποίηση με UV : ελέγχεται το φάσμα 200-400nm δείγματος και προτύπου χρησιμοποιώντας κυψελίδα 1,0 cm και η ταυτοποίηση θεωρείται θετική εάν το δείγμα και το πρότυπο έχουν maxima και minima στα ίδια μήκη κύματος.

III. Υγρασία

Κονιορτοποιούνται 10 ταμπλέτες σε σκόνη. Ζυγίζεται 1,0γρ δείγματος και προσδιορίζεται η υγρασία με Karl Fisher. Η υγρασία για όλες τις συγκεντρώσεις δεν πρέπει να υπερβαίνει το 6%.

IV. Μέσο βάρος δισκίου

Το μέσο βάρος υπολογίζεται από το μέσο όρο 20 ταμπλετών. Για κάθε συγκέντρωση τα όρια του μέσου βάρους είναι :

- 5 mg: 99-106 mg
- 10 mg: 149-159 mg
- 20 mg: 298-319 mg
- 40 mg: 298-319 mg

V. Ομοιομορφία χορηγούμενης δόσης

Κριτήριο αποδοχής (AV): ≤ 15.0

Acceptance Value (AV) = $|M-X| + ks$, όπου

X : μέσος όρος υπολογισμένος στον προσδιορισμό περιεκτικότητας

k: 2,4 όταν ο αριθμός των δειγμάτων είναι 10 και 2,0 όταν ο αριθμός των δειγμάτων είναι 30

s: τυπική απόκλιση (SD)

M: ισούται με X όταν $98,5 < X < 101,5\%$

ισούται με 98,5 όταν $X < 98,5$

ισούται με 101,5 όταν $X > 101,5$

VI. Διαλυτοποίηση

Αν και τα 6 δείγματα με χρόνο δειγματοληψίας 20min έχουν αποτέλεσμα $\geq 80\%$ της αρχικής περιεκτικότητας της ταμπλέτας, το αποτέλεσμα θεωρείται αποδεκτό.

VII. Περιεκτικότητα

Η κάθε ταμπλέτα θα πρέπει να έχει συγκέντρωση σε ροσουβαστατίνη 95-105% (ισχύει για αναλύσεις ημιετοιμού και τελικού προϊόντος, καθώς και αναλύσεις σταθερότητας).

VIII. Συναφείς ουσίες

- Για το ημιετοιμο-τελικό προϊόν ισχύει:

Imp ROU RC2 $\leq 0,20\%$	Imp ROU RC3 $\leq 0,20\%$	Imp ROU RC5 $\leq 0,20\%$
Imp ROU RC6 $\leq 0,20\%$	Imp ROU RC9 $\leq 0,30\%$	Imp ROU RC10 $\leq 30\text{ppm}$
Οποιαδήποτε άγνωστη πρόσμιξη $\leq 0,20\%$		
Σύνολο όλων των προσμίξεων $\leq 0,60\%$		

- Για αναλύσεις σταθερότητας ισχύει:

Imp ROU RC2 $\leq 0,40\%$	Imp ROU RC3 $\leq 0,40\%$	Imp ROU RC5 $\leq 0,30\%$
Imp ROU RC6 $\leq 0,30\%$	Imp ROU RC9 $\leq 0,80\%$	Imp ROU RC10 $\leq 60\text{ppm}$
Οποιαδήποτε άγνωστη πρόσμιξη $\leq 0,20\%$		
Σύνολο όλων των προσμίξεων $\leq 1,0\%$		

2.5.2 Έλεγχος περιεκτικότητας, ομοιομορφίας και ταυτοποίησης

Για την επικύρωση της συγκεκριμένης μεθόδου καθορίστηκαν ως κρίσιμα σημεία οι συγκεντρώσεις των 5 και 40mg, των οποίων η επαλήθευση καλύπτει και τις ενδιάμεσες συγκεντρώσεις των 10 και 20mg.

Οι παράμετροι που αξιολογήθηκαν από το εργαστήριο ποιοτικού ελέγχου ήταν:

- Δοκιμή καταλληλότητας συστήματος (System suitability test)
- Ειδικότητα (Specificity)
- Γραμμικότητα (Linearity)
- Ακρίβεια (Accuracy)
- Ακρίβεια μεθόδου (επαναληψιμότητα και ενδιάμεση ακρίβεια)

1) Όργανα –εξοπλισμός- αντιδραστήρια:

- UPLC (με ανιχνευτή UV, αυτόματο δειγματολήπτη και δυνατότητα ελέγχου θερμοκρασίας δειγματολήπτη και στήλης). Η καταγραφή και η επεξεργασία των δεδομένων έγινε μέσω προγράμματος Empower 3
- Στήλη UPLC BEH Shield RP 18 (χαρακτηριστικά: 10cm*2.1mm, 1.7μm)
- Rosuvastatin Calcium Reference standard
- Rosuvastatin tablets συγκέντρωσης 5 και 40mg
- Placebo για Rosuvastatin tablets συγκέντρωσης 5 και 40mg αντίστοιχα

2) Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

- Πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 0,25mg/ml Rosuvastatin (5,2 mg Rosuvastatin calcium Reference Standard -που περιέχει 5,0 mg Rosuvastatin- σε 25ml διαλύτη δειγμάτων)
- Διάλυμα δείγματος για τον έλεγχο περιεκτικότητας :

Για κάθε strength ζυγίστηκαν 20 ταμπλέτες και μεταφέρθηκαν στην κατάλληλη ογκομετρική φιάλη, όπου προστέθηκε ο όγκος του διαλύτη δειγμάτων, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2 Αντιστοιχία του όγκου διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για τα διαφορετικά strengths χαπιών

Strength-mg	Ογκομετρική φιάλη-mL (V1)	Όγκος διαλύτη δειγμάτων-mL
5	200	150
10	500	400
20	500	400
40	1000	800

Με την βοήθεια λουτρού υπερήχων επιτεύχθηκε πλήρης διάλυση των ταμπλετών και στη συνέχεια αραιώση έως την χαραγή (διάλυμα STOCK). Στη συνέχεια ποσότητα του stock διαλύματος αραιώθηκε εκ νέου σε συγκεκριμένο όγκο διαλύτη δειγμάτων σύμφωνα με τον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 3 Αντιστοιχία του όγκου διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για την αραιώση των stock διαλυμάτων, για τα διαφορετικά strengths χαπιών

Strength-mg	Όγκος stock-mL (V2)	Ογκομετρική φιάλη-mL (V3)	Συγκέντρωση-μg/mL
5	5	10	250
10	16	25	256
20	8	25	256
40	8	25	256

Η περιεκτικότητα σε Rosuvastatin υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\text{Rosuvastatin (\%label claim)} = \frac{A_{\text{sample}} \cdot W_{\text{std}} \cdot a \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot M_{\text{Brosuvastatin}}}{A_{\text{std}} \cdot 200 \cdot N \cdot V_2 \cdot LC \cdot M_{\text{Brosuvastatin calcium}}} \cdot 100$$

A sample: area rosuvastatin στο διάλυμα δείγματος

A std: average area rosuvastatin στο διάλυμα προτύπου

W std: area rosuvastatin στο διάλυμα προτύπου

a: δραστικότητα του Rocuvastatin Calcium Reference standard

V1: όγκος αραιώσης παρασκευής του Stock διαλύματος δείγματος (mL)

V3: όγκος αραιώσης παρασκευής τελικού διαλύματος δείγματος (mL)

N: αριθμός ταμπλετών που χρησιμοποιήθηκαν

V2: ποσότητα Stock διαλύματος δείγματος που αραιώθηκε (mL)

M_{Brosuvastatin}: 481,54*2

M_{Brosuvastatin calcium} : 1001,14

- System suitability test

Για τη δοκιμή καταλληλότητας του συστήματος παρασκευάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα σύμφωνα με τη μέθοδο.

- Σε μία ένεση του προτύπου ελέγχθηκαν τα κριτήρια καταλληλότητας του συστήματος

Tailing factor: 0.9-2.0

Theoretical plates \geq 7500

- Για τον έλεγχο της σταθερότητας του συστήματος εκτελέστηκαν 5 διαδοχικές ενέσεις του προτύπου διαλύματος και 2 ενέσεις στο τέλος της ανάλυσης, από τις οποίες υπολογίστηκε το %RSD σύμφωνα με τον τύπο :

$$RSD(\%CV) = \frac{SD \cdot 100}{\bar{x}}$$

Όπου %RSD area(των 5 διαδοχικών ενέσεων) \leq 2,0%

%RSD area(των 3 πρώτων επαναλήψεων και των 2 τελευταίων) \leq 2,0%

Για τον έλεγχο της ακρίβειας του συστήματος σε όλη τη διάρκεια της ανάλυσης ενέθηκαν δύο ενέσεις προτύπου μετά από κάθε 5 δείγματα ελέγχου. Στην περίπτωση που τα προς ανάλυση δείγματα

είναι >10, τότε μετά από κάθε δεκάδα δειγμάτων ενίεται ξανά πεντάδα διαδοχικών ενέσεων προτύπου διαλύματος.

Αποτελέσματα:

Πίνακας 4 Συγκεντρωτικός πίνακας που περιέχει το εμβαδόν, το ύψος, τον χρόνο ανάσχεσης και το %RSD για την πεντάδα των προτύπων. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο του συστήματος στην αρχή της ανάλυσης.

**Component Summary Table
Name: Rosuvastatin**

	SampleName	Inj	Channel	Name	RT	Area	Height	Amount
1	201021_Rosuvastatin_Std1_1	1	PDA Ch1 242nm@4.8nm	Rosuvastatin	9.955	11938390	973713	
2	201021_Rosuvastatin_Std1_2	1	PDA Ch1 242nm@4.8nm	Rosuvastatin	9.971	11964388	973437	
3	201021_Rosuvastatin_Std1_5	1	PDA Ch1 242nm@4.8nm	Rosuvastatin	9.977	12027648	978496	
4	201021_Rosuvastatin_Std1_4	1	PDA Ch1 242nm@4.8nm	Rosuvastatin	9.958	12030989	981109	
5	201021_Rosuvastatin_Std1_3	1	PDA Ch1 242nm@4.8nm	Rosuvastatin	9.970	11981741	975188	
Mean					9.966	11988631	976389	
Std. Dev.					0.009	40237		
% RSD					0.09	0.3		

Πίνακας 5 Συγκεντρωτικός πίνακας που περιέχει το εμβαδόν, το ύψος, τον χρόνο ανάσχεσης και το %RSD για την πεντάδα των προτύπων-ενδιάμεσων προτύπων. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο του συστήματος στο μέσο της ανάλυσης.

**Component Summary Table
Name: Rosuvastatin**

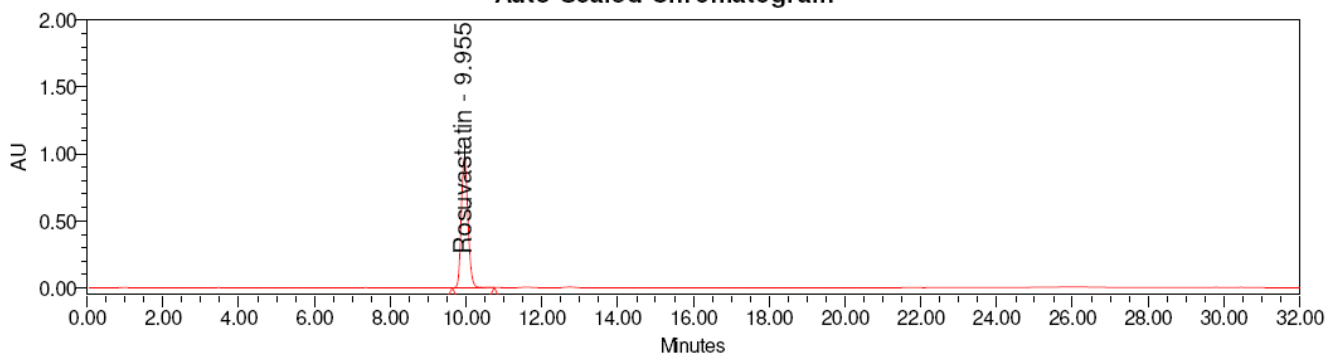
	SampleName	Inj	Channel	Name	RT	Area	Height	Amount
1	201021_Rosuvastatin_Std1_1	1	PDA Ch1 242nm@4.8nm	Rosuvastatin	9.955	11938390	973713	
2	201021_Rosuvastatin_Std1_2	1	PDA Ch1 242nm@4.8nm	Rosuvastatin	9.971	11964388	973437	
3	201021_Rosuvastatin_Std1_3	1	PDA Ch1 242nm@4.8nm	Rosuvastatin	9.970	11981741	975188	
4	201021_Rosuvastatin_Br1	1	PDA Ch1 242nm@4.8nm	Rosuvastatin	10.040	12148378	982965	
5	201021_Rosuvastatin_Br2	1	PDA Ch1 242nm@4.8nm	Rosuvastatin	10.030	12188490	991434	
Mean					9.993	12044278	979348	
Std. Dev.					0.039	115260		
% RSD					0.39	1.0		

Πίνακας 6 Συγκεντρωτικός πίνακας που περιέχει το εμβαδόν, το ύψος, τον χρόνο ανάσχεσης και το %RSD για την πεντάδα των προτύπων-ενδιάμεσων προτύπων. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο του συστήματος στο τέλος της ανάλυσης.

Component Summary Table
Name : Rosuvastatin

	SampleName	Inj	Channel	Name	RT	Area	Height	Amount
1	201021_Rosuvastatin_Std1_1	1	PDA Ch1 242nm@4.8nm	Rosuvastatin	9.955	11938390	973713	
2	201021_Rosuvastatin_Std1_2	1	PDA Ch1 242nm@4.8nm	Rosuvastatin	9.971	11964388	973437	
3	201021_Rosuvastatin_Std1_3	1	PDA Ch1 242nm@4.8nm	Rosuvastatin	9.970	11981741	975188	
4	201021_Rosuvastatin_Br3	1	PDA Ch1 242nm@4.8nm	Rosuvastatin	10.032	12052599	981900	
5	201021_Rosuvastatin_Br4	1	PDA Ch1 242nm@4.8nm	Rosuvastatin	10.031	12188760	993213	
Mean					9.992	12025176	979490	
Std. Dev.					0.037	100779		
% RSD					0.37	0.8		

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units	USP Plate Count	USP Tailing
1	Rosuvastatin	9.955	11938390	973713			15145.9	1.2

Εικόνα 2 Χρωματογράφημα μίας ένεσης προτύπου διαλύματος κατά τον έλεγχο περιεκτικότητας

- **Ειδικότητα (Specificity)**

Κατά τη μελέτη παρεμποδίσεων ενέθηκαν κατά σειρά :

1. Τυφλό διάλυμα (διαλύτης δειγμάτων)
2. Πρότυπο διάλυμα 0,25mg/ml Rosuvastatin
3. Διάλυμα δείγματος
4. Διάλυμα placebo

Κριτήρια αποδοχής : οποιαδήποτε παρεμπόδιση που βρίσκεται στον χρόνο ανάσχεσης του Rosuvastatin, δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,5% του εμβαδού της κύριας κορυφής του προτύπου διαλύματος.

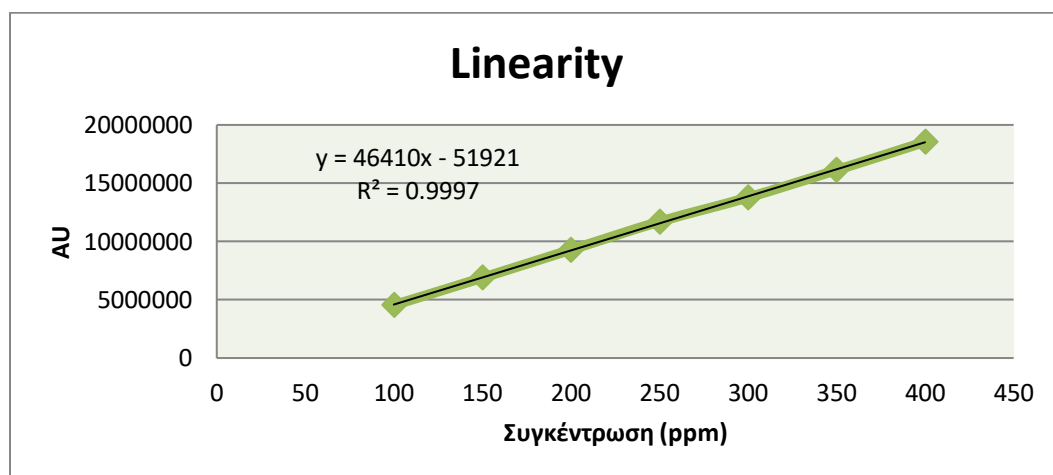
Αποτελέσματα: Δεν ανιχνεύθηκε καμία παρεμπόδιση στον χρόνο ανάσχεσης της κύριας κορυφής.

- Γραμμικότητα (Linearity)

Για τον έλεγχο της γραμμικότητας της μεθόδου αρχικά παρασκευάστηκε ένα πυκνό πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 800ppm (stock standard). Στη συνέχεια με διαδοχικές αραιώσεις στο stock διάλυμα, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 100, 150, 200, 250, 300, 350 και 400ppm και πραγματοποιήθηκε μία ένεση από το κάθε διάλυμα. Από την γραφική παράσταση του εμβαδού της κορυφής της Rosuvastatin για κάθε ένεση προς την συγκέντρωση του εκάστοτε διαλύματος, υπολογίζεται η κλίση της ευθείας.

Κριτήρια αποδοχής : r^2 όχι μικρότερο από 0,998

Αποτελέσματα:



- Ακρίβεια (Accuracy)

1. Για τον υπολογισμό της ακρίβειας (του αναλυτή) παρασκευάστηκαν δύο πρότυπα διαλύματα με τον ίδιο ακριβώς τρόπο, ενέθηκαν στο σύστημα και στη συνέχεια υπολογίστηκε η ακρίβεια από την σχέση :

$$\%accuracy = \frac{Area\ std1}{Area\ std\ 2} * \frac{Weight\ std2}{weight\ std1} * 100$$

Αποτελέσματα: a= 99.1%

2. Παρασκευάστηκαν 3 δείγματα για την κάθε συγκέντρωση δειγμάτων κάνοντας spike διαλύματα placebo με βάση τον παρακάτω πίνακα :

Label claim (mg)	Amount of placebo (mg)	Amount of Rosuvastatin Calcium (mg)	Volume of solution (mL)
5	1956	104	200
40	5168	832	1000

3. Υπολογίστηκε η % ανάκτηση για κάθε δείγμα που ενέθηκε.

Κριτήρια αποδοχής : η ανάκτηση για κάθε μεμονωμένο δείγμα θα πρέπει να είναι εντός 98-102%.

Αποτελέσματα:

Ανάκτηση (5mg)= 101.3%, 100.2%, 100.5%

Ανάκτηση (40mg)= 100.1 %, 100.8%, 100.1%

- Ακρίβεια μεθόδου (επαναληψιμότητα και ενδιάμεση ακρίβεια)

A. Επαναληψιμότητα (πρώτος αναλυτής)

Παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν 6 δείγματα για την κάθε συγκέντρωση δειγμάτων (5 και 40mg) σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω και υπολογίστηκαν :

- Η %περιεκτικότητα σε Rosuvastatin για κάθε δείγμα που ενέθηκε
- Ο μέσος όρος και %RSD για κάθε εξάδα δειγμάτων που ενέθηκε

B. Ενδιάμεση ακρίβεια (δεύτερος αναλυτής)

Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε για την επαναληψιμότητα, από διαφορετικό αναλυτή και διαφορετική ημέρα.

Αποτελέσματα:

Πίνακας 7 Συγκριτικός πίνακας των αποτελεσμάτων από τους 2 διαφορετικούς αναλυτές

Δείγμα	Αναλυτής A		Αναλυτής B	
	5mg	40mg	5mg	40mg
1	99,9	100,7	100,1	102,2
2	99,5	99,9	100,6	102
3	100,1	99,9	100,8	101,6
4	100,5	100,1	100,7	101,5
5	100,7	101	100,5	101,9
6	100,7	99,9	100,6	102
Μέσος όρος	100,23	100,25	100,55	101,87
STDEV	0,48	0,48	0,24	0,27
%RSD	0,5	0,5	0,2	0,3

|Διαφορά μεταξύ 2 αναλύσεων|: 5mg: 0.2% , 40mg: 1.6%

Κριτήρια αποδοχής:

- %RSD για κάθε εξάδα δειγμάτων που ενέθηκε <2.0%
- Η απόλυτη διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων της %περιεκτικότητας σε Rosuvastatin του μέσου όρου των δειγμάτων, μεταξύ των 2 αναλυτών πρέπει να είναι < 2,0%

2.5.3 Προσδιορισμός συναφών ουσιών Rosuvastatin σε Rosuvastatin Calcium Tablets 5,10,20 και 40mg/tab

Για την επικύρωση της συγκεκριμένης μεθόδου αξιολογήθηκαν οι εξής παράμετροι:

- Δοκιμή καταλληλότητας συστήματος (System suitability test)
- Ειδικότητα (Specificity)
- Προσδιορισμός ορίου ποσοτικοποίησης LOQ –κατώτατου ορίου αναφοράς Reporting threshold
- Γραμμικότητα (Linearity)
- Ακρίβεια (Accuracy)
- Ακρίβεια μεθόδου (επαναληψιμότητα και ενδιάμεση ακρίβεια)

1) Όργανα–εξοπλισμός- αντιδραστήρια:

- UPLC (με ανιχνευτή UV, αυτόματο δειγματολήπτη και δυνατότητα ελέγχου θερμοκρασίας δειγματολήπτη και στήλης). Η καταγραφή και η επεξεργασία των δεδομένων έγινε μέσω προγράμματος Empower 3
- Στήλη UPLC Acquity BEH Shield RP 18 (χαρακτηριστικά: 10cm*2.1mm, 1.7μm)
- Rosuvastatin Calcium Reference standard
- Rosuvastatin tablets συγκέντρωσης 5, 10, 20 και 40mg
- Placebo για Rosuvastatin tablets συγκέντρωσης 5,10, 20 και 40mg αντίστοιχα

2) Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

- Πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 0,001mg/ml Rosuvastatin
- Διάλυμα δείγματος για τον έλεγχο προσμίξεων : Ζυγίζονται και κονιορτοποιούνται 20 ταμπλέτες Rosuvastatin Calcium, από τις οποίες ζυγίζεται ποσότητα που αντιστοιχεί σε 50mg Rosuvastatin και διαλύεται σε 100ml διαλύτη δειγμάτων με τη βοήθεια λουτρού

υπερήχων, μέχρι πλήρη διάλυση. Φιλτράρεται ποσότητα του προκύπτοντος διαλύματος από φίλτρο 0,45μm nylon (τα πρώτα 3ml απορρίπτονται).

- Διάλυμα placebo: παρασκευάζεται όπως το δείγμα για τον έλεγχο προσμίξεων

Πίνακας 8 Οι χρόνοι ανάλυσης (RT) και οι σχετικοί χρόνοι ανάλυσης (RRT) για κάθε πρόσμιξη και της δραστηκής, καθώς και τα relative response factors (RRF)

Name	RT	RRT	RRF
Rosuvastatin	3,6	1,00	1,00
ROU RC2	3,9	1,06	1,14
ROU RC5	4,9	1,32	1,21
ROU RC6	5,3	1,47	1,44
ROU RC9	5,1	1,41	1,95
Unknown imp	-	-	1,00

Δεν λαμβάνονται υπ όψιν κορυφές με εμβαδόν μικρότερο από 0,10 % (Reporting threshold 0,10%)

Ο υπολογισμός των συναφών ουσιών (γνωστών και αγνώστων) πραγματοποιείται με τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Any individual imp of Rosuvastatin} = \frac{A_{imp} * RRF * W_{std} * a * 1 * 100 * A_w * 481.54 * 2 * 100}{A_{std} * 50 * 100 * W_{smpl} * LC * 1001.14}$$

όπου:

A_{imp} : εμβαδόν πρόσμιξης στο διάλυμα δείγματος

A_{std} : εμβαδόν Rosuvastatin στο πρότυπο διάλυμα

W_{std} : βάρος Rosuvastatin calcium στο πρότυπο διάλυμα

W_{smpl} : βάρος δείγματος

A_w : μέσο βάρος ταμπλετών

LC: θεωρητική περιεκτικότητα του Rosuvastatin (5, 10, 20 και 40mg)

a: δραστηκότητα του Rosuvastatin calcium

481,54*2: μοριακό βάρος του Rosuvastatin

1001,14: μοριακό βάρος του Rosuvastatin calcium

- System suitability test

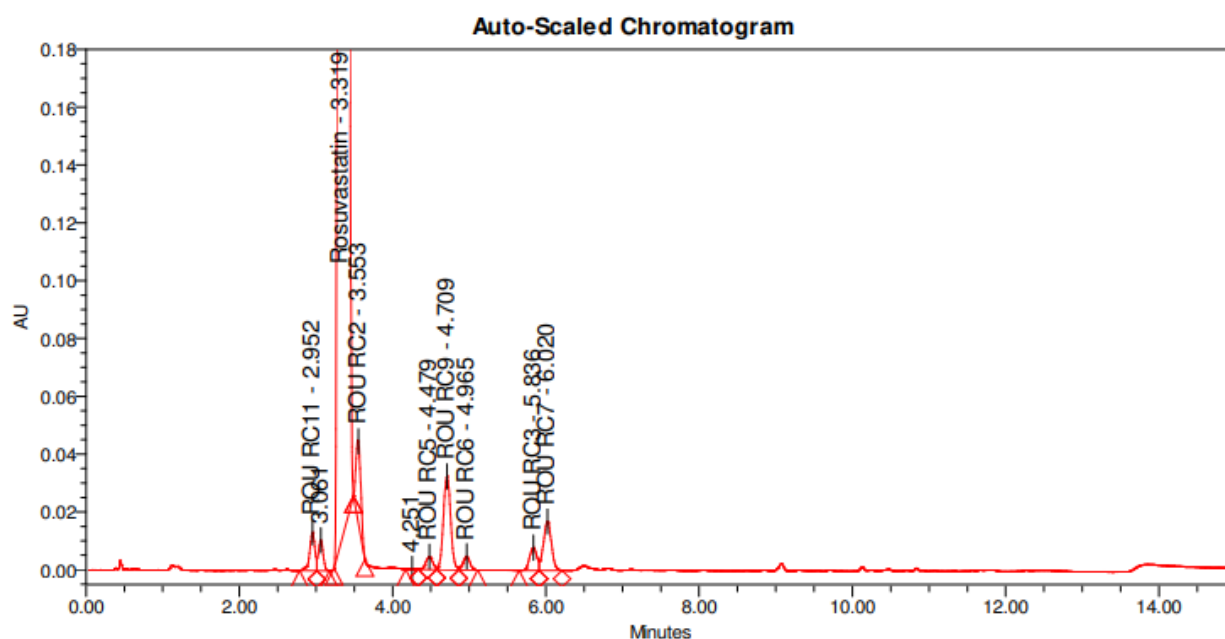
Για τη δοκιμή καταλληλότητας του συστήματος

1. Παρασκευάστηκε ένα διάλυμα SST (system suitability solution) σύμφωνα με τη μέθοδο.
2. Παρασκευάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα σύμφωνα με τη μέθοδο.

- Σε μία ένεση του διαλύματος SST ελέγχθηκαν τα κριτήρια καταλληλότητας του συστήματος
Resolution between Rosuvastatin and ROU RC2 ≥ 1.5
Resolution between ROU RC7 and ROU RC3 ≥ 0.8
- Σε μία ένεση του προτύπου ελέγχθηκαν τα κριτήρια καταλληλότητας του συστήματος
Tailing factor ≤ 1.5
Theoretical plates ≥ 10000
- Για τον έλεγχο της σταθερότητας του συστήματος εκτελέστηκαν 5 διαδοχικές ενέσεις του προτύπου διαλύματος, από τις οποίες υπολογίστηκε το %RSD.
Όπου %RSD area(των 5 διαδοχικών ενέσεων) $\leq 5,0\%$

Αποτελέσματα:

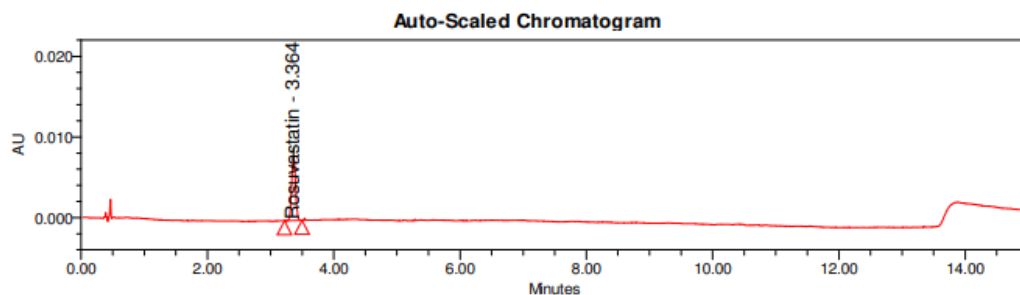
SST solution



Peak Results							Peak Results								
	Name	RT	Area	Height	Amount	Units	USP Resolution		Name	RT	Area	Height	Amount	Units	USP Resolution
1	ROU RC11	2.952	63489	13205				6	ROU RC5	4.479	27948	4364			1.6
2		3.061	45276	10534			0.9	7	ROU RC9	4.709	212754	32302			1.3
3	Rosuvastatin	3.319	20385850	2729082			1.8	8	ROU RC6	4.965	29001	4682			1.5
4	ROU RC2	3.553	123071	28099			1.7	9	ROU RC3	5.836	52795	7878			4.6
5		4.251	697	152			6.0	10	ROU RC7	6.020	123164	16909			0.9

Εικόνα 3 Χρωματογράφημα του διαλύματος για τον έλεγχο καταλληλότητας του συστήματος

Standard solution



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units	USP Plate Count	USP Tailing
1	ROU RC11	2.950						
2	Rosuvastatin	3.364	33843	7731			13514.6	1.0
3	ROU RC2	3.500						
4	ROU RC5	4.450						
5	ROU RC9	4.700						
6	ROU RC6	4.900						
7	ROU RC3	5.800						
8	ROU RC7	5.900						

Εικόνα 4 Χρωματογράφημα του προτύπου διαλύματος κατά τον έλεγχο συναφών ουσιών

Πίνακας 9 Συγκεντρωτικός πίνακας που περιέχει το εμβαδόν, το ύψος, τον χρόνο ανάσχεσης και το %RSD για την πεντάδα των προτύπων. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της σταθερότητας συστήματος της ανάλυσης.

Component Summary Table
Name: Rosuvastatin

	SampleName	Inj	Channel	Name	RT	Area	Height	Amount	Units	Vial
1	201112_Rosuvastatin_std_1_6	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	Rosuvastatin	3.363	33857	7743			1:A,4
2	201112_Rosuvastatin_std_1_2	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	Rosuvastatin	3.364	33755	7719			1:A,4
3	201112_Rosuvastatin_std_1_5	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	Rosuvastatin	3.363	33219	7679			1:A,4
4	201112_Rosuvastatin_std_1_1	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	Rosuvastatin	3.364	33843	7731			1:A,4
5	201112_Rosuvastatin_std_1_4	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	Rosuvastatin	3.363	33792	7745			1:A,4
6	201112_Rosuvastatin_std_1_3	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	Rosuvastatin	3.364	33548	7697			1:A,4
	Mean				3.364	33669	7719			
	Std. Dev.				0.000	247				
	% RSD				0.01	0.7				

- Προσδιορισμός ορίου ποσοτικοποίησης (Quantitation Limit/ Reporting Threshold)

Παρασκευάστηκε ένα διάλυμα το οποίο περιείχε Rosuvastatin free acid και τα γνωστά impurities RC2, RC5, RC6, RC9 σε συγκέντρωση 0,5µg/mL από το καθένα. Το διάλυμα ενέθηκε 6 φορές και υπολογίστηκε ο μέσος όρος και το %RSD area από τον κάθε αναλύτη (%RSD area ≤ 10.0%).

Αποτελέσματα:

Πίνακας 10 Συγκεντρωτικοί πίνακες που περιέχουν το εμβαδόν, το ύψος, τον χρόνο ανάλυσης και το %RSD για κάθε πρόσμιξη που εμφανίζεται στο διάλυμα, κατά τον προσδιορισμό ορίου ποσοτικοποίησης

Component Summary Table

Name: ROU RC2

	SampleName	Inj	Channel	Name	RT	Area	Height	Amount	Units	Vial
1	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_4	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	ROU RC2	3.544	15652	3474			1:B,5
2	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_5	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	ROU RC2	3.545	15719	3491			1:B,5
3	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_6	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	ROU RC2	3.544	15729	3507			1:B,5
4	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_1	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	ROU RC2	3.543	15821	3459			1:B,5
5	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_2	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	ROU RC2	3.544	15624	3457			1:B,5
6	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_3	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	ROU RC2	3.543	15578	3448			1:B,5
Mean					3.544	15687	3473			
Std. Dev.					0.001	87				
% RSD					0.02	0.6				

Component Summary Table

Name: ROU RC5

	SampleName	Inj	Channel	Name	RT	Area	Height	Amount	Units	Vial
1	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_3	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	ROU RC5	4.465	9697	1786			1:B,5
2	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_5	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	ROU RC5	4.468	9822	1817			1:B,5
3	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_1	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	ROU RC5	4.465	9736	1796			1:B,5
4	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_4	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	ROU RC5	4.467	9614	1773			1:B,5
5	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_2	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	ROU RC5	4.466	9621	1769			1:B,5
6	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_6	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	ROU RC5	4.466	9730	1817			1:B,5
Mean					4.466	9703	1793			
Std. Dev.					0.001	79				
% RSD					0.03	0.8				

Component Summary Table

Name: ROU RC6

	SampleName	Inj	Channel	Name	RT	Area	Height	Amount	Units	Vial
1	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_5	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	ROU RC6	4.954	9333	1876			1:B,5
2	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_4	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	ROU RC6	4.951	9090	1827			1:B,5
3	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_3	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	ROU RC6	4.951	8877	1794			1:B,5
4	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_2	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	ROU RC6	4.953	9064	1815			1:B,5
5	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_1	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	ROU RC6	4.950	9834	1821			1:B,5
6	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_6	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	ROU RC6	4.954	8981	1823			1:B,5
Mean					4.952	9197	1826			
Std. Dev.					0.002	347				
% RSD					0.04	3.8				

**Component Summary Table
Name: ROU RC9**

	SampleName	Inj	Channel	Name	RT	Area	Height	Amount	Units	Vial
1	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_1	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	ROU RC9	4.698	8281	1507			1:B,5
2	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_5	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	ROU RC9	4.700	8183	1520			1:B,5
3	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_3	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	ROU RC9	4.696	8622	1551			1:B,5
4	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_6	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	ROU RC9	4.702	8618	1567			1:B,5
5	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_4	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	ROU RC9	4.700	8535	1560			1:B,5
6	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_2	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	ROU RC9	4.700	8419	1538			1:B,5
Mean					4.699	8443	1541			
Std. Dev.					0.002	182				
% RSD					0.04	2.2				

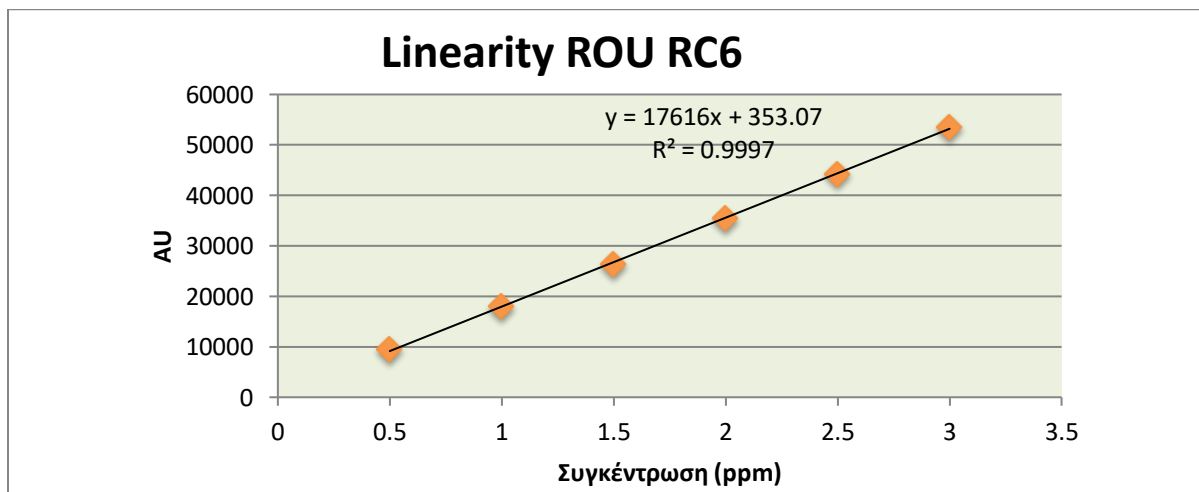
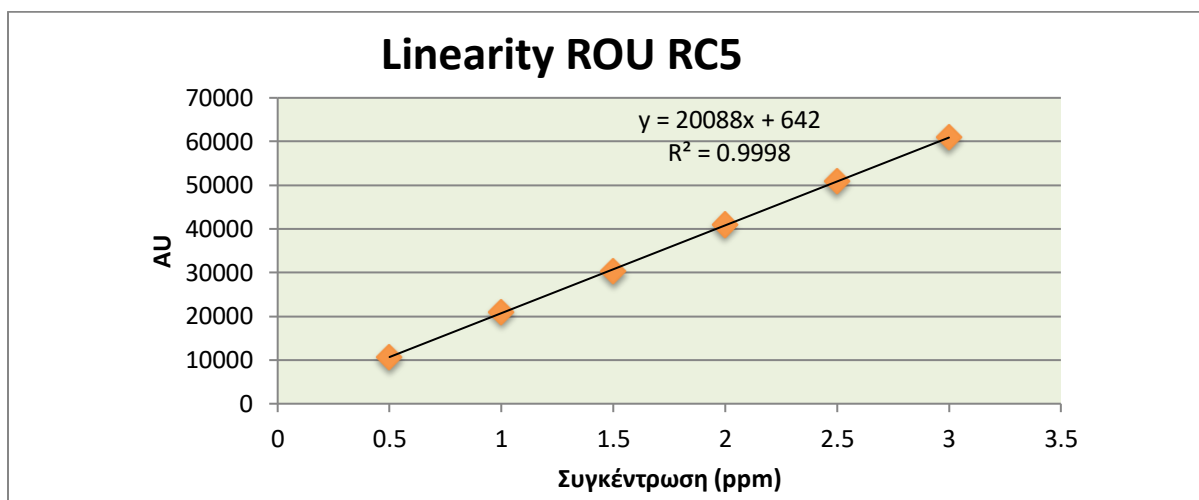
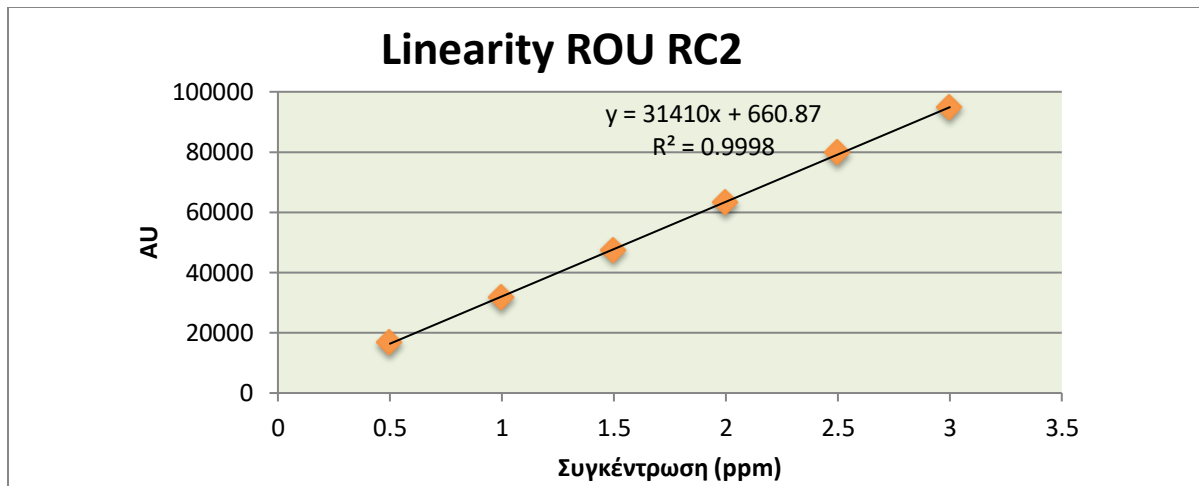
**Component Summary Table
Name: Rosuvastatin**

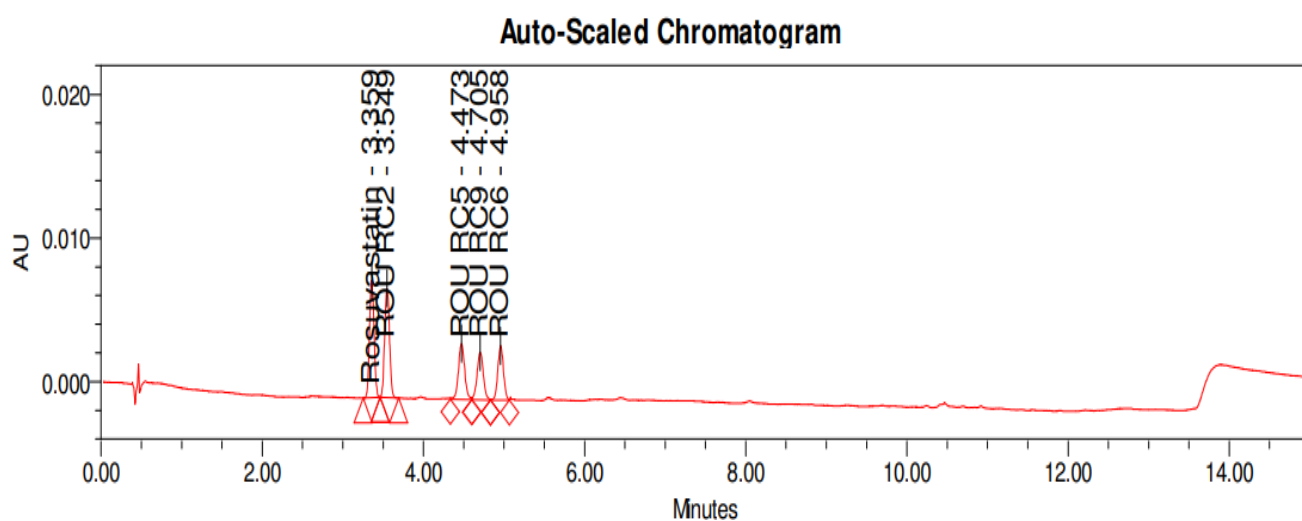
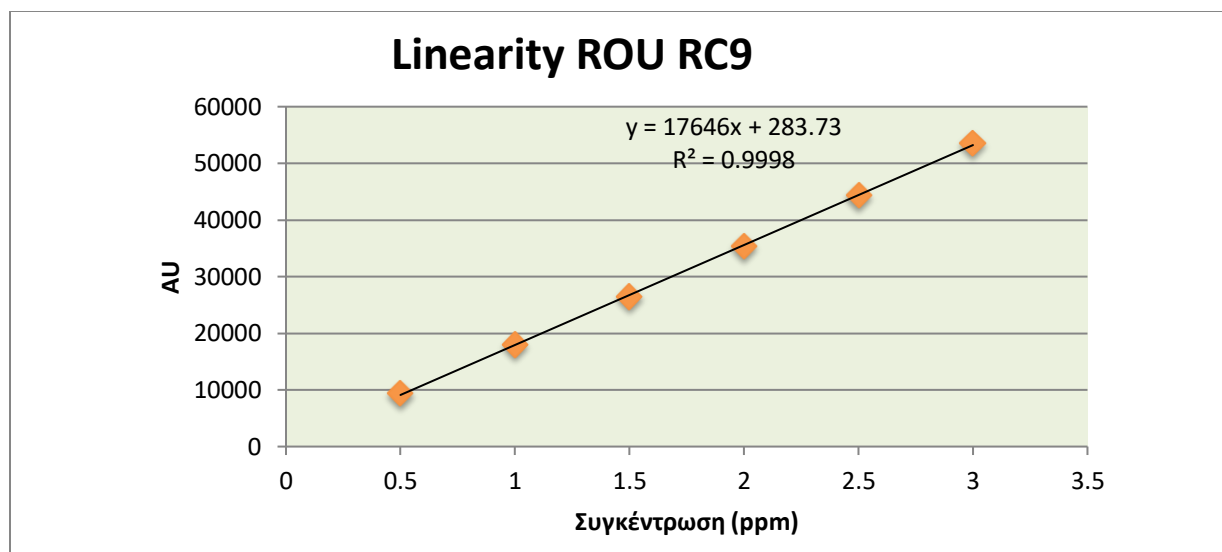
	SampleName	Inj	Channel	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_5	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	Rosuvastatin	3.357	16167	3786		
2	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_4	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	Rosuvastatin	3.355	16196	3741		
3	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_3	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	Rosuvastatin	3.354	16593	3776		
4	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_6	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	Rosuvastatin	3.355	16069	3742		
5	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_1	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	Rosuvastatin	3.355	16180	3709		
6	201102_Rosuvastatin_QL_Std1_2	1	PDA Ch1 240nm@4.8nm	Rosuvastatin	3.355	16241	3748		
Mean					3.355	16241	3750		
Std. Dev.					0.001	182			
% RSD					0.03	1.1			

- Γραμμικότητα - Linearity

Για τον έλεγχο της γραμμικότητας παρασκευάστηκε stock standard που περιείχε ROU RC2, ROU RC5, ROU RC6, ROU RC9 και Rosuvastatin 25ppm και από αυτό με διαδοχικές αραιώσεις παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκεντρώσεων 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 και 3ppm. Τα διαλύματα ενέθηκαν με τη σειρά και σχεδιάστηκε η γραφική παράσταση της απόκρισης προς την συγκέντρωση του κάθε διαλύματος αντίστοιχα.

Αποτελέσματα :





Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units	USP Plate Count	USP Tailing
1	ROU RC11	2.950						
2	Rosuvastatin	3.359	32492	8145			15896.5	1.0
3	ROU RC2	3.549	31829	7615			16229.5	1.1
4	ROU RC5	4.473	20980	3900			16387.4	1.1
5	ROU RC9	4.705	17978	3328			18009.0	1.0
6	ROU RC6	4.958	18427	3769			24069.0	1.0
7	ROU RC3	5.800						
8	ROU RC7	5.900						

Εικόνα 5 Χρωματογράφημα προτύπου διαλύματος συγκέντρωσης 1ppm, κατά τον έλεγχο γραμμικότητας σε ανάλυση προσδιορισμού συναφών ουσιών,

- Ακρίβεια μεθόδου (επαναληψιμότητα και ενδιάμεση ακρίβεια)
(Method Validation σε 5mg και 40mg Rosuvastatin Calcim Tabs)

A. Επαναληψιμότητα (πρώτος αναλυτής)

- Παρασκευάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα που περιείχε Rosuvastatin και κάθε ένα από τα γνωστά impurities στις περιεκτικότητες που εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 11 Συγκεντρώσεις Ροσουβαστατίνης και γνωστών προσμίξεων σε πρότυπο διάλυμα, κατά τον έλεγχο επαναληψιμότητας σε ανάλυση προσδιορισμού συναφών ουσιών

Compound	Concentration (μL/mL)	% of sample concentration
Rosuvastatin	1.0	0.2
ROU RC2	1.0	0.2
ROU RC5	1.0	0.2
ROU RC6	1.0	0.2
ROU RC9	1.5	0.3

- Επιπλέον παρασκευάστηκε ένα δείγμα από κάθε συγκέντρωση, σύμφωνα με τη μέθοδο.
- Τέλος παρασκευάστηκαν 6 spiked δείγματα από κάθε συγκέντρωση, με τη βοήθεια του παραπάνω προτύπου διαλύματος, με αποτέλεσμα στο τελικό δείγμα οι συγκεντρώσεις των προσμίξεων να είναι σύμφωνες με τον Πίνακα 1.
- Πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός των συναφών ουσιών σύμφωνα με τον τύπο της μεθόδου.

Θα πρέπει :

1. Το %RSD της %συγκέντρωσης για κάθεμια πρόσμιξη στις 6 ενέσεις των spiked δειγμάτων να είναι $\leq 10.0\%$
2. Η ανάκτηση (ακρίβεια) για κάθε impurity των spiked δειγμάτων θα πρέπει να είναι 80-120%
3. Η μέση ανάκτηση κάθε impurity των 6 unspiked δειγμάτων θα πρέπει να είναι 80-120%.
4. Το %RSD της ανάκτησης για κάθε γνωστή πρόσμιξη 6 unspiked δειγμάτων θα πρέπει να είναι $\leq 10.0\%$

Όπου %ανάκτηση= $(\% \text{found imp in spiked sample} - \% \text{found imp in unspiked sample}) / \% \text{imp in spiked sample} * 100$

Πίνακας 12 Αποτελέσματα %συγκέντρωσης γνωστών προσμίξεων για όλα τα δείγματα που ενέθηκαν σε χάπια συγκέντρωσης 40mg και %ανάκτηση αυτών σε δείγματα spiked και unspiked (Αναλυτής Α)

40mg	%found imp			
	ROU RC2	ROU RC5	ROU RC9	ROU RC6
unspiked	0,11	BRT	0,04	BRT
spiked 1	0,34	0,15	0,36	0,18
spiked 2	0,34	0,16	0,35	0,17
spiked 3	0,34	0,15	0,35	0,17
spiked 4	0,32	0,14	0,34	0,16
spiked 5	0,32	0,14	0,35	0,17
spiked 6	0,31	0,14	0,35	0,17
Mean spiked	0,33	0,15	0,35	0,17
STDEV spiked	0,01	0,01	0,01	0,01
%RSD spiked	4,05	5,57	1,81	3,72

%Recovery-40mg				
	ROU RC2	ROU RC5	ROU RC9	ROU RC6
spiked 1	105,9	95	108,3	102,9
spiked 2	105,7	97,3	106,7	97,4
spiked 3	103,8	93,4	104,8	97,2
spiked 4	96,5	91,6	102	93,7
spiked 5	100,7	93,8	105,2	96,1
spiked 6	103,3	93,6	104,4	98,2
Mean spiked	102,7	94,1	105,2	97,6
STDEV spiked	3,6	1,9	2,1	3,0
%RSD spiked	3,5	2,0	2,0	3,1

Πίνακας 13 Αποτελέσματα %συγκέντρωσης γνωστών προσμίξεων για όλα τα δείγματα που ενέθηκαν σε χάπια συγκέντρωσης 5mg και %ανάκτηση αυτών σε δείγματα spiked και unspiked (Αναλυτής Α)

5mg	%found imp			
	ROU RC2	ROU RC5	ROU RC9	ROU RC6
unspiked	0,09	brt	0,05	BRT
spiked 1	0,32	0,14	0,33	0,18
spiked 2	0,33	0,15	0,34	0,16
spiked 3	0,33	0,15	0,34	0,16
spiked 4	0,31	0,13	0,31	0,15
spiked 5	0,3	0,13	0,31	0,15
spiked 6	0,29	0,13	0,31	0,15
Mean spiked	0,31	0,14	0,32	0,16
STDEV spiked	0,02	0,01	0,02	0,01
%RSD spiked	5,21	7,11	4,66	7,38

%Recovery-5mg				
	ROU RC2	ROU RC5	ROU RC9	ROU RC6
spiked 1	102,1	88,9	97,5	88,8
spiked 2	109,3	91	100	90,4
spiked 3	109,2	91,1	99,8	90,2
spiked 4	99,9	82,8	92,5	83
spiked 5	93,4	82,5	91,3	83,8
spiked 6	92,4	81,6	90,5	85
Mean spiked	101,1	86,3	95,3	86,9
STDEV spiked	7,4	4,5	4,3	3,3
%RSD spiked	7,3	5,2	4,6	3,8

B. Ενδιάμεση ακρίβεια (δεύτερος αναλυτής)

Επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε για την επαναληψιμότητα διαφορετική μέρα, σε διαφορετικό όργανο, με διαφορετική στήλη, χρησιμοποιώντας τις ίδιες παρτίδες προϊόντων.

Για να θεωρηθεί η μέθοδος αποδεκτή πρέπει η διαφορά των %found impurities από τον πρώτο και τον δεύτερο αναλυτή για τα spiked δείγματα να μην ξεπερνάει το reporting threshold (0,10%). Ακόμη, πρέπει τα χρωματογραφικά προφίλ από τις 2 αναλύσεις να είναι παρόμοια για όλα τα δείγματα, χωρίς την εμφάνιση νέων κορυφών, την εξαφάνιση οποιασδήποτε κορυφής και χωρίς σημαντικές αλλαγές στις αποκρίσεις.

Πίνακας 14 Αποτελέσματα %συγκέντρωσης γνωστών προσμίξεων για όλα τα δείγματα που ενέθηκαν σε χάρτια συγκέντρωσης 40mg και %ανάκτηση αυτών σε δείγματα spiked και unspiked (Αναλυτής Β)

40mg	%found imp			
	ROU RC2	ROU RC5	ROU RC9	ROU RC6
unspiked	0,11	BRT	0,04	BRT
spiked 1	0,33	0,14	0,38	0,21
spiked 2	0,32	0,14	0,38	0,21
spiked 3	0,32	0,15	0,38	0,21
spiked 4	0,31	0,14	0,39	0,21
spiked 5	0,31	0,14	0,38	0,21
spiked 6	0,31	0,14	0,38	0,21
Mean spiked	0,32	0,14	0,38	0,21
STDEV spiked	0,01	0,00	0,00	0,00
%RSD spiked	2,58	2,88	1,07	0,00

%Recovery-40mg				
	ROU RC2	ROU RC5	ROU RC9	ROU RC6
spiked 1	106	88,2	113,9	91,7
spiked 2	102,4	87,7	114,7	90,9
spiked 3	101	88,1	114,1	91,7
spiked 4	103,6	89,6	115	90,8
spiked 5	100,3	87,8	114,7	90,4
spiked 6	100,5	89,6	111,9	89,6
Mean spiked	102,3	88,5	114,1	90,9
STDEV spiked	2,2	0,9	1,1	0,8
%RSD spiked	2,2	1,0	1,0	0,9

Πίνακας 15 Αποτελέσματα %συγκέντρωσης γνωστών προσμίξεων για όλα τα δείγματα που ενέθηκαν σε χάπια συγκέντρωσης 5mg και %ανάκτηση αυτών σε δείγματα spiked και unspiked (Αναλυτής Β)

5mg	%found imp			
	ROU RC2	ROU RC5	ROU RC9	ROU RC6
unspiked	0,11	brt	0,04	BRT
spiked 1	0,32	0,14	0,38	0,2
spiked 2	0,31	0,13	0,37	0,2
spiked 3	0,31	0,14	0,38	0,2
spiked 4	0,32	0,14	0,37	0,2
spiked 5	0,31	0,14	0,37	0,2
spiked 6	0,31	0,14	0,37	0,2
Mean spiked	0,31	0,14	0,37	0,20
STDEV spiked	0,01	0,00	0,01	0,00
%RSD spiked	1,65	2,95	1,38	0,00

%Recovery-5mg				
	ROU RC2	ROU RC5	ROU RC9	ROU RC6
spiked 1	104,7	84,2	114,2	88,5
spiked 2	101,1	81,2	109,5	85
spiked 3	101,8	83	109,1	87
spiked 4	103,4	85,5	111,2	88,7
spiked 5	102	85,5	110,3	89,2
spiked 6	101,8	84,6	110,5	88,2
Mean spiked	102,5	84,0	110,8	87,8
STDEV spiked	1,3	1,7	1,8	1,5
%RSD spiked	1,3	2,0	1,6	1,8

- Ειδικότητα (Specificity)

Εισήχθησαν στο σύστημα κατά σειρά:

- μία ένεση δείγματος (για κάθε συγκέντρωση)
- μία ένεση SST διαλύματος (σύμφωνα με τη μέθοδο)
- μία ένεση placebo (για κάθε συγκέντρωση)
- μία ένεση standard (σύμφωνα με τη μέθοδο)
- Δείγματα που έχουν γίνει spike με συγκεκριμένη συγκέντρωση known impurities, σύμφωνα με τον Πίνακα 1 (που αναφέρεται στην ανάλυση για την ακρίβεια μεθόδου)

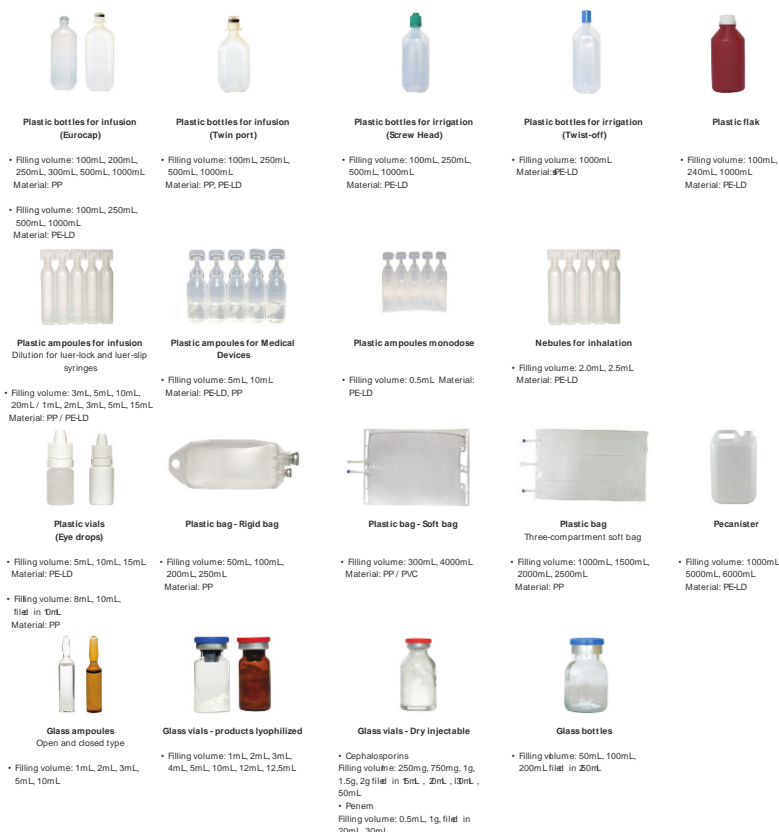
Προσδιορίστηκαν οι τυχόν παρεμποδίσεις στο χρόνο ανάσχεσης των κορυφών που μας ενδιαφέρουν.

Πρέπει οποιαδήποτε παρεμπόδιση στον χρόνο ανάσχεσης της κύριας κορυφής της Rosuvastatin, αλλά και στον χρόνο ανάσχεσης των impurities ROU RC2, ROU RC5, ROU RC6, ROU RC9 να μην είναι μεγαλύτερη από το 50% του εμβαδού των αντίστοιχων κορυφών στην ανάλυση του ορίου ποσοτικοποίησης (reporting threshold).

Αποτελέσματα : Δεν παρατηρήθηκαν παρεμποδίσεις στο χρόνο ανάσχεσης των κορυφών που μας ενδιαφέρουν.

3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η φαρμακευτική εταιρεία DEMO SA κατέχει την πρωτιά στις νοσοκομειακές πωλήσεις (σε αριθμό τεμαχίων) στην Ελλάδα, στις εξαγωγές επώνυμων παραγόμενων προϊόντων αλλά και σε εγκαταστάσεις παραγωγής ενέσιμων προϊόντων, καθώς έχει επικεντρωθεί αποκλειστικά στην ανάπτυξη και παραγωγή ενέσιμων σκευασμάτων.



Εικόνα 6 Κατηγορίες ενέσιμων σκευασμάτων που παράγει η εταιρεία DEMO SA

Οι κατηγορίες των σκευασμάτων που δραστηριοποιείται η βιομηχανία αφορούν:

- Νοσοκομειακά σκευάσματα: Αντιβιοτικά (κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες, πενικιλίνες, αντιικά, μη β-λακτάμες), ορούς και αμπούλες, φάρμακα για αναισθησία αναλγησία, αιματολογία, νεφρολογία, πνευμονολογία, εντατική θεραπεία, βιταμινούχα, Κεντρικό νευρικό σύστημα (CNS), γαστροπροστασία, ογκολογία και ιατρικές συσκευές
- Σκευάσματα ιδιωτικής αγοράς που αφορούν : καρδιολογία, πνευμονολογία, ουρολογία, υπερουριχαιμία, ρευματολογία, συμπληρώματα διατροφής και ιατροτεχνολογικά προϊόντα

Όσον αφορά τον τομέα της καρδιολογίας, ο οποίος τα τελευταία χρόνια πρωταγωνιστεί στις πωλήσεις φαρμακευτικών σκευασμάτων, η βιομηχανία DEMO SA αποφάσισε να επεκταθεί, πέρα από τα ενέσιμα σκευάσματα, στα φάρμακα που είναι σε μορφή ταμπλέτας. Η παραγωγή των συγκεκριμένων σκευασμάτων ήταν αδύνατη, καθώς η γραμμή παραγωγής της εταιρείας είναι αποκλειστικά για ενέσιμα προϊόντα. Κατά συνέπεια, στράφηκε στην συνεργασία με εταιρεία, η οποία παράγει δισκία που αφορούν το καρδιολογικό/αντιλιπιδαιμικό και συγκεκριμένα χάπια Ασβεστιούχου Ροσουβαστατίνης, που κατέχει υψηλή θέση στις πωλήσεις καρδιολογικών φαρμάκων. Στην συγκεκριμένη περίπτωση η φαρμακευτική εταιρεία που έκλεισε το συμβόλαιο συνεργασίας είναι η φαρμακευτική εταιρεία Arotex, η οποία εδρεύει στον Καναδά.

Πίνακας 16 Σκευάσματα για το καρδιολογικό που παράγονται στην εταιρεία DEMO SA

IN HOUSE			
CARDIAC STIMULANTS -IN HOUSE			
Active substance	Supplier	Originator	Th.Category
Epinephrine	DEMO	Not applicable	Adrenergic and dopaminergic agent
Dobutamine	DEMO	Inotrex	Cardiac stimulant
Norepinephrine	DEMO	Not applicable	Adrenergic and dopaminergic agent
Atropine sulfate	DEMO	Not applicable	Belladonna alkaloids, tertiary amine
Dopamine HCl	DEMO	Giludop [Solvay Pharma]	Adrenergic and dopaminergic agent

Πίνακας 17 Σκευάσματα για το καρδιολογικό, τα οποία δεν παράγει η εταιρεία DEMO SA, αλλά έχει την άδεια κυκλοφορίας τους

IN LICENSING				
Cardiology				
Active substance	Brand	Supplier	Originator	Th.Category
ATORVASTATIN FC TAB	HOLISTEN	ELPEN	LIPITOR/PFIZER	ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΑ - ΑΝΤΙΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΟ
CLOPIDOGREL FC TAB	DEMOGREL	SALUBRIS	PLAVIX/SANOFI	ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΟ - ΑΝΤΙΘΡΟΜΒΩΤΙΚΟ
IRBESARTAN FC TAB	PIESITON	PHARMAC	APROVEL/SANOFI	ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΟ - ΑΝΤΙΥΠΕΡΤΑΣΙΚΟ
IRBESARTAN+HCTZ FC TAB	PIESITON-R	PHARMAC	COAPROVEL/SANOFI	ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΟ - ΑΝΤΙΥΠΕΡΤΑΣΙΚΟ

BOSENTAN FC TAB	VRADEM	PHARMASCIENCE	TRACLEER/ACTELION	ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΟ-ΠΝ. ΑΡΤ ΥΠΕΡΤ
IVABRADINE FC TAB	IVABRADINE/DEMO	SYNTHON	PROCORALAN/ASTELLAS	ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΑ-ΑΝΤΙΣΤΗΘΑΧΙΚΟ
EZETIMIB TABS	DELIPID	PHARMASCIENCE	EZETROL/MERCK	ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΑ - ΑΝΤΙΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΟ
EZETIMIBE+SIMVASTATIN	ZETIDEM	MEDIS	INEGY/MSD	ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΑ - ΑΝΤΙΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΟ
ROSUVASTATIN FC TAB	HOLESTATIN	APOTEX	CRESTOR/ASTRA ZENECA	ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΟ - ΑΝΤΙΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΟ
AMLODIPINE+VALSARTAN	COVADIR	MACLEODS	EXFORGE/NOVARTIS	ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΑ - ΑΝΤΙΥΠΕΡΤΑΣΙΚΟ
AMLODIPINE+VALSARTAN+HCTZ	COVADIR-HCTZ	MACLEODS	EXFORGE HCT/NOVARTIS	ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΑ - ΑΝΤΙΥΠΕΡΤΑΣΙΚΟ
AMLODIPINE+OLMESARTAN	NOT SUBMITTED	MENARINI	ORIZAL/MENARINI	ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΑ - ΑΝΤΙΥΠΕΡΤΑΣΙΚΟ
AMLODIPINE+OLMESARTAN+HCTZ	NOT SUBMITTED	MENARINI	ORIZAL-HCTZ/MENARINI	ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΑ - ΑΝΤΙΥΠΕΡΤΑΣΙΚΟ

Η παραγωγή του προϊόντος Rosuvastatin FC Tabs πραγματοποιείται στην Ινδία, κατά συνέπεια για την εισαγωγή του εντός ΕΕ είναι απαραίτητος ο επανέλεγχος κάθε παρτίδας προς απελευθέρωση από εργαστήριο πιστοποιημένο εντός ΕΕ, καθώς και η έγκριση από αρμόδιο-πιστοποιημένο άτομο QP. Το συμβόλαιο συνεργασίας των δύο εταιρειών αναφέρει ότι η φαρμακευτική εταιρεία DEMO SA αναλαμβάνει τόσο τον επανέλεγχο-επικύρωση των προϊόντων (EU-Import Testing), αλλά και την πιστοποίηση για την απελευθέρωσή τους στις αγορές της ΕΕ (QP Release).

Πίνακας 18 Οι αρμοδιότητες της επιχείρησης δέκτη (DEMO SA), σύμφωνα με το συμβόλαιο συναργασίας με την επιχείρηση μεταφοράς (Apotex)

Product Description	Manufacturing Site	EU Testing Site	QP Release site
Rosuvastatin FC Tabs	Apotex Research Private Limited (ARPL), India Plot no.1&2, Bommasandra Industrial Area, 4th Phase, Jigani Link Road, Bangalore, 560 099 India	DEMO S.A., Pharmaceutical Industry, Greece	DEMO S.A., Pharmaceutical Industry, Greece

Για την πραγματοποίηση του EU Import Testing απαραίτητο στάδιο ήταν η μεταφορά τεχνολογίας της μεθόδου που αφορά την ανάλυση των χαπιών, ώστε να διασφαλιστεί ότι:

- Το εργαστήριο αποδοχής της εταιρείας DEMO SA είναι ικανό να πραγματοποιεί τον ποιοτικό έλεγχο των προϊόντων Rosuvastatin Tabs
- Οι μέθοδοι του εργαστηρίου αναφοράς της εταιρείας Apotex είναι σύμφωνες με τους κανόνες GMPs που διέπει η ΕΕ

- Τα αποτελέσματα των ελέγχων των δύο εργαστηρίων είναι σύμφωνα και δεν απέχουν από τα επιτρεπτά όρια που έχουν καθοριστεί τον WHO (World Health Organization)

Όπως ήδη αναφέρθηκε η μεταφορά τεχνολογίας είναι επιτυχημένη όταν τεκμηριώνεται η ικανότητα της μονάδας δέκτη (RU) να εκτελεί τη μεταφερόμενη τεχνολογία σύμφωνα με τις καθορισμένες προδιαγραφές που έχουν τεθεί από την μονάδα αναφοράς και τις κανονιστικές αρχές, ώστε να προκύπτει ταυτόχρονη ικανοποίηση όλων των εμπλεκόμενων μερών.

Για την επίτευξη της μεταφοράς τεχνολογίας της συγκεκριμένης αναλυτικής μεθόδου, ακολουθήθηκαν όλα τα απαραίτητα προκαθορισμένα στάδια. Αφού πραγματοποιήθηκε η μεταφορά των πρωτοκόλλων επικύρωσης και επαλήθευσης αναλυτικών μεθόδων και μεταφοράς των αναλυτικών διαδικασιών, στη συνέχεια έγινε η μεταφορά της αναλυτικής μεθόδου και τεχνογνωσίας στην επιχείρηση δέκτη DEMO SA. Με χρήση κατάλληλων εργαλείων project management επιτεύχθηκε ο προγραμματισμός και η διαχείριση των πρωτοκόλλων που μεταφέρθηκαν από εξειδικευμένα άτομα, ώστε να πραγματοποιηθεί η μερική επικύρωση και επαλήθευση (mini validation) από την RU.

Έπειτα από τη διενέργεια της μερικής επικύρωσης, προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

- Ο συντελεστής συσχέτισης, R^2 , βρέθηκε σε όλες τις καμπύλες που σχεδιάστηκαν να είναι μεγαλύτερος από 0.99, κάτι που αποδεικνύει την γραμμικότητα τους.
- Δεν παρατηρήθηκαν παρεμποδίσεις στον χρόνο ανάλυσης των κορυφών που μας ενδιαφέρουν, συνεπώς οι μέθοδοι διακρίνονται από ειδικότητα.
- Τα κριτήρια καταλληλότητας του συστήματος βρέθηκαν να πληρούνται σε όλες τις μεθόδους που εκτελέστηκαν από την RU.
- Η μέθοδοι διακρίνονται από ακρίβεια, επαναληψιμότητα και εκλεκτικότητα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που δόθηκαν από την RU.
- Τα αποτελέσματα της RU, είναι σύμφωνα και δεν αποκλίνουν με τα αποτελέσματα της μονάδας αναφοράς.

Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η επιτυχής επικύρωση των μεθόδων από την επιχείρηση δέκτη και κατά συνέπεια η επιτυχής μεταφορά της μεθόδου μεταξύ των δύο εργαστηρίων.

Η επιχείρηση DEMO SA κατέχει αυτή την στιγμή την άδεια κυκλοφορίας και κατά συνέπεια και τη δυνατότητα της διακίνησης των χαπιών Ασβεστιούχου Ροσουβαστατίνης εντός της ΕΕ, καθώς είναι υπεύθυνη για τον έλεγχο και την επικύρωση κάθε παρτίδας που τίθεται προς απελευθέρωση. Ο έλεγχος γίνεται αποκλειστικά σε τελικά προϊόντα τα οποία κυκλοφορούν με την εμπορική ονομασία Holestatin.

4 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ačimovič, J., & Rozman, D. (2013). Steroidal Triterpenes of Cholesterol Synthesis. *Molecules*, 18(4), 4002–4017. <https://doi.org/10.3390/molecules18044002>
- Analytical Method Validation: Collation between - ProQuest*. (n.d.). Retrieved 1 March 2021, from <https://www.proquest.com/docview/2053261451/956BF0C5E77740F1PQ/3>
- Bajaj, T., & Giwa, A. O. (2021). Rosuvastatin. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539883/>
- Collins, R., Reith, C., Emberson, J., Armitage, J., Baigent, C., Blackwell, L., Blumenthal, R., Danesh, J., Smith, G. D., DeMets, D., Evans, S., Law, M., MacMahon, S., Martin, S., Neal, B., Poulter, N., Preiss, D., Ridker, P., Roberts, I., ... Peto, R. (2016). Interpretation of the evidence for the efficacy and safety of statin therapy. *The Lancet*, 388(10059), 2532–2561. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31357-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31357-5)
- Dresser, G. K., & Spence, J. D. (n.d.). *Overcoming Challenges With Statin Therapy*. <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002497>
- Fielding, C. J., & Fielding, P. E. (1995). Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *Journal of Lipid Research*, 36(2), 211–228. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)39898-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)39898-9)
- Finegold, J. A., Manisty, C. H., Goldacre, B., Barron, A. J., & Francis, D. P. (2014). What proportion of symptomatic side effects in patients taking statins are genuinely caused by the drug? Systematic review of randomized placebo-controlled trials to aid individual patient choice. *European Journal of Preventive Cardiology*, 21(4), 464–474. <https://doi.org/10.1177/2047487314525531>
- Goldman, R. E., Parker, D. R., Eaton, C. B., Borkan, J. M., Gramling, R., Cover, R. T., & Ahern, D. K. (2006). Patients' Perceptions of Cholesterol, Cardiovascular Disease Risk, and

- Risk Communication Strategies. *The Annals of Family Medicine*, 4(3), 205–212.
<https://doi.org/10.1370/afm.534>
- Gordon D J, Probstfield J L, Garrison R J, Neaton J D, Castelli W P, Knoke J D, Jacobs D R, Bangdiwala S, & Tyroler H A. (1989). High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation*, 79(1), 8–15.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.79.1.8>
- Hayley Bennett, H. B. (2012, July). *Cholesterol*. Chemistry World.
<https://www.chemistryworld.com/podcasts/cholesterol/3005737.article>
- Horita, N., Miyazawa, N., Kojima, R., Inoue, M., Ishigatsubo, Y., Ueda, A., & Kaneko, T. (2014). Statins reduce all-cause mortality in chronic obstructive pulmonary disease: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Respiratory Research*, 15(1), 80. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-15-80>
- Istvan, E. S. (2001). Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. *Science*, 292(5519), 1160–1164. <https://doi.org/10.1126/science.1059344>
- Lecker, J. L., Matthan, N. R., Billheimer, J. T., Rader, D. J., & Lichtenstein, A. H. (2011). Changes in cholesterol homeostasis modify the response of F1B hamsters to dietary very long chain n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Lipids in Health and Disease*, 10(1), 186. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-186>
- Mansueto, G., Niola, M., & Napoli, C. (2020). Can COVID 2019 induce a specific cardiovascular damage or it exacerbates pre-existing cardiovascular diseases? *Pathology - Research and Practice*, 216(9), 153086. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2020.153086>
- McTaggart, F. (2003). Comparative pharmacology of rosuvastatin. *Atherosclerosis Supplements*, 4(1), 9–14. [https://doi.org/10.1016/S1567-5688\(03\)00004-7](https://doi.org/10.1016/S1567-5688(03)00004-7)
- Reid, G. L. (2020). Analytical method transfer. In *Specification of Drug Substances and Products* (pp. 125–148). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102824-7.00006-3>

- Robson, J. (2007). Lipid modification: Cardiovascular risk assessment and the modification of blood lipids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Heart*, 94(10), 1331–1332. <https://doi.org/10.1136/hrt.2008.150979>
- Schumacher, B. (2011). Batch Testing and Product Release of Medicines Imported into the European Union. *LIFE SCIENCE I TECHNICAL BULLETIN*, N°50, 4.
- Scott, L. J., Curran, M. P., & Figgitt, D. P. (2004). Rosuvastatin: A Review of its Use in the Management of Dyslipidemia. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 4(2), 117–138. <https://doi.org/10.2165/00129784-200404020-00005>
- Shimadzu. (2021). *The Apparatus of the HPLC*. https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what_is_hplc.html
- Skoog D. A., Holler F. J., & Nieman T. A. (2007). *Αρχή της Ενόργανης Ανάλυσης*. Μτφ: Μ. Ι. Καραγιάννης, Κ. Η. Ευσταθίου, Ν. Χανιωτάκης. Εκδόσεις Κωσσταράκη.
- Stancu, C., & Sima, A. (2001). Statins: Mechanism of action and effects. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 5(4), 378–387. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2001.tb00172.x>
- THE LANCET. (2003). The statin wars. *November 1, 2003, Vol 362*. <https://www.thelancet.com/>
- Tousoulis, D., Antoniadou, C., & Stefanadis, C. (2008). Statins ameliorate atherosclerosis induced by inhibition of nitric oxide synthase: Another novel vascular protective mechanism? *International Journal of Cardiology*, 123(2), 91–93. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2007.04.054>
- WHO. (2011). *WHO guidelines on transfer of technology in pharmaceutical manufacturing*. World Health Organization, No. 961; Annex 7. https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/TransferTechnologyPharmaceuticalManufacturingTRS961Annex7.pdf
- Widomska, J., Subczynski, W. K., Mainali, L., & Raguz, M. (2017). Cholesterol Bilayer Domains in the Eye Lens Health: A Review. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 75(3–4), 387–398. <https://doi.org/10.1007/s12013-017-0812-7>

- Wu, J., Qian, X., Yang, Z., & Zhang, L. (2010). Study on the matrix effect in the determination of selected pharmaceutical residues in seawater by solid-phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography–electrospray ionization low-energy collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(9), 1471–1475. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.074>
- Γ. Μπαζούκης, Σ. Σαββανής, & Α. Γιαλούρης. (2017). Η δράση των στατινών στη μεταβολική οδό του μεβαλονικού οξέος και νεότερα δεδομένα για την επίδρασή τους σε σημαντικά συστήματα του οργανισμού. *Archives of Hellenic Medicine*, 34(2), 181–190.
- Γαληνός—Δραστική ουσία—Ροσουβαστατίνη—Χορήγηση. (n.d.). Retrieved 13 June 2021, from <https://www.galinos.gr/web/drugs/main/substances/rosuvastatin/usage>