



From Pharmacopeias to industrial analytical control

University of Pavia - 17th November 2023

Corrado Taborelli – QP&QU Director Curia Italy



Dalla Farmacopea all'applicazione pratica in laboratorio Controllo Qualità:

- Introduzione
- Applicabilità ed adattamento dei metodi di Farmacopea;
- Cenni sulla verifica dei metodi compendiali;
- Necessità di adottare metodi alternativi a quelli di Farmacopea.



Introduzione



Le monografie di Farmacopea, fino alla fine degli anni '90, erano dei testi molto «rigidi» e al tempo stesso «autoportanti» per qualificare una sostanza farmaceutica.

A partire dagli anni 2000 la situazione è andata progressivamente mutando, per una serie di ragioni:

- Adozione a livello internazionale di linee guida basate su un approccio «risk based»;
- Evoluzione della tecnologia che ha reso i metodi analitici strumentali sempre più predominanti rispetto ai metodi analitici «classici»

Introduzione

Fra le linee guida *risk based* si possono citare:

- ICH Q3C Guideline for residual solvents (1997) → adottata da Ph.Eur nel 1999
- ICH Q3D Guideline for elemental impurities (2013) → adottata da Ph Eur nel 2017
- EMA/189634/2019 Information on nitrosamines for MAH revisione monografie sartani Ph. Eur nel 2020

Nella evoluzione della tecnologia vanno citate le tecniche spettroscopiche (es. **FT-IR**) per l'identificazione delle sostanze e le tecniche cromatografiche strumentali (**GC, HPLC**) per l'identificazione e la determinazione quantitative di potency e impurezze correlate



Applicabilità ed adattamento dei metodi di Farmacopea

Quando un laboratorio deve analizzare per la prima volta una sostanza secondo una monografia da farmacopea, la prima attività che deve implementare è verificare l'**applicabilità** del metodo e, se necessario, fare degli **adattamenti** nei limiti ammessi dalla Farmacopea stessa.

PREREQUISITI

- la strumentazione da utilizzare deve essere conforme ai requisiti riportati al capitolo
2.2.xx PHYSICAL AND PHYSICO-CHEMICAL METHODS

01/2021:20224



2.2.24. ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY, INFRARED

PRINCIPLE

Infrared absorption spectrophotometry (also known as infrared (IR) spectroscopy) is based on the interaction of infrared radiation with matter. As a result of interaction between a molecule and IR radiation, absorption of frequencies specific to that molecule can occur, and some intermolecular and intramolecular vibrations can be excited to higher vibrational levels. This results in an infrared absorption spectrum with characteristic bands that correspond to the functional groups of the molecule.

[...]

CONTROL OF EQUIPMENT PERFORMANCE

Accuracy of wavenumber scale and spectral resolution are critical parameters and must be verified. The tests described below can be used for the control of instrument performance and for qualification. They can also be used as system suitability tests.

These parameters are checked using suitable reference materials which are selected and presented depending on the measurement mode (e.g. transmission or ATR).

For quantitative analysis, appropriate assessment criteria for the control of absorption intensity must also be defined.

WAVENUMBER SCALE

The wavenumber scale is typically verified using a polystyrene film that exhibits IR absorption bands at the wavenumbers shown in Table 2.2.24.-1.

Table 2.2.24.-1 - *Band positions and associated acceptable tolerances of the polystyrene film used to verify wavenumber accuracy*

Band position (cm ⁻¹)		Tolerance (cm ⁻¹)
Transmission	ATR	
906.6	906.1	± 1.0
1028.3	1027.7	± 1.0
1601.2	1601.0	± 1.0
3060.0	3059.7	± 1.0

Applicabilità ed adattamento dei metodi di Farmacopea

Identification

Prepare the substance to be examined appropriately and record the spectra between 4000 and 650 cm^{-1} , unless otherwise prescribed.

Identification testing is performed by comparing the spectrum of the substance to be examined with the spectrum obtained from a Ph. Eur. chemical reference substance (CRS) or with a Ph. Eur. reference spectrum.

The spectrum of the current batch of the Ph. Eur. CRS may be recorded for immediate use or stored, for example, in a spectral library for future consultation. A stored spectrum may be used, provided traceability to the current batch of CRS is ensured.

In the case of substances that are not covered by individual monographs, a suitable reference standard may be used.

In all cases, spectra must be recorded using the same operating conditions and procedure, and especially the same measurement mode.

When comparison of the spectra recorded in the solid state show differences (see below), treat the substance to be examined and the reference substance in the same manner so that they recrystallise or are produced in the same crystalline form, or proceed as prescribed in the monograph, then record the spectra again. However, this procedure must only be done for substances where the monograph does not cover a particular form of a substance that exhibits polymorphism.

Several comparison procedures may be used, and the analyst must document and justify the method used and the specific acceptance criteria that allow a conclusion for identification. The spectra can be compared either by overlaying the spectra (in the whole spectral range or in the region of interest specified in the monograph) or by using mathematical calculations from the software. It is possible for example to perform:

- visual comparison based on band positions and relative intensities unless otherwise specified - the transmission minima (or absorption maxima) in the spectrum obtained with the substance to be examined correspond in position and relative size to those of the reference;
- calculation of the correlation coefficient between the 2 spectra - this value is calculated by the software and the identification threshold is defined by the user;
- evaluation by chemometric methods (e.g. Euclidean distance, Mahalanobis distance, classification methods); these methods involve the set-up, assessment and validation of the chemometric model by the analyst (see 5.21. *Chemometric methods applied to analytical data*).

Applicabilità ed adattamento dei metodi di Farmacopea

Le cose si complicano quando si considerano i metodi cromatografici (GC, HPLC).

Le condizioni per le analisi cromatografiche sono descritte dettagliatamente nelle singole monografie, ma poiché i risultati analitici sono influenzabili da molti fattori (pompe, colonna, detector, eluenti) il solo rispetto delle condizioni compendiali non è sufficiente per garantire la applicabilità del metodo.

Occorre infatti verificare la **SYSTEM SUITABILITY (SST)**





2.2.46. CHROMATOGRAPHIC SEPARATION TECHNIQUES⁽⁷⁾

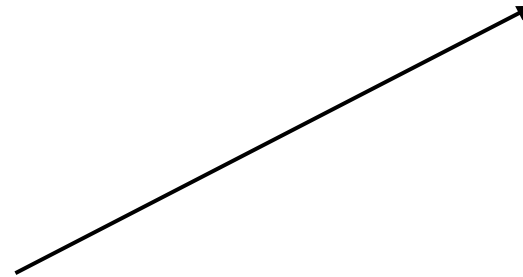
[...]

SYSTEM SUITABILITY

This section only covers liquid chromatography and gas chromatography.

The various components of the equipment employed must be qualified and be capable of achieving the performance required to conduct the test or assay.

The system suitability tests represent an integral part of the analytical procedure and are used to ensure adequate performance of the chromatographic system. Column plate number, retention factor (mass distribution ratio), system repeatability, signal-to-noise, resolution/peak-to-valley ratio and symmetry factor are the parameters that may be employed in assessing the performance of the chromatographic system. When stated in the individual monograph, in case of complex chromatographic profiles (e.g. for biotechnological/biological products), visual comparison of the profiles can be used as a system suitability test.



N°piatti
Fattori di ritenzione
Ripetibilità
Rapporto segnale/rumore
Risoluzione / rapporto peak valley
Fattore di simmetria

Uno o più di questi parametri è sempre specificato nei metodi cromatografici di una data sostanza

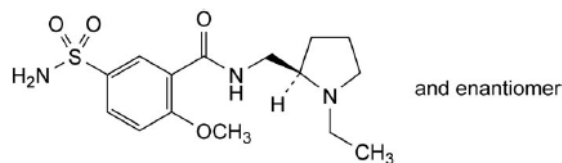
Applicabilità ed adattamento dei metodi di Farmacopea

01/2017:1045



SULPIRIDE

Sulpiridum



$C_{15}H_{23}N_3O_4S$
[15676-16-1]

M_r 341.4

Related substances. Liquid chromatography (2.2.29).

Test solution. Dissolve 0.100 g of the substance to be examined in the mobile phase and dilute to 100.0 mL with the mobile phase.

Reference solution (a). Dilute 1.0 mL of the test solution to 100.0 mL with the mobile phase. Dilute 1.0 mL of this solution to 10.0 mL with the mobile phase.

Reference solution (b). Dissolve 5 mg of the substance to be examined and 5 mg of *sulpiride impurity B CRS* in the mobile phase and dilute to 50.0 mL with the mobile phase.

Column:

- size: $l = 0.25$ m, $\varnothing = 4.6$ mm;
- stationary phase: end-capped octylsilyl silica gel for chromatography R (5 μ m).

Mobile phase: mix 10 volumes of acetonitrile R, 10 volumes of methanol R and 80 volumes of a solution containing 6.8 g/L of potassium dihydrogen phosphate R and 1 g/L of sodium octanesulfonate R, previously adjusted to pH 3.3 with phosphoric acid R.

Flow rate: 1.5 mL/min.

Detection: spectrophotometer at 240 nm.

Injection: 10 μ L.

Run time: twice the retention time of sulpiride.

Identification of impurities: use the chromatogram obtained with reference solution (b) to identify the peak due to impurity B.

Relative retention with reference to sulpiride (retention time = about 15 min): impurity B = about 0.7.

System suitability: reference solution (b):

- resolution: minimum 2.5 between the peaks due to impurity B and sulpiride.

Calculation of percentage contents:

- for each impurity, use the concentration of sulpiride in reference solution (a).

Limits:

- unspecified impurities: for each impurity, maximum 0.10 per cent;
- total: maximum 0.3 per cent;
- reporting threshold: 0.05 per cent.

Applicabilità ed adattamento dei metodi di Farmacopea

Ma il solo rispetto di quanto riportato nella monografia specifica di una sostanza non è sufficiente: sempre il capitolo 2.2.46 della Ph. Eur indica che in aggiunta a quanto riportato da una specifica monografia vanno inoltre verificati, come SST:

RIPETIBILITA' (applicabile alle determinazioni quantitative): la RSD% della reference solution deve essere inferiore a quanto riportato nella tabella:

Table 2.2.46.-1. – *Maximum permitted relative standard deviation (assay)*

	Number of individual injections <i>n</i>			
	3	4	5	6
<i>B (per cent)</i>	<i>Maximum permitted relative standard deviation (per cent)</i>			
2.0	0.41	0.59	0.73	0.85
2.5	0.52	0.74	0.92	1.06
3.0	0.62	0.89	1.10	1.27

Esempio: se il limite per il titolo è 98,0% - 102,0% → (B = 2,0) quindi se si effettuano 6 iniezioni di standard la RSD% ≤ 0,85%

Applicabilità ed adattamento dei metodi di Farmacopea

RAPPORTO SEGNALE/RUMORE: deve essere verificato sperimentalmente al valore di disregard limit: il limite di quantificazione (10 volte il rapporto segnale/rumore) deve essere uguale o inferiore al disregard limit

Table 2034.-1. – *Reporting, identification and qualification of organic impurities in active substances*

Use	Maximum daily dose	Reporting threshold	Identification threshold	Qualification threshold
Human use or human and veterinary use	≤ 2 g/day	> 0.05 per cent	> 0.10 per cent or a daily intake of > 1.0 mg (whichever is the lower)	> 0.15 per cent or a daily intake of > 1.0 mg (whichever is the lower)
Human use or human and veterinary use	> 2 g/day	> 0.03 per cent	> 0.05 per cent	> 0.05 per cent
Veterinary use only	Not applicable	> 0.10 per cent	> 0.20 per cent	> 0.50 per cent

Applicabilità ed adattamento dei metodi di Farmacopea

FATTORE DI SIMMETRIA (tailing factor): il fattore di simmetria del picco usato per la quantificazione deve essere compreso fra 0,8 e 1,8

Symmetry factor (A_s)

The symmetry factor of a peak (also known as asymmetry factor or tailing factor) (Figure 2.2.46.-8) is calculated using the following equation:

$$A_s = \frac{w_{0.05}}{2d}$$

$w_{0.05}$ = width of the peak at one-twentieth of the peak height;

d = distance between the perpendicular dropped from the peak maximum and the leading edge of the peak at one-twentieth of the peak height.

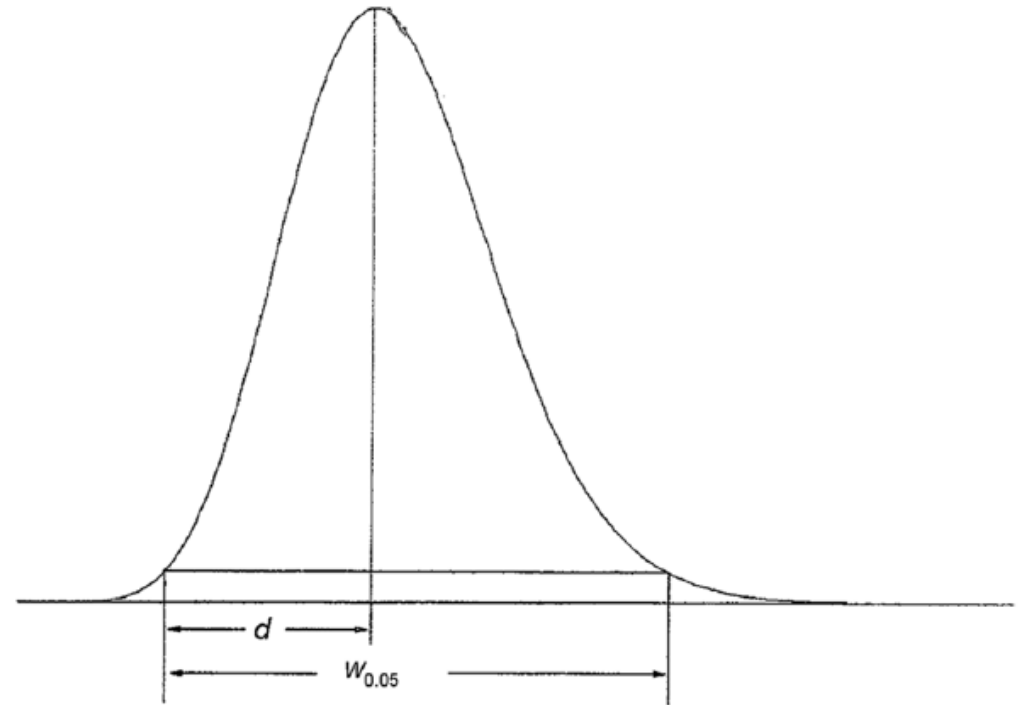


Figure 2.2.46.-8.

Applicabilità ed adattamento dei metodi di Farmacopea

ADATTAMENTO DEI METODI



E' possibile che un metodo cromatografico applicato così come descritto in monografia non passi il SST.



In questo caso la Farmacopea prevede dei possibili aggiustamenti dei parametri analitici, da implementare entro limiti ben definiti:

Applicabilità ed adattamento dei metodi di Farmacopea

Parametro	Eluizione isocratica	Eluizione a gradiente
Identità della fase stazionaria	Nessun cambiamento	Nessun cambiamento
Altre caratteristiche della fase s.	Possibili variazioni	Possibili variazioni
Lunghezza (L) e particle size (dp)	Rapporto L/dp entro limiti definiti	Rapporto L/dp entro limiti definiti
Diametro interno	Si, con aggiustamenti di flusso	Si, con aggiustamenti di flusso
Temperatura colonna	$\pm 10^{\circ}\text{C}$	$\pm 5^{\circ}\text{C}$
Composizione fase mobile	$\pm 30\%$ relativo (<10% assoluto)	Possibili ma con limitazioni (RT $\pm 15\%$)
pH	± 0.2 Unità pH	± 0.2 Unità pH
Concentrazione sali	$\pm 10\%$	$\pm 10\%$
Flusso	$\pm 50\%$ in assenza di altre modifiche	Possibili variazioni
Lunghezza d'onda	Nessun cambiamento	Nessun cambiamento
Volume di iniezione	Possibili variazioni	Possibili variazioni

Verifica dei metodi compendiali

La messa a punto e l'adattamento di un metodo compendiale sono una condizione necessaria ma non sufficiente per poterlo applicare ai fini delle analisi in GMP.

Occorre infatti verificare i metodi compendiali, dimostrare cioè che diano risultati riproducibili nel tempo e che siano applicabili quindi correttamente.

1.1.2.4 Validation and implementation of Ph. Eur. analytical procedures

The analytical procedures given in an individual monograph have been validated in accordance with accepted scientific practice and recommendations on analytical validation.

Unless otherwise stated in the individual monograph or in the corresponding general chapter, validation of these procedures by the user is not required.

The analytical procedures provided in general chapters may be used for active substances, excipients, medicinal products and other articles that are not covered by an individual monograph. In such cases, validation of the procedures is the responsibility of the user.

When implementing a Ph. Eur. analytical procedure, the user must assess whether and to what extent its suitability under the actual conditions of use needs to be demonstrated according to relevant monographs, general chapters and quality systems.



5.26. IMPLEMENTATION OF PHARMACOPOEIAL PROCEDURES

This general chapter is published for information. It provides guidance on setting up an approach for the implementation of analytical procedures given in monographs of the Ph. Eur. (or ‘pharmacopoeial procedures’ hereinafter). The approach set out below is valid only when used in accordance with the principles laid down in the General Notices (including a suitable quality system). The term “implementation” is used to describe the overall activities performed, whereas “verification” is used exclusively to refer to the experimental activities.

Approaches other than the one set forth in this general chapter may also be appropriate to ensure successful implementation. Ultimately, the implementation process runs under the user’s responsibility and its successful outcome needs to be demonstrated and documented to the satisfaction of the competent authority.

1.1.2.5 Alternative analytical procedures

The tests and assays described are the official analytical procedures upon which the standards of the Ph. Eur. are based. With the agreement of the competent authority, alternative analytical procedures may be used for control purposes, provided that they enable an unequivocal decision to be made as to whether compliance with the standards of the monographs would be achieved if the official procedures were used. In the event of doubt or dispute, the analytical procedures of the Ph. Eur. are alone authoritative.

Adeguamento al progresso scientifico



Nome Ditta:


Data Ispezione:

21-25/03/2022

Pagine:

3 di 4

12. Per le analisi di rilascio delle sostanze attive da parte del Controllo Qualità, sono state riscontrate le seguenti lacune:

- 
- a. per le analisi relative alla determinazione della purezza di diverse sostanze attive, vengono utilizzati metodi obsoleti (TLC);
 - b. per le analisi effettuate tramite cromatografia liquida, il CQ non esegue correttamente, per tutte le sostanze attive, i System Suitability Test previsti dalla monografia generale di Farmacopea (paragrafo System Suitability del capitolo 2.2.46); in particolare:
 - i. per la verifica della ripetibilità viene considerato un limite di accettazione più ampio rispetto a quanto riportato dalla monografia;
 - ii. non viene sempre effettuata la verifica del rapporto segnale rumore al disregard limit.

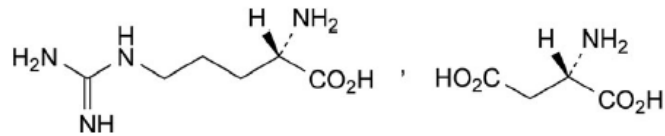
Adeguamento al progresso scientifico



01/2017:2096
corrected 11.0

ARGININE ASPARTATE

Arginini aspartas



$C_{10}H_{21}N_5O_6$
[7675-83-4]

M_r 307.3

Ninhydrin-positive substances. Thin-layer chromatography (2.2.27).

[...]

System suitability: reference solution (b):

– the chromatogram shows 2 clearly separated principal spots.

Limit: test solution (a):

– *any impurity:* any spots, apart from the 2 principal spots, are not more intense than each of the 2 principal spots in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.2 per cent).

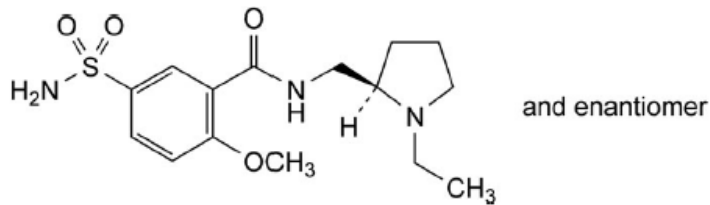
Adeguamento al progresso scientifico



01/2017:1045

SULPIRIDE

Sulpiridum



$C_{15}H_{23}N_3O_4S$
[15676-16-1]

M_r 341.4

DEFINITION

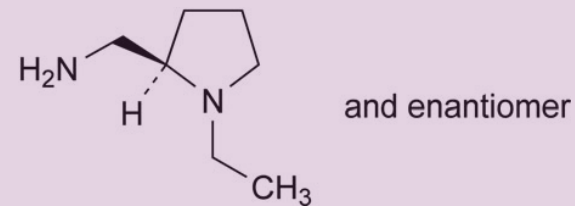
N-[[[(2*RS*)-1-Ethylpyrrolidin-2-yl]]methyl]-2-methoxy-5-sulfamoylbenzamide.

Content: 98.5 per cent to 101.0 per cent (dried substance).

Impurity A. Thin-layer chromatography (2.2.27).

Limit: test solution (a):

– *impurity A*: any spot due to impurity A is not more intense than the corresponding spot in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.1 per cent).



Related substances. Liquid chromatography (2.2.29).

Limits:

- *unspecified impurities*: for each impurity, maximum 0.10 per cent;
- *total*: maximum 0.3 per cent;
- *reporting threshold*: 0.05 per cent.

Conclusioni



La Farmacopea e le sue monografie sono uno strumento fondamentale per garantire la qualità dei farmaci, e certamente un approccio ad un prodotto iscritto in Farmacopea è più facilitato rispetto ad un prodotto non compendiale.

Nell'applicazione in ambito GMP però è ormai chiaro che un metodo non può essere applicato «as is» senza uno studio approfondito, e soprattutto non è insindacabile specialmente se non al passo col progresso scientifico.