



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Direttore Chiar.ma Prof.ssa Simona Collina

**LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN
CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE**

**Verifica del metodo HPLC per identificazione, titolo e sostanze
correlate in Octreotide acetato materia prima, USP: caso di studio**

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Giuseppina Sandri

Correlatore:

Dott. Davide Bregolin



Tesi di Laurea Magistrale a Ciclo Unico di

Diana Corvo

Anno Accademico 2025/2026

“Ai miei genitori, la mia ancora”

RIASSUNTO

Il presente progetto di tesi ha riguardato l'attività di verifica di un metodo analitico HPLC eseguita presso il laboratorio di Controllo Qualità Chimico dell'azienda farmaceutica Hikma S.p.A.

L'oggetto dello studio è stata la materia prima Octreotide Acetato, un principio attivo (API) di natura peptidica utilizzato nella formulazione di prodotti iniettabili. L'attività è stata condotta in piena conformità alle linee guida USP (*United States Pharmacopeia*), specificamente seguendo i requisiti del capitolo generale USP <1226> "Verification of Analytical Procedures".

L'obiettivo primario è stato dimostrare che il metodo analitico per la determinazione del titolo e delle sostanze correlate, sebbene già standardizzato in farmacopea, risulti riproducibile se applicato nelle condizioni operative specifiche del laboratorio.

A tal fine, è stata seguita una dettagliata pianificazione che ha previsto la verifica dei seguenti parametri:

1. **Idoneità e precisione del sistema (System Suitability):** per confermare la corretta risoluzione e stabilità della risposta cromatografica;
2. **Specificità:** per garantire l'identificazione univoca dell'analita rispetto a possibili interferenze;
3. **Precisione (Ripetibilità e Precisione Intermedia):** valutata per assicurare la costanza dei risultati tra diverse sessioni analitiche e operatori;
4. **Limite di Quantificazione (LOQ) e Limite di Rilevabilità (LOD):** parametri essenziali per il monitoraggio accurato delle sostanze correlate (impurezze).

La verifica di tali parametri, eseguita sistematicamente per ogni sessione analitica, ha permesso di confermare che il metodo per la determinazione del titolo e delle sostanze correlate soddisfa pienamente i criteri di accettabilità predefiniti dunque sia **robusto e riproducibile** nel contesto operativo del laboratorio di prova.

In conclusione, l'attività di verifica è stata completata con successo, qualificando ufficialmente il laboratorio all'utilizzo del metodo per le analisi di routine. Ciò garantisce che il controllo qualità della materia prima avvenga secondo i massimi

standard di sicurezza e precisione, garantendo la qualità e la sicurezza del prodotto finito destinato al mercato.

ABSTRACT

This thesis project focuses on the **verification of an HPLC analytical method** conducted at the Chemical Quality Control laboratory of **Hikma S.p.A.** The study was performed on the raw material **Octreotide Acetate**, a peptide active pharmaceutical ingredient (API) used in the formulation of injectable products.

The activity was carried out in full compliance with the **United States Pharmacopeia (USP)** guidelines, specifically following the requirements of the general chapter **USP <1226> "Verification of Analytical Procedures"**. The primary objective was to demonstrate that the analytical method for **assay and related substances** determination, although already standardized in the pharmacopeia, is reproducible and suitable when applied under the specific operating conditions of the laboratory.

To this end, a detailed experimental plan was implemented to verify the following performance parameters:

1. **System Suitability and System Precision:** to confirm the correct resolution and stability of the chromatographic response.
2. **Specificity:** to ensure the unequivocal identification of the analyte in the presence of potential interferences.
3. **Precision (Repeatability and Intermediate Precision):** evaluated to ensure the consistency of results across different analytical sessions and operators.
4. **Limit of Quantitation (LOQ) and Limit of Detection (LOD):** essential parameters for the accurate monitoring of related substances (impurities).

The verification of these parameters, systematically performed for each analytical session, confirmed that the method for assay and related substances determination meets all predefined **acceptance criteria**. Consequently, the method proved to be robust and reproducible within the laboratory's operational context.

In conclusion, the verification activity was successfully completed, officially qualifying the laboratory for the use of the method in **routine analysis**. This ensures that the quality control of the raw material adheres to the highest standards of safety and precision, thereby guaranteeing the quality and safety of the final drug product intended for the market.

Indice

INTRODUZIONE	1
1 OCTREOTIDE ACETATO	2
1.1 INTRODUZIONE E RAZIONALE FARMACOLOGICO	2
1.2 CHIMICA E STRUTTURA MOLECOLARE	3
1.2.1 Sequenza peptidica e configurazione degli amminoacidi	3
1.2.2 Il ponte disolfuro: struttura ciclica e stabilità conformazionale	4
1.2.3 Relazione Struttura-attività (SAR): perché le modifiche aumentano l'efficacia.....	4
1.3 PROCESSO DI SINTESI SPPS Fmoc	6
1.3.1 Strategia di sintesi: <i>Solid Phase Peptide Synthesis</i> (SPPS).....	6
1.4 IMPUREZZE E SOSTANZE CORRELATE	7
1.4.1 Classificazione delle sostanze correlate	7
1.4.2 Acetil-Octreotide.....	8
1.5 MECCANISMO D'AZIONE	9
1.5.1 Selettività recettoriale e targeting farmacologico.....	10
1.6 VERIFICA HPLC USP <1226>	10
2 HPLC	12
2.1 Principi generali della cromatografia liquida	12
2.1.1 Introduzione e cenni storici.....	12
2.1.2 Meccanismi di separazione	13
2.1.3 Cromatografia a fase inversa.....	13
2.2 Strumentazione del sistema HPLC	14
2.2.1 Sistema di gestione della fase mobile e pompe.....	15
2.2.2 Autosampler.....	16
2.2.3 Colonne cromatografiche.....	16
2.2.4 Sistemi di rivelazione.....	17
2.2.5 Sistema di acquisizione dati.....	17
2.3 Parametri cromatografici	18
2.3.1 Tempi di ritenzione e volume morto.....	18
2.3.2 Fattore di ritenzione (k) e selettività (α).....	18
2.3.3 Efficienza della colonna: numero di piatti teorici ed equazione di Van Deemter ...	19

2.3.4	Risoluzione (R_s) e fattore di simmetria (A_s).....	20
2.3.5	Rapporto segnale/rumore (S/N)	21
2.4	METODI DI QUANTIFICAZIONE.....	21
2.4.1	Metodo dello standard esterno	21
2.4.2	Metodo dello standard interno	22
2.4.3	Procedura di normalizzazione.....	22
2.4.4	Fattore di risposta relativo (RRF) e fattore di correzione (CF).....	22
2.5	IDONEITA' DEL SISTEMA (System Suitability Testing, SST)	23
2.5.1	Parametri SST	23
	Ripetibilità del sistema (%RSD)	23
	Risoluzione (R_s)	24
	Fattore di simmetria (A_s).....	24
	Numero di piatti teorici (N).....	24
	Rapporto segnale/rumore (S/N).....	24
	Fattore di ritenzione (k).....	24
	Iniezione bianco e <i>standard bracketing</i>	24
	Verifica dell'accuratezza del sistema (CTRL).....	25
2.5.2	Aggiustamento delle condizioni cromatografiche.....	25
3	VALIDAZIONE E VERIFICA	27
3.1	Validazione delle procedure analitiche.....	27
3.2	Verifica di procedure farmacopee secondo USP <1226>	30
4	MATERIALI E METODI.....	32
4.1	Reagenti e Standard	32
4.2	Solventi	32
4.3	Apparecchiatura	33
4.4	Condizioni cromatografiche	34
4.5	Composizione della fase mobile.....	34
4.6	Specificità	35
4.6.1	Criteri di accettazione	35
4.6.2	Preparazioni soluzioni.....	36
4.6.3	Procedura sperimentale	38
4.7	Precisione.....	40
4.7.1	Precisione intra-saggio/Ripetibilità.....	40

4.7.2	Precisione intermedia.....	48
4.8	Limite di Quantificazione(LOQ)/Limite di Rilevabilità (LOD)	56
4.8.1	Criteri di accettazione	56
4.8.2	Preparazioni soluzioni.....	57
4.8.3	Procedura sperimentale.....	58
5	<i>RISULTATI</i>	60
6	<i>CONCLUSIONI</i>	70
	<i>BIBLIOGRAFIA</i>	71
	<i>Allegato A - Cromatogrammi</i>	73

INTRODUZIONE

Il presente lavoro di tesi è stato sviluppato presso i laboratori di **Controllo Qualità Chimico-Fisica di Hikma Italy S.p.A.**, realtà farmaceutica globale leader nello sviluppo, produzione e commercializzazione di medicinali equivalenti (*branded e unbranded*).

Con una solida presenza nei mercati di Europa, Nord America e area MENA, l'azienda opera in stretta conformità con gli standard definiti dalle principali autorità regolatorie internazionali.

Nello specifico, l'attività sperimentale è stata condotta presso il sito produttivo Hikma Italia, polo specializzato nella fabbricazione di prodotti farmaceutici sterili iniettabili. La produzione del sito comprende prodotti liofilizzati in flaconi e soluzioni liquide iniettabili, realizzate sia mediante sterilizzazione terminale che attraverso riempimento asettico.

Coerentemente con gli elevati standard del settore, tutte le attività di laboratorio sono condotte nel rigoroso rispetto delle *Procedure Operative Standard* (SOP), le quali risultano pienamente allineate alle linee guida e ai requisiti *Good Manufacturing Practice* (GMP) definiti a livello europeo (UE). Tale impianto normativo garantisce la conformità, la tracciabilità e la sicurezza di ogni fase del processo analitico e produttivo.

1.2 CHIMICA E STRUTTURA MOLECOLARE

1.2.1 Sequenza peptidica e configurazione degli amminoacidi

L'Octreotide presenta la seguente sequenza peptidica secondo la nomenclatura IUPAC/IUB:



dove il termine C-terminale è modificato in *threoninol* (Thr-ol, L-treoninolo), un amminoacido ridotto a struttura amminodiolica. La molecola contiene 8 residui amminoacidici, due dei quali in configurazione D: la *D-fenilalanina* in posizione 1 e il *D-triptofano* in posizione 4 (D-Trp4), elemento farmacoforo critico per il riconoscimento recettoriale.

La tabella seguente riassume i residui amminoacidici, la loro configurazione e il ruolo farmacologico:

Posizione	Residuo	Configurazione	Ruolo Farmacologico
1	D-Phe (D-Fenilalanina)	D	Resistenza alle aminopeptidasi N-terminali
2	Cys (Cisteina)	L	Formazione del ponte disolfuro (posizione 2-7)
3	Phe (Fenilalanina)	L	Interazioni idrofobiche con la tasca recettoriale
4	D-Trp (D-Triptofano)	D	Chiave molecolare del farmacoforo (interazioni π -stacking)
5	Lys (Lisina)	L	Ponti idrogeno con Asp del recettore SSTR2
6	Thr (Treonina)	L	Stabilizzazione conformazionale
7	Cys (Cisteina)	L	Formazione del ponte disolfuro (posizione 2-7)
8	Thr-ol (Treoninolo)	L	Blocco C-terminale: resistenza alle carbossipeptidasi

Tabella 1. Ruolo farmacologico per ciascun residuo amminoacidico

1.2.2 Il ponte disolfuro: struttura ciclica e stabilità conformazionale

Un elemento strutturale di primaria importanza è la presenza di un *ponte disolfuro intramolecolare* tra i residui cisteinici in posizione 2 e 7 (Cys2–Cys7). Tale legame covalente determina la *ciclizzazione della catena peptidica*, imponendo alla molecola una conformazione a ansa (*loop*) β -turn di tipo II'.

Questa architettura conformazionale è *indispensabile per l'attività biologica*: la struttura ciclica obbligata posiziona con precisione geometrica il motivo farmacoforo D-Trp4–Lys5 all'interno della tasca di legame del recettore SSTR2. Qualsiasi alterazione del ponte disolfuro — per riduzione ossidativa a forma lineare, o per ciclizzazione aberrante a forme polimeriche — produce derivati privi di affinità recettoriale, classificati come *sostanze correlate inattive* secondo la farmacopea.

Da un punto di vista analitico, il controllo dell'integrità del ponte disolfuro rappresenta pertanto uno degli obiettivi primari della verifica del metodo HPLC oggetto del presente lavoro.

1.2.3 Relazione Struttura-attività (SAR): perché le modifiche aumentano l'efficacia

La superiorità dell'Octreotide rispetto alla somatostatina naturale come agente terapeutico deriva da tre modificazioni chimiche chiave, ciascuna con un razionale strutturale preciso.

a) Sostituzione con D-amminoacidi

L'inserimento di D-Phe1 e D-Trp4 in configurazione D costituisce la strategia principale per conferire resistenza enzimatica. Le proteasi sieriche (endopeptidasi come la chimotripsina e la tripsina) e le peptidasi tissutali, essendo enzimi stereoselettivi, riconoscono e idrolizzano preferenzialmente i legami peptidici tra amminoacidi in configurazione L. L'introduzione di D-amminoacidi crea una distorsione locale della catena peptidica che impedisce il corretto fitting nel sito catalitico degli enzimi proteolitici, rallentando drasticamente la velocità di degradazione e prolungando l'emivita plasmatica da 2–3 minuti (somatostatina) a circa 1,5–2 ore (Octreotide s.c.).

b) Aminoalcol C-terminale (Threoninolo)

Il terminale C dell'Octreotide non è un gruppo carbossilico libero ($-COOH$) bensì un amminodiolo alifatico derivante dalla riduzione della treonina (L-threoninol). Questa modifica strutturale persegue un duplice obiettivo:

- Blocca l'azione delle carbossipeptidasi, enzimi che degradano i peptidi a partire dall'estremità C-terminale, riconoscendo specificamente il gruppo carbossilico libero.
- Modifica le proprietà chimico-fisiche della molecola ($\log P$, solubilità acquosa) in modo favorevole per le formulazioni iniettabili sterili.

c) Il Motivo Farmacoforo D-Trp-Lys

Come evidenziato da recenti studi di biologia strutturale (*Nature Communications*, 2023), l'efficacia terapeutica dell'Octreotide è determinata dalla precisa interazione del motivo D-Trp4-Lys5 (fig.1) con la tasca di legame del recettore SSTR2 (proteina *G-Protein Coupled Receptor* di classe A):

- Il residuo D-Trp4 si inserisce profondamente nella tasca idrofobica del recettore, stabilizzando il complesso ligando-recettore mediante interazioni π -stacking con residui aromatici del dominio transmembranario.
- Il residuo Lys5 forma ponti idrogeno essenziali con i residui di acido aspartico (Asp) presenti nel sito di legame del recettore, contribuendo alla specificità per SSTR2 rispetto ad altri sottotipi.
- Qualsiasi racemizzazione del D-Trp4 a L-Trp4 (diastereoisomero) compromette fatalmente l'affinità recettoriale, poiché altera la geometria tridimensionale del farmacoforo.

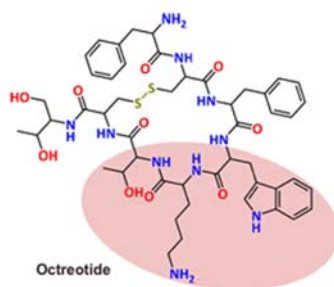


Figura 2. Zhao J. et al. (2023). Prospect of acromegaly therapy: molecular mechanism of clinical drugs octreotide and paltusotine. *Nature Communications*, 14, 1033.

1.3 PROCESSO DI SINTESI SPPS Fmoc

1.3.1 Strategia di sintesi: *Solid Phase Peptide Synthesis* (SPPS)

La sintesi dell'Octreotide Acetato è condotta esclusivamente mediante Sintesi in Fase Solida (SPPS) secondo il protocollo di protezione temporanea Fmoc/tBu (9-fluorenilmetossicarbonil/tert-butil). Questa strategia, preferita rispetto al protocollo Boc/Bzl per le migliori condizioni di clivaggio compatibili con i residui sensibili all'acido del peptide, prevede tre macrofasi distinte:

Fase 1 — Assemblaggio della Catena Lineare su Resina

La sintesi procede in direzione C→N terminale su un supporto solido polimerico (resina di *Rink Amide* o resina 2-clorotritile, scelta in base al C-terminale desiderato). L'incorporazione sequenziale degli amminoacidi N-protetti con Fmoc avviene tramite cicli ripetuti di:

1. Deprotezione del gruppo Fmoc con piperidina al 20% in dimetilformammide (DMF)
2. Lavaggio con DMF per rimozione dei sottoprodotti
3. Accoppiamento (coupling) con l'amminoacido attivato (reattivi HATU/HOAt o HBTU/HOBt) in presenza di base (DIEA)
4. Capping delle catene non accoppiate con anidride acetica per minimizzare le delezioni

La sintesi del residuo Thr-ol (threoninolo) C-terminale richiede una procedura specifica: la resina viene funzionalizzata con il derivato del treoninolo pre-attivato, poiché il gruppo alcolico primario (–CH₂OH) non può essere ottenuto per riduzione in-situ sulla resina.

Fase 2 — Clivaggio dalla Resina e Deprotezione Globale

Il clivaggio del peptide lineare dalla resina e la rimozione dei gruppi protettori sulle catene laterali (tBu per Thr, Boc per Lys, Trt per Cys) vengono effettuati in un'unica operazione con una soluzione di TFA (acido trifluoroacetico, 90–95%) in presenza di *scavenger* (trisopropilsilano, acqua, 1,2-etanditiolo) per prevenire la rialchilazione dei nucleofili peptidici da parte dei carbocationi generati.

Fase 3 — Ciclizzazione Ossidativa (Formazione del Ponte Disolfuro)

La fase più critica dell'intero processo è la ciclizzazione ossidativa per formare il ponte disolfuro Cys2–Cys7.

Il peptide lineare ridotto (con gruppi tiolici –SH liberi) viene sottoposto a ossidazione controllata in soluzione diluita con:

- Iodio (I₂) in soluzione acquosa/acetonitrilica: metodo rapido, con rischio di ossidazione del residuo Trp;
- Dimetilsolfossido (DMSO) in tampone acquoso: metodo più selettivo e compatibile con il residuo D-Trp4;
- Aria/ossigeno in tampone basico (pH 7–8): metodo blando, tempi più lunghi.

La corretta formazione del ponte disolfuro è verificata per HPLC (shift di ritenzione cromatografica rispetto alla forma lineare).

1.4 IMPUREZZE E SOSTANZE CORRELATE

1.4.1 Classificazione delle sostanze correlate

Il complesso processo di sintesi SPPS genera inevitabilmente una serie di **sostanze correlate** (*related substances*), la cui presenza deve essere monitorata e quantificata secondo le linee guida ICH Q3A e la monografia farmacopeica di riferimento.

La tabella seguente classifica le principali impurezze:

Tipologia di Impurezza	Origine	Impatto sull'Attività Biologica
Peptidi troncati (deletion sequences)	Accoppiamento incompleto durante SPPS	Perdita totale o parziale dell'affinità per SSTR2
Diastereoisomeri (es. [L-Trp4]-Octreotide)	Racemizzazione del D-Trp4 durante sintesi/clivaggio	Drastica riduzione della selettività per SSTR2; possibile binding SSTR5
Forma lineare (ridotta)	Mancata o incompleta ciclizzazione ossidativa	Inattiva (conformazione non farmacofora)
Forme polimeriche/aggregate	Ossidazione intermolecolare o errata ciclizzazione	Inattive; potenziale immunogenicità

Tipologia di Impurezza	Origine	Impatto sull'Attività Biologica
Acetil-Octreotide	Reazione con agenti acetilanti; sottoprodotto del capping	Biologicamente attivo su SSTR2 e SSTR5; alterazione profilo farmacodinamico
Residui di TFA/solventi organici	Processo di sintesi e purificazione	Tossicità; interferenza analitica

Tabella 2. Impurezze

1.4.2 Acetil-Octreotide

Tra le sostanze correlate, l'**Acetil-Octreotide** merita una trattazione specifica per la sua rilevanza sia biologica che analitica.

Questa impurezza può originarsi durante il processo SPPS nel fase del *capping* (eseguito con anidride acetica per bloccare le catene non accoppiate) o dall'interazione del peptide purificato con agenti acetilanti.

Studi recenti hanno dimostrato che l'Acetil-Octreotide mantiene un'alta affinità per i recettori SSTR2 e SSTR5, attivando il medesimo *pathway* di segnalazione intracellulare tramite proteina Gi inibitoria.

Sebbene biologicamente attivo, esso rappresenta una variazione non accettabile rispetto al profilo farmacodinamico richiesto per l'Octreotide Acetato puro, in quanto:

- Altera la selettività recettoriale con potenziale incremento degli effetti indesiderati mediati da SSTR5 (es. effetti sul metabolismo glucidico);
- Costituisce una variazione non specificata dell'API, non conforme alle specifiche farmaceutiche;
- Deve essere identificato e quantificato con precisione dal metodo HPLC verificato.

La capacità dell'Acetil-Octreotide di attivare il medesimo *pathway* dell'Octreotide rende la sua identificazione e quantificazione tramite HPLC di primaria importanza, imponendo requisiti di specificità e sensibilità (LOD/LOQ) particolarmente stringenti al metodo analitico oggetto di verifica.

1.5 MECCANISMO D'AZIONE

Il legame dell'Octreotide al recettore SSTR2 (GPCR di classe A, accoppiato a proteina Gi inibitoria) innesca una cascata di segnalazione intracellulare che produce la soppressione della secrezione ormonale:

1. Legame ligando-recettore: Il motivo D-Trp4–Lys5 si inserisce nella tasca di legame del recettore, determinando un cambio conformazionale transmembranario con attivazione della proteina Gi (subunità α - $\beta\gamma$).
2. Inibizione dell'Adenilato Ciclasi (AC): La subunità α_i attivata interagisce con l'AC, inibendo la conversione dell'ATP in AMP ciclico (cAMP).
3. Riduzione del cAMP intracellulare: Il calo della concentrazione di cAMP riduce l'attività della Protein Chinasi A (PKA), bloccando le vie di fosforilazione che normalmente promuovono l'esocitosi dei granuli ormonali.
4. Soppressione ormonale: Il risultato finale è una potente soppressione della secrezione di GH (ormone della crescita), glucagone, insulina, TSH, VIP, gastrina e serotonina.

Parallelamente, l'attivazione di SSTR2 può modulare i canali del potassio (iperpolarizzazione cellulare) e i canali del calcio voltaggio-dipendenti (riduzione dell'influsso di Ca^{2+}), contribuendo all'effetto antiproliferativo nel trattamento dei NET (Fig.3).

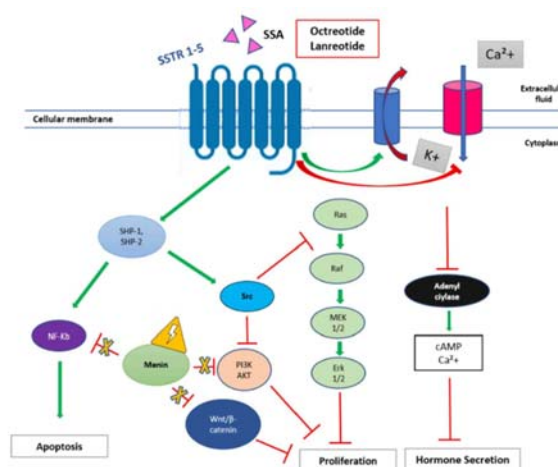


Figura 3. Sesti F., La Salvia A., Grinzato A., Mazzilli R., Faggiano A. "L'approccio con analoghi della somatostatina nelle neoplasie neuroendocrine associate a sindromi neoplastiche multi-endocrine ereditarie". *L'Endocrinologo*, 2021; 22: 423–428.

1.5.1 Selettività recettoriale e targeting farmacologico

La famiglia dei recettori della somatostatina comprende cinque sottotipi (SSTR1–SSTR5), con profili di espressione tissutale distinti.

L'Octreotide presenta un'evidente selettività per SSTR2, con affinità nettamente inferiore per SSTR3 e SSTR5 e scarsa affinità per SSTR1 e SSTR4.

Sottotipo Recettoriale	Affinità Octreotide (CI ₅₀ , nM)	Espressione Prevalente	Rilevanza Clinica
SSTR1	> 1000	SNC, ipofisi	Bassa (non target principale)
SSTR2	0.1 – 2	Ipofisi (somatotropi), NET, pancreas	Alta — target primario dell'Octreotide
SSTR3	10 – 50	Pancreas, cervello	Moderata — effetti antiproliferativi
SSTR4	> 1000	Cervello	Minima
SSTR5	5 – 30	Ipofisi (corticotropi), pancreas	Moderata — secrezione insulina/glucagone

Tabella 3. Selettività recettoriale

È fondamentale sottolineare che la selettività per SSTR2 è strettamente dipendente dall'integrità stereoisomerica del residuo D-Trp4.

Il diastereoisomero [L-Trp4]-Octreotide presenta una distribuzione di affinità alterata, con riduzione del rapporto SSTR2/SSTR5, contribuendo a un profilo di effetti collaterali potenzialmente modificato (maggiore impatto sul metabolismo glucidico).

1.6 VERIFICA HPLC USP <1226>

L'analisi della struttura chimica, del meccanismo di sintesi e del profilo di degradazione dell'Octreotide Acetato ha permesso di delineare con chiarezza il rationale analitico che

sottende l'importanza della verifica del metodo HPLC condotta nel presente lavoro di tesi presso i laboratori di Hikma S.p.A.

La determinazione del Titolo (*Assay*) e delle Sostanze Correlate tramite HPLC in fase inversa non è solo un requisito regolatorio imposto dalla farmacopea (USP <1226>): essa rappresenta la garanzia molecolare che l'interazione ligando-recettore SSTR2 avvenga con la specificità e la riproducibilità richieste per l'efficacia terapeutica. In particolare:

- La verifica della SPECIFICITÀ assicura che il picco cromatografico dell'Octreotide sia libero da interferenze dei diastereoisomeri (es. [L-Trp4]-Octreotide) e dei peptidi troncati, molecole strutturalmente simili ma farmacologicamente inferiori.
- La verifica della PRECISIONE (ripetibilità e precisione intermedia) garantisce la riproducibilità delle misure di purezza tra analisti e strumenti diversi, condizione indispensabile per il rilascio di lotti di API destinati alla produzione di iniettabili sterili.
- La determinazione dei Limiti di rilevabilità (LOD) e quantificazione (LOQ) permette di monitorare le sostanze correlate a livelli di traccia, incluso l'Acetil-Octreotide, la cui presenza deve essere quantificata con precisione per garantire la costanza del profilo farmacodinamico del prodotto finito.

La comprensione del meccanismo d'azione molecolare dell'Octreotide evidenzia come la sua efficacia terapeutica dipenda in modo critico dall'integrità strutturale della molecola e dalla sua purezza. Il controllo della purezza tramite HPLC, oggetto del presente lavoro di verifica secondo USP <1226>, rappresenta dunque lo strumento analitico indispensabile per garantire che l'interazione ligando-recettore avvenga correttamente, salvaguardando l'efficacia clinica del farmaco finito.

2 HPLC

2.1 Principi generali della cromatografia liquida

2.1.1 Introduzione e cenni storici

La cromatografia è una delle tecniche analitiche più diffuse e versatili in chimica analitica, biochimica e farmaceutica.

Il termine deriva dal greco $\chi\rho\omicron\mu\alpha$ (chroma, colore) e $\gamma\rho\acute{\alpha}\phi\epsilon\iota\nu$ (graphein, scrivere), in riferimento agli esperimenti pionieristici del botanico russo Mikhail Semenovitch Tswett che, agli inizi del Novecento (1903–1906), separò i pigmenti vegetali mediante una colonna di carbonato di calcio e solfuro di petrolio. Sebbene le prime applicazioni riguardassero composti colorati, il principio fisico sottostante era immediatamente generalizzabile a qualsiasi miscela di sostanze.

Lo sviluppo della cromatografia liquida ad alta efficienza — High Performance Liquid Chromatography (HPLC) — avvenne principalmente negli anni Sessanta e Settanta del XX secolo. L'introduzione di fasi stazionarie con particelle di piccolo diametro (5–10 μm) e di pompe in grado di operare ad alta pressione consentì di ridurre drasticamente i tempi di analisi e di aumentare il potere risolutivo rispetto alla cromatografia liquida classica a bassa pressione. Negli anni successivi, la miniaturizzazione delle particelle (< 3 μm , poi sub-2 μm), lo sviluppo della *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC) e l'introduzione di colonne monolitiche e a particelle superficialmente porose (*Superficially Porous Particles*, SPP) hanno ulteriormente ampliato le possibilità analitiche.

Oggi l'HPLC rappresenta la tecnica di elezione per la determinazione del titolo (*assay*) e delle sostanze correlate nei prodotti farmaceutici, come riconosciuto dalle principali farmacopee internazionali — United States Pharmacopeia (USP-NF), European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) e Japanese Pharmacopoeia (JP).

La monografia USP dell'Octreotide acetato prevede specificamente l'impiego di metodi HPLC in fase inversa con gradiente per entrambe le determinazioni oggetto del presente studio.

2.1.2 Meccanismi di separazione

Il principio fisico comune a tutte le tecniche cromatografiche è la distribuzione degli analiti tra due fasi: una fase stazionaria e una fase mobile (che fluisce attraverso la fase stazionaria). La separazione di una miscela di componenti avviene perché ciascun componente interagisce in modo diverso con le due fasi, determinando diversi gradi di ritenzione e quindi diversi tempi di eluizione (EP 2.2.46, 2025; USP <621>, 2024).

I principali meccanismi impiegati nella cromatografia liquida sono:

- **Adsorbimento (cromatografia liquido-solido, LSC):** la separazione si basa sull'adsorbimento selettivo degli analiti sulla superficie della fase stazionaria solida (es. silice, allumina). Le interazioni predominanti sono di tipo dipolo-dipolo, legame a idrogeno e forze di Van der Waals.
- **Ripartizione (RP-HPLC):** la separazione si basa sulla diversa affinità degli analiti tra due fasi immiscibili quali la fase mobile e la fase stazionaria apolare (es. C18 legato alla silice). È il meccanismo dominante nei metodi HPLC di interesse farmaceutico.
- **Scambio ionico (IEC):** la separazione si basa sull'interazione elettrostatica tra gli analiti ionizzati e i gruppi funzionali a carica opposta presenti sulla fase stazionaria.
- **Esclusione dimensionale (SEC):** la separazione si basa sulle differenze di dimensioni molecolari. Impiegata per la caratterizzazione di macromolecole e per la determinazione del peso molecolare.

2.1.3 Cromatografia a fase inversa

La cromatografia a fase inversa (Reversed-Phase HPLC, RP-HPLC) è la modalità cromatografica di gran lunga più utilizzata nell'industria farmaceutica. Viene definita "inversa" in quanto la polarità della fase stazionaria e della fase mobile è opposta rispetto alla cromatografia normale: la fase stazionaria è apolare e la fase mobile è polare.

Fase stazionaria C18. La fase stazionaria (fig.4) più comune in RP-HPLC è costituita da silice porosa (1,7–5 µm) sulla cui superficie i gruppi silanici (Si–OH) sono stati chimicamente modificati mediante reazione con alchilsilani contenenti catene di 18 atomi di carbonio (ottadecilsilano, ODS o C18).

Un passaggio successivo di "end-capping" riduce le interazioni silanoliche residue responsabili del *tailing* dei picchi.

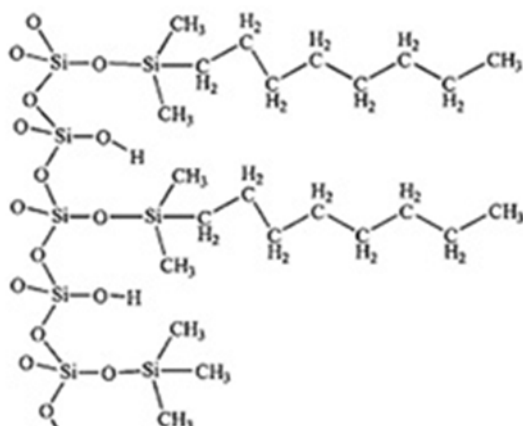


Figura 4. Architettura molecolare della superficie di silice in RP-HPLC. Si osservano le catene idrofobiche, i siti di end-capping e i gruppi silanolo residui.

Fase mobile acquosa-organica. La fase mobile è tipicamente costituita da una miscela di un solvente acquoso (spesso un tampone fosfato, acetato, TFA o TFA/H₂O) e di un solvente organico miscibile con l'acqua (acetonitrile, metanolo). La forza eluotropa aumenta all'aumentare della percentuale di solvente organico. Per la separazione di peptidi complessi come l'Octreotide e le sue sostanze correlate, si impiegano gradienti di concentrazione del solvente organico per ottimizzare la selettività. Il controllo del pH è fondamentale per garantire la riproducibilità della ritenzione e la risoluzione dalle sostanze correlate.

2.2 Strumentazione del sistema HPLC

Secondo la USP <621>, lo strumento è costituito da (fig.5): un serbatoio contenente la fase mobile, una pompa, un iniettore, una colonna cromatografica, un detector e un sistema di acquisizione dati. Le varie componenti dell'apparecchiatura devono essere qualificate per garantire la tracciabilità dei risultati analitici in ambito GMP.

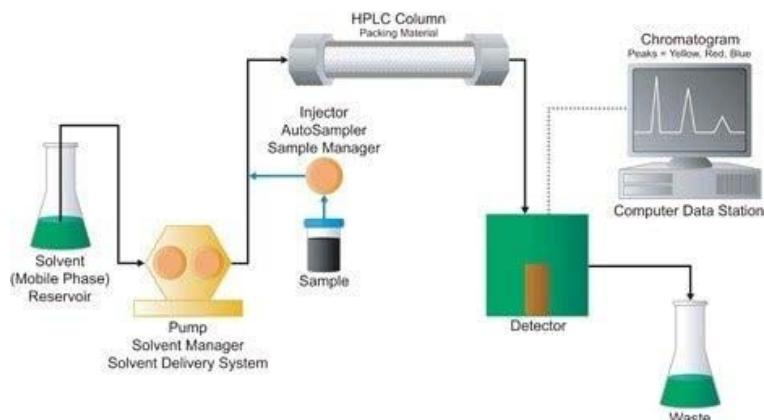


Figura 5. HPLC

2.2.1 Sistema di gestione della fase mobile e pompe

I serbatoi della fase mobile sono in genere di vetro borosilicato (ambrati per solventi fotosensibili), dotati di tubi pescanti con filtri. Prima dell'uso, la fase mobile deve essere degasata per eliminare gas disciolti che possono formare bolle nel detector o nella pompa. Il degasatore in linea opera mediante membrane permeabili ai gas: la fase mobile scorre attraverso tubi immersi in camera a depressione.

Le pompe HPLC devono garantire un flusso costante, accurato e privo di pulsazioni fino a 400–600 bar. Si impiegano comunemente pompe a pistone alternativo.

La composizione della fase mobile può essere gestita in due modalità (EP 2.2.46, 2025; USP <621>, 2024):

- *Eluizione isocratica*: la composizione rimane costante per tutta l'analisi. Garantisce la migliore riproducibilità dei tempi di ritenzione; adatta per matrici semplici e per il saggio.
- *Eluizione in gradiente*: la composizione varia nel tempo (tipicamente aumentando la percentuale di solvente organico). Indispensabile per la separazione di miscele complesse come le sostanze correlate dell'Octreotide. Richiede attenzione nella verifica SST e nella caratterizzazione del volume di ritardo (*dwell volume*).

Nei sistemi a gradiente a bassa pressione (LP mixing), la miscelazione avviene prima della pompa; nei sistemi ad alta pressione (HP mixing), due pompe indipendenti dosano i solventi separatamente. Il *dwell volume* (distanza tra il punto di miscelazione e l'ingresso

della colonna) deve essere caratterizzato e documentato per garantire la riproducibilità inter-sistema (EP 2.2.46, 2025).

2.2.2 Autosampler

L'*autosampler* preleva automaticamente aliquote definite di soluzione campione e le introduce nel flusso verso la colonna, garantendo maggiore riproducibilità del volume iniettato rispetto all'iniezione manuale.

Il funzionamento prevede: (1) aspirazione di un volume definito dal flacone tramite un ago robotico; (2) trasferimento nel loop di iniezione; (3) iniezione mediante una valvola rotante a 6 vie. Il volume di iniezione è tipicamente nell'ordine di 1–100 μL .

L'*autosampler* è dotato di termostato (tipicamente 2–8°C per peptidi instabili come l'Octreotide), limitando la degradazione durante sessioni analitiche prolungate. La verifica della stabilità delle soluzioni campione nell'*autosampler* termostato fa parte degli studi di verifica del metodo.

2.2.3 Colonne cromatografiche

La colonna cromatografica è il cuore del sistema HPLC: è il componente in cui avviene la separazione fisica degli analiti. È costituita da un tubo di acciaio inossidabile riempito in modo uniforme con la fase stazionaria.

I principali parametri geometrici sono:

- **Lunghezza (L):** tipicamente 50–250 mm; colonne più lunghe aumentano il numero dei piatti teorici (N) ma anche la pressione e i tempi di analisi.
- **Diametro interno (dc):** tipicamente 2,1–4,6 mm per analisi standard; colonne *narrow-bore* (1–2,1 mm) migliorano la sensibilità con detector a spettrometria di massa (MS).
- **Diametro delle particelle (dp):** 3–5 μm per HPLC convenzionale; 1,7–2,5 μm per UHPLC.

La USP-NF identifica la fase stazionaria mediante la designazione "L" (L1 = C18). La sostituzione con fasi di tipo diverso non è consentita senza ri-validazione (USP <621>, 2024). Alla colonna principale è spesso premessa una precolonna (*guard column*) della stessa fase stazionaria, con lunghezza non superiore al 15% di quella analitica.

La termostatazione della colonna è critica: la EP 2.2.46 e la USP <621> consentono variazioni di $\pm 10^{\circ}\text{C}$ in eluizione isocratica e $\pm 5^{\circ}\text{C}$ in gradiente, purché i criteri SST siano soddisfatti.

2.2.4 Sistemi di rivelazione

Rivelatore UV-Vis a lunghezza d'onda variabile: misura l'assorbanza della fase mobile in uscita a una singola lunghezza d'onda. La risposta è lineare con la concentrazione nell'intervallo di validità della legge di Beer-Lambert: $A = \varepsilon \times c \times l$. I peptidi assorbono nella regione UV a $\sim 210\text{--}220$ nm (legame peptidico ammidico) e a $\sim 254\text{--}280$ nm (residui aromatici Trp, Tyr, Phe). Per l'Octreotide la rilevazione è tipicamente a ~ 220 nm.

Photodiode Array Detector (PDA/DAD): acquisisce simultaneamente gli spettri di assorbimento su un intervallo di lunghezze d'onda (tipicamente 190–800 nm) per ogni punto del cromatogramma.

Offre due importanti vantaggi: in primo luogo, consente la verifica della purezza del picco (*peak purity test*), confrontando gli spettri UV-Vis registrati in diversi punti del picco stesso; in secondo luogo, permette la conferma dell'identità dell'analita mediante la corrispondenza spettrale con lo standard di riferimento. Il test di purezza DAD è uno strumento chiave nella verifica della specificità del metodo nell'analisi delle sostanze correlate.

La lunghezza d'onda del detector non è soggetta ad alcuna variazione consentita nell'ambito degli aggiustamenti delle condizioni cromatografiche (EP 2.2.46, 2025; USP <621>, 2024).

2.2.5 Sistema di acquisizione dati

Il software cromatografico (es. Empower) acquisisce il segnale elettrico del detector in funzione del tempo, visualizzando e registrando il cromatogramma in tempo reale. Quest'ultimo rappresenta graficamente la risposta del detector in funzione del tempo: in condizioni ideali, ciascun analita genera un picco gaussiano simmetrico sulla linea di base. L'integrazione automatica dei picchi — la determinazione delle aree — è eseguita dal software sulla base dei parametri di integrazione impostati dall'utente, la cui correttezza e coerenza tra le diverse sessioni analitiche devono essere rigorosamente documentate.

2.3 Parametri cromatografici

I parametri cromatografici quantitativi sono definiti in modo armonizzato dalla USP <621> e dalla EP 2.2.46. Essi costituiscono la base per la valutazione delle prestazioni del sistema (*System Suitability*) e per il calcolo dei risultati quantitativi.

2.3.1 Tempi di ritenzione e volume morto

Il tempo di ritenzione (t_R) è il parametro primario di identificazione cromatografica: ogni analita, nelle condizioni cromatografiche definite, possiede un caratteristico t_R riproducibile.

Il tempo morto t_M (*hold-up time*) è il tempo richiesto per l'eluizione di un componente completamente non trattenuto dalla fase stazionaria.

Il volume morto V_m e il volume di ritenzione V_r sono definiti come:

$$V_m = t_M \times F \quad V_r = t_R \times F$$

F velocità di flusso (mL/min); t_M = tempo morto (min) e t_R = tempo di ritenzione (min)

2.3.2 Fattore di ritenzione (k) e selettività (α)

Il fattore di ritenzione k (*mass distribution ratio D_m ; capacity factor k'*) descrive il grado di interazione di un analita con la fase stazionaria, normalizzato rispetto al tempo morto (EP 2.2.46, 2025; USP <621>, 2024):

$$k = (t_R - t_M) / t_M$$

- $k = 0$: assenza di ritenzione;
- $2 \leq k \leq 10$: valori ottimali;
- valori inferiori a 2 indicano possibili interferenze con il fronte del solvente;
- valori superiori a 10 comportano tempi d'analisi eccessivi.

Il fattore di selettività α descrive la selettività della separazione tra due picchi adiacenti (per convenzione $\alpha > 1$):

$$\alpha = k_2 / k_1$$

k_1 = fattore di ritenzione del picco con minore ritenzione; k_2 = fattore di ritenzione del secondo picco. Un $\alpha = 1$ indica che i due componenti non sono separabili con quel sistema.

La ritenzione relativa (r) caratterizza la posizione di un picco rispetto a un picco di riferimento (solitamente il picco principale):

$$r = (t_{Ri} - t_M)/(t_{Rst} - t_M)$$

t_{Ri} = tempo di ritenzione del picco di interesse e t_{Rst} = tempo di ritenzione del picco di riferimento.

2.3.3 Efficienza della colonna: numero di piatti teorici ed equazione di Van Deemter

L'efficienza della colonna esprime la capacità di produrre picchi stretti e simmetrici. Il modello dei piatti teorici, introdotto da Martin e Synge (1941), formalizza questo concetto.

Il numero di piatti teorici N è calcolabile solo in eluizione isocratica:

$$N = 5,54 \times (t_R/W_h)^2$$

t_R = tempo di ritenzione del picco; W_h = larghezza del picco a metà altezza.

L'altezza equivalente al piatto teorico H (HETP) normalizza l'efficienza rispetto alla lunghezza della colonna, e l'altezza ridotta del piatto h la normalizza ulteriormente rispetto al diametro delle particelle:

$$H = L/N \qquad h = H/d_p$$

L = lunghezza della colonna; d_p = diametro delle particelle.

La relazione tra H e la velocità lineare della fase mobile “ u ” è descritta dall'equazione di Van Deemter (1956), fondamento teorico della cromatografia moderna:

$$H = A + B/u + C \times u$$

I tre termini descrivono i meccanismi di allargamento di banda: (A) diffusione di Eddy (percorsi multipli attraverso il letto), indipendente da u ; (B/ u) diffusione longitudinale assiale, dominante a basse velocità; (C $\times u$) resistenza al trasferimento di massa, dominante ad alte velocità.

2.3.4 Risoluzione (R_s) e fattore di simmetria (A_s)

La risoluzione R_s è il principale indicatore della qualità di una separazione cromatografica e il parametro SST più importante nei metodi per le sostanze correlate. Formula armonizzata USP <621> / EP 2.2.46 (EP 2.2.46, 2025; USP <621>, 2024):

$$R_s = 1,18 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (W_{h1} + W_{h2})$$

t_{R1}, t_{R2} = tempi di ritenzione dei due picchi ($t_{R2} > t_{R1}$); W_{h1}, W_{h2} = larghezze a metà altezza.

Valore di R_s	Significato fisico	Idoneità per uso quantitativo
< 1,0	Picchi parzialmente sovrapposti	Non accettabile
= 1,0	Separazione dell'84% (parziale)	Generalmente non accettabile
= 1,5	Separazione baseline completa	Accettabile (standard farmaceutico)
> 2,0	Separazione sovrabbondante	Eccellente; ampio margine di sicurezza

Tabella 4. Valori di R_s

La risoluzione dipende simultaneamente da tre parametri fondamentali (equazione di Purnell):

$$R_s = (\sqrt{N}/4) \times [(\alpha - 1)/\alpha] \times [k/(1 + k)]$$

N = efficienza della colonna; α = fattore di selettività; k = fattore di ritenzione del secondo picco. Questa relazione evidenzia le leve disponibili per ottimizzare R_s : aumentare N , aumentare α , ottimizzare k .

Fattore di simmetria (A_s). Il fattore di simmetria descrive la forma del picco. Un picco gaussiano ideale ha $A_s = 1,0$; $A_s > 1,0$ indica tailing (coda posteriore), $A_s < 1,0$ indica fronting (coda anteriore). Le cause di tailing includono: interazioni con i silanoli residui della silice, volumi morti extra-colonna (EP 2.2.46, 2025; USP <621>, 2024):

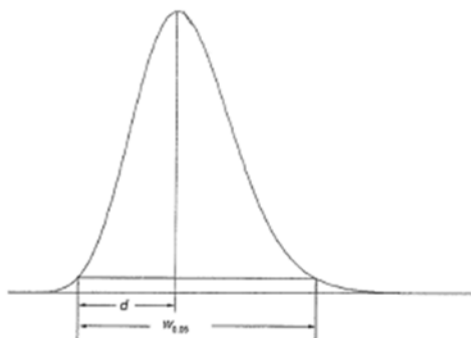


Figura 6

$$A_s = W_{0,05}/2d$$

$W_{0,05}$ = larghezza del picco a 1/20 dell'altezza massima; d = distanza tra la perpendicolare dal massimo del picco e il bordo anteriore del picco, misurata a 1/20 dell'altezza. Intervallo accettabile: 0,8–1,8 (EP 2.2.46).

2.3.5 Rapporto segnale/rumore (S/N)

Il rapporto segnale/rumore (S/N) definisce la sensibilità del sistema e viene impiegato come parametro SST nei metodi per le sostanze correlate per verificare la capacità di rilevare e quantificare le impurezze ai livelli richiesti (EP 2.2.46, 2025):

$$S/N = 2H/h$$

H = altezza del picco nel cromatogramma della soluzione di riferimento, dal massimo alla baseline estrapolata, su distanza $\geq 5 \times Wh$; h = ampiezza del rumore nel cromatogramma del bianco su analoga distanza. Il LOQ corrisponde a $S/N = 10$ ed è uguale o inferiore alla reporting threshold (0,05%) (EP 2.2.46, 2025).

2.4 METODI DI QUANTIFICAZIONE

L'HPLC è ampiamente utilizzata per determinare il titolo del principio attivo (assay) e il contenuto di impurezze (sostanze correlate) in un prodotto farmaceutico. L'area del picco è proporzionale alla concentrazione dell'analita ed è calcolata integrando l'intensità del segnale del detector in funzione del tempo. I metodi di quantificazione applicabili sono i seguenti (EP 2.2.46, 2025; USP <621>, 2024):

2.4.1 Metodo dello standard esterno

La concentrazione del componente è determinata confrontando le risposte (aree o altezze dei picchi) della soluzione campione con quelle di una soluzione di riferimento a concentrazione nota. È il metodo più comunemente impiegato nell'industria farmaceutica per il saggio e le sostanze correlate.

Mediante calibrazione a un punto (*one-point calibration*), la concentrazione del campione si ottiene dalla relazione:

$$[\text{campione}] = (\text{risposta campione} / \text{risposta standard}) \times [\text{standard}]$$

Per le sostanze correlate, l'impurezza espressa come percentuale relativa rispetto all'analita principale è calcolata come:

$$\% \text{ impurezza} = (\text{risposta campione} / \text{risposta standard}) \times ([\text{standard}] / [\text{campione}]) \times CF \times 100$$

CF = fattore di correzione (v. § 2.4.4).

2.4.2 Metodo dello standard interno

Un composto stabile, scelto come standard interno, è aggiunto in quantità uguali sia alla soluzione di riferimento sia alla soluzione campione. La concentrazione è determinata confrontando il rapporto delle aree del composto e dello standard interno nelle due soluzioni. Lo standard interno deve: non reagire con il composto da analizzare; essere stabile; non presentare picchi interferenti; avere un picco ben separato da tutti gli altri (EP 2.2.46, 2025; USP <621>, 2024).

2.4.3 Procedura di normalizzazione

Previa dimostrazione della linearità, il contenuto percentuale di un componente è calcolato come percentuale dell'area del picco rispetto all'area totale di tutti i picchi, escludendo picchi di solventi, reagenti, fase mobile o matrice, e picchi uguali o al di sotto della *reporting threshold* (EP 2.2.46, 2025).

2.4.4 Fattore di risposta relativo (RRF) e fattore di correzione (CF)

La sensibilità del detector per una data sostanza relativamente a una sostanza standard di riferimento è espressa dal *Relative Response Factor* (RRF). Il fattore di correzione CF (reciproco dell'RRF) viene applicato nei test per le sostanze correlate quando il *response factor* dell'impurezza si discosta significativamente da quello del composto principale (al di fuori dell'intervallo 0,8–1,2) (EP 2.2.46, 2025; USP <621>, 2024):

$$CF = 1/RRF$$

Il CF può essere determinato mediante studio di linearità nell'intervallo di concentrazioni rilevante, oppure mediante iniezioni replicate a un singolo livello (tipicamente al limite di specifica dell'impurezza).

2.5 IDONEITA' DEL SISTEMA (System Suitability Testing, SST)

I test di idoneità del sistema (System Suitability Tests, SST) sono una componente integrante della procedura analitica cromatografica. Il fondamento concettuale degli SST, come enunciato dalla USP <621>, è che "le apparecchiature, l'elettronica, le operazioni analitiche e i campioni da analizzare costituiscono un sistema integrato che può essere valutato come tale" (USP <621>, 2024). La conformità ai criteri SST è obbligatoria per l'intera durata della procedura cromatografica: la EP 2.2.46 afferma che nessuna analisi del campione è accettabile a meno che non sia stata dimostrata l'idoneità del sistema (EP 2.2.46, 2025).

I criteri SST vengono sviluppati e fissati durante la validazione del metodo. I fattori che possono influenzare il comportamento cromatografico, e che l'SST consente di monitorare, includono: composizione e temperatura della fase mobile; forza ionica e pH della componente acquosa; velocità di flusso, dimensioni e temperatura della colonna; caratteristiche della fase stazionaria (tipo di supporto, dimensioni e porosità delle particelle, tipo e grado di modifica superficiale).

2.5.1 Parametri SST

Ripetibilità del sistema (%RSD)

La ripetibilità della risposta è espressa come deviazione standard relativa percentuale (%RSD) di non meno di 3 iniezioni consecutive di una soluzione di riferimento (EP 2.2.46, 2025; USP <621>, 2024):

$$\%RSD = (100/\bar{y}) \times \sqrt{[\sum(y_i - \bar{y})^2 / (n - 1)]}$$

y_i = valori individuali (aree dei picchi); \bar{y} = media; n = numero di determinazioni.

Quando la monografia non specifica un requisito di %RSD, il valore massimo ammesso (%RSD_{max}) è calcolato in funzione del limite di conformità superiore B della monografia e del numero di iniezioni n, secondo la formula ufficiale USP:

$$\%RSD_{max} = K \times B / t(90\%, n - 1) \times \sqrt{n}$$

$K = 0,349$ (costante); B = limite superiore della monografia meno 100 (espresso come numero intero); $t(90\%, n - 1)$ = t di Student al 90% (double-sided) con $n - 1$ gradi di libertà.

Risoluzione (R_s)

La risoluzione tra la coppia critica di picchi è il principale parametro SST per la specificità del metodo nelle sostanze correlate. Il criterio di accettazione è definito nella singola monografia; in generale, $R_s \geq 1,5$ garantisce la separazione baseline completa. Calcolo: v. § 2.3.4.

Fattore di simmetria (A_s)

Il fattore di simmetria del picco usato per la quantificazione deve essere compreso nell'intervallo 0,8–1,8, salvo diversa indicazione. Il tailing eccessivo ($A_s > 2$) compromette la risoluzione, l'integrazione e l'accuratezza della quantificazione. Calcolo: v. § 2.3.4.

Numero di piatti teorici (N)

Un valore minimo di N può essere richiesto dalla monografia come indicatore di efficienza della colonna. Calcolabile solo in condizioni isocratiche. Calcolo: v. § 2.3.3.

Rapporto segnale/rumore (S/N)

Il rapporto S/N definisce la sensibilità del sistema ed è impiegato per verificare che il sistema sia in grado di rilevare e quantificare le impurezze ai livelli richiesti. La verifica prevede l'iniezione di una soluzione alla concentrazione corrispondente alla *reporting threshold* e la verifica che $S/N \geq 10$ per il picco di interesse (EP 2.2.46, 2025). Calcolo: v. § 2.3.5.

Fattore di ritenzione (k)

Un valore minimo di k può essere specificato per garantire la separazione degli analiti dal fronte del solvente (v. § 2.3.2).

Iniezione bianco e *standard bracketing*

Una soluzione bianco (diluente) deve essere iniettata all'inizio della sessione per verificare l'assenza di picchi interferenti. Per i test quantitativi sulle impurezze, è raccomandato lo *standard bracketing*: intercalare e ripetere al termine della sessione l'iniezione della soluzione standard, per verificare la stabilità del sistema nel corso dell'intera sessione (EP 2.2.46, 2025).

Verifica dell'accuratezza del sistema (CTRL)

La verifica dell'accuratezza si effettua iniettando una seconda soluzione standard indipendente rispetto a quella impiegata per la calibrazione e la verifica della ripetibilità. Entrambe le soluzioni devono essere preparate dallo stesso materiale di riferimento di purezza nota. L'accuratezza è espressa come deviazione percentuale tra il risultato ottenuto e il valore teorico di riferimento.

2.5.2 Aggiustamento delle condizioni cromatografiche

Le condizioni cromatografiche nelle monografie farmaceutiche sono state validate durante l'elaborazione della monografia. L'entità entro cui i parametri possono essere modificati senza compromettere la procedura è definita dalla EP 2.2.46 e dalla USP <621>. Variazioni diverse da quelle indicate richiedono una nuova validazione; aggiustamenti multipli possono avere effetto cumulativo e devono essere valutati con cura.

Per l'HPLC in eluizione in gradiente — modalità rilevante per le sostanze correlate dell'Octreotide acetato — le variazioni richiedono maggiore cautela rispetto all'eluizione isocratica, poiché possono spostare picchi in diverse fasi del gradiente, causare co-eluzioni o inversioni dell'ordine di eluizione.

Parametro	Variazione consentita (isocratica)	Variazione consentita (gradiente)
Fase stazionaria	Nessuna sostituzione del tipo (es. C18 ≠ C8)	Come isocratica
Dimensioni colonna (L/d _p)	Da -25% a +50%	Da -25% a +50%; riscaldare il profilo del gradiente
Temperatura colonna	±10°C	±5°C
Composizione fase mobile (componenti minori)	±30% relativo; max ±10% assoluto per componente	Solo aggiustamenti esplicitamente previsti dalla monografia
pH fase mobile	±0,2 unità pH	±0,2 unità pH
Concentrazione sali nel buffer	±10%	±10%
Velocità di flusso	±50% (assenza variazioni colonna)	Ricalcolato: $F_2 = F_1 \times (dc_2^2 \times dp_1) / (dc_1^2 \times dp_2)$

Parametro	Variazione consentita (isocratica)	Variazione consentita (gradiente)
Lunghezza d'onda detector	Nessuna variazione consentita	Nessuna variazione consentita
Volume di iniezione	Variabile se SST soddisfatto	Variabile se SST soddisfatto

Tabella 5. *Variazioni consentite delle condizioni cromatografiche HPLC senza rivalidazione. (EP 2.2.46, 2025; USP <621>, 2024)*

3 VALIDAZIONE E VERIFICA

Nell'ambito della conformità regolatoria applicabile all'industria farmaceutica, la distinzione concettuale e operativa tra validazione e verifica di procedure analitiche riveste un ruolo di primaria importanza. Sebbene i due processi condividano l'obiettivo comune di garantire l'idoneità della procedura analitica allo scopo previsto (“*fit for intended purpose*”), essi differiscono in modo sostanziale per scopo, estensione degli studi e quadro normativo di riferimento.

3.1 Validazione delle procedure analitiche

La validazione di una procedura analitica, disciplinata a livello internazionale dalla linea guida ICH Q2(R2) “Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology” — nella sua versione revisionata, allineata con ICH Q14 “Analytical Procedure Development” — costituisce il processo sistematico con cui si dimostra, mediante evidenza sperimentale oggettiva, che una procedura analitica sviluppata “*ex novo*” sia adeguata all'uso cui è destinata, garantendo risultati accurati e affidabili durante l'intero ciclo di vita del prodotto, dallo sviluppo farmaceutico all'autorizzazione all'immissione in commercio

La validazione si applica in particolare a: nuove procedure analitiche proposte per l'inclusione nella USP-NF; procedure esistenti sottoposte a revisione significativa; procedure sviluppate internamente per prodotti non coperti da monografie farmacopêiche. Una ri-validazione può essere necessaria in caso di modifiche alla sintesi della sostanza attiva, variazioni nella composizione del prodotto farmaceutico o cambiamenti alla procedura analitica stessa (ICH Q2(R2), 2023; USP <1225>, 2024).

La USP <1225> distingue quattro categorie di procedure analitiche: Categoria I (saggi quantitativi); Categoria II (impurezze quantitative e test limite); Categoria III (caratteristiche prestazionali); Categoria IV (identificazione).

Le APPCs da valutare variano in funzione della categoria.

Specificità / Selettività

La specificità è la capacità di identificare e/o quantificare inequivocabilmente un analita in presenza di altri componenti (impurezze, prodotti di degradazione, eccipienti). Per i test sulle impurezze, si dimostra aggiungendo al campione di quantità note di impurezze specificate, eventualmente mediante *forced degradation studies* (luce, calore, umidità, idrolisi acido/base, ossidazione). Nelle procedure cromatografiche, la risoluzione tra la coppia critica di picchi è il principale indicatore di specificità (ICH Q2(R2), 2023; USP <1225>, 2024).

Accuratezza

L'accuratezza esprime la vicinanza tra il valore ottenuto dalla procedura e il valore di riferimento (valore vero). Tre approcci principali: (1) confronto con materiale di riferimento di purezza nota; (2) studio di addizione (*spiking*), con campione addizionato di quantità note dell'analita o delle impurezze; (3) confronto con procedura ortogonale. Si raccomandano almeno 9 determinazioni su 3 livelli di concentrazione. L'accuratezza è espressa come percentuale di recupero (%R) o bias (b):

$$R(\%) = (\bar{x}/x_{ref}) \times 100$$

\bar{x} = media dei risultati sperimentali; x_{ref} = valore di riferimento accettato.

Precisione

La precisione esprime il grado di accordo tra i risultati individuali quando la procedura è applicata ripetutamente a prelievi multipli di un campione omogeneo. Si esprime come %RSD. Si valuta a tre livelli crescenti: (1) Ripetibilità (intra-saggio): stesse condizioni operative, breve intervallo di tempo, stesso analista e stessa strumentazione — minimo 6 determinazioni al 100% della concentrazione di prova; (2) Precisione intermedia: variabilità intra-laboratorio su giorni diversi, analisti diversi o strumentazioni diverse; (3) Riproducibilità: precisione inter-laboratorio, applicata nella standardizzazione dei metodi (USP <1225>, 2024; ICH Q2(R2), 2023).

Linearità e Range

La linearità è la capacità di fornire risultati direttamente proporzionali alla concentrazione dell'analita nell'intervallo specificato (modello $y = mx + b$), dimostrata mediante regressione lineare con almeno 5 livelli di concentrazione. Per il saggio: range dall'80%

al 120% della concentrazione di prova. Per le impurezze: dalla *reporting threshold* al 120% del limite di specifica (ICH Q2(R2), 2023; USP <1225>, 2024).

LOD e LOQ

Per le procedure strumentali con rumore di baseline, LOD e LOQ sono stimati sulla base del rapporto segnale/rumore: LOD corrisponde a $S/N \geq 3:1$; LOQ a $S/N \geq 10:1$. In alternativa si calcolano dalla deviazione standard della risposta (σ) e dalla pendenza della curva di calibrazione (S):

$$LOD = 3,3\sigma/S \quad LOQ = 10\sigma/S$$

Per i test sulle impurezze, il LOQ deve essere uguale o inferiore alla *reporting threshold* (0,05% della concentrazione del campione) (ICH Q2(R2), 2023; EP 2.2.46, 2025).

Robustezza

La robustezza è la capacità della procedura di rimanere non influenzata da piccole variazioni deliberate dei parametri procedurali, fornendo un'indicazione dell'affidabilità durante l'uso ordinario. Per i metodi HPLC, le variazioni tipicamente studiate comprendono: composizione della fase mobile ($\pm 2-5\%$), pH ($\pm 0,2$ unità), temperatura della colonna ($\pm 5-10^\circ\text{C}$), velocità di flusso ($\pm 10-20\%$), tipo/lotto di colonna, condizioni di preparazione del campione (ICH Q2(R2), 2023).

Stabilità delle soluzioni

La stabilità delle soluzioni campione e di riferimento dopo preparazione deve essere dimostrata nell'ambito della validazione/verifica. Questo aspetto è critico per sessioni analitiche prolungate (*overnight*), in cui i campioni restano nell'*autosampler* per molte ore. La verifica prevede il confronto delle risposte analitiche al tempo zero con quelle ottenute dopo un periodo di conservazione definito (es. 24 h a $2-8^\circ\text{C}$ in *autosampler*), espresso come percentuale di variazione rispetto al tempo zero (USP <1226>, 2024).

L'intera documentazione di validazione, comprensiva di protocollo, dati grezzi e rapporto finale, costituisce parte integrante del *Common Technical Document* (CTD) e viene sottoposta a revisione da parte delle autorità regolatorie in fase di approvazione del medicinale.

3.2 Verifica di procedure farmacopee secondo USP <1226>

La verifica di procedure farmacopee, come definita nel capitolo generale USP <1226> “Verification of Compendial Procedures”, si applica a quelle procedure analitiche ufficialmente riconosciute e pubblicate nelle farmacopee (es. United States Pharmacopeia, European Pharmacopoeia), le quali, in virtù della natura pubblica della loro validazione originaria, sono ritenute intrinsecamente adeguate allo scopo dichiarato.

Tuttavia, la mera esistenza di una monografia farmacopea non garantisce automaticamente che il metodo in essa descritto sia pienamente applicabile nelle specifiche condizioni operative di un determinato laboratorio di Controllo Qualità. Fattori quali, differenze nella strumentazione disponibile, caratteristiche del prodotto farmaceutico analizzato (es. formulazione, matrice peptidica), qualità dei reagenti e dei materiali di riferimento, nonché le competenze degli analisti, possono influenzare significativamente le prestazioni del metodo.

La verifica, dunque, è definita dalla USP <1226> come il processo di valutazione della capacità della procedura di essere utilizzata per lo scopo previsto, nelle condizioni effettive d'uso per una specifica matrice. Consiste nella valutazione di selezionate APPCs (*Analytical Performance Characteristics*) al fine di generare dati appropriati, senza ripetere l'intero processo di validazione.

Intended use APPCs	Identification	Testing for impurities		Assay - content/potency - dissolution (measurement only)	Other quantitative tests
		Limit test	Quantitative test		
Accuracy	○	○	○	◐	◐
Precision					
- Repeatability	○	○	●	●	●
- Intermediate precision	○	○	◐	◐	◐
Specificity/Selectivity	◐	●	●	●	◐
Sensitivity	○	●	●	○	◐
Linearity	○	○	○	◐	◐
Range	○	○	○	◐	◐
Robustness	○	○	◐	◐	◐

Tabella 6.
Analytical Performance Characteristics (APPCs) raccomandate in funzione dell'uso previsto del metodo analitico, secondo le linee guida ICH Q2(R1).

- (cerchio pieno) — caratteristica **normalmente richiesta**
- ◐ (semicerchio) — caratteristica **da valutare caso per caso**, in funzione della natura del metodo e della matrice analizzata
- (cerchio vuoto) — caratteristica **normalmente non richiesta**

Nel mio progetto di tesi la scelta di condurre una verifica — e non una validazione — è pertanto una scelta normativa obbligata, non discrezionale: essa è la risposta regolamentare corretta all'adozione di un metodo ufficiale USP in un nuovo contesto laboratoristico. Le APPCs selezionate per la verifica comprendono: la specificità; la precisione (ripetibilità e precisione intermedia); la sensibilità (LOQ) e la stabilità delle soluzioni.

4 MATERIALI E METODI

4.1 Reagenti e Standard

La verifica del metodo è stata condotta utilizzando lo standard di riferimento USP di Octreotide Acetato, impiegato per la preparazione delle soluzioni volte a dimostrare l'idoneità del sistema e per il calcolo del titolo del campione in esame.

L'API (materia prima oggetto di studio) è stato fornito da *PolyPeptide Laboratories API*.

Le condizioni di stoccaggio prevedono la conservazione a -20°C per lo standard Octreotide USP e a 2-8 °C per l'Octreotide Acetato API; in entrambi i casi lo stoccaggio deve avvenire al riparo da luce e umidità.

Altri standard utilizzati nel corso della verifica sono i seguenti:

- Acido acetico STD
- Acido trifluoroacetico STD
- Octreote non-ciclico STD come marker del *System Suitability*
- N-Acetyl-Lys-Octreotide STD
- N-Acetyl-Phe-Octreotide STD

4.2 Solventi

Tutti i solventi utilizzati sono di grado HPLC in conformità con i requisiti della monografia USP <621> per metodi cromatografici:

- Acqua ultrapura generata da sistema Milli-Q
- Acetonitrile grado HPLC, purezza $\geq 99,9\%$ (v/v)
- Acido trifluoroacetico, purezza $\geq 99,9\%$

4.3 Apparecchiatura

Le operazioni di pesata sono state eseguite utilizzando bilance annualmente qualificate:

- Microbilancia analitica (sensibilità 0,001 mg)
- Bilancia analitica (sensibilità 0,1 mg)

I sistemi HPLC utilizzati sono qualificati e idonei all'analisi di routine quantitativa e qualitativa, garantendo tutte le prestazioni necessarie per soddisfare rigorosi requisiti normativi.

Gli strumenti sono composti da diversi moduli: una pompa binaria/quaternaria con degasser, un compartimento colonna termostata, un autocampionatore termostata, un rivelatore UV/VIS o DAD e una postazione lavoro.

Inoltre tutti gli strumenti sono controllati tramite il software Waters Empower 3 CDS.

Tutte le sessioni di analisi cromatografica sono state condotte utilizzando una colonna *Synergi Max-RP C12* (250 × 4,6 mm, 4 µm). Dalla specifiche tecniche fornite dal produttore, si evince che la colonna è dotata di un *end-capping* idrofilico, il quale consente alle catene alchiliche di mantenersi in posizione anche in presenza di fasi mobili ad elevato contenuto acquoso, prevenendo il fenomeno noto come *phase collapse*. Tale fenomeno, che nelle colonne C18 convenzionali si verifica in condizioni di forte polarità della fase mobile, determina il collasso delle catene idrocarburiche verso la superficie silicea, compromettendo irreversibilmente le proprietà retentive della fase stazionaria.

La scelta di tale colonna è motivata, dunque, dalle caratteristiche del metodo in esame: l'analisi dell'Octreotide Acetato prevede infatti l'impiego di gradienti che iniziano con una fase mobile a prevalente componente acquosa. In assenza di una fase stazionaria resistente al collasso, si assisterebbe ad una sensibile perdita del potere risolutivo e ad una mancata riproducibilità dei tempi di ritenzione, con conseguente compromissione dell'idoneità del sistema cromatografico.

4.4 Condizioni cromatografiche

Le condizioni operative sono state estrapolate dalla monografia USP relativa all'Octreotide Acetato e mantenute invariate per l'intera durata della verifica, consentendo il confronto dei risultati ottenuti in sessioni analitiche diverse.

Di seguito si riportano i parametri strumentali impostati nel software Empower 3 CDS prima di ogni sessione:

<i>Detector</i>	UV DAD λ 220 nm
<i>Column</i>	C12 250×4,6 mm 4 μ m
<i>Injection Volume</i>	10 μ l
<i>Flow rate</i>	1,0 ml/min
<i>Run time</i>	Vedi tab. gradiente
<i>T Column oven (°C)</i>	40°C
<i>T autosampler (°C)</i>	5°C
<i>Mobile phase A</i>	0,02% (v/v) di TFA in acqua
<i>Mobile phase B</i>	Acetonitrile
<i>Diluent</i>	Fase mobile A

Tabella 7

4.5 Composizione della fase mobile

La separazione cromatografica è stata realizzata in modalità di eluizione in gradiente con due fasi mobili, la cui composizione è stata precedentemente descritta. Le fasi sono state preparate in quantità adeguata a garantire il condizionamento iniziale della colonna e l'esecuzione dell'intera sequenza analitica prevista per ciascuna sessione. Una volta preparate, le fasi sono state degassate mediante sonicazione e filtrate su membrana PVDF 0,22 μ m prima dell'uso.

Di seguito si riporta il programma di gradiente adottato:

Time (min.)	Duration (min.)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0 → 25.0	25	90 → 65	10 → 35
25.0 → 30.0	5	65 → 10	35 → 90
30.0 → 35.0	5	10	90
35.0 → 40.0	5	10 → 90	90 → 10
40.0 → 45.0 (or until stable baseline and system pressure are achieved)	5	90	10

Tabella 8. Programma di gradiente

4.6 Specificità

La specificità del metodo è stata verificata per dimostrare che il metodo è in grado di identificare l'Octreotide materia prima ottenendo risultati positivi, rispetto ad uno standard, da campioni contenenti l'Octreotide e risultati negativi da campioni che non contengono l'API.

Il campione, inoltre, è stato addizionato con un quantitativo noto di impurezze note, dimostrando che il risultato dell'analisi non è influenzato dalla presenza di questi componenti rispetto ai risultati ottenuti dal campione non addizionato.

4.6.1 Criteri di accettazione

In conformità con quanto previsto da USP<1226>, il comportamento cromatografico e i tempi di ritenzione devono risultare simili a quelli descritti nella monografia di riferimento. Tali parametri vengono analizzati solo dopo aver dimostrato la conformità ai criteri di idoneità del sistema quali:

- *System sensitivity solution*: $S/N \geq 10$ per il picco dell'Octreotide
- *System suitability solution*: $R_s \geq 2,0$ tra il picco dell'Octreotide e il picco dell'Octreotide non-ciclico
- *Standard solution*: $RSD\% \leq 2,0\%$ per il picco dell'Octreotide (5 repliche)
- *Control solution*: $-2,0\% \leq \% dev \leq +2,0\%$ per il picco dell'Octreotide

Inoltre il $Purity\ angle^1 < Purity\ threshold^2$ (calcolati dal software Empower 3) per i picchi di Octreotide, Acetil-Lys-Octreotide e Acetil-Phe-Octreotide. Tale requisito dimostra che i picchi non contengono impurezze co-eluite.

4.6.2 Preparazioni soluzioni

Blank: 0,02% (v/v) di TFA in WFI (diluente)

STD solution: 1 flacone di Octreotide Acetato USPRS è stato ricostituito e disciolto con il diluente, trasferito accuratamente in un matraccio tarato da 10 ml, portato a volume con il diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente.

System sensitivity solution: diluizione della *STD solution* 1:1000 con diluente.

System suitability solution: 0,2 mg/ml di *Octreotide Non-Ciclico suitability marker USPR*. Pesati 1,07 mg di marker in un matraccio tarato da 5 ml, disciolto con diluente; portato a volume con diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente.

CTRL solution: preparazione identica alla *STD solution*.

Acetyl-Lys-Octreotide solution 0,5%: pesati accuratamente 1,16 mg di *Acetyl-Lys-Octreotide STD* in un matraccio tarato da 20 ml, disciolto e portato a volume con il diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente (Stock solution). Trasferiti accuratamente 0,5 ml della *Stock solution* in un matraccio tarato da 10 ml, portato a volume con il diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente.

Acetyl-Phe-Octreotide 0,5%: pesati accuratamente 1,01 mg di *Acetyl-Phe-Octreotide STD* in un matraccio tarato da 20 ml, disciolto e portato a volume con il diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente (Stock solution). Trasferiti

¹ Indica la differenza spettrale media tra gli spettri acquisiti lungo il picco e lo spettro all'apice. Un valore basso indica un picco puro.

² Indica il valore massimo consentito per la differenza spettrale, calcolato dal software tenendo conto del rumore di fondo e del diluente.

accuratamente 0,5 ml della *Stock solution* in un matraccio tarato da 10 ml, portato a volume con il diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente.

Acetic acid solution 0,5%: pesati accuratamente circa 50.0 mg di *Acido acetico WSTD* in un matraccio tarato da 100 ml contenente diluente, portato a volume con diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente. Trasferiti accuratamente 0,5 ml della soluzione preparata in un matraccio tarato da 100 ml, portato a volume con diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente.

Trifluoro acetic acid (TFA) 0,5%: pesati accuratamente circa 50.0 mg di *TFA WSTD* in un matraccio tarato da 100 ml contenente diluente, portato a volume con diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente. Trasferiti accuratamente 0,5 ml della soluzione in un matraccio tarato da 100 ml, portato a volume con diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente.

Sample solution (0,5mg/ml): pesati accuratamente circa 5.0 mg della materia prima da esaminare in un matraccio tarato da 10 ml, disciolta tale quantità e portato a volume con il diluente.

Acetic acid Stock Solution: pesati accuratamente circa 50.0 mg di acido acetico WSTD in un matraccio tarato da 100 ml contenente diluente, portato a volume con diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente.

TFA Stock Solution : pesati accuratamente circa 50.0 mg di TFA WSTD in un matraccio tarato da 100 ml contenente diluente, portato a volume con diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente.

Sample solution spiked : pesati accuratamente circa 5.0 mg dell'Octreotide materia prima da esaminare in un matraccio tarato da 10 ml. Il campione è stato addizionato con le seguenti quantità di impurezze note, Acido acetico e TFA:

- 0,5 ml di Acetyl-Lys-Octreotide Stock solution
- 0,5 ml di Acetyl-Phe-Octreotide Stock solution
- 50 µL di Acido acetico Stock solution
- 50 µL di TFA Stock solution

4.6.3 Procedura sperimentale

L'HPLC, inclusa la colonna, è stato condizionato con la fase mobile prima dell'inizio della sessione analitica.

La sequenza generale di iniezione è stata la seguente:

<i>Soluzione</i>	<i>N° di iniezioni</i>	<i>Volume di iniezione</i>	<i>Durata (minuti)</i>	<i>Verifica</i>
Blank	1	10µL	45 min	Verifica della linea di base e dell'assenza di potenziali picchi interferenti dovuti alla fase mobile e/o al diluente
Sistem sensitivity solution	1	10µL	45 min	Verifica dell'adeguatezza della risposta strumentale (S/N)
System suitability solution	1	10µL	45 min	Verifica della capacità di risoluzione del sistema
STD #1	1	10µL	45 min	Verifica della ripetibilità del sistema
STD #2	1	10µL	45 min	
STD #3	1	10µL	45 min	
STD #4	1	10µL	45 min	
STD #5	1	10µL	45 min	

<i>Soluzione</i>	<i>N° di iniezioni</i>	<i>Volume di iniezione</i>	<i>Durata (minuti)</i>	<i>Verifica</i>
CTRL	1	10µL	45 min	Verifica dell'accuratezza del sistema

Tabella 9. System suitability test

Una volta accertata l' idoneità del sistema, si è proseguito con le seguenti iniezioni, al fine di verificare la specificità del metodo HPLC per l' analisi dell' Octreotide Acetato materia prima:

<i>Soluzione</i>	<i>N° di iniezioni</i>	<i>Volume di iniezione</i>	<i>Durata (minuti)</i>	<i>Verifica</i>
Acetil-Lys-Octreotide 0,5%	1	10µL	45 min	/
Acetil-Phe-Octreotide 0,5%	1	10µL	45 min	/
Acido acetico 0,5%	1	10µL	45 min	/
TFA 0,5%	1	10µL	45 min	/
Sample solution	1	10µL	45 min	/
Sample solution spiked	1	10µL	45 min	/

Tabella 10. Procedura analitica per la specificità

4.7 Precisione

4.7.1 Precisione intra-saggio/Ripetibilità

La determinazione sperimentale della ripetibilità è stata effettuata analizzando sei soluzioni campione indipendenti preparate come da metodo e sei soluzioni campione indipendenti addizionate con Acetyl-Lys-Octreotide e Acetyl-Phe-Octreotide al limite di specifica (in presenza di acido acetico e TFA). Tali soluzioni sono state preparate e testate sia per la determinazione del titolo che per la determinazione delle sostanze correlate.

La caratteristica prestazionale in oggetto è stata determinata calcolando la deviazione standard relativa, parametro statistico che indica la dispersione dei risultati rispetto alla media, espressa in percentuale.

La deviazione standard relativa è stata calcolata per entrambe le determinazioni facendo riferimento alla percentuale di Octreotide nel campione in esame (*un-spiked e spiked*) e alla percentuale di *recovery* per le impurezze (solo nei campioni *spiked*).

La percentuale di titolo di Octreotide è stata calcolata, ricavando prima la percentuale di titolo tal quale, usando la seguente equazione:

$$\% \text{Titolo tal quale} = \frac{A_{\text{sample}} \times STD_{\text{conc}}}{A_{\text{STD}} \times \text{SAMPLE}_{\text{conc}}} \times 100$$

Dove:

- A_{sample} = area del picco Octreotide nella soluzione campione
- A_{STD} = area media del picco Octreotide da soluzione Standard (5 repliche)
- STD_{conc} = concentrazione Octreotide nella soluzione standard (mg/ml)
- $\text{SAMPLE}_{\text{conc}}$ = concentrazione soluzione campione come Octreotide Acetato (mg/ml)

Dalla percentuale di titolo tal quale, considerando il contenuto di acqua, di acido acetico e dei solventi residui determinati sperimentalmente, è stato possibile risalire al titolo percentuale sulla sostanza anidra, esente da acido acetico e solventi residui, applicando la seguente formula:

$$\% \text{Titolo} = \frac{\% \text{Titolo tal quale}}{100 - \text{KF}\% - \text{Acetic acid}\% - \text{RS}\%} \times 100$$

Dove:

- KF%= contenuto in percentuale di acqua nel campione
- Acetic acid %= contenuto in percentuale di acido acetico nel campione
- RS%= contenuto in percentuale dei solventi residui

La percentuale di *recovery* è stata calcolata, per ciascuna delle impurezze note, con la seguente equazione:

$$\%Recovery = \frac{Area\ impurezza\ (spiked) - Area\ impurezza\ (unspiked)}{Area\ media\ impurezza\ nella\ soluzione\ STD\ 0,5\%}$$

Dove l'area del picco dell'impurezza nel campione *un-spiked* corrisponde alla media dei picchi dell'impurezza ottenuti dai campioni *un-spiked*.

4.7.1.1 Criteri di accettazione

E' stato necessario dimostrare la conformità ai criteri di idoneità del sistema, prima di intraprendere la sessione analitica, quali:

- *System sensitivity solution*: $S/N \geq 10$ per il picco dell'Octreotide
- *System suitability solution*: $R_s \geq 2,0$ tra il picco dell'Octreotide e il picco dell'Octreotide non-ciclico
- *Standard solution*: $RSD\% \leq 2,0\%$ per il picco dell'Octreotide (5 repliche)
- *Control solution*: $-2,0\% \leq \% dev \leq +2,0\%$ per il picco dell'Octreotide

Il titolo in percentuale dell'Octreotide (nei campioni *un-spiked* ed *spiked*) calcolato su base anidra e priva di solventi residui e acido acetico, deve rientrare nel seguente range:

- $95,0\% \leq \% titolo \leq 103,0\%$, rispettando la monografia USP dell'Octreotide acetato
- %RSD del titolo deve essere $\leq 2,0\%$

Per le sostanze correlate

- nei campioni *un-spiked* la %RSD deve rispettare limiti specifici relativi alla percentuale di impurezza. Per valori al di sotto del limite di quantificazione, la %RSD non è calcolata.

% di impurezza	Limite %RSD
<0,1%	≤20,0%
≥0,1% e <1,0%	≤10,0%
≥1,0% e <10,0%	≤5,0%

- nei campioni *spiked* i criteri da rispettare, sia per l'Acetyl-Lys-Octreotide che per l'Acetyl-Phe-Octreotide, sono i seguenti:
 - a) $70,0\% \leq \% Recovery \leq 130,0\%$
 - b) $80,0\% \leq Media \% Recovery \leq 120,0\%$
 - c) $\%RSD \text{ di } Recovery \leq 10,0\%$

L'identificazione dell'Octreotide nella soluzione campione, deve risultare positiva.

4.7.1.2 Preparazioni soluzioni

Blank : 0,02% (v/v) di TFA in WFI (diluente)

Standard solution : 1 flacone di Octreotide Acetato USPRS è stato ricostituito e disciolto con il diluente, trasferito accuratamente in un matraccio tarato da 10 ml, portato a volume con il diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente.

System sensitivity solution : diluizione della *STD solution* 1:1000 con diluente.

System suitability solution : 0,2 mg/ml di *Octreotide Non-Ciclico suitability marker USPR*. Pesati accuratamente circa 1,07 mg di marker in un matraccio tarato da 5 ml, disciolto con diluente; portato a volume con diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente.

CTRL solution: preparazione identica alla *STD solution*

Acetyl-Lys-Octreotide solution 0,5% : pesati accuratamente circa 1,14 mg di *Acetyl-Lys-Octreotide STD* in un matraccio tarato da 20 ml, disciolto e portato a volume con il diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente (Stock solution). Trasferiti accuratamente 0,5 ml della *Stock solution* in un matraccio tarato da 10 ml, portato a volume con il diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente.

Acetyl-Phe-Octreotide 0,5%: pesati accuratamente circa 1,47 mg di *Acetyl-Phe-Octreotide STD* in un matraccio tarato da 20 ml, disciolto e portato a volume con il diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente (Stock solution). Trasferiti accuratamente 0,5 ml della *Stock solution* in un matraccio tarato da 10 ml, portato a volume con il diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente.

Acetic acid Stock Solution: pesati accuratamente circa 53,77 mg di acido acetico WSTD in un matraccio tarato da 100 ml contenente diluente, portato a volume con diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente.

TFA Stock Solution : pesati accuratamente circa 49,30 mg di TFA WSTD in un matraccio tarato da 100 ml contenente diluente, portato a volume con diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente.

Sample solution (0,5mg/ml) #1: pesati accuratamente circa 5,40 mg della materia prima da esaminare in un matraccio tarato da 10 ml, disciolta tale quantità e portato a volume con il diluente.

Sample solution (0,5mg/ml) #2: pesati accuratamente circa 5,71 mg della materia prima da esaminare in un matraccio tarato da 10 ml, disciolta tale quantità e portato a volume con il diluente.

Sample solution (0,5mg/ml) #3: pesati accuratamente circa 5,36 mg della materia prima da esaminare in un matraccio tarato da 10 ml, disciolta tale quantità e portato a volume con il diluente.

Sample solution (0,5mg/ml) #4: pesati accuratamente circa 5,55 mg della materia prima da esaminare in un matraccio tarato da 10 ml, disciolta tale quantità e portato a volume con il diluente.

Sample solution (0,5mg/ml) #5: pesati accuratamente circa 5,74 mg della materia prima da esaminare in un matraccio tarato da 10 ml, disciolta tale quantità e portato a volume con il diluente.

Sample solution (0,5mg/ml) #6: pesati accuratamente circa 5,76 mg della materia prima da esaminare in un matraccio tarato da 10 ml, disciolta tale quantità e portato a volume con il diluente.

Per l'identificazione dell'Octreotide, sono stati miscelati volumi uguali, pari ad 1 ml, di soluzione campione e soluzione standard.

Sample solution spiked #1: pesati accuratamente circa 5,69 mg della materia prima da esaminare in un matraccio tarato da 10 ml e sciolti con il diluente. Prima di portare a volume, il campione è stato addizionato con le seguenti quantità note di impurezze: 0,5 ml di Acetyl-Lys-Octreotide Stock solution; 0,5 ml di Acetyl-Phe-Octreotide Stock solution; 50 µL di Acido acetico Stock solution; 50 µL di TFA Stock solution.

Sample solution spiked #2: pesati accuratamente circa 5,43 mg della materia prima da esaminare in un matraccio tarato da 10 ml e sciolti con il diluente. Prima di portare a volume, il campione è stato addizionato con le seguenti quantità note di impurezze: 0,5 ml di Acetyl-Lys-Octreotide Stock solution; 0,5 ml di Acetyl-Phe-Octreotide Stock solution; 50 µL di Acido acetico Stock solution; 50 µL di TFA Stock solution.

Sample solution spiked #3: pesati accuratamente circa 5,14 mg della materia prima da esaminare in un matraccio tarato da 10 ml e sciolti con il diluente. Prima di portare a volume, il campione è stato addizionato con le seguenti quantità note di impurezze: 0,5 ml di Acetyl-Lys-Octreotide Stock solution; 0,5 ml di Acetyl-Phe-Octreotide Stock solution; 50 µL di Acido acetico Stock solution; 50 µL di TFA Stock solution.

Sample solution spiked #4: pesati accuratamente circa 5,37 mg della materia prima da esaminare in un matraccio tarato da 10 ml e sciolti con il diluente. Prima di portare a volume, il campione è stato addizionato con le seguenti quantità note di impurezze: 0,5 ml di Acetyl-Lys-Octreotide Stock solution; 0,5 ml di Acetyl-Phe-Octreotide Stock solution; 50 µL di Acido acetico Stock solution; 50 µL di TFA Stock solution.

Sample solution spiked #5: pesati accuratamente circa 5,25 mg della materia prima da esaminare in un matraccio tarato da 10 ml e sciolti con il diluente. Prima di portare a volume, il campione è stato addizionato con le seguenti quantità note di impurezze: 0,5

ml di Acetyl-Lys-Octreotide Stock solution; 0,5 ml di Acetyl-Phe-Octreotide Stock solution; 50 µL di Acido acetico Stock solution; 50 µL di TFA Stock solution.

Sample solution spiked #6: pesati accuratamente circa 5,31 mg della materia prima da esaminare in un matraccio tarato da 10 ml e sciolti con il diluente. Prima di portare a volume, il campione è stato addizionato con le seguenti quantità note di impurezze: 0,5 ml di Acetyl-Lys-Octreotide Stock solution; 0,5 ml di Acetyl-Phe-Octreotide Stock solution; 50 µL di Acido acetico Stock solution; 50 µL di TFA Stock solution.

4.7.1.3 Procedura sperimentale

L'HPLC, inclusa la colonna, è stato condizionato con la fase mobile prima dell'inizio della sessione analitica.

La sequenza generale di iniezione è stata la seguente:

<i>Soluzione</i>	<i>N° di iniezioni</i>	<i>Volume di iniezione</i>	<i>Durata (minuti)</i>	<i>Verifica</i>
Blank	1	10µL	45 min	Verifica della linea di base e dell'assenza di potenziali picchi interferenti dovuti alla fase mobile e/o al diluente
System sensitivity solution	1	10µL	45 min	Verifica dell'adeguatezza della risposta strumentale (S/N)
System suitability solution	1	10µL	45 min	La capacità di risoluzione del sistema

<i>Soluzione</i>	<i>N° di iniezioni</i>	<i>Volume di iniezione</i>	<i>Durata (minuti)</i>	<i>Verifica</i>
STD #1	1	10µL	45 min	Verifica della ripetibilità
STD #2	1	10µL	45 min	
STD #3	1	10µL	45 min	
STD #4	1	10µL	45 min	
STD #5	1	10µL	45 min	
CTRL	1	10µL	45 min	Verifica dell'accuratezza

Tabella 11. System suitability test

Una volta accertata l' idoneità del sistema, si è proseguito con le seguenti iniezioni, al fine di verificare la precisione del metodo HPLC per il titolo dell'Octreotide, intesa come sostanza anidra e priva di solventi residui e acido acetico:

<i>Soluzione</i>	<i>N° di iniezioni</i>	<i>Volume di iniezione</i>	<i>Durata (minuti)</i>	<i>Verifica</i>
<i>Sample solution</i> #1	1	10µL	45 min	/
<i>Sample solution</i> #2	1	10µL	45 min	/
<i>Sample solution</i> #3	1	10µL	45 min	/
<i>Sample solution</i> #4	1	10µL	45 min	/

<i>Soluzione</i>	<i>N° di iniezioni</i>	<i>Volume di iniezione</i>	<i>Durata (minuti)</i>	<i>Verifica</i>
Sample solution #5	1	10µL	45 min	/
Sample solution #6	1	10µL	45 min	/
CTRL	1	10µL	45 min	Verifica dell'accuratezza
Identification sample solution	1	10µL	45 min	Identificazione del campione

Tabella 12. Procedura analitica per la precisione nella determinazione del titolo

Una volta verificata la continua stabilità del sistema cromatografico, si è proseguito con le seguenti iniezioni, per verificare la precisione del metodo HPLC nella determinazione delle sostanze correlate:

<i>Soluzione</i>	<i>N° di iniezioni</i>	<i>Volume di iniezione</i>	<i>Durata (minuti)</i>	<i>Verifica</i>
Sample solution spiked #1	1	10µL	45 min	/
Sample solution spiked #2	1	10µL	45 min	/
Sample solution spiked #3	1	10µL	45 min	/
Sample solution spiked #4	1	10µL	45 min	/
Sample solution spiked #5	1	10µL	45 min	/

<i>Soluzione</i>	<i>N° di iniezioni</i>	<i>Volume di iniezione</i>	<i>Durata (minuti)</i>	<i>Verifica</i>
<i>Sample solution spiked #6</i>	1	10µL	45 min	/
CTRL	1	10µL	45 min	Verifica dell'accuratezza

Tabella 13. Procedura analitica per la precisione nella determinazione delle sostanze correlate

4.7.2 Precisione intermedia

La valutazione della precisione intermedia/robustezza del metodo HPLC, sia per la determinazione del titolo che delle sostanze correlate, è stata eseguita da un secondo analista in un giorno differente e utilizzando uno strumento diverso.

Il secondo analista ha applicato il medesimo protocollo analitico utilizzato nella prima sessione d'analisi. Sono state analizzate sei soluzioni campione indipendenti preparate come da metodo e sei soluzioni campione indipendenti addizionate con Acetyl-Lys-Octreotide e Acetyl-Phe-Octreotide al limite di specifica (in presenza di acido acetico e TFA).

Propedeuticamente alla verifica della precisione intermedia, si è reso necessario dimostrare la ripetibilità del metodo. A tal fine, è stata calcolata la deviazione standard relativa riferita sia al titolo in percentuale dell' Octreotide nel campione in esame (*unspiked e spiked*) che alla percentuale di *recovery* per le impurezze (solo nei campioni *spiked*). Per i calcoli vedere le equazioni precedentemente illustrate (cfr. par. 4.7.1).

Confrontando i risultati ottenuti nelle due diverse sessioni analitiche, è stato possibile calcolare la deviazione standard relativa globale, che nel rispetto dei limiti di accettabilità previsti dal protocollo, dimostra la riproducibilità del metodo in giorni diversi e con l'uso di strumenti diversi.

4.7.2.1 Criteri di accettazione

E' stato necessario dimostrare la conformità ai criteri di idoneità del sistema, prima di intraprendere la sessione analitica, quali:

- *System sensitivity solution*: $S/N \geq 10$ per il picco dell'Octreotide
- *System suitability solution*: $R_s \geq 2,0$ tra il picco dell'Octreotide e il picco dell'Octreotide non-ciclico
- *Standard solution*: $RSD\% \leq 2,0\%$ per il picco dell'Octreotide (5 repliche)
- *Control solution*: $-2,0\% \leq \% dev \leq +2,0\%$ per il picco dell'Octreotide

Il titolo in percentuale dell' Octreotide, (nei campioni *unspiked* ed *spiked*), calcolato su base anidra e priva di solventi residui e acido acetico, deve rientrare nel seguente range, sia per la singola sessione che considerando il risultato globale ottenuto integrando i dati delle due diverse sessioni analitiche:

- $95,0\% \leq \% \text{ titolo} \leq 103,0\%$, rispettando la monografia USP dell'Octreotide acetato
- %RSD del titolo deve essere $\leq 2,0\%$

Per le sostanze correlate

- nei campioni *un-spiked* la %RSD deve rispettare limiti specifici relativi alla percentuale di impurezza, sia per la singola sessione che considerando il risultato globale ottenuto integrando i dati delle due diverse sessioni analitiche.

Per valori al di sotto del limite di quantificazione, la %RSD non è calcolata

% di impurezza	Limite %RSD
<0,1%	$\leq 20,0\%$
$\geq 0,1\%$ e <1,0%	$\leq 10,0\%$
$\geq 1,0\%$ e <10,0%	$\leq 5,0\%$

- nei campioni *spiked* i criteri da rispettare, sia per l'Acetyl-Lys-Octreotide che per l'Acetyl-Phe-Octreotide, sono i seguenti per la singola sessione analitica:
d) $70,0\% \leq \% Recovery \leq 130,0\%$

- e) $80,0\% \leq \text{Media \% Recovery} \leq 120,0\%$
- f) $\%RSD \text{ di Recovery} \leq 10,0\%$

La %RSD deve rientrare nei limiti di accettabilità anche per i risultati ottenuti dall'integrazione dei dati delle due diverse sessioni analitiche.

L'identificazione dell'Octreotide nella soluzione campione, deve risultare positiva.

4.7.2.2 Preparazioni soluzioni

Blank : 0,02% (v/v) di TFA in WFI (diluente)

Standard solution : 1 flacone di Octreotide Acetato USPRS è stato ricostituito e disciolto con il diluente, trasferito accuratamente in un matraccio tarato da 10 ml, portato a volume con il diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente.

System sensitivity solution : diluizione della *STD solution* 1:1000 con diluente.

System suitability solution : 0,2 mg/ml di *Octreotide Non-Ciclico suitability marker USPR*. Pesati accuratamente circa 1,05 mg di marker in un matraccio tarato da 5 ml, disciolto con diluente; portato a volume con diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente.

CTRL solution: preparazione identica alla *STD solution*

Acetyl-Lys-Octreotide solution 0,5% : pesati accuratamente circa 1,20 mg di *Acetyl-Lys-Octreotide STD* in un matraccio tarato da 20 ml, disciolto e portato a volume con il diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente (Stock solution). Trasferiti accuratamente 0,5 ml della *Stock solution* in un matraccio tarato da 10 ml, portato a volume con il diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente.

Acetyl-Phe-Octreotide 0,5%: pesati accuratamente circa 1,27 mg di *Acetyl-Phe-Octreotide STD* in un matraccio tarato da 20 ml, disciolto e portato a volume con il diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente (Stock solution). Trasferiti accuratamente 0,5 ml della *Stock solution* in un matraccio tarato da 10 ml, portato a volume con il diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente.

Acetic acid Stock Solution: pesati accuratamente circa 52,00 mg di acido acetico WSTD in un matraccio tarato da 100 ml contenente diluente, portato a volume con diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente.

TFA Stock Solution : pesati accuratamente circa 52,52 mg di TFA WSTD in un matraccio tarato da 100 ml contenente diluente, portato a volume con diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente.

Sample solution (0,5mg/ml) #1: pesati accuratamente circa 5,12 mg della materia prima da esaminare in un matraccio tarato da 10 ml, disciolta tale quantità e portato a volume con il diluente.

Sample solution (0,5mg/ml) #2: pesati accuratamente circa 5,47 mg della materia prima da esaminare in un matraccio tarato da 10 ml, disciolta tale quantità e portato a volume con il diluente.

Sample solution (0,5mg/ml) #3: pesati accuratamente circa 5,19 mg della materia prima da esaminare in un matraccio tarato da 10 ml, disciolta tale quantità e portato a volume con il diluente.

Sample solution (0,5mg/ml) #4: pesati accuratamente circa 5,49 mg della materia prima da esaminare in un matraccio tarato da 10 ml, disciolta tale quantità e portato a volume con il diluente.

Sample solution (0,5mg/ml) #5: pesati accuratamente circa 5,40 mg della materia prima da esaminare in un matraccio tarato da 10 ml, disciolta tale quantità e portato a volume con il diluente.

Sample solution (0,5mg/ml) #6: pesati accuratamente circa 5,17 mg della materia prima da esaminare in un matraccio tarato da 10 ml, disciolta tale quantità e portato a volume con il diluente.

Per l'identificazione dell'Octreotide, sono stati miscelati volumi uguali, pari ad 1 ml, di soluzione campione e soluzione standard.

Sample solution spiked #1 : pesati accuratamente circa 5,18 mg della materia prima da esaminare in un matraccio tarato da 10 ml e sciolti con il diluente. Prima di portare a

volume, il campione è stato addizionato con le seguenti quantità note di impurezze: 0,5 ml di Acetyl-Lys-Octreotide Stock solution; 0,5 ml di Acetyl-Phe-Octreotide Stock solution; 50 µL di Acido acetico Stock solution; 50 µL di TFA Stock solution.

Sample solution spiked #2: pesati accuratamente circa 5,67 mg della materia prima da esaminare in un matraccio tarato da 10 ml e sciolti con il diluente. Prima di portare a volume, il campione è stato addizionato con le seguenti quantità note di impurezze: 0,5 ml di Acetyl-Lys-Octreotide Stock solution; 0,5 ml di Acetyl-Phe-Octreotide Stock solution; 50 µL di Acido acetico Stock solution; 50 µL di TFA Stock solution.

Sample solution spiked #3: pesati accuratamente circa 5,54 mg della materia prima da esaminare in un matraccio tarato da 10 ml e sciolti con il diluente. Prima di portare a volume, il campione è stato addizionato con le seguenti quantità note di impurezze: 0,5 ml di Acetyl-Lys-Octreotide Stock solution; 0,5 ml di Acetyl-Phe-Octreotide Stock solution; 50 µL di Acido acetico Stock solution; 50 µL di TFA Stock solution.

Sample solution spiked #4: pesati accuratamente circa 5,81 mg della materia prima da esaminare in un matraccio tarato da 10 ml e sciolti con il diluente. Prima di portare a volume, il campione è stato addizionato con le seguenti quantità note di impurezze: 0,5 ml di Acetyl-Lys-Octreotide Stock solution; 0,5 ml di Acetyl-Phe-Octreotide Stock solution; 50 µL di Acido acetico Stock solution; 50 µL di TFA Stock solution.

Sample solution spiked #5: pesati accuratamente circa 5,36 mg della materia prima da esaminare in un matraccio tarato da 10 ml e sciolti con il diluente. Prima di portare a volume, il campione è stato addizionato con le seguenti quantità note di impurezze: 0,5 ml di Acetyl-Lys-Octreotide Stock solution; 0,5 ml di Acetyl-Phe-Octreotide Stock solution; 50 µL di Acido acetico Stock solution; 50 µL di TFA Stock solution.

Sample solution spiked #6: pesati accuratamente circa 5,48 mg della materia prima da esaminare in un matraccio tarato da 10 ml e sciolti con il diluente. Prima di portare a volume, il campione è stato addizionato con le seguenti quantità note di impurezze: 0,5 ml di Acetyl-Lys-Octreotide Stock solution; 0,5 ml di Acetyl-Phe-Octreotide Stock solution; 50 µL di Acido acetico Stock solution; 50 µL di TFA Stock solution.

4.7.2.3 Procedura sperimentale

L'HPLC, inclusa la colonna, è stato condizionato con la fase mobile prima dell'inizio della sessione analitica.

La sequenza generale di iniezione è stata la seguente:

<i>Soluzione</i>	<i>N° di iniezioni</i>	<i>Volume di iniezione</i>	<i>Durata (minuti)</i>	<i>Verifica</i>
Blank	1	10µL	45 min	Verifica della linea di base e dell'assenza di potenziali picchi interferenti dovuti alla fase mobile e/o al diluente
Sistem sensitivity solution	1	10µL	45 min	Verifica dell'adeguatezza della risposta strumentale (S/N)
System suitability solution	1	10µL	45 min	Verifica della capacità di risoluzione del sistema
STD #1	1	10µL	45 min	Verifica della ripetibilità
STD #2	1	10µL	45 min	
STD #3	1	10µL	45 min	
STD #4	1	10µL	45 min	
STD #5	1	10µL	45 min	

<i>Soluzione</i>	<i>N° di iniezioni</i>	<i>Volume di iniezione</i>	<i>Durata (minuti)</i>	<i>Verifica</i>
CTRL	1	10µL	45 min	Verifica dell'accuratezza

Tabella 14. System suitability test

Una volta accertata l' idoneità del sistema, si è proseguito con le seguenti iniezioni, al fine di verificare la precisione del metodo HPLC per il titolo dell'Octreotide, intesa come sostanza anidra e priva di solventi residui e acido acetico:

<i>Soluzione</i>	<i>N° di iniezioni</i>	<i>Volume di iniezione</i>	<i>Durata (minuti)</i>	<i>Verifica</i>
<i>Sample solution #1</i>	1	10µL	45 min	/
<i>Sample solution #2</i>	1	10µL	45 min	/
<i>Sample solution #3</i>	1	10µL	45 min	/
<i>Sample solution #4</i>	1	10µL	45 min	/
<i>Sample solution #5</i>	1	10µL	45 min	/
<i>Sample solution #6</i>	1	10µL	45 min	/
CTRL	1	10µL	45 min	Verifica dell'accuratezza

<i>Soluzione</i>	<i>N° di iniezioni</i>	<i>Volume di iniezione</i>	<i>Durata (minuti)</i>	<i>Verifica</i>
<i>Identification sample solution</i>	1	10µL	45 min	Identificazione del campione

Tabella 15. Procedura analitica per la precisione intermedia nella determinazione del titolo

Una volta verificata la continua stabilità del sistema cromatografico, si è proseguito con le seguenti iniezioni, per verificare la precisione del metodo HPLC nella determinazione delle sostanze correlate:

Soluzione	N° di iniezioni	Volume di iniezione	Durata (minuti)	Verifica
<i>Sample solution spiked #1</i>	1	10µL	45 min	/
<i>Sample solution spiked #2</i>	1	10µL	45 min	/
<i>Sample solution spiked #3</i>	1	10µL	45 min	/
<i>Sample solution spiked #4</i>	1	10µL	45 min	/
<i>Sample solution spiked #5</i>	1	10µL	45 min	/
<i>Sample solution spiked #6</i>	1	10µL	45 min	/
CTRL	1	10µL	45 min	Verifica dell'accuratezza

Tabella 16. Procedura analitica per la precisione intermedia nella determinazione delle sostanze correlate

4.8 Limite di Quantificazione(LOQ)/Limite di Rilevabilità (LOD)

La verifica del Limite di Quantificazione (LOQ) e del Limite di Rilevabilità (LOD) ha permesso di valutare la sensibilità del metodo HPLC per l'analisi dell'Octreotide acetato.

Il LOQ è la minima concentrazione quantificabile con adeguati livelli di precisione e accuratezza; il LOQ è stato definito pari al *reporting threshold* dello 0,1%, valore riportato dalla monografia USP dell'Octreotide acetato come livello minimo di sensibilità richiesto. Per validare la precisione del metodo a basse concentrazioni, sono state eseguite sei iniezioni replicate della soluzione per la verifica della sensibilità (0,1%) ed è stata calcolata la deviazione standard relativa delle aree dei picchi e la percentuale di *recovery*.

Il LOD, invece, rappresenta la minima concentrazione di Octreotide acetato che può essere rilevata e distinta dal rumore di fondo dello strumento ma non quantificata con un sufficiente grado di precisione ed accuratezza. La valutazione di tale parametro è avvenuta per diluizione della soluzione LOQ fino al raggiungimento di un rapporto segnale/rumore (S/N) superiore o uguale a 3. La verifica dell'LOD è stata eseguita mediante 3 repliche.

4.8.1 Criteri di accettazione

Si rende necessario dimostrare la conformità ai criteri di idoneità del sistema, prima di intraprendere la sessione analitica, quali:

- *System sensitivity solution*: $S/N \geq 10$ per il picco dell'Octreotide
- *System suitability solution*: $R_s \geq 2,0$ tra il picco dell'Octreotide e il picco dell'Octreotide non-ciclico
- *Standard solution*: $RSD\% \leq 2,0\%$ per il picco dell'Octreotide (5 repliche)
- *Control solution*: $-2,0\% \leq \% dev \leq +2,0\%$ per il picco dell'Octreotide

Limite di Quantificazione (LOQ), per il picco dell'Octreotide:

- $S/N \geq 10,0$ (6 repliche)
- $RSD\% \leq 10,0\%$ (6 repliche)
- $70,0\% \leq \%Recovery \leq 130,0\%$ (6 repliche)

- $80,0\% \leq \text{Media \% Recovery} \leq 120,0\%$ (6 repliche)

Limite di Rilevabilità (LOD), per il picco dell'Octreotide:

- $S/N \geq 3$ (3 repliche)

4.8.2 Preparazioni soluzioni

Blank: 0,02% (v/v) di TFA in WFI (diluente)

Standard solution: 1 flacone di Octreotide Acetato USPRS è stato ricostituito e disciolto con il diluente, trasferito accuratamente in un matraccio tarato da 10 ml, portato a volume con il diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente.

System sensitivity solution: diluizione della *STD solution* 1:1000 con diluente.

System suitability solution: 0,2 mg/ml di *Octreotide Non-Ciclico suitability marker USPR*. Pesati accuratamente circa 0,99 mg di marker in un matraccio tarato da 5 ml, disciolto con diluente; portato a volume con diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente.

CTRL solution: preparazione identica alla *STD solution*

Octreotide Stock Solution: 1 flacone di Octreotide Acetato USPRS è stato ricostituito e disciolto con il diluente, trasferito accuratamente in un matraccio tarato da 10 ml, portato a volume con il diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente. Trasferito 1,0 ml della soluzione preparata in un matraccio tarato da 10 ml, portato a volume con il diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente.

LOQ Solution 0,1%: trasferiti accuratamente 0,5 ml di *Octreotide Stock Solution* in un matraccio tarato da 50 ml, portati a volume con il diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente.

LOQ Solution 0,05%: trasferiti accuratamente 5,0 ml di *LOQ Solution 0,1%* in un matraccio tarato da 10 ml, portati a volume con il diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente.

LOD Solution 0,025%: trasferiti accuratamente 2,5 ml di *LOQ Solution 0,05%* in un matraccio tarato da 5 ml, portati a volume con il diluente e, successivamente, la soluzione è stata miscelata adeguatamente.

4.8.3 Procedura sperimentale

L'HPLC, inclusa la colonna, è stato condizionato con la fase mobile prima dell'inizio della sessione analitica. La sequenza generale di iniezione è stata la seguente:

<i>Soluzione</i>	<i>N° di iniezioni</i>	<i>Volume di iniezione</i>	<i>Durata (minuti)</i>	<i>Verifica</i>
Blank	1	10µL	45 min	Verifica della linea di base e dell'assenza di potenziali picchi interferenti dovuti alla fase mobile e/o al diluente
System sensitivity solution	1	10µL	45 min	Verifica dell'adeguatezza della risposta strumentale (S/N)
System suitability solution	1	10µL	45 min	Verifica della capacità di risoluzione del sistema
STD #1	1	10µL	45 min	Verifica della ripetibilità
STD #2	1	10µL	45 min	
STD #3	1	10µL	45 min	
STD #4	1	10µL	45 min	

<i>Soluzione</i>	<i>N° di iniezioni</i>	<i>Volume di iniezione</i>	<i>Durata (minuti)</i>	<i>Verifica</i>
STD #5	1	10µL	45 min	
CTRL	1	10µL	45 min	Verifica dell'accuratezza

Tabella 17. System suitability test

Accertata l' idoneità e la stabilità del sistema, sono state effettuate delle iniezioni di lavaggio della colonna con solo il diluente (blank), in quanto si debba passare dall' analisi di soluzioni ad alta concentrazione all' analisi di soluzioni diluite. Le iniezioni di lavaggio servono ad evitare il fenomeno del *carry over* che potrebbe influenzare la riproducibilità dell' analisi cromatografica.

Per la verifica del LOQ sono state effettuate sei iniezioni ripetute del *LOQ Solution 0,1%*; dopo ulteriori iniezioni di lavaggio sono state eseguite tre iniezioni del *LOD Solution 0,025%* per la verifica del LOD. Infine, a seguito di iniezioni di lavaggio è stato iniettato il controllo per verificare che il sistema si sia mantenuto stabile nel tempo.

5 RISULTATI

Specificità

I parametri di idoneità del sistema (*System Suitability Test*) hanno soddisfatto i criteri di accettazione prestabiliti. Nello specifico:

- Assenza di picchi interferenti nel cromatogramma relativo all'iniezione del bianco (cfr. Cromatogramma 01 "Allegato A").
- Sensibilità elevata per concentrazioni basse di Octreotide $S/N \geq 10$ (cfr. Cromatogramma 02 "Allegato A").
- Risoluzione (R_s) $\geq 2,0$ tra il picco dell'Octreotide e quello dell'Octreotide non-ciclica RT~ 18,5 (cfr. Cromatogramma 03 "Allegato A").
- Ripetibilità del sistema dimostrata dalla stretta concordanza tra le aree del picco ottenute da cinque repliche della soluzione Octreotide Standard alla concentrazione di 0,5 mg/ml. Tale concordanza è stata espressa con la deviazione standard relativa percentuale ($RSD\% \leq 2,0\%$) (cfr. Cromatogramma 04 "Allegato A").
- L'analisi della soluzione controllo ha garantito l'accuratezza del sistema cromatografico per l'intera durata della sessione analitica.

Sono state iniettate in modo indipendente le diverse impurezze a concentrazione al limite di specifica, quali Acetyl-Lys-Octreotide 0,5% (cfr. Cromatogramma 05 "Allegato A"), Acetyl-Phe-Octreotide 0,5% (cfr. Cromatogramma 06 "Allegato A"), Acetic acid 0,5% (cfr. Cromatogramma 07 "Allegato A), TFA 0,5% (cfr. Cromatogramma 07 "Allegato A") al fine di verificare che il metodo sia specifico per l'analisi dell'Octreotide.

Analizzando i valori di *Purity angle*, calcolati dal Software Empower 3, e verificando che risultino inferiori al *Purity threshold*, si è dimostrato che i picchi di Octreotide, Acetyl-Lys-Octreotide e Acetyl-Phe-Octreotide non presentavano impurezze co-eluite.

Al fine di verificare la specificità del metodo per l'analisi dell'Octreotide, si è ritenuto necessario effettuare un'iniezione della soluzione campione *spiked*, addizionando la

soluzione campione con gli standard Acetyl-Lys-Octreotide e Acetyl-Phe-Octreotide (selezionati tra quelli che hanno dato degli ottimi cromatogrammi) e con piccole quantità di soluzioni madre di Acido acetico e TFA. Si è visto dal cromatogramma della soluzione campione *spiked* come queste impurezze note, abbiano avuto scarsa influenza sull'analisi dell'Octreotide.

Precisione intra-saggio/Ripetibilità

I parametri di idoneità del sistema (*System Suitability Test*) hanno soddisfatto i criteri di accettazione prestabiliti. Nello specifico:

- Assenza di picchi interferenti nel cromatogramma relativo dall'iniezione del bianco.
- Sensibilità elevata per concentrazioni basse di Octreotide $S/N \geq 10$.
- Risoluzione (R_s) $\geq 2,0$ tra il picco dell'Octreotide e quello dell'Octreotide non-ciclica $RT \sim 18,5$.
- Ripetibilità del sistema dimostrata dalla stretta concordanza tra le aree del picco ottenute da cinque repliche della soluzione Octreotide Standard alla concentrazione di 0,5 mg/ml. Tale concordanza è stata espressa con la deviazione standard relativa percentuale ($RSD\% \leq 2,0\%$).
- Accuratezza del sistema dimostrata dalla percentuale di deviazione entro $\pm 2\%$ tra la concentrazione teorica di controllo e la concentrazione effettiva della soluzione ottenuta tramite l'iniezione di una seconda soluzione standard indipendente detta soluzione controllo.

La determinazione del titolo è stata effettuata con metodo dello standard esterno, in cui l'area media del picco dell'Octreotide ottenuta da cinque repliche della soluzione standard insieme alla concentrazione dello standard (mg/ml) sono state utilizzate per la quantificazione dei campioni.

Il cromatogramma rappresentativo della soluzione campione è il Cromatogramma 09 "Allegato A".

I risultati ottenuti per la determinazione del titolo sono riassunti nella seguente tabella, sia per quanto riguarda le soluzioni campione *unspiked* che *spiked*.

	% Titolo (<i>un-spiked</i>)	% Titolo (<i>spiked</i>)
#1	101,6	99,7
#2	100,2	100,5
#3	100,5	100,7
#4	100,3	99,9
#5	99,5	100,0
#6	99,3	100,5
Media	100,2	100,2
Varianza	0,8	0,4
RSD%	0,8	0,4

Tabella 18. Dati sperimentali test di precisione per la determinazione del titolo

In conformità ai criteri di accettazione, la deviazione standard relativa per entrambe le determinazioni risulta essere inferiore al valore limite di 2,0% e dunque il metodo si definisce preciso.

Inoltre, i risultati del test ottenuti da tutti i campioni hanno rispettato il limite di specifica predefinito (95,0-103,0 %) dalla monografia USP per l'Octreotide.

L'identificazione dell'Octreotide (cfr. Cromatogramma 10 "Allegato A") è stata effettuata iniettando una miscela costituita da ugual volume di soluzione standard e soluzione campione, in tal modo è stato possibile verificare che si tratti della stessa sostanza avente il medesimo tempo di ritenzione, e che il picco sia spettrofotometricamente puro.

La percentuale di *recovery* delle sostanze correlate, quali Acetyl-Lys-Octreotide e Acetyl-Phe-Octreotide, nei campioni *un-spiked* è inferiore al limite di quantificazione per ciascun

campione analizzato dunque la deviazione standard relativa percentuale non risulta essere calcolabile.

Le percentuali di *recovery* delle sostanze correlate nei campioni *spiked* sono le seguenti:

	<i>%Recovery (spiked)</i> <i>Acetyl-Lys-Octreotide</i>	<i>%Recovery (spiked)</i> <i>Acetyl-Phe-Octreotide</i>
#1	103,0	103,2
#2	103,7	104,0
#3	101,4	100,8
#4	101,6	101,3
#5	101,5	102,1
#6	103,3	102,3
Media	102,4	102,3
Varianza	1,0	1,2
RSD%	1,0	1,2

Tabella 19. Dati sperimentali test di precisione per la determinazione delle sostanze correlate

In conformità ai criteri di accettazione, la deviazione standard relativa percentuale delle percentuali *recovery* di ciascuna sostanza correlata nota è inferiore al valore limite di 10,0%, dunque il metodo si definisce preciso.

Il cromatogramma rappresentativo della soluzione campione *spiked* è il Cromatogramma 11 “Allegato A”.

Si può concludere che il metodo è preciso sia nella determinazione del titolo dell’Octreotide come sostanza anidra esente da solventi residui e acido acetico che nella

determinazione delle sostanze correlate, quali Acetyl-Lys-Octreotide e Acetyl-Phe-Octreotide.

Precisione intermedia/Robustezza

Si verifica che la sessione d'analisi eseguita da un altro operatore in un altro giorno e con un altro strumento rispetti tutti i criteri di accettazione.

I parametri di idoneità del sistema (*System Suitability Test*) hanno soddisfatto i criteri di accettazione prestabiliti. Nello specifico:

- Assenza di picchi interferenti nel cromatogramma relativo dall'iniezione del bianco.
- Sensibilità elevata per concentrazioni basse di Octreotide $S/N \geq 10$.
- Risoluzione (R_s) $\geq 2,0$ tra il picco dell'Octreotide e quello dell'Octreotide non-ciclica $RT \sim 18,5$.
- Ripetibilità del sistema dimostrata dalla stretta concordanza tra le aree del picco ottenute da cinque repliche della soluzione Octreotide Standard alla concentrazione di 0,5 mg/ml. Tale concordanza è stata espressa con la deviazione standard relativa percentuale ($RSD\% \leq 2,0\%$)
- Accuratezza del sistema dimostrata dalla percentuale di deviazione entro $\pm 2\%$ tra la concentrazione teorica di controllo e la concentrazione effettiva della soluzione ottenuta tramite l'iniezione di una seconda soluzione standard indipendente detta soluzione controllo.

La determinazione del titolo è stata effettuata con metodo dello standard esterno, in cui l'area media del picco dell'Octreotide ottenuta da cinque repliche della soluzione standard insieme alla concentrazione dello standard (mg/ml) sono state utilizzate per la quantificazione dei campioni.

Di seguito, sono riportati i risultati ottenuti dalle due diverse sessione d'analisi sui campioni sia *spiked* che *un-spiked*.

	%Titolo (<i>un-spiked</i>)		%Titolo (Spiked)	
	Analisi 1	Analisi 2	Analisi 1	Analisi 2
#1	101,6	101,2	99,7	99,8
#2	100,2	96,9	100,5	97,8
#3	100,5	97,9	100,7	96,4
#4	100,3	100,3	99,9	99,3
#5	99,5	96,8	100,0	99,4
#6	99,3	99,9	100,5	96,6
Media	100,2	98,8	100,2	98,2
RSD%	0,8	1,9	0,4	1,5

Tabella 20. Dati sperimentali test di precisione intermedia per la determinazione del titolo (Sessione 1 e 2)

In conformità ai criteri di accettazione, la deviazione standard relativa per la determinazione del titolo nei campioni *spiked* e *un-spiked*, nelle due diverse sessioni d'analisi, risulta essere inferiore al valore limite di 2,0% dunque il metodo si definisce preciso. Inoltre, i risultati del test ottenuti da tutti i campioni, per la seconda sessione d'analisi come per la prima, hanno rispettato il limite di specificità predefinito (95,0-103,0 %) dalla monografia USP per l'Octreotide.

Facendo adesso riferimento al valore globale relativo alle due sessioni d'analisi, sia il titolo in percentuale rispetta i limiti d'accettazione e sia la RSD % rientra nei limiti previsti.

Media	99,5	99,2
RSD%	1,6	1,5

La percentuale di *recovery* delle sostanze correlate, quali Acetyl-Lys-Octreotide, Acetyl-Phe-Octreotide, nei campioni *un-spiked* è inferiore al limite di quantificazione per ciascun campione analizzato e dunque la deviazione standard relativa percentuale non risulta essere calcolabile né per la seconda singola sessione analitica né per le due sessioni nella loro globalità.

Le percentuali di *recovery* delle sostanze correlate, per la seconda sessione analitica messa a confronto con la prima sessione analitica, nei campioni *spiked*, sono le seguenti:

	%Recovery (<i>spiked</i>) Acetyl-Lys-Octreotide		%Recovery (<i>spiked</i>) Acetyl-Phe-Octreotide	
	Analisi 1	Analisi 2	Analisi 1	Analisi 2
#1	103,0	101,8	103,2	100,6
#2	103,7	103,3	104,0	102,1
#3	101,4	102,3	100,8	102,5
#4	101,6	103,2	101,3	102,3
#5	101,5	102,1	102,1	101,4
#6	103,3	101,7	102,3	100,9
Media	102,4	102,4	102,3	101,6
RSD%	1,0	0,7	1,2	0,8

Tabella 21. Dati sperimentali test di precisione intermedia per la determinazione delle sostanze correlate (Sessione 2)

In conformità ai criteri di accettazione, la deviazione standard relativa percentuale delle percentuali *recovery* di ciascuna sostanza correlata nota è inferiore al valore limite di 10,0% dunque il metodo si definisce preciso.

Facendo adesso riferimento al valore globale relativo alle due sessioni d'analisi, sia il titolo in percentuale rispetta i limiti d'accettazione e sia la RSD % rientra nei limiti previsti.

Media	102,4	102,0
RSD%	0,8	1,0

Si può concludere che il metodo è robusto sia nella determinazione del titolo dell'Octreotide come sostanza anidra esente da solventi residui e acido acetico che nella determinazione delle sostanze correlate note, quali Acetyl-Lys-Octreotide e Acetyl-Phe-Octreotide.

Limite di quantificazione (LOQ)/ Limite di rilevabilità (LOD)

I parametri di idoneità del sistema (*System Suitability Test*) hanno soddisfatto i criteri di accettazione prestabiliti. Nello specifico:

- Assenza di picchi interferenti nel cromatogramma relativo dall'iniezione del bianco.
- Sensibilità elevata per concentrazioni basse di Octreotide $S/N \geq 10$.
- Risoluzione (R_s) $\geq 2,0$ tra il picco dell'Octreotide e quello dell'Octreotide non-ciclica $RT \sim 18,5$.
- La deviazione standard relativa percentuale per il picco dell'Octreotide è risultata conforme ai limiti ($RSD\% \leq 2,0$).
- L'analisi della soluzione controllo ha garantito l'accuratezza del sistema cromatografico per l'intera durata della sessione analitica.

I risultati ottenuti dall'analisi di sei repliche dell'*LOQ solution 0,1%*, corrispondente al limite imposto dalla monografia USP, sono i seguenti:

<i>Injection</i>	<i>LOQ Solution 0,1%</i>		
	<i>Area</i>	<i>S/N</i>	<i>Recovery %</i>
1	9898	40,9	109,0
2	10417	36,0	114,7
3	9855	35,1	108,5
4	10000	35,0	110,1
5	9543	39,2	105,1
6	9685	39,8	106,7
Media	9900	37,7	109,0
Varianza	301	-	3,3
RSD%	3,0	-	3,0

Tabella 22. LOQ Solution 0,1%

In conformità ai criteri di accettazione la deviazione standard relativa percentuale è inferiore al limite del 10,0%, indice di una ridotta distribuzione dei dati; il rapporto segnale rumore per tutte le iniezioni è $S/N > 10$ dunque i picchi sono quantificabili con un sufficiente grado di precisione ed accuratezza e la percentuale di *recovery* rientra nei limiti definiti.

Il cromatogramma rappresentativo della soluzione LOQ è il cromatogramma 12 “Allegato A”.

I risultati ottenuti dall'analisi di tre repliche dell'*LOD solution 0,025%* sono i seguenti:

<i>Injection</i>	<i>LOD Solution 0,025%</i>	
	Area	S/N
1	2477	7,5
2	2252	7,1
3	2239	7,2
Media	2323	7,3

Tabella 23. LOD Solution 0,025%

I valori di segnale rumore (S/N) per la *LOD Solution 0,025%*, ottenuta per diluizione dalla soluzione LOQ, sono tutti superiori a 3 quale limite inferiore di rilevabilità.

Il cromatogramma rappresentativo della soluzione LOD è il cromatogramma 13 "Allegato A".

I criteri di accettazione rispettati per LOQ e LOD definiscono il metodo analitico idoneo a rilevare e quantificare le impurezze dell'Octreotide con un sufficiente grado di precisione ed accuratezza.

6 CONCLUSIONI

Il metodo HPLC da monografia USP per la determinazione del titolo dell'Octreotide, come sostanza anidra esente da solventi residui ed acido acetico, e delle sostanze correlate, quali Acetyl-Lys-Octreotide e Acetyl-Phe-Octreotide, nella materia prima è adatto allo scopo previsto, soddisfa tutti i requisiti ICH Q2(R2) e i criteri di accettazione predefiniti.

Il metodo HPLC si è dimostrato specifico per l'Octreotide anche in presenza di altri componenti attesi come le sostanze correlate; ha dimostrato un adeguato grado di precisione (ripetibilità e precisione intermedia) in giorni e con strumenti diversi, utilizzati sia per la determinazione del titolo che per la determinazione quantitativa delle sostanze correlate.

Il metodo HPLC ha soddisfatto, inoltre, i requisiti per il Limite di quantificazione (LOQ) e il limite di rilevabilità (LOD) nell'analisi di soluzioni a basse concentrazioni. L'adeguatezza di questi parametri, definisce il metodo sensibile e preciso, in grado rilevare e quantificare le impurezze anche a basse concentrazioni, i cui limiti sono definiti dalla monografia USP.

In conclusione, lo studio di verifica del metodo HPLC, standardizzato già in farmacopea, può essere considerato completato con successo, in quanto l'obiettivo primario era dimostrare che il metodo analitico per la determinazione del titolo e delle sostanze correlate risultasse riproducibile nelle condizioni operative specifiche del laboratorio, e ciò è stato pienamente confermato.

Pertanto, sarà possibile utilizzare tale metodo per analisi di routine della materia prima Octreotide acetato, garantendo risultati accurati e affidabili.

BIBLIOGRAFIA

Battershill, P. E., e S. P. Clissold. «Octreotide. A Review of Its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Potential in Conditions Associated with Excessive Peptide Secretion». *Drugs* 38, fasc. 5 (1989): 658–702. <https://doi.org/10.2165/00003495-198938050-00002>.

Battershill, Paul E., e Stephen P. Clissold. «Octreotide». *Drugs* 38, fasc. 5 (1989): 658–702. <https://doi.org/10.2165/00003495-198938050-00002>.

European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM) (2023). Chapter <5.26> *Implementation of pharmacopoeial procedures*. European Pharmacopoeia, 11th Volume, 1 Edition. Council of Europe. Strasbourg, Cedex, France

European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM) (2025). Chapter <2.2.46> *Chromatographic Separation Techniques*. European Pharmacopoeia, 11th Volume, 1 Edition. Council of Europe Strasbourg, Cedex, France.

Hsieh, H. P., Y. T. Wu, S. T. Chen, e K. T. Wang. «Direct Solid-Phase Synthesis of Octreotide Conjugates: Precursors for Use as Tumor-Targeted Radiopharmaceuticals». *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 7, fasc. 9 (1999): 1797–803. [https://doi.org/10.1016/s0968-0896\(99\)00125-x](https://doi.org/10.1016/s0968-0896(99)00125-x).

ICH (2023). Guideline Q2(R2) on validation of analytical procedures. *International Council for Harmonisation*. <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>

Sesti, Franz, Anna La Salvia, Chiara Grinzato, Rossella Mazzilli, e Antongiulio Faggiano. «L'approccio con analoghi della somatostatina nelle neoplasie neuroendocrine associate a sindromi neoplastiche multi-endocrine ereditarie». *L'Endocrinologo* 22, fasc. 5 (2021): 423–28. <https://doi.org/10.1007/s40619-021-00952-y>.

Shimadzu (2023). *Cos'è l'HPLC (Cromatografia Liquida ad Alte Prestazioni)?* www.shimadzu.com.

United States Pharmacopeia Convention (2022). Chapter <621> Chromatography *USP-NF*. Rockville, MD, USA.

United States Pharmacopeia Convention (2022). Chapter <1224> Transfer of Analytical Procedures. *USP-NF*. Rockville, MD, USA.

United States Pharmacopeia Convention (2022). Chapter <1225> Validation of Compendial Methods. *USP-NF*. Rockville, MD, USA.

United States Pharmacopeia Convention (2022). Chapter <1226> Verification of Compendial Methods. *USP-NF*. Rockville, MD, USA.

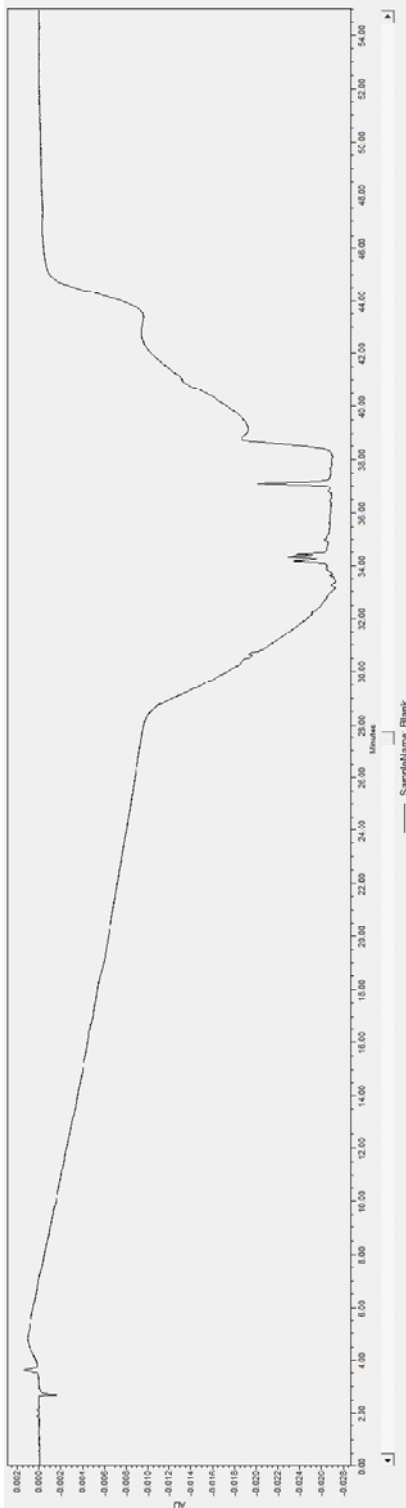
Yasin, Muhammad, Khalid Hussain, Kashif Khan, et al. «Development And Validation Of A Reversed-Phase Hplc Method For Assay Of The Octapeptide Octreotide In Raw Material And Pharmaceutical Dosage Form». *Journal of Population Therapeutics and Clinical Pharmacology* 31 (gennaio 2024): 1195–203. <https://doi.org/10.53555/jptcp.v31i1.4048>.

Zhang, Bo, Li Xue, e Zhe Bao Wu. «Structure and Function of Somatostatin and Its Receptors in Endocrinology». *Endocrine Reviews* 46, fasc. 1 (2025): 26–42. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnae022>.

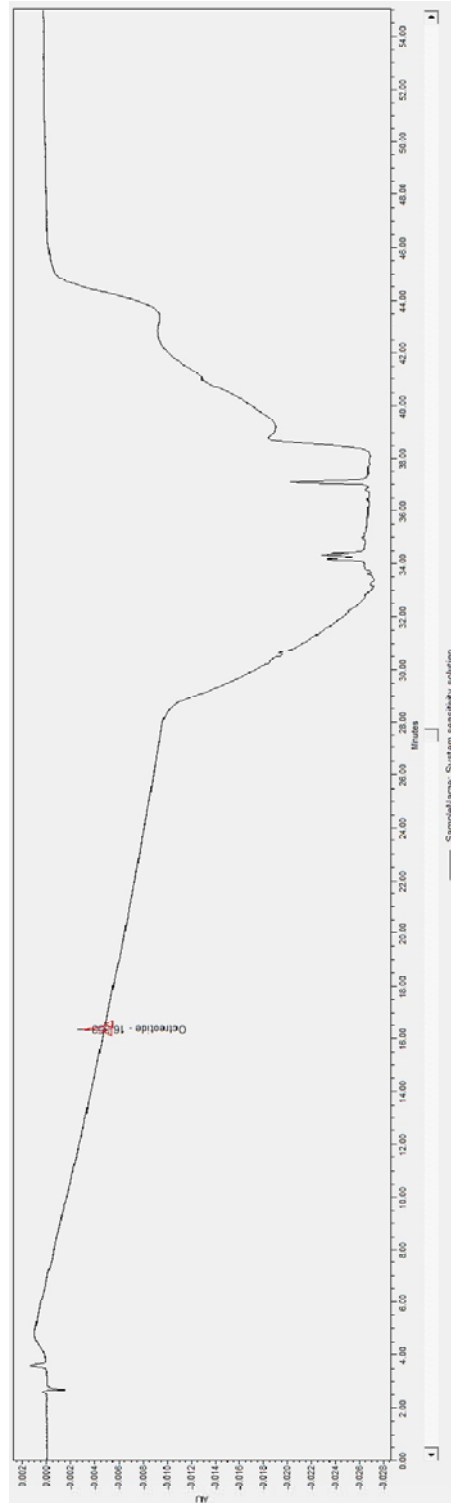
Zhao, Jie, Hong Fu, Jingjing Yu, et al. «Prospect of acromegaly therapy: molecular mechanism of clinical drugs octreotide and paltusotine». *Nature Communications* 14 (febbraio 2023): 962. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36673-z>.

Allegato A - Cromatogrammi

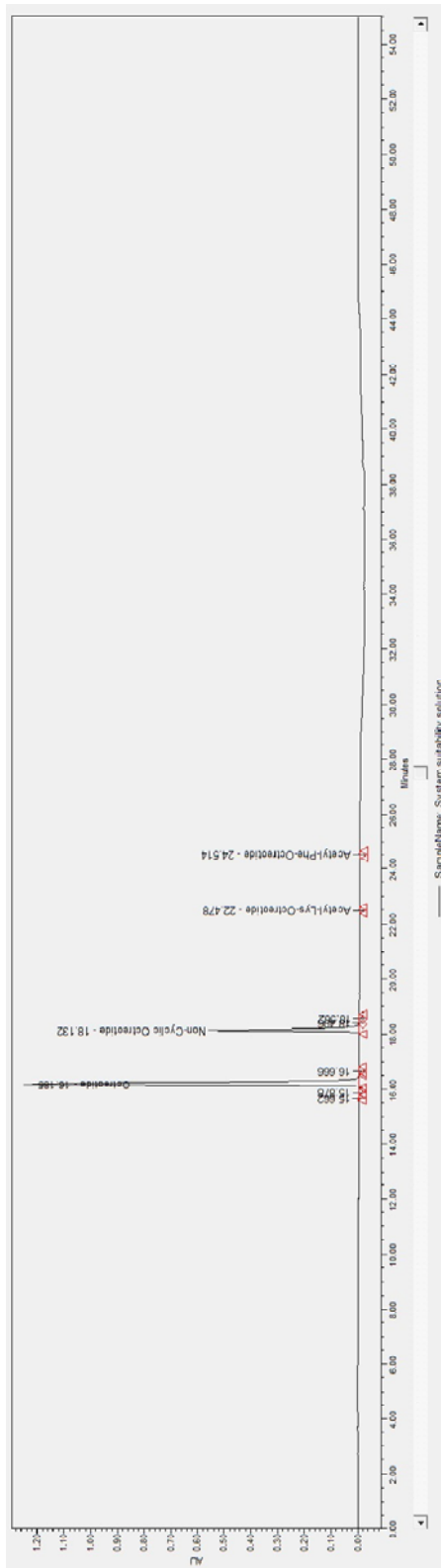
Cromatogramma 01:Blank



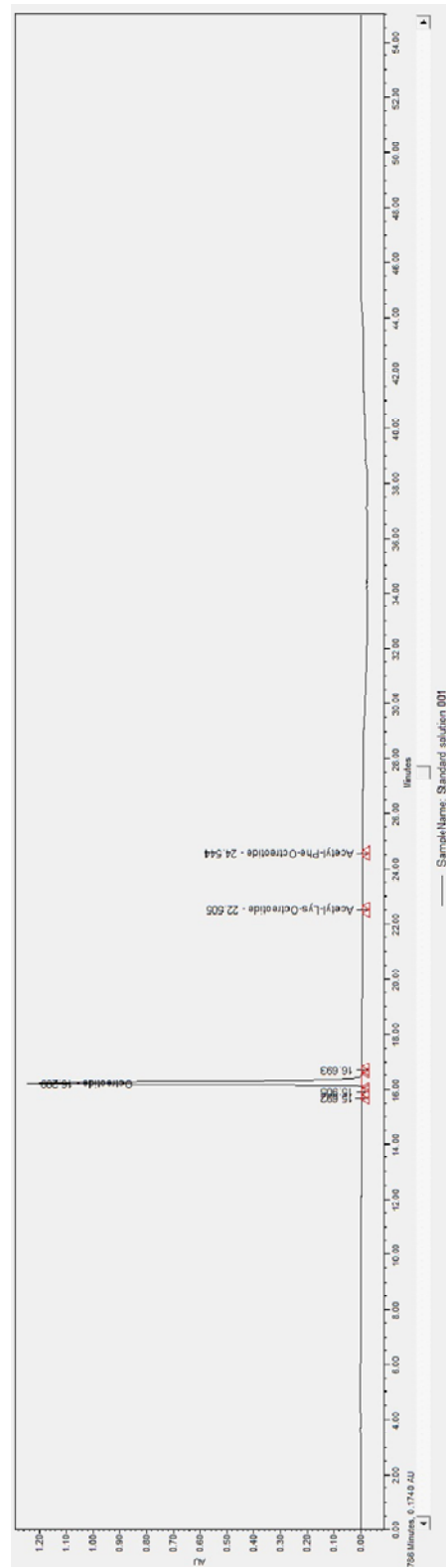
Cromatogramma 02: System Sensitivity solution



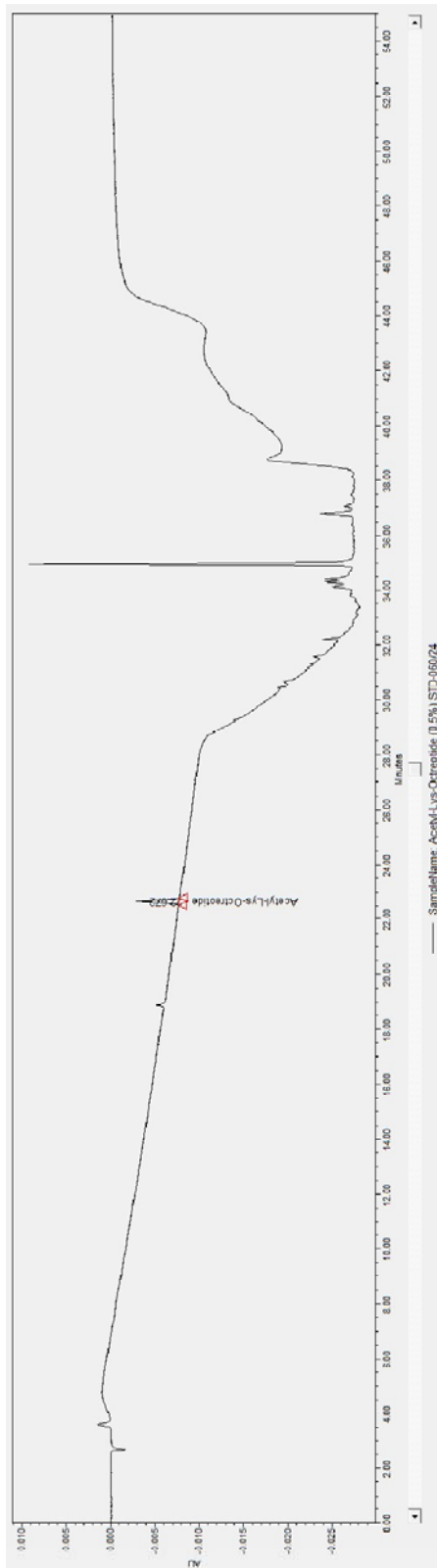
Cromatogramma 03: System suitability solution



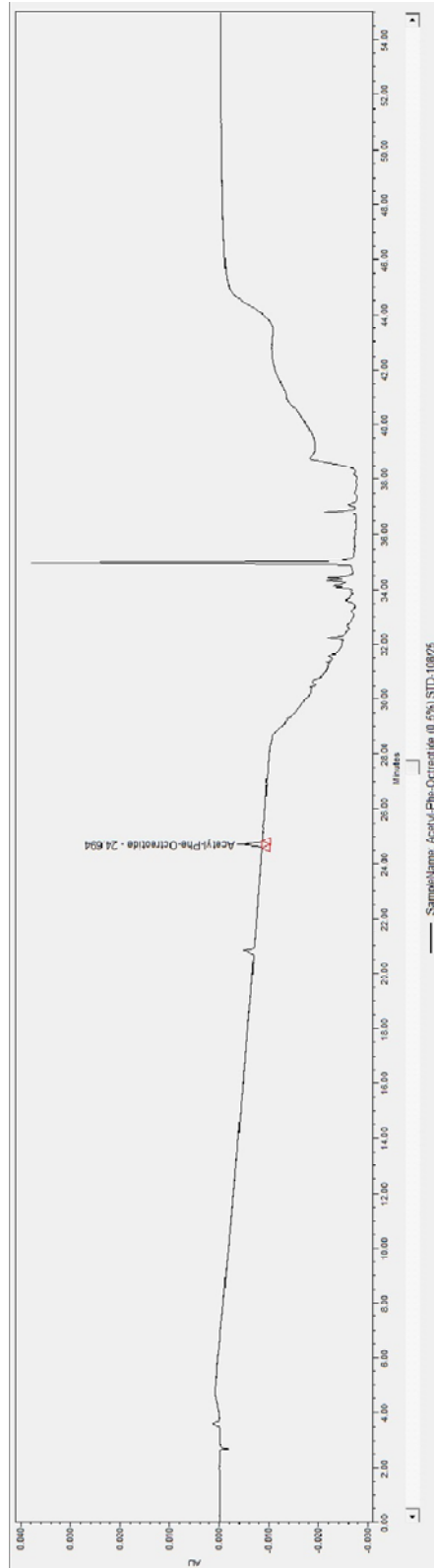
Cromatogramma 04: Standard Solution



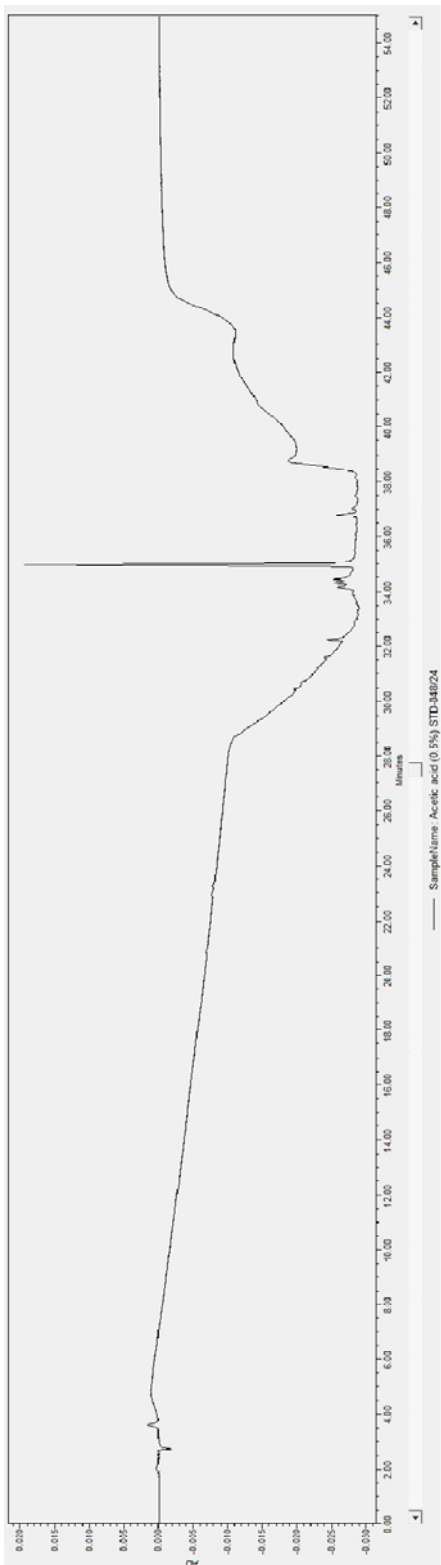
Cromatogramma 05: Acetyl-Lys-Octreotide 0,5%



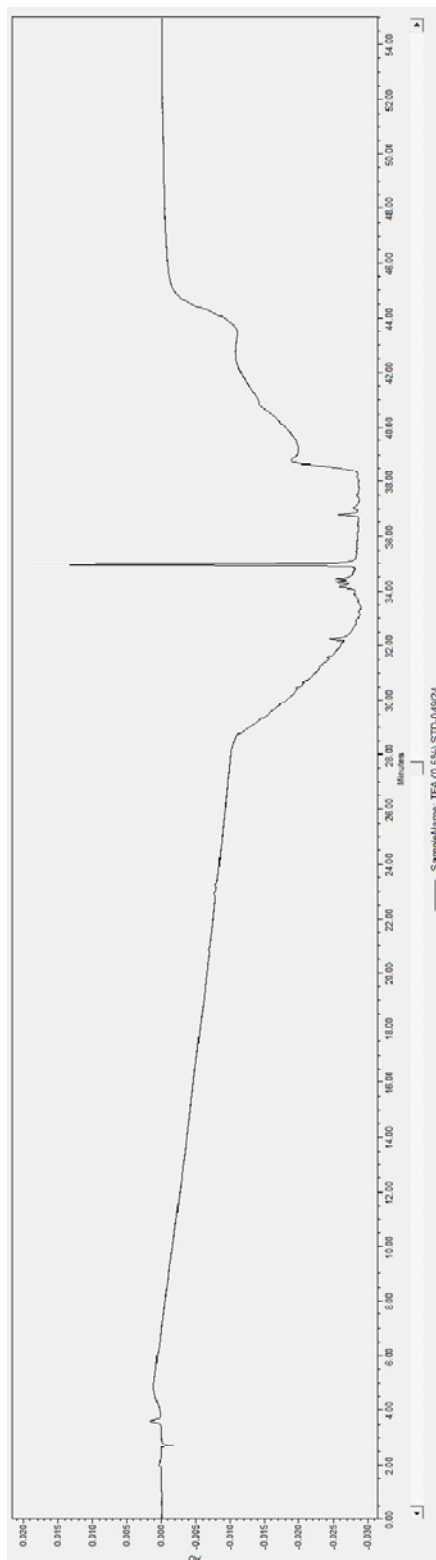
Cromatogramma 06: Acetyl-Phe-Octreotide 0,5%



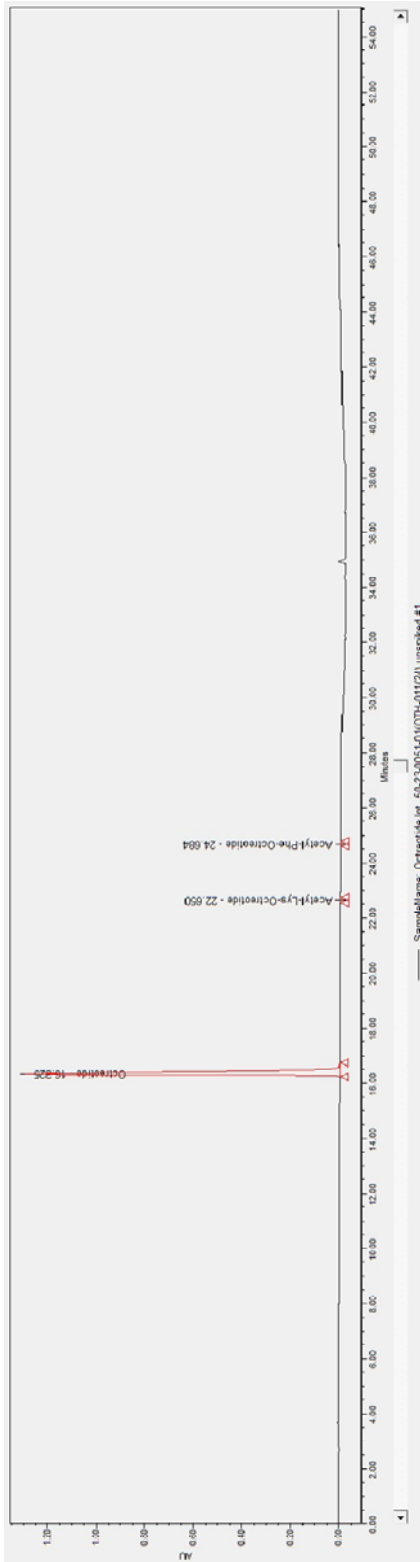
Cromatogramma 07: Acetic acid 0,5%



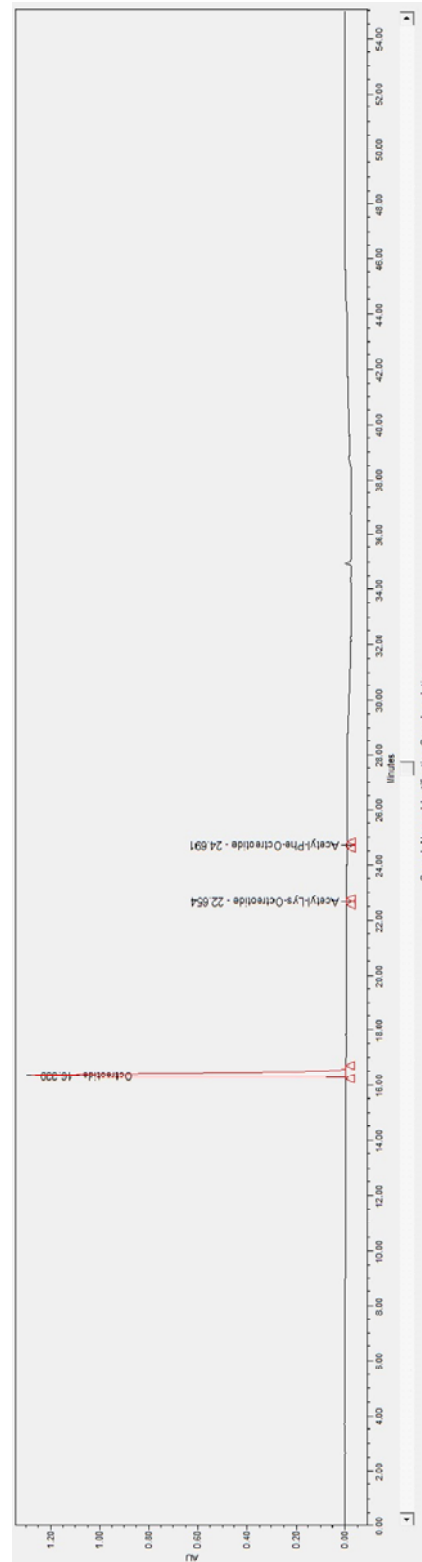
Cromatogramma 08: TFA 0,5%



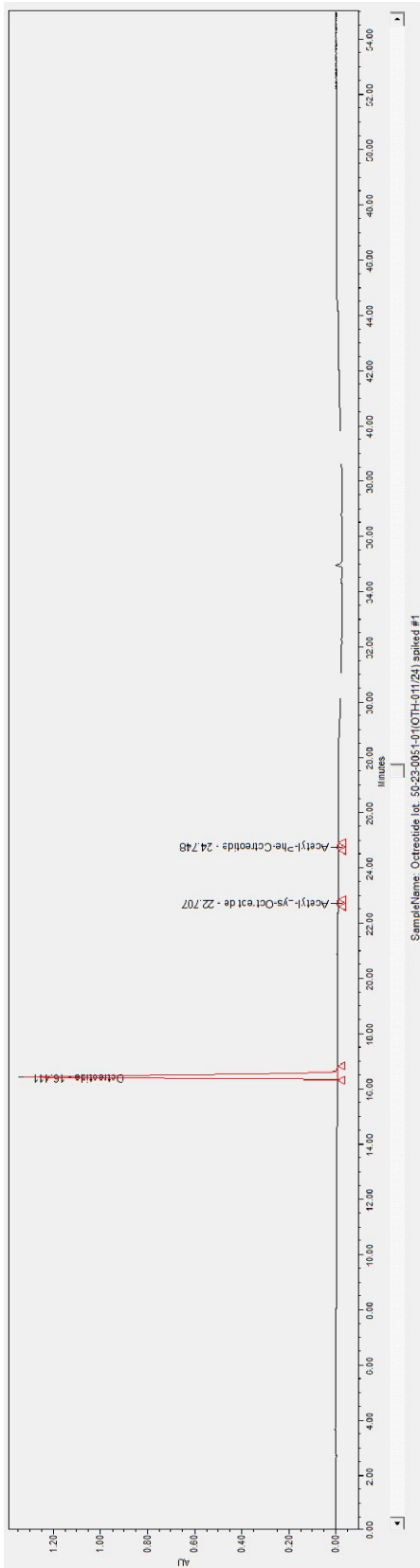
Cromatogramma 09: Sample solution



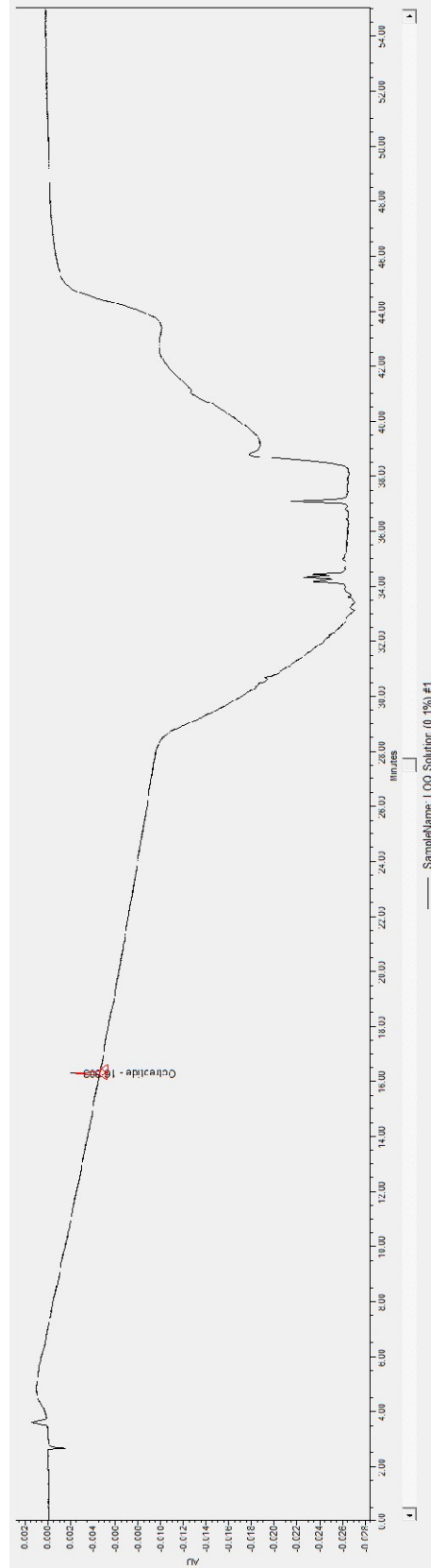
Cromatogramma 10: Identification sample solution



Cromatogramma 11: Sample solution spiked



Cromatogramma 12: LOQ solution 0,1%



Cromatogramma 13: LOD solution 0,25%

