



# UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN PRODUZIONI ANIMALI INNOVATIVE E SOSTENIBILI

## **Sviluppo e validazione di un metodo HPLC per l'identificazione e la quantificazione della clorexidina in un dentifricio per cani e gatti**

## **Development and validation of an HPLC method for the identification and quantification of chlorhexidine in a dog and cat toothpaste**

Relatore:

Chiar.mo Prof. Simone BERTINI

Correlatrice:

Dott.ssa Alicia Maria CARRILLO HEREDERO

Laureando:

Francesco Pasquale RUGGIERO

Matr. 383782

Anno accademico 2025-2026

## INDICE

|                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| ABSTRACT .....                                                              | 4  |
| ABSTRACT .....                                                              | 4  |
| INTRODUZIONE .....                                                          | 6  |
| IL CONTROLLO QUALITÀ.....                                                   | 6  |
| <b>Normative di riferimento</b> .....                                       | 6  |
| <b>Applicazione delle norme nel Laboratorio Controllo Qualità</b> .....     | 9  |
| <b>Importanza del controllo qualità nell'industria veterinaria</b> .....    | 10 |
| CLOREXIDINA .....                                                           | 12 |
| <b>Definizione di principio attivo</b> .....                                | 12 |
| <b>La Clorexidina</b> .....                                                 | 13 |
| <b>Metodi analitici qualitativi e quantitativi per la clorexidina</b> ..... | 16 |
| IL DENTIHEX.....                                                            | 18 |
| <b>L'Azienda</b> .....                                                      | 18 |
| <b>Storia del prodotto</b> .....                                            | 20 |
| <b>Principi attivi ed Eccipienti</b> .....                                  | 20 |
| <b>Ambito di utilizzo</b> .....                                             | 21 |
| <b>Processo produttivo</b> .....                                            | 21 |
| TECNICHE ANALITICHE: HPLC.....                                              | 25 |
| <b>Principi teorici</b> .....                                               | 25 |
| <b>Componenti dello strumento</b> .....                                     | 26 |
| <b>Vantaggi e limiti</b> .....                                              | 27 |
| OBIETTIVI DELLA TESI.....                                                   | 28 |
| MATERIALI E METODI: VALIDAZIONE DEL METODO HPLC PER LA CLOREXIDINA .....    | 29 |
| <b>Reagenti e Solventi</b> .....                                            | 29 |

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Strumentazione</b> .....                                               | 30 |
| <b>Preparazione delle soluzioni di lavoro</b> .....                       | 30 |
| <b>Metodo qualitativo</b> .....                                           | 31 |
| <b>Metodo quantitativo</b> .....                                          | 31 |
| <b>Parametri di validazione</b> .....                                     | 32 |
| <b>APPLICAZIONE AL PRODOTTO DENTIHEX</b> .....                            | 35 |
| <b>Campioni analizzati</b> .....                                          | 35 |
| <b>RISULTATI</b> .....                                                    | 36 |
| <b>REPORT DI ANALISI</b> .....                                            | 37 |
| <b>Solidità statistica</b> .....                                          | 40 |
| <b>Tabella dei picchi</b> .....                                           | 45 |
| <b>Tabella di acquisizione</b> .....                                      | 46 |
| <b>Confronto dei risultati ottenuti con le specifiche aziendali</b> ..... | 47 |
| <b>Eventuali anomalie o deviazioni</b> .....                              | 47 |
| <b>Esperienza in laboratorio QC (LQC)</b> .....                           | 48 |
| <b>DISCUSSIONE</b> .....                                                  | 50 |
| <b>Impatto ambientale</b> .....                                           | 50 |
| <b>Interpretazione dei risultati</b> .....                                | 51 |
| <b>Punti di forza del metodo</b> .....                                    | 51 |
| <b>Limiti dello studio</b> .....                                          | 53 |
| <b>CONCLUSIONI</b> .....                                                  | 55 |
| <b>SVILUPPI FUTURI</b> .....                                              | 56 |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b> .....                                                 | 57 |

## ABSTRACT

Il lavoro si inserisce nel contesto delle attività di controllo qualità, dove l'accurata determinazione del principio attivo è essenziale per garantire sicurezza, efficacia e conformità del prodotto alle specifiche aziendali e ai requisiti normativi. La clorexidina, antisettico ad ampio spettro largamente impiegato in medicina umana e veterinaria, richiede metodiche analitiche selettive e robuste per essere correttamente identificata in matrici complesse contenenti eccipienti quali paraffina, vanillina e Carbopol 980. Lo studio presenta lo sviluppo e la validazione di un metodo cromatografico HPLC-DAD per l'identificazione e la quantificazione della clorexidina all'interno del dentifricio veterinario DentiHex, destinato a cani e gatti.

Il metodo HPLC è stato sviluppato utilizzando una colonna C18 in fase inversa e rivelazione DAD, valutando i principali parametri di validazione secondo le linee guida ICH Q2(R1), tra cui specificità, linearità, accuratezza, precisione, limiti di rilevazione e quantificazione, robustezza e stabilità delle soluzioni. I risultati hanno evidenziato un'elevata selettività del metodo, assenza di interferenze nel tempo di ritenzione della clorexidina e una risposta lineare con coefficiente di correlazione  $\geq 0,990$ . La quantificazione del lotto analizzato (26020313) ha mostrato un contenuto di clorexidina pari allo 0,20% (g/g), pienamente conforme alle specifiche aziendali (0,18–0,22% g/g).

Il metodo validato si è dimostrato idoneo per l'impiego routinario nel laboratorio di controllo qualità, garantendo risultati affidabili, riproducibili e pienamente tracciabili. Nonostante alcuni limiti legati alla variabilità strumentale e alla complessità della matrice, l'approccio HPLC-DAD rappresenta una soluzione efficace per il monitoraggio del principio attivo nel prodotto finito. Lo studio fornisce inoltre le basi per futuri sviluppi, tra cui l'estensione del metodo ad altre formulazioni contenenti clorexidina e il consolidamento del monitoraggio analitico su più lotti produttivi.

## ABSTRACT

Quality control is essential to ensure the safety, efficacy, and compliance of pharmaceutical and veterinary products. This work falls within the context of quality control activities, where accurate determination of the active ingredient is essential to guarantee product safety, efficacy, and compliance with company specifications and regulatory requirements. Chlorhexidine, a broad-spectrum antiseptic widely used in human and veterinary medicine, requires selective and robust analytical methods to be correctly identified in complex matrices containing excipients such as paraffin, vanillin, and Carbopol 980. The study presents the development and validation of an HPLC-

DAD chromatographic method for the identification and quantification of chlorhexidine in DentiHex veterinary toothpaste, intended for dogs and cats.

The HPLC method was developed using a reversed-phase C18 column and DAD detection, evaluating key validation parameters according to ICH Q2(R1) guidelines, including specificity, linearity, accuracy, precision, limits of detection and quantification, robustness, and solution stability. The results demonstrated high method selectivity, absence of interference in chlorhexidine retention time, and a linear response with a correlation coefficient  $\geq 0.990$ . Quantification of the analyzed batch (26020313) showed a chlorhexidine content of 0.20% (g/g), fully compliant with company specifications (0.18–0.22% g/g).

The validated method proved suitable for routine use in the quality control laboratory, ensuring reliable, reproducible, and fully traceable results. Despite some limitations related to instrumental variability and matrix complexity, the HPLC-DAD approach represents an effective solution for monitoring the active ingredient in the finished product. The study also provides the basis for future developments, including extending the method to other formulations containing chlorhexidine and consolidating analytical monitoring across multiple production batches.

# INTRODUZIONE

## IL CONTROLLO QUALITÀ

Il controllo qualità, comunemente indicato con l'acronimo QC (*Quality Control*), si riferisce all'insieme strutturato di procedure e analisi tecniche progettate per verificare che le materie prime, i prodotti intermedi e i prodotti finiti rispettino pienamente gli standard qualitativi prefissati (1). Questo processo è fondamentale per garantire non solo la conformità alle specifiche stabilite, ma anche la sicurezza, l'efficacia e la coerenza delle caratteristiche intrinseche del prodotto durante tutto il ciclo di vita produttivo. Solo attraverso un controllo qualità meticoloso è possibile garantire l'affidabilità del prodotto e tutelare sia la salute dei consumatori finali sia la reputazione del produttore. In questo scenario, il laboratorio di controllo qualità assume un ruolo che va ben oltre la semplice verifica finale del prodotto, estendendosi all'intero ciclo produttivo con controlli approfonditi su materie prime, semilavorati e prodotto finito. Le attività principali includono sia l'identificazione che la quantificazione del principio attivo. L'identificazione prevede la conferma dell'identità chimica della sostanza di interesse, ottenuta confrontando i parametri analitici misurati con quelli di uno standard di riferimento. La quantificazione, invece, permette di determinare con precisione la concentrazione del principio attivo all'interno della formulazione, assicurandone così l'adeguata qualità e conformità.

## Normative di riferimento

### ***GMP: definizione, principi e applicazione pratica***

Quando parliamo di norme GMP ci riferiamo alle *Good Manufacturing Practice*, conosciute in italiano anche come *Norme di Buona Fabbricazione*. Per definizione sono un insieme di regole che descrivono la buona operatività da adottare al fine di assicurare che i prodotti farmaceutici soddisfino gli standard appropriati. A volte è possibile notare che al posto del termine GMP venga utilizzata la dicitura “cGMP”, dove la “c” sta per “*current*”. Tale indicazione sottolinea l'applicazione delle pratiche aggiornate nel tempo. Le GMP, dal punto di vista storico, trovano le loro origini nel *Code of Federal Regulations* (CFR) emanato dalla *Food and Drug Administration* (FDA) statunitense (2). Questo regolamento, introdotto nel 1978, definisce i principi fondamentali che le aziende farmaceutiche sono obbligate a seguire per legge. Il CFR è organizzato in 50 titoli (2), ciascuno suddiviso a sua volta in diverse parti. Un esempio significativo è il Titolo 21, che include:

- Parte 11: Garantisce che i record elettronici e le firme digitali siano accurati, affidabili e considerati equivalenti ai documenti in formato cartaceo.
- Parte 210: Regola le cGMP relative alle attività di produzione, trasformazione, confezionamento e stoccaggio dei farmaci.
- Parte 211: Disciplina le cGMP specifiche per i prodotti farmaceutici finiti.

Questa struttura contribuisce a garantire il rispetto di standard elevati nella produzione e gestione dei medicinali.

Le GMP rappresentano un sistema di requisiti progettati per garantire che i medicinali vengano prodotti e sottoposti a controlli secondo standard qualitativi appropriati rispetto al loro utilizzo previsto. A livello europeo, i principi delle GMP sono regolamentati dalla Direttiva 2003/94/CE della Commissione, che fornisce indicazioni specifiche per la produzione di medicinali destinati all'uso umano e di quelli sperimentali (3). Inoltre, tali principi trovano riferimento nel quadro legislativo delineato dalla Direttiva 2001/83/CE (4). In Italia, queste normative sono state recepite attraverso il Decreto Legislativo numero 219 del 24 aprile 2006. Le GMP sono state sviluppate per rispondere alla necessità di regolamentare la produzione e la distribuzione di medicinali, garantendo standard elevati in termini di qualità, sicurezza ed efficacia. Nel tempo, i principi cardine su cui si basano sono stati estesi, con adeguamenti specifici, ad altri ambiti del settore *healthcare*, come dispositivi medici, cosmetici e alimenti. Sebbene le modalità di applicazione delle GMP possano differire a seconda della categoria di prodotto e delle normative di riferimento, il loro obiettivo primario resta invariato. Gli organismi di regolamentazione, sia a livello nazionale che internazionale, conducono regolarmente ispezioni presso gli impianti di produzione per accertare l'aderenza agli standard GMP. Il mancato rispetto di tali requisiti può avere conseguenze quali il ritiro dei prodotti dal mercato, la sospensione o la revoca delle autorizzazioni, sanzioni amministrative e, nei casi più seri, azioni penali. Queste ispezioni prevedono sia un esame approfondito della documentazione correlata sia un controllo dell'effettiva implementazione delle procedure operative all'interno dello stabilimento. Nel corso degli ultimi decenni, le GMP hanno subito un'evoluzione costante, integrando aspetti come l'integrità dei dati, la gestione del rischio qualitativo e requisiti mirati per la produzione in condizioni di sterilità. Questo sviluppo risponde alla necessità di assicurare standard sempre più elevati di qualità e affidabilità nei processi produttivi.

### *Data Integrity*

L'integrità dei dati, conosciuta anche come *data integrity*, rappresenta l'insieme di qualità che assicurano che i dati restino completi, coerenti, accurati e affidabili durante l'intero ciclo di vita. Questo include le fasi di generazione, registrazione, elaborazione, archiviazione e recupero delle informazioni. In ambiti regolamentati, tale concetto costituisce un pilastro fondamentale per garantire la solidità delle decisioni legate alla qualità, una valutazione adeguata delle conformità e la salvaguardia della salute pubblica. Le autorità regolatorie, con particolare riferimento alla *European Medicines Agency (EMA)*, definiscono la *data integrity* come la salvaguardia della completezza e affidabilità dei dati, garantendo che siano attribuibili, leggibili, registrati in concomitanza con l'attività svolta, autentici (o rappresentati da copie certificate) e accurati (2). Viene inoltre evidenziato il ruolo

cruciale di strumenti come i *metadata* e gli *audit trail*, che permettono di tracciare in modo trasparente tutte le operazioni effettuate sui dati. Questi principi rappresentano una base imprescindibile per le ispezioni regolatorie e per i sistemi di gestione della qualità impiegati dalle aziende operanti nel settore farmaceutico e biotecnologico. Il modello concettuale maggiormente utilizzato per trasformare requisiti teorici in pratiche operative è rappresentato dall'acronimo ALCOA, che delinea le caratteristiche essenziali dei dati: Attribuibili, Leggibili, Contestuali, Originali e Accurati. Questo approccio è stato successivamente ampliato con il concetto di ALCOA+, che aggiunge ulteriori requisiti come la completezza, la coerenza, la durabilità e la disponibilità dei dati. Più di recente, si è arrivati a proporre un'evoluzione denominata ALCOA++, che pone un'accentuata enfasi sulla tracciabilità delle informazioni e sulla gestione dei metadati nei sistemi digitali (5). Tale progressione evidenzia l'importanza di aggiornare i principi tradizionali dell'integrità dei dati per far fronte alle sfide crescenti derivanti dall'automatizzazione dei processi e dall'adozione di tecnologie informatizzate sempre più sofisticate. Per garantire la *data integrity* a livello operativo, è necessario adottare un sistema strutturato che combini controlli documentali, organizzativi e tecnologici. Elementi essenziali di tale sistema comprendono politiche aziendali formalizzate, che delineino in modo preciso ruoli, responsabilità e livelli di autorizzazione, affiancate da procedure operative standard (SOP) per regolare la registrazione, modifica e gestione dei dati lungo tutte le fasi del loro ciclo di vita. Inoltre, è fondamentale integrare programmi di formazione continua per il personale e attività di monitoraggio indipendente, come verifiche periodiche e controlli incrociati, con l'obiettivo di assicurare la corretta applicazione delle procedure e la solidità delle informazioni prodotte. Un elemento fondamentale per garantire l'integrità dei dati risiede nella gestione accurata dei *metadata*. Questi devono essere conservati, archiviati e prontamente accessibili, così da permettere una ricostruzione dettagliata e completa delle attività eseguite. Allo stesso modo, qualsiasi intervento sui dati richiede una giustificazione chiara, una tracciabilità rigorosa e un processo di revisione approfondito, assicurando così trasparenza e verificabilità in ogni operazione compiuta. Le indagini effettuate dalle autorità regolatorie mettono spesso in luce diverse criticità legate a pratiche non conformi. Tra queste rientrano l'uso di account condivisi, che mina la tracciabilità dei dati, la mancanza o la manipolazione degli audit trail, l'adozione di sistemi informatizzati privi di convalida, la registrazione delle informazioni non effettuata in tempo reale e l'utilizzo di procedure di backup insufficienti. Tali lacune possono incidere negativamente sull'affidabilità dei dati e compromettere la capacità dell'azienda di dimostrare la propria conformità ai requisiti normativi vigenti. Le implicazioni derivanti da tali non conformità possono comportare l'emissione di osservazioni ispettive ufficiali, avviare richiami di prodotti, portare all'invio di *warning letter* e, nei casi più severi, dar luogo a provvedimenti restrittivi che potrebbero compromettere il mantenimento delle

autorizzazioni regolatorie e la commercializzazione dei prodotti. Per prevenire tali scenari, è fondamentale che le organizzazioni implementino programmi di monitoraggio costante e strategie di miglioramento continuo, mirate a individuare e risolvere prontamente eventuali criticità. La protezione dell'integrità dei dati non è un'attività isolata, ma un processo integrato che attraversa tutte le aree dell'organizzazione. Essa implica la sinergia tra sistemi di *governance*, gestione del rischio, convalida dei sistemi informatici, procedure operative e formazione del personale. In questo contesto, l'adozione coerente dei principi ALCOA, ALCOA+ e ALCOA++, combinata con l'implementazione di controlli tecnici e procedurali adeguati al livello di rischio, costituisce un pilastro essenziale per garantire che i dati impiegati nelle decisioni di qualità siano affidabili, completi, tracciabili e ricostruibili. La capacità di dimostrare l'affidabilità dei dati rappresenta inoltre un requisito imprescindibile per garantire la qualità del prodotto e salvaguardare la salute dei consumatori.

### **Applicazione delle norme nel Laboratorio Controllo Qualità**

Il tirocinio personalmente condotto all'interno del laboratorio di QC di un'azienda farmaceutica specializzata in prodotti veterinari ha rappresentato un'opportunità formativa di grande valore, consentendo un'immersione pratica nelle complesse dinamiche legate al controllo qualità nel settore dei medicinali veterinari. Questa esperienza mi ha permesso di sviluppare una solida conoscenza delle principali tecniche analitiche strumentali, utilizzate per garantire che i prodotti finiti rispettino rigorosamente gli standard qualitativi richiesti dalle normative di settore. Inoltre, mi ha fornito la possibilità di comprendere a fondo i molteplici passaggi e le rigorose procedure necessarie per assicurare sia l'affidabilità dei dati analitici raccolti sia la loro piena tracciabilità, elementi fondamentali per certificare la sicurezza e l'efficacia dei farmaci destinati all'uso veterinario. Nel contesto delle attività di laboratorio, l'attenzione si concentra in modo particolare sulla verifica della conformità dei prodotti attraverso una serie di procedure analitiche che includono sia prove di identificazione sia saggi quantitativi. Questi ultimi sono specificamente finalizzati alla determinazione precisa del contenuto dei principi attivi, in relazione alle specifiche rigorosamente stabilite per il prodotto. I controlli vengono effettuati su campioni che rappresentano in maniera affidabile l'intero lotto di produzione e svolgono un ruolo fondamentale nel garantire che il medicinale soddisfi i criteri di qualità, sicurezza ed efficacia richiesti. Un elemento di estrema importanza all'interno di questo processo è rappresentato dall'integrazione delle analisi chimiche e fisiche in un sistema qualità ben strutturato. Tale sistema si fonda sull'adozione di procedure operative standardizzate (SOP), sulla gestione di una documentazione accuratamente controllata e sull'assicurazione di una completa tracciabilità di ciascuna operazione eseguita. Questo approccio sistematico è cruciale per assicurare che i risultati ottenuti siano non solo riproducibili ma anche perfettamente confrontabili, favorendo così un controllo qualitativo rigoroso e coerente nel tempo.

Nel panorama delle tecniche analitiche applicate al controllo qualità, la cromatografia liquida ad alte prestazioni, conosciuta comunemente con l'acronimo HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*), assume un'importanza fondamentale. Questa metodologia si distingue per la sua elevata precisione e sensibilità, rendendola uno strumento indispensabile per l'identificazione accurata e la determinazione quantitativa dei principi attivi contenuti all'interno delle formulazioni farmaceutiche (6). L'impiego dell'HPLC non solo permette di verificare in modo rigoroso la conformità dei prodotti rispetto agli standard di qualità stabiliti, ma rappresenta anche un mezzo cruciale per il monitoraggio continuo della stabilità del principio attivo durante l'intero ciclo di vita del prodotto. Grazie a queste caratteristiche, la tecnica contribuisce a garantire che i medicinali mantengano nel tempo la loro efficacia, sicurezza e qualità complessiva, rispondendo così ai requisiti normativi e alle esigenze dei pazienti. Contestualmente, l'esperienza acquisita nel tempo ha messo in luce l'assoluta rilevanza delle GMP, le quali rappresentano il cardine normativo su cui si fondano i processi di produzione e controllo dei farmaci (2). Nell'ambito delle attività di laboratorio, l'applicazione di tali principi si concretizza in numerosi aspetti fondamentali: si parte dall'implementazione di procedure operative standard che assicurano uniformità operativa, per passare alla qualificazione e alla regolare manutenzione delle apparecchiature utilizzate, garantendone un funzionamento sempre ottimale. A ciò si aggiunge la validazione rigorosa dei metodi analitici impiegati, indispensabile per certificare la precisione e l'affidabilità delle analisi eseguite, oltre a una gestione accurata dei dati analitici secondo linee guida che ne garantiscano integrità, sicurezza e riservatezza. L'adozione sistematica di queste buone pratiche non solo consente di elevare gli standard qualitativi, ma svolge anche un ruolo cruciale nell'assicurare l'affidabilità, la tracciabilità e la riproducibilità dei risultati ottenuti. Questo processo rafforza la conformità ai severi requisiti qualitativi richiesti dalla normativa vigente nel settore farmaceutico, contribuendo in modo significativo a mantenere la sicurezza e l'efficacia dei prodotti destinati al mercato.

### ***Importanza del controllo qualità nell'industria veterinaria***

Nel contesto del settore farmaceutico veterinario, il controllo qualità assume un'importanza cruciale nel garantire che i medicinali prodotti siano pienamente conformi agli standard e alle specifiche prestabilite. Questo processo è essenziale per proteggere la salute e il benessere degli animali, contribuendo sia alla sicurezza che all'efficacia dei trattamenti somministrati. Attraverso queste analisi, si garantisce non solo l'efficacia terapeutica del medicinale, ma si riducono sensibilmente i rischi associati a possibili deviazioni nei livelli di concentrazione, che potrebbero avere un impatto negativo sia sulla sicurezza del prodotto che sulla sua attività farmacologica prevista. Questi controlli rappresentano, dunque, un pilastro fondamentale per la tutela della salute animale e per il

mantenimento di elevati standard qualitativi all'interno di tale settore. Nel contesto veterinario, l'importanza di questi controlli risulta fondamentale, data la varietà di formulazioni utilizzate sia per gli animali da compagnia che per quelli da reddito. In tale ambito, garantire un'elevata qualità dei medicinali non solo promuove il benessere degli animali, ma riveste anche un ruolo cruciale nella protezione della salute pubblica. Questo si armonizza con il principio *One Health*, che sottolinea l'indissolubile legame tra la salute animale, quella umana e l'ambiente. Le operazioni di controllo qualità si fondano sull'utilizzo di metodologie analitiche validate, mirate a determinare in modo accurato la composizione qualitativa e quantitativa dei principi attivi, oltre a verificare che il prodotto rispetti le specifiche stabilite. Queste attività costituiscono un pilastro fondamentale del sistema di qualità aziendale, assicurando sia l'affidabilità del processo produttivo sia la coerenza nelle caratteristiche del prodotto finale.

# CLOREXIDINA

## Definizione di principio attivo

Nel settore regolatorio e farmaceutico, il principio attivo costituisce l'elemento chiave responsabile dell'efficacia terapeutica o funzionale di un farmaco. Secondo quanto stabilito dal Regolamento (CE) n. 847/2000, si tratta di una sostanza capace di esplicare un'azione farmacologica, immunologica o metabolica, dalla quale deriva l'effetto terapeutico del medicinale. Il principio attivo (4) determina l'efficacia di un medicinale, differenziandosi dagli altri componenti della formulazione, che sono per lo più destinati a funzioni tecnologiche o di supporto. Per questo motivo, una comprensione approfondita delle caratteristiche chimico-fisiche e funzionali della sostanza attiva diventa un requisito indispensabile per progettare strategie analitiche mirate alla sua identificazione e quantificazione. Nella Farmacopea Europea, nella sezione relativa alle sostanze per uso farmaceutico (Substances for Pharmaceutical Use), viene indicata una chiara distinzione tra principi attivi ed eccipienti (7). Questi ultimi, pur non essendo direttamente responsabili dell'effetto terapeutico, rivestono un ruolo cruciale nella composizione del medicinale. Gli eccipienti, infatti, possono incidere significativamente sulla stabilità del prodotto, sulle proprietà tecnologiche della forma farmaceutica e, in determinate circostanze, su aspetti fondamentali come la dissoluzione e la biodisponibilità del principio attivo (7). Secondo le disposizioni della Direttiva 2001/83/CE e relative modifiche, il produttore deve assicurare la qualità, l'identità e la conformità delle sostanze attive e degli eccipienti utilizzati nella formulazione. È inoltre obbligato a garantire la tracciabilità e l'aderenza alle specifiche lungo l'intero processo produttivo (European Parliament and Council of the European Union, 2001).

## *Ruolo nei prodotti veterinari*

L'evoluzione della farmaceutica moderna, supportata dal progresso nelle tecniche di isolamento e caratterizzazione delle sostanze, ha condotto alla concezione dei medicinali come sistemi complessi. Questi si basano su principi attivi ben definiti, determinanti per l'efficacia terapeutica, e su eccipienti che svolgono un ruolo fondamentale sia nella tecnologia di produzione sia nella formulazione finale. Nel settore veterinario, e non solo, i medicinali rappresentano un elemento cardine per la prevenzione e la cura delle patologie animali. Questi prodotti possono essere composti da uno o più principi attivi, accuratamente selezionati e preparati attraverso formulazioni specifiche. Tali formulazioni sono progettate per garantire, in modo ottimale, l'efficacia terapeutica del prodotto, la sua stabilità nel tempo e un elevato livello di sicurezza per gli animali a cui sono destinati. In questo ambito, la qualità complessiva di un medicinale dipende in modo imprescindibile dal controllo rigoroso del principio attivo utilizzato. Questo deve soddisfare precisi requisiti relativi alla sua identità chimica, al livello di purezza, e al titolo quantitativo, che determinano la dose effettiva presente nel prodotto. Tutte

queste specifiche sono accuratamente definite secondo le disposizioni delle normative farmaceutiche applicabili e descritte nelle monografie ufficiali degli enti regolatori. Le norme che regolano questi standard derivano da una combinazione di leggi e linee guida internazionali riconosciute, tra cui si annoverano la Direttiva 2001/82/CE, dedicata ai medicinali veterinari, e le prescrizioni dettagliate contenute nella Farmacopea Europea, che funge da riferimento normativo per garantire l'uniformità e l'eccellenza qualitativa nel settore. La gestione accurata di questi parametri è fondamentale per assicurare la sicurezza, l'efficacia e la consistenza del medicinale, rappresentando inoltre la base per l'esecuzione di analisi quantitative attraverso tecniche strumentali avanzate, come la cromatografia liquida ad alte prestazioni (*HPLC - High-Performance Liquid Chromatography*).

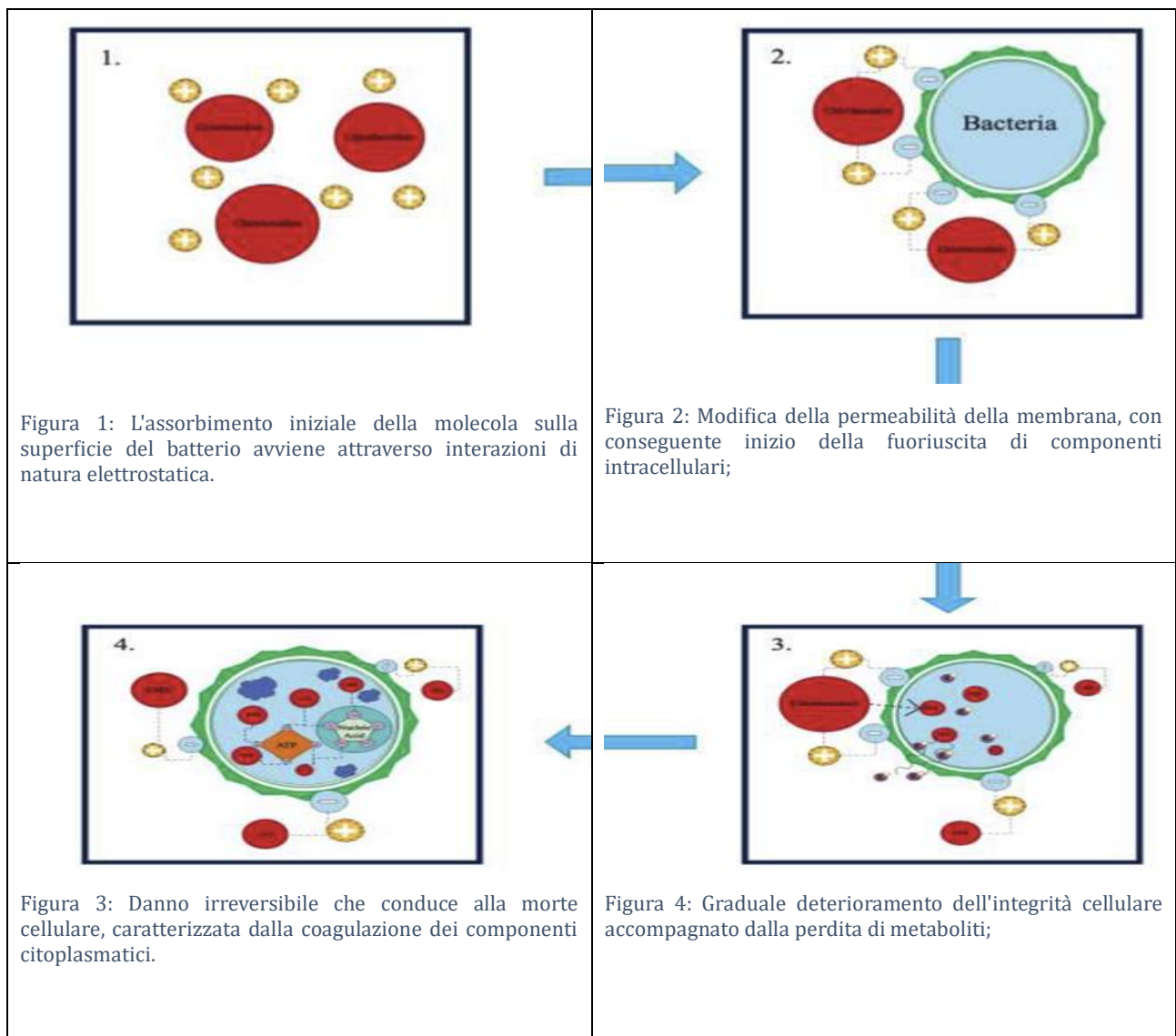
## La Clorexidina

La clorexidina è una sostanza chimica sviluppata nel Regno Unito in seguito alle ricerche condotte dalla *Imperial Chemical Industries* (ICI) tra gli anni Quaranta e Cinquanta del ventesimo secolo. Dopo essere stata scoperta e analizzata per le sue proprietà antimicrobiche, la molecola venne commercializzata nella prima metà degli anni Cinquanta, trovando impiego come antisettico e disinfettante. In seguito, la clorexidina è diventata l'agente antisettico di riferimento in campo medico e chirurgico, apprezzata per il suo ampio spettro d'azione e per la durata prolungata del suo effetto sulla pelle. Dal 1957 è stata adottata nell'uso clinico nel Regno Unito come antisettico per la cute e, successivamente, integrata in numerose formulazioni. Tra queste figurano soluzioni detergenti, prodotti per la preparazione preoperatoria della cute e articoli dedicati all'igiene orale (8).

### *Meccanismo d'azione*

Il funzionamento della clorexidina si basa principalmente sulla sua interazione con la membrana delle cellule microbiche. Essendo un composto di natura cationica, la molecola mostra una forte predisposizione a legarsi alle superfici batteriche, che sono caratterizzate da cariche negative dovute alla presenza di elementi come i fosfolipidi e, nei batteri Gram-negativi, i lipopolisaccaridi. Questa interazione elettrostatica porta a un accumulo graduale di clorexidina sulla superficie cellulare, alterando la permeabilità della membrana citoplasmatica. Questa interazione elettrostatica porta a un accumulo graduale di clorexidina sulla superficie cellulare, rappresentando il primo passaggio del meccanismo d'azione (Figura 1). A concentrazioni basse, tale alterazione può causare il rilascio di componenti intracellulari a basso peso molecolare, tra cui ioni potassio e vari metaboliti, perturbando l'equilibrio cellulare e inducendo principalmente un effetto batteriostatico. La modificazione della permeabilità della membrana determina infatti l'inizio della fuoriuscita di componenti intracellulari (Figura 2). Con l'incremento della concentrazione, il danno alla membrana diventa più evidente, provocando la possibile perdita di componenti cruciali come proteine, fosfati, ATP e acidi nucleici. Il

progressivo deterioramento dell'integrità cellulare è accompagnato dalla perdita di metaboliti e di altri componenti intracellulari (Figura 3). Questo può condurre a un compromesso irreparabile delle funzioni metaboliche e alla morte della cellula. Nelle condizioni di maggiore esposizione alla clorexidina, il danno diventa irreversibile e può determinare la coagulazione dei componenti citoplasmatici e la conseguente morte cellulare (Figura 4). L'efficacia antimicrobica della clorexidina è quindi influenzata sia dalla concentrazione impiegata sia dalla durata dell'esposizione, con un effetto battericida che tende a manifestarsi sotto condizioni di esposizione più intensa al principio attivo. La clorexidina è nota per il suo ampio spettro d'azione, risultando altamente efficace contro i batteri Gram-positivi e mostrando anche attività contro diversi batteri Gram-negativi, funghi e lieviti. Tuttavia, la sensibilità dei microrganismi può variare a seconda delle caratteristiche strutturali delle cellule e della presenza di barriere protettive specifiche. Queste barriere possono limitare l'accesso della molecola ai siti bersaglio, riducendo così la sua efficacia. Comprendere queste caratteristiche è essenziale per un uso adeguato della clorexidina nelle varie formulazioni, rendendo importante anche il controllo della concentrazione del principio attivo e della qualità del prodotto finale.



### ***Impieghi in medicina umana e veterinaria***

La clorexidina è un antisettico largamente impiegato sia in medicina umana che veterinaria (14), grazie alla sua efficacia nella preparazione cutanea, nella pulizia di ferite e nella riduzione della carica microbica. Nel contesto umano, viene utilizzata come disinfettante cutaneo prima di interventi invasivi, come componente di soluzioni per l'igiene delle mani dedicate al personale sanitario e come principio attivo nei collutori, per la gestione della placca dentale e il trattamento dell'infiammazione delle gengive. Le sue formulazioni comprendono sia soluzioni acquose sia preparati idroalcolici, combinando l'azione immediata dell'alcol con l'effetto antimicrobico prolungato assicurato dalla clorexidina. Nel settore veterinario, il composto trova impiego in diverse applicazioni, tra cui la pulizia di pelle e ferite, la sterilizzazione di strumenti e ambienti, i prodotti destinati alla toelettatura e le formulazioni mirate alla prevenzione delle infezioni mammarie negli animali da reddito, come le mastiti nei bovini. Le quantità e le modalità d'uso vengono adattate in base all'applicazione specifica.

La diffusione della clorexidina in questi ambiti è strettamente legata alla sua caratteristica di sostantività, che ne consente un prolungamento dell'efficacia antimicrobica sulle superfici trattate.

### ***Limiti d'uso e sicurezza***

L'uso prolungato e sistematico della clorexidina non è generalmente consigliato senza un'adeguata supervisione medica, poiché potrebbe aumentare il rischio di effetti collaterali senza offrire alcun vantaggio significativo in termini di efficacia antimicrobica. Le formulazioni per uso orale maggiormente diffuse contengono concentrazioni che variano tra lo 0,12% e lo 0,2%, con una comprovata efficacia clinica nei trattamenti a breve termine, come nel periodo post-operatorio o in situazioni in cui l'igiene meccanica risulti temporaneamente insufficiente. Tra gli effetti collaterali più comunemente descritti in letteratura spicca la pigmentazione dei tessuti dentali, che può comparire già dopo poche settimane di uso continuativo e spesso richiede il ricorso a trattamenti di igiene professionale per essere eliminata. È inoltre segnalata la possibilità di un'alterazione temporanea della percezione del gusto. Per queste ragioni, è consigliabile che i proprietari degli animali vengano informati in maniera adeguata prima di avviare il trattamento, prevedendo inoltre un monitoraggio regolare durante il suo utilizzo. Nonostante siano rari, sono stati riportati episodi di ipersensibilità e reazioni anafilattiche legate all'esposizione alla clorexidina, talvolta di natura grave. Alla luce di quanto emerge dalla letteratura scientifica e dalle segnalazioni di farmacovigilanza, risulta opportuno valutare con attenzione la storia clinica per individuare possibili allergie note e sospendere immediatamente l'applicazione del prodotto qualora si manifestino sintomi suggestivi. In ambito preoperatorio, è altresì suggerita una revisione della pregressa esposizione a formulazioni contenenti clorexidina, al fine di minimizzare il rischio di eventi avversi.

### **Metodi analitici qualitativi e quantitativi per la clorexidina**

L'analisi della clorexidina in prodotti farmaceutici, dispositivi medici, formulazioni per l'igiene orale e matrici biologiche richiede l'utilizzo di metodiche analitiche altamente selettive, affidabili e validate. Tali metodiche devono essere in grado di assicurare sia un'identificazione precisa del principio attivo sia una quantificazione accurata dello stesso. La letteratura scientifica riporta numerosi approcci analitici per lo studio della clorexidina, tra cui tecniche cromatografiche, spettrofotometriche e spettrometriche, sviluppate e applicate in base alla complessità della matrice analizzata e alla concentrazione dell'analita. La cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) è considerata uno dei metodi di riferimento più diffusi per la determinazione quantitativa della clorexidina (9). Numerosi studi hanno esaminato metodi di RP-HPLC che utilizzano colonne C18 in combinazione con rivelatori UV o a Diode Array Detector (DAD), evidenziando un'elevata specificità, precisione, accuratezza e robustezza nell'analisi della clorexidina in formulazioni

farmaceutiche e prodotti per l'igiene orale. Inoltre, il rivelatore DAD permette di acquisire l'intero spettro UV di ogni picco cromatografico, facilitando sia il confronto spettrale per confermare l'identità dell'analita, sia la valutazione della purezza del picco, rendendo possibile l'individuazione di impurità o prodotti di degradazione. Per applicazioni che richiedono limiti di rilevabilità estremamente bassi o l'analisi di matrici altamente complesse, come campioni biologici o ricerche in ambito farmacocinetico, sono state introdotte tecniche avanzate integrate con spettrometria di massa, quali LC-MS e LC-MS/MS (9). Questi approcci garantiscono un'elevata sensibilità e una notevole selettività, rendendo possibile non solo la misurazione accurata della clorexidina a concentrazioni molto ridotte, ma anche la conferma strutturale dell'analita tramite l'identificazione di specifici ioni caratteristici. La spettrofotometria UV-Vis è stata ampiamente descritta in letteratura come un metodo utile per il dosaggio della clorexidina, in particolare nelle formulazioni semplici prive di interferenti significativi. Pur mostrando un livello di specificità generalmente inferiore rispetto alle tecniche cromatografiche, questa metodologia rappresenta comunque una soluzione rapida e conveniente dal punto di vista economico, risultando particolarmente adatta alle analisi di routine in quei contesti dove non sia necessario raggiungere alti standard di sensibilità o una separazione dettagliata degli analiti. Oltre alle tradizionali analisi chimico-fisiche, l'attività antimicrobica della clorexidina viene comunemente valutata mediante protocolli microbiologici standardizzati, progettati per garantire risultati scientificamente accurati e riproducibili. Tra le tecniche più diffuse spicca la determinazione della concentrazione minima inibente (*Minimum Inhibitory Concentration*, MIC), che rappresenta la più bassa quantità di antimicrobico capace di arrestare la crescita visibile di un microrganismo, fornendo un parametro fondamentale per valutare l'efficacia della sostanza. Un altro metodo frequentemente adottato consiste nei saggi di diffusione su agar, utilizzati per misurare l'attività antibatterica nei confronti di specifici ceppi microbici, permettendo un'indagine mirata della sensibilità microbica. Sebbene queste metodiche non offrano una quantificazione diretta della concentrazione del principio attivo, risultano estremamente utili per stabilire una correlazione tra la presenza di clorexidina e la sua capacità biologica di contrastare la proliferazione microbica.

# IL DENTIHEX

## *L'Azienda*

### ***Storia e mission aziendale***

LIVISTO Italia, parte di TREI S.p.A. (10), si distingue nel settore della salute animale in quanto membro del gruppo internazionale *AGRAVIS Raiffeisen AG*. Questa solida realtà consente all'azienda di combinare conoscenze scientifiche, attività di ricerca e sviluppo e una posizione consolidata nel panorama veterinario europeo. L'azienda si dedica allo sviluppo e alla distribuzione di prodotti per la salute e il benessere degli animali, ponendo particolare enfasi sulla qualità, sulla sicurezza e sull'efficacia delle sue formulazioni. Grazie alla stretta collaborazione con esperti nel campo veterinario, vengono create soluzioni capaci di soddisfare le esigenze della pratica clinica e del monitoraggio sanitario. La missione dell'azienda si basa sul sostegno ai professionisti della salute animale, offrendo soluzioni affidabili, strumenti tecnico-scientifici avanzati e opportunità di formazione continua. Questo impegno evidenzia la determinazione a favorire l'innovazione e il progresso costante nel settore veterinario, sostenendo il benessere degli animali e promuovendo l'adozione di pratiche sanitarie fondate su solide evidenze scientifiche.

### ***Aree produttive***

La struttura produttiva di LIVISTO Italia si articola in reparti altamente specializzati, progettati per assicurare un controllo rigoroso su ciascuna fase del processo produttivo e garantire il pieno rispetto degli standard qualitativi richiesti dalle normative di settore. Il processo di produzione prende avvio con la ricezione delle materie prime, le quali vengono catalogate e sottoposte a controlli qualitativi iniziali. Una delle tecniche adottate per l'identificazione delle sostanze è la spettroscopia nel vicino infrarosso (*NIR, Near-Infrared Spectroscopy*). L'azienda ha strutturato le sue aree produttive in base alle diverse tipologie di prodotti, includendo reparti dedicati alla lavorazione di sostanze beta-lattamiche, polveri, formulazioni liquide e prodotti nutrizionali. Questa suddivisione permette di soddisfare in modo ottimale le esigenze specifiche legate alla produzione e al controllo di ciascuna categoria. Al completamento del processo, i prodotti finiti vengono inviati al magazzino apposito, da cui vengono distribuiti seguendo procedure rigorose che assicurano sia la tracciabilità che la continuità nella fornitura.

### ***Medicinali***

LIVISTO Italia si dedica con impegno allo sviluppo e alla commercializzazione di medicinali veterinari pensati per rispondere alle esigenze di un'ampia varietà di specie animali, affrontando al

contempo differenti aree terapeutiche. La gamma di prodotti offerti dall'azienda abbraccia soluzioni innovative e specifiche per il trattamento di infezioni batteriche, il controllo e la gestione delle patologie che colpiscono l'apparato respiratorio e quello gastrointestinale, oltre a fornire un valido supporto nelle pratiche riproduttive degli animali destinati all'allevamento. Ogni formulazione viene sviluppata seguendo rigorosamente i più elevati standard di qualità e sicurezza richiesti dal settore farmaceutico veterinario. Questi prodotti non solo garantiscono elevata efficacia terapeutica, ma sono accuratamente progettati per soddisfare le diverse necessità cliniche e produttive delle specie animali cui sono destinati, assicurando soluzioni su misura che combinano innovazione ed affidabilità.

### ***Altri prodotti***

Oltre a sviluppare medicinali veterinari, LIVISTO offre una varietà di prodotti pensati per la salvaguardia, il benessere e il supporto terapeutico degli animali. Tra questi, Deltatic si distingue come un collare per cani progettato per offrire protezione contro ectoparassiti. Grazie alla sua azione repellente, crea una barriera efficace che impedisce l'avvicinamento dei parassiti, contribuendo al loro controllo e assicurando una protezione duratura. La linea V-SKIN si distingue per una gamma completa di prodotti dermocosmetici appositamente formulati per affiancare e ottimizzare l'efficacia delle terapie farmacologiche nei casi di problematiche dermatologiche. Tale linea è il risultato di un'attenta ricerca scientifica volta a rispondere alle esigenze specifiche della pelle in condizioni di stress, irritazione o alterazioni fisiologiche. Tra i prodotti inclusi in questa offerta si trovano:

- Prebiotic Spray, una soluzione innovativa studiata per promuovere attivamente l'equilibrio del microbiota cutaneo, essenziale per il mantenimento della salute della pelle e la sua naturale capacità di difesa;
- Oxicare Cream, una crema specifica particolarmente efficace come supporto nel trattamento delle irritazioni cutanee e nella gestione dello stress ossidativo attraverso l'azione protettiva e lenitiva dei suoi ingredienti;
- Olamina Cream, un preparato dermocosmetico utilizzato come coadiuvante nella gestione di stati irritativi e infiammatori della pelle, ideale per donare sollievo e contribuire al ripristino del benessere cutaneo.

Questi prodotti rappresentano una soluzione versatile e mirata, progettata per rispondere alle diverse necessità della pelle compromessa, garantendo risultati ottimali grazie a formulazioni accuratamente sviluppate. Per la cura dell'igiene orale, DentiHex offre una soluzione avanzata, progettata per aiutare a contrastare la formazione di placca batterica e tartaro, combattere l'alito cattivo e favorire la prevenzione di gengiviti e altre comuni problematiche del cavo orale.

### Storia del prodotto

Il Dentihex veniva inizialmente fabbricato e sottoposto a controllo qualità in un diverso stabilimento LIVISTO. Con il passaggio della produzione al sito di Rio Saliceto (RE), si è resa necessaria anche la migrazione del metodo analitico HPLC utilizzato per il controllo qualità del prodotto. Il processo di trasferimento del metodo è stato articolato in diverse fasi fondamentali, a partire dall'implementazione della procedura analitica all'interno del laboratorio ricevente. Questo ha comportato un adattamento accurato alle specifiche strumentazioni disponibili presso la struttura, assicurandone la piena funzionalità e conformità agli standard richiesti. Inoltre, per garantire l'affidabilità e l'efficienza del metodo nel nuovo contesto, sono state condotte attività mirate di qualificazione, inclusi test di verifica delle prestazioni e uno stringente confronto interlaboratorio. L'insieme di queste operazioni ha permesso di certificare l'idoneità del metodo nell'ambito operativo destinato, preservando al contempo la continuità e la qualità dei processi di controllo, fondamentali per il corretto svolgimento delle attività. Il processo di trasferimento metodologico è stato suddiviso in diverse fasi:

- Condivisione della documentazione tecnica e delle procedure operative standard (SOP);
- Implementazione preliminare del metodo e verifica delle condizioni operative presso il laboratorio ricevente;
- Conduzione di studi interlaboratorio comparativi per valutare la riproducibilità e la coerenza dei risultati ottenuti;
- Verifica approfondita e convalida delle prestazioni del metodo all'interno del laboratorio ricevente;
- Approvazione finale e messa a disposizione del metodo per l'impiego regolare nelle attività di controllo qualità del prodotto.

La produzione ha avuto inizio a giugno 2025.

### Principi attivi ed Eccipienti

| PRINCIPI ATTIVI | ECCIPIENTI       |
|-----------------|------------------|
| Clorexidina     | <i>Vanillina</i> |
|                 | Carbopol 980     |
|                 | <i>Paraffina</i> |

Composizione del Dentihex: principio attivo ed eccipienti presenti

## Ambito di utilizzo

### *Igiene orale: Prevenzione e Supporto*

La salute orale degli animali domestici si basa sull'equilibrio tra la formazione della placca batterica e l'adozione di strategie preventive adeguate. In condizioni normali, la placca dentale si accumula gradualmente sulle superfici dentali a seguito dell'ingestione di alimenti e, se non adeguatamente eliminata, subisce un processo di mineralizzazione che porta alla formazione del tartaro. Questo rappresenta il punto di partenza per lo sviluppo delle patologie orali più comuni. L'accumulo di placca e tartaro crea un ambiente favorevole alla crescita di microrganismi patogeni, principali responsabili dello sviluppo della gengivite e, negli stadi più avanzati, della parodontite. Con il progredire dell'infiammazione, i tessuti di sostegno del dente possono essere progressivamente danneggiati, fino a coinvolgere le strutture più profonde. Ciò può causare dolore, instabilità dentale e, nei casi più estremi, la perdita del dente stesso. Senza adeguate misure preventive, queste condizioni tendono a peggiorare gradualmente, compromettendo in modo significativo la salute orale complessiva. In questo specifico ambito, DentiHex si configura come un prezioso alleato nell'ambito dell'igiene orale degli animali da compagnia. La sua formulazione innovativa è studiata per aderire efficacemente alla superficie di denti e gengive, offrendo un'azione prolungata nel tempo che risulta particolarmente utile nella riduzione della carica batterica all'interno del cavo orale. L'impiego costante e regolare di questo prodotto non solo contribuisce in modo significativo al controllo della formazione della placca batterica, ma svolge anche un ruolo cruciale nel contrastare il processo di mineralizzazione responsabile della comparsa e dell'accumulo del tartaro dentale. Grazie a queste proprietà, DentiHex si rivela uno strumento essenziale per mantenere la salute orale e il benessere generale degli amici a quattro zampe. L'utilizzo di DentiHex si propone quindi come un valido supporto alle pratiche professionali di igiene dentale, contribuendo attivamente alla cura quotidiana della salute orale. La semplicità d'uso, insieme all'elevata tollerabilità e all'ottima accettazione da parte degli animali, ne incoraggia un impiego costante, elemento essenziale per preservare i benefici a lungo termine.

## Processo produttivo

Il processo di produzione del DentiHex è attentamente organizzato secondo gli standard *GMP*, assicurando sia la piena tracciabilità delle attività che il rigoroso rispetto delle SOP (11). Ogni

passaggio viene accuratamente documentato attraverso registrazioni ufficiali, permettendo una ricostruzione dettagliata dell'intero ciclo produttivo di ciascun lotto. La documentazione relativa alla produzione include dettagli come l'identificazione del prodotto e del lotto, le date di produzione e scadenza, il periodo di validità e la quantità realizzata. Queste informazioni rappresentano il fulcro del sistema di tracciabilità, consentendo di collegare ogni lotto alle condizioni specifiche di fabbricazione e ai responsabili delle operazioni eseguite. La fase di omogeneizzazione, realizzata con apparecchiature specifiche come il FrymaKoruma, (Figura 5) (FrymaKoruma AG, parte del Romaco Group, situata a Rheinfelden, in Svizzera), è cruciale per ottenere un bulk, cioè un prodotto sfuso, con caratteristiche fisico-chimiche uniformi al termine del processo di miscelazione. Questa uniformità è essenziale per assicurare la qualità, la stabilità e l'efficacia del prodotto finale. Un aspetto di fondamentale importanza è rappresentato dal controllo rigoroso e costante della pulizia delle attrezzature utilizzate nei processi aziendali. Le procedure operative previste dall'organizzazione stabiliscono che il periodo massimo intercorrente tra due interventi di sanificazione non debba in alcun caso superare il limite di dieci giorni. Nel caso in cui tale limite venga oltrepassato, diventa indispensabile procedere con un nuovo ciclo di pulizia accurata e una successiva sanificazione completa degli impianti, operazione da effettuare obbligatoriamente prima di riavviare qualunque attività produttiva. Questa strategia non solo mira a scongiurare potenziali rischi legati a contaminazioni crociate tra i diversi lotti di produzione, ma si pone anche l'obiettivo di assicurare il rispetto scrupoloso degli standard igienici richiesti, contribuendo così a garantire la qualità e la sicurezza dei prodotti finali dopo la produzione le attrezzature devono essere nuovamente lavate e sanificate. Questo obbligo serve a preservare le condizioni operative richieste e a garantire che il processo resti conforme alle indicazioni specificate nella documentazione di riferimento. Ogni passaggio viene monitorato e validato attraverso le firme e le sigle dei responsabili designati, attestando così la corretta esecuzione delle attività e l'assenza di deviazioni non autorizzate. (Figura 6)

La campagna produttiva è soggetta a un limite massimo di dieci giorni, al termine dei quali tutto l'equipaggiamento deve essere pulito e sottoposto a sanificazione, le attrezzature venivano sanificate seguendo le procedure operative standard dell'azienda, utilizzando detergenti e sanificanti che erano stati qualificati e validati in precedenza. Questi prodotti erano adatti a garantire l'eliminazione dei residui di prodotto e a prevenire il rischio di contaminazione incrociata. Questo requisito è fondamentale per mantenere le condizioni operative ideali e assicurare che il processo segua le direttive dettagliate nella documentazione ufficiale. Ogni fase viene attentamente supervisionata e certificata mediante firme e sigle dei responsabili incaricati, garantendo così l'esecuzione corretta delle operazioni e l'assenza di eventuali deviazioni non autorizzate. La produzione del bulk rappresenta la fase successiva, durante la quale vengono eseguiti controlli in processo (In-Process

Controls, IPC) per garantire il rispetto degli standard qualitativi stabiliti. Una volta conclusa questa fase, si passa al confezionamento, preceduto da un'attenta preparazione della linea produttiva. Tale preparazione comprende il controllo preliminare delle attrezzature, la rimozione di eventuali residui di materiale e la verifica della piena funzionalità dei macchinari utilizzati, come l'astucciatrice. (Figura 7) Durante il confezionamento si effettuano attività come l'imballaggio, il controllo dell'integrità e della completezza delle confezioni, oltre alla verifica della resa produttiva per assicurare il raggiungimento degli obiettivi prefissati. Ogni passaggio del processo, dalla produzione al confezionamento, viene documentato accuratamente e sottoposto all'approvazione del Responsabile della Qualità prima di autorizzare il rilascio del lotto.



Figura 5 Frymakoruma



Figura 6 Linea confezionamento

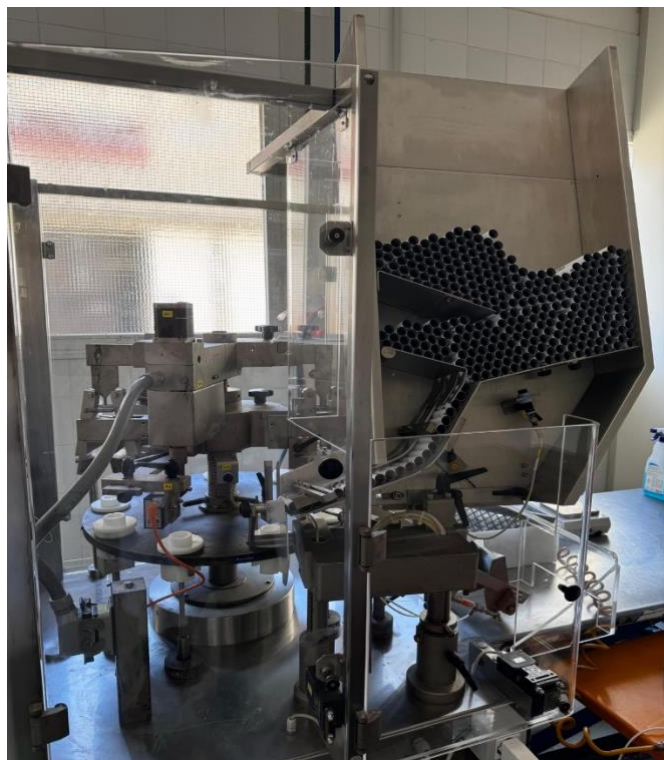


Figura 7 Macchina astucciatrice

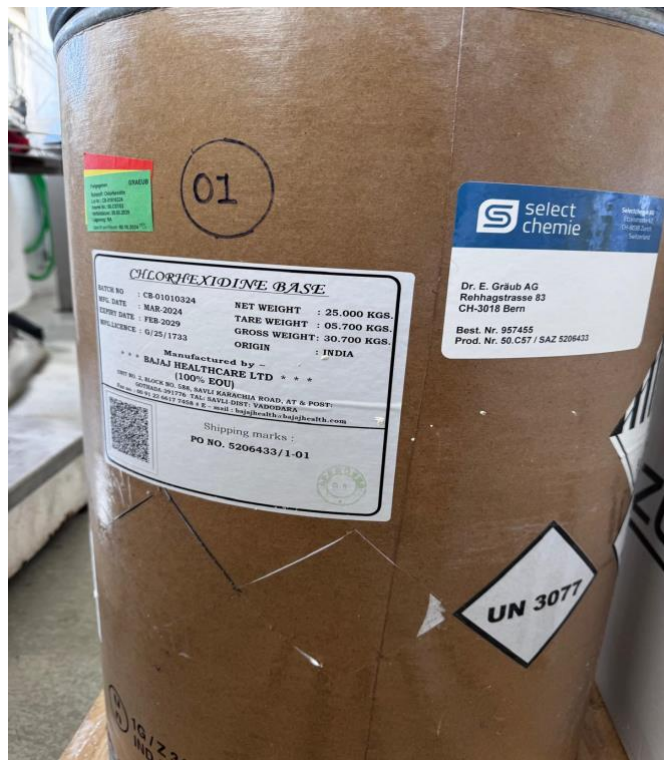


Figura 8 Materia prima Clorexidina

# TECNICHE ANALITICHE: HPLC

## Principi teorici

La cromatografia liquida ad alte prestazioni, nota come HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), rappresenta una tecnica analitica ampiamente adottata per separare, identificare e quantificare i vari componenti di una miscela complessa (6). Questo metodo si basa sull'interazione tra una fase mobile liquida e una fase stazionaria all'interno di una colonna cromatografica. Durante il passaggio all'interno della colonna, i diversi analiti, trasportati dalla fase liquida interagiscono in maniera diversa con la fase stazionaria, dando origine a velocità di migrazione differenti che portano alla loro separazione, questo perché ognuno possiede caratteristiche chimico-fisiche proprie, che determinano un diverso grado di interazione con la fase stazionaria e la fase mobile. La fase mobile, elemento essenziale nel processo cromatografico, è composta da uno o più solventi che svolgono il compito di trasportare gli analiti lungo il sistema cromatografico, garantendo così la progressione del campione attraverso le diverse fasi del processo. Nella tecnica di cromatografia liquida ad alte prestazioni a fase inversa, comunemente nota come RP-HPLC, la fase stazionaria è solitamente costituita da particelle di silice porosa. Queste particelle vengono chimicamente modificate attraverso l'attaccamento di catene idrofobiche per aumentare l'interazione con le molecole target. Le catene idrofobiche più comuni sono rappresentate da legami con gruppi specifici come C18 (octadecilsilano), C8 e C4. Tra queste opzioni, la fase C18 è di gran lunga la più utilizzata e apprezzata all'interno della comunità scientifica per la sua eccezionale abilità nel trattenere una vasta gamma di composti con diverse proprietà di idrofobicità. (6) Questa caratteristica la rende una scelta versatile e efficace in numerose applicazioni analitiche e di ricerca. Il processo di separazione cromatografica si basa su una serie di meccanismi specifici di interazione tra gli analiti e la fase stazionaria stessa. Tali meccanismi possono essere classificati in diverse tipologie principali, ciascuna caratterizzata da dinamiche uniche e da specifiche proprietà chimico-fisiche che influenzano la capacità di separazione dei componenti della miscela. I principali meccanismi di separazione cromatografica includono l'adsorbimento, la ripartizione, l'esclusione sterica, lo scambio ionico e l'affinità. Nell'ambito dell'HPLC, il meccanismo più frequentemente utilizzato è quello di ripartizione, che costituisce la base della cromatografia a fase inversa. Questo metodo è il più comune per analizzare composti farmaceutici come la clorexidina. La separazione avviene grazie alla diversa distribuzione degli analiti tra la fase mobile e quella stazionaria, a seconda della loro affinità con ciascuna delle due fasi. Diversi meccanismi cromatografici vengono utilizzati per applicazioni particolari. L'adsorbimento si basa sulle interazioni tra gli analiti e la superficie della fase stazionaria, mentre l'esclusione sterica permette di separare le molecole in base alle loro dimensioni. Lo scambio ionico sfrutta invece le

interazioni elettrostatiche reversibili tra specie cariche e gruppi ionici presenti sulla fase stazionaria. Infine, la cromatografia di affinità si basa su interazioni estremamente selettive tra l'analita e specifici ligandi fissati sulla fase stazionaria ed è principalmente utilizzata per la purificazione di biomolecole. Nel settore farmaceutico e nel controllo qualità, la tecnica più comunemente utilizzata è la cromatografia in fase inversa (RP-HPLC - Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography). In questo metodo, la fase stazionaria è di natura apolare, mentre la fase mobile risulta relativamente polare. All'interno di questo sistema, gli analiti caratterizzati da una maggiore idrofobicità tendono a stabilire interazioni più forti con la fase stazionaria, mostrando di conseguenza tempi di ritenzione superiori rispetto alle molecole dotate di una polarità più alta.

All'estremità della colonna è posizionato un rivelatore che opera in connessione diretta con un sistema di acquisizione dati avanzato. Questo sistema registra in maniera continua e precisa il segnale prodotto dagli analiti man mano che vengono eluiti attraverso la colonna. Il prodotto finale di questa analisi è il cromatogramma, un grafico dettagliato in cui l'intensità del segnale rilevato è tracciata in funzione del tempo, fornendo così una rappresentazione visiva del processo di separazione e rilevamento degli analiti. L'analisi qualitativa degli analiti si fonda sull'osservazione e la misurazione del tempo di ritenzione, definito come l'intervallo di tempo compreso tra il momento in cui il campione viene introdotto nel sistema cromatografico e quello in cui appare il relativo picco sul cromatogramma. Questo valore rappresenta una caratteristica distintiva per ogni composto quando le condizioni operative rimangono costanti, rendendolo un indicatore affidabile per determinare e confermare l'identità delle diverse sostanze analizzate. La determinazione quantitativa si fonda sulla misurazione dell'area del picco cromatografico, direttamente proporzionale alla quantità di analita presente nel campione. (6) La conversione di quest'area in una concentrazione può avvenire utilizzando diverse tecniche di calibrazione, come il metodo dello standard esterno, il metodo dello standard interno o il metodo delle aggiunte standard. (12)

## **Componenti dello strumento**

I principali componenti del sistema HPLC impiegato nel laboratorio aziendale sono elencati di seguito:

- Pompa Jasco PU-2089, equipaggiata con un sistema di erogazione a gradiente e un degasatore integrato.
- Rivelatore a fotodiodi (PDA) Jasco, progettato per rilevazioni accurate e versatili.
- Autocampionatore Jasco AS-2055 Plus, per una gestione automatizzata e precisa dei campioni.
- Forno termostato dedicato al mantenimento controllato della temperatura della colonna cromatografica.

- Personal computer configurato con interfaccia LC-Net II/ADC e software ChromNAV 2 CFR, ideali per l'acquisizione e il trattamento dei dati cromatografici.
- Colonne cromatografiche.

## Vantaggi e limiti

La cromatografia liquida ad alte prestazioni è una delle tecniche analitiche più utilizzate nei laboratori di ricerca e controllo qualità, apprezzata per la sua eccellente capacità di separazione, l'elevata sensibilità e la notevole riproducibilità (13). Questa metodologia si presta all'analisi di un'ampia gamma di composti, inclusi quelli non volatili o sensibili al calore, che risulterebbero difficilmente rilevabili con altre tecniche cromatografiche. Uno dei principali punti di forza dell'HPLC è rappresentato dalla buona risoluzione cromatografica, che consente di eseguire analisi sia qualitative che quantitative con un alto grado di precisione. Inoltre, questa tecnica si distingue per la sua straordinaria versatilità, trovando applicazione in una vasta gamma di settori, come l'industria farmaceutica, alimentare. Nonostante i suoi vantaggi, questa tecnica presenta alcune criticità, tra cui l'alto costo delle apparecchiature e della loro manutenzione, il considerevole utilizzo di solventi e la necessità di disporre di personale altamente specializzato per lo sviluppo, l'ottimizzazione e la validazione dei metodi analitici. I principali vantaggi e il limite della tecnica HPLC sono riassunti nella Tabella 1

| Caratteristica                | Vantaggi                                                                                                           | Limiti                                                                                                             |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Risoluzione                   | Alta risoluzione per miscele complesse.                                                                            | Richiede colonne cromatografiche in condizioni ottimali.                                                           |
| Applicabilità                 | Adatto a composti non volatili e termolabili.                                                                      | Non ideale per l'analisi di composti volatili (GC).                                                                |
| Sensibilità                   | Permette di rilevare e quantificare gli analiti a basse concentrazioni (mg/kg-ug/kg; fino a ng/kg con HPLC-MS/MS). | Dipende dal rilevatore e natura dell'analita; alcuni composti mostrano una risposta limitata con la rilevazione UV |
| Automazione e riproducibilità | Elevata automazione e ripetibilità delle corse.                                                                    | Manutenzione e calibrazione continua.                                                                              |

|                  |                          |                                                                                 |
|------------------|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Costi e ambiente | Ancora poco identificati | Strumentazione e colonne costosi con impatto ambientale per i rifiuti solventi. |
|------------------|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|

Tabella 1 Analisi dei benefici e delle limitazioni della tecnica HPLC

## OBIETTIVI DELLA TESI

Questa tesi si propone di validare un metodo cromatografico HPLC, finalizzato all'identificazione e alla quantificazione della clorexidina nel prodotto Dentihex. L'obiettivo è garantire un efficace controllo di qualità all'interno del laboratorio aziendale. L'obiettivo principale di questo lavoro consiste nel valutare la validità di un metodo analitico sviluppato per la determinazione quantitativa della clorexidina all'interno della matrice del prodotto in esame. A tal fine, il metodo è stato sottoposto a un processo di validazione nel corso del quale sono stati esaminati i principali parametri previsti dalle linee guida pertinenti, ICH Q2 (R1), al fine di verificarne l'accuratezza, la precisione, la specificità e la linearità, garantendo così l'affidabilità dei risultati ottenibili. (12) Una volta accertata la robustezza del metodo, questo è stato impiegato per l'analisi di campioni reali di Dentihex, allo scopo di determinarne il contenuto effettivo di principio attivo. Infine, è stata predisposta la documentazione tecnica necessaria a consentire il trasferimento del metodo al laboratorio di controllo qualità, così da permettere un utilizzo sistematico e continuativo nell'ambito dei processi di routine.

# MATERIALI E METODI: VALIDAZIONE DEL METODO HPLC PER LA CLOREXIDINA

## Reagenti e Solventi

Per sviluppare, validare e applicare il metodo cromatografico, sono stati utilizzati reagenti di grado analitico e solventi appropriati per analisi HPLC.

Diidrogenofosfato di potassio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) per preparare la fase mobile, purezza di almeno il 99%

Acido fosforico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) usato per regolare il pH della fase mobile purezza dell'85%

Metanolo, impiegato come solvente per la preparazione della soluzione principale di clorexidina, delle successive soluzioni standard di calibrazione e per la diluizione del campione prima dell'analisi cromatografica.

Etilacetato e l'acido formico, utilizzati per la preparazione del solvente di estrazione.

Il riferimento standard di clorexidina, specificando il tipo di sale impiegato (ad esempio, clorexidina digluconato o clorexidina base), è stato utilizzato per preparare le soluzioni standard necessarie per la costruzione della curva di calibrazione e la validazione del metodo.

L'acqua impiegata per la preparazione delle soluzioni e della fase mobile era acqua ultrapura per HPLC.

### ***Preparazione della fase mobile.***

La fase mobile A è stata preparata utilizzando una soluzione acquosa di diidrogenofosfato di potassio, resa acida con l'aggiunta di acido fosforico. La soluzione è stata realizzata impiegando acqua per HPLC, seguita da filtrazione con una membrana da 0,45  $\mu\text{m}$  e successivamente sottoposta a degasaggio per garantirne l'adeguata qualità prima dell'uso.

Il solvente di estrazione impiegato nella preparazione dei campioni era una miscela composta di etilacetato e acido formico (70:30 v/v). La soluzione veniva preparata quotidianamente e accuratamente miscelata prima dell'uso.

## Strumentazione

Per la preparazione dei campioni e delle soluzioni standard sono stati impiegati flaconcini in vetro dotati di tappi a vite e setti in PTFE/silicone, pipette volumetriche in vetro di classe A accuratamente tarate e matracci volumetrici graduati di classe A con diverse capacità. Le soluzioni sono state omogeneizzate utilizzando un vortex, mentre la dissoluzione e la rimozione dei gas dai campioni sono state ottimizzate grazie a un bagno ad ultrasuoni. I campioni sono stati pesati utilizzando una bilancia analitica con una sensibilità di 0,1 mg. Le analisi cromatografiche sono state eseguite utilizzando un sistema di cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) Jasco. Questo sistema comprendeva una pompa PU-2089, un autocampionatore AS-2055 Plus, un forno termostato per la conservazione della colonna cromatografica e un rivelatore a diodi fotoelettrici (PDA). Il tutto era interconnesso a un personal computer tramite l'interfaccia LC-Net II/ADC e gestito dal software ChromNAV 2 CFR per la raccolta e l'elaborazione dei dati cromatografici. La separazione cromatografica è stata realizzata mediante l'uso di una colonna analitica, operante secondo i parametri descritti dettagliatamente nella sezione relativa al metodo cromatografico.

## Preparazione delle soluzioni di lavoro

Il campione di bianco “blank” consiste in una soluzione contenente unicamente il solvente di estrazione, composto da una miscela di etilacetato e acido formico in proporzione 70:30 (v/v). Il campione bianco viene estratto e purificato con il resto dei campioni per verificare la presenza di interferenze cromatografiche derivanti dai solventi impiegati.

Due soluzioni contenenti clorexidina ad una concentrazione nominale di 0,4 mg/mL. sono state preparate prelevando  $20,0 \pm 0,2$  mg di clorexidina, utilizzando una bilancia analitica e sciogliendola in solvente di estrazione. La soluzione è stata agitata con vortex per un di 1 minuto.

### *Procedura per la preparazione delle soluzioni campione*

Per ogni campione, è stato pesato un quantitativo di prodotto di circa 1,00 g ( $1,00 \pm 0,01$  g), utilizzando una provetta con tappo a vite per mantenere l'integrità. Successivamente, sono stati aggiunti 5,0 mL di un solvente di estrazione composto da etilacetato e acido formico in rapporto 70:30 (v/v). La miscela ottenuta è stata sottoposta ad agitazione mediante vortex per 1 minuto, al fine di ottimizzare il processo di estrazione della clorexidina dalla matrice. I campioni sono stati in un bagno a ultrasuoni per 5 minuti, seguito da una breve agitazione a mano. Le soluzioni ottenute sono state poi centrifugate per 10 minuti a 5000 rpm, a 5 °C. In seguito, il surnatante (lo strato oleoso) è stato eliminato, la fase limpida sottostante è stata trasferita in vial, per l'analisi.

## Metodo qualitativo

La clorexidina viene individuata attraverso un meticoloso confronto dei risultati ottenuti dall'analisi cromatografica della soluzione standard di riferimento e quelli del campione in esame. Questo processo di identificazione si fonda essenzialmente sul confronto tra i tempi di ritenzione, specifici per ciascun composto, e lo spettro UV, ottenuto grazie al sofisticato utilizzo del rivelatore a fotodiodi (PDA). Nello specifico, il picco che viene associato alla clorexidina nel campione deve mostrare un tempo di ritenzione in perfetto allineamento con quello riscontrato nella soluzione standard, con una variazione accettabile che non superi  $\pm 0,5$  minuti. Inoltre, la somiglianza tra gli spettri UV funge da ulteriore conferma dell'identità del composto analizzato, garantendo un'elevata accuratezza nell'identificazione dell'analita in questione.

## Metodo quantitativo

La quantità di clorexidina presente nel Dentihex è stata determinata confrontando le risposte cromatografiche del campione e di una soluzione standard di riferimento. Il contenuto del principio attivo è stato calcolato calcolando il rapporto tra le aree dei picchi cromatografici dei due campioni, regolato tenendo conto dei fattori di diluizione e delle masse utilizzate nella preparazione delle rispettive soluzioni.

La quantità di clorexidina presente, espressa in percentuale sul peso totale (% g/g), è stata ricavata attraverso l'applicazione della seguente formula matematica:

$$\text{Contenuto di clorexidina (\% g/g)} = \frac{FP \times EWS \times 5}{EWP \times FS \times 50 \times 10}$$

In tale equazione, le variabili rappresentano:

- EWP indica la massa del campione misurata in grammi (g);
- FP si riferisce all'area del picco della clorexidina rilevata nella soluzione del campione;
- FS rappresenta l'area del picco della clorexidina misurata nella soluzione standard;
- EWS è la massa dello standard di riferimento impiegata per preparare la soluzione standard;
- I numeri 5 e 50 sono i fattori di diluizione adottati rispettivamente per il campione e lo standard;
- Il valore 10 è il fattore di conversione richiesto per riportare il risultato finale in percentuale (% g/g).

La formula applicata permette di calcolare la quantità di clorexidina presente nel prodotto e di verificarla rispetto agli standard di accettazione stabiliti dall'azienda. Il valore risultante rappresenta il parametro quantitativo fondamentale per determinare la conformità del lotto sottoposto a analisi.

## Parametri di validazione

I parametri di validazione sono stati considerati come definiti nella linea guida ICH Q2(R1) (7).

### *Specificità*

Per ogni campione, è stata pesata una quantità di prodotto di circa 1,00 g (con un margine di  $\pm 0,01$  g), utilizzando una provetta con tappo a vite per preservarne l'integrità. La specificità di un metodo analitico è la capacità di identificare e quantificare in maniera univoca l'analita in presenza di altre sostanze nel campione, come eccipienti, impurità, prodotti di degradazione o componenti della matrice. Questo parametro è essenziale per assicurare l'affidabilità del metodo analitico. La specificità del metodo HPLC per la misurazione della clorexidina è stata testata tramite l'analisi del bianco dei reagenti, del bianco della matrice, della soluzione standard di clorexidina e del campione commerciale DentiHex. Questo è stato eseguito utilizzando le condizioni cromatografiche stabilite dal metodo validato. I cromatogrammi risultanti sono stati analizzati per garantire che non ci fossero picchi interferenti nel tempo di ritenzione della clorexidina. L'identificazione del picco è stata confermata attraverso la comparazione tra il tempo di ritenzione e lo spettro UV ottenuto con il rivelatore a diodi (DAD) e quelli della soluzione standard. L'assenza di interferenze nei cromatogrammi dei bianchi, sia dei reagenti che della matrice, ha dimostrato l'efficacia del metodo nel distinguere in modo selettivo la clorexidina dagli altri elementi della formulazione. Di conseguenza, il metodo si è dimostrato specifico e adeguato per la misurazione quantitativa della clorexidina nel prodotto DentiHex.

### *Linearità*

La linearità indica la capacità di un metodo analitico di generare risultati proporzionali alla concentrazione dell'analita presente nel campione, all'interno di uno specifico intervallo operativo. La valutazione di questo parametro permette di comprovare che la risposta dello strumento segue un andamento prevedibile in funzione delle variazioni nella concentrazione della sostanza presa in esame. La linearità del metodo HPLC per la determinazione della clorexidina è stata verificata conformemente alla linea guida ICH Q2(R1). A tal fine, sono state analizzate soluzioni standard con concentrazioni progressive, preparate all'interno del range operativo stabilito per il metodo. Per ciascuna soluzione standard è stata misurata l'area del picco cromatografico relativo alla clorexidina. I valori ottenuti sono stati impiegati per elaborare la curva di calibrazione, rappresentando la risposta strumentale in relazione alla concentrazione teorica. La linearità del sistema è stata verificata attraverso un'analisi di regressione lineare dei dati sperimentali e il calcolo del coefficiente di correlazione (R). Il metodo è stato valutato come lineare quando il coefficiente di correlazione raggiungeva un valore pari o superiore a 0,990, conformemente ai criteri di accettazione stabiliti dalla

procedura interna. La validità del modello lineare è stata ulteriormente confermata attraverso l'analisi della disposizione dei dati sperimentali in relazione alla retta di regressione.

### ***Accuratezza***

L'accuratezza indica quanto il valore ottenuto sperimentalmente si avvicina al valore reale o di riferimento dell'analita. Questo parametro serve a identificare eventuali errori sistematici nel metodo utilizzato e a verificarne l'affidabilità nel produrre risultati precisi e corretti. L'accuratezza del metodo HPLC per la determinazione della clorexidina è stata verificata conformemente alla linea guida ICH Q2(R1) attraverso test di recupero. Per questo scopo sono state realizzate soluzioni o campioni arricchiti con quantità note di clorexidina a varie concentrazioni, rappresentative del range operativo del metodo analitico. Per ogni livello di analisi, è stata misurata la concentrazione recuperata attraverso l'uso di tecniche di analisi cromatografica. Successivamente, il recupero percentuale è stato determinato effettuando un confronto tra il valore sperimentale ottenuto e la quantità teorica che era stata inizialmente aggiunta al sistema. L'accuratezza del metodo è stata ritenuta soddisfacente quando il recupero medio si attestava tra il 98% e il 102% per ogni livello di concentrazione esaminato. Parallelamente, la variabilità dei risultati è stata verificata attraverso il calcolo della deviazione standard relativa (RSD), che doveva essere entro il limite del 4,0%. Il rispetto di questi parametri conferma l'affidabilità del metodo nell'identificare con precisione il contenuto di clorexidina nella matrice analizzata.

### ***Precisione (ripetibilità)***

La precisione rappresenta il livello di concordanza tra i risultati ottenuti da misurazioni ripetute sul medesimo campione, eseguite in condizioni specifiche. Come indicato nella linea guida ICH Q2(R1), essa può essere analizzata su differenti livelli: ripetibilità, precisione intermedia e riproducibilità. La ripetibilità indica il grado di precisione di un metodo quando viene applicato in condizioni operative costanti. Questo significa utilizzare la medesima strumentazione, affidarsi allo stesso operatore e lavorare nello stesso laboratorio, il tutto entro un intervallo di tempo circoscritto. La precisione del metodo HPLC per la determinazione della clorexidina è stata verificata analizzando sei preparazioni distinte ( $n = 6$ ) di un campione da laboratorio con una concentrazione nominale del 100% di clorexidina. Per ogni preparazione, il contenuto del principio attivo è stato misurato seguendo la procedura analitica specificata. La precisione del metodo è stata valutata calcolando la deviazione standard relativa (RSD) delle concentrazioni misurate.

Criterio di accettazione:

L'RSD delle concentrazioni di clorexidina deve essere pari o inferiore al 2,0% ( $n = 6$ ).

Il rispetto di questo requisito conferma la capacità del metodo di garantire risultati riproducibili nelle medesime condizioni operative.

### ***Limite di rilevamento (LOD), Limite di quantificazione (LOQ)***

Tra i parametri considerati durante la fase di validazione di un metodo analitico vi sono il limite di rilevamento (LOD, *Limit of Detection*) e il limite di quantificazione (LOQ, *Limit of Quantification*). Il LOD indica la minima quantità di analita che il metodo è in grado di rilevare, pur senza garantire una stima quantitativa affidabile. Al contrario, il LOQ rappresenta la più bassa concentrazione di analita che può essere quantificata con livelli soddisfacenti di accuratezza e precisione, come definito dalle linee guida ICH Q2(R1). Determinare questi parametri permette di valutare la sensibilità del metodo e di verificarne l'adeguatezza per l'uso previsto. Le linee guida internazionali offrono diversi approcci per stimarli, applicabili sia ai metodi strumentali sia a quelli non strumentali. Per quanto riguarda le tecniche cromatografiche, la stima può essere effettuata attraverso il rapporto segnale/rumore o tramite l'impiego della deviazione standard della risposta abbinata alla pendenza della curva di calibrazione, come indicato nella normativa ICH Q2(R1). La determinazione dei parametri di LOD (limite di rilevabilità) e LOQ (limite di quantificazione) riveste un ruolo cruciale, poiché consente di dimostrare in maniera inequivocabile che il metodo analitico sviluppato possiede la sensibilità necessaria per rilevare e misurare con precisione la clorexidina alle concentrazioni considerate rilevanti. Questo processo è essenziale per garantire l'affidabilità dei risultati ottenuti, assicurando al contempo che essi siano pienamente conformi agli standard richiesti nell'ambito delle attività di controllo qualità e rispondano efficacemente alle esigenze specifiche dell'applicazione prevista.

### ***Robustezza e stabilità***

Nell'analisi della robustezza del metodo è stata anche approfondita la stabilità delle soluzioni analitiche durante il periodo di permanenza nell'autocampionatore HPLC.

Per valutare la stabilità delle soluzioni analitiche e garantire che la concentrazione di clorexidina restasse costante durante il tempo richiesto per le analisi cromatografiche, sono stati predisposti due campioni: uno di riferimento e uno di laboratorio. I campioni sono stati conservati nell'autocampionatore HPLC alla temperatura di 20 °C e sottoposti a analisi a intervalli di 0, 2, 4, 6 e 8 ore dalla loro preparazione. Per ogni intervallo temporale considerato, è stato calcolato il tasso di recupero della clorexidina. Questo è stato ottenuto mettendo a confronto l'area del picco relativo alla sostanza analizzata con l'area corrispondente misurata al tempo iniziale, ovvero al momento zero ( $t =$

0 h). Parallelamente, è stata effettuata un'analisi approfondita dei cromatogrammi al fine di individuare l'eventuale presenza di nuovi picchi. Questi ultimi potrebbero essere indicativi di processi di degradazione del composto o della potenziale formazione di impurità, fenomeni rilevanti per valutare la stabilità e la purezza della sostanza nel tempo.

Criteri di accettazione:

- Recupero compreso tra il 98% e il 102% rispetto all'area del picco iniziale ( $t = 0$  h).
- Assenza di nuovi picchi cromatografici oltre a quelli rilevati al tempo iniziale.

Individuazione del periodo temporale finale in cui vengono rispettati i criteri di accettazione

## **APPLICAZIONE AL PRODOTTO DENTIHEX**

### **Campioni analizzati**

Lotto di DentiHex

Per l'applicazione del metodo HPLC sul prodotto finito è stato esaminato il lotto DentiHex n. 26020313, analizzato in data 17 marzo 2026.

Il riferimento standard impiegato è rappresentato dalla clorexidina di grado analitico, identificata con il lotto LRAD6793.

Lo standard di clorexidina è stato prodotto da Sigma-Aldrich RTC, azienda con sede a Laramie (Wyoming, USA) e accreditata da ANAB come produttore di materiali di riferimento secondo ISO 17034.

La purezza certificata del lotto LRAD6793 ha un valore di 99,1%. (18)

Matrice bianca

Per condurre le attività di validazione, è stata utilizzata una matrice bianca (placebo) composta dalla stessa formulazione del prodotto, ma priva del principio attivo. Questa matrice includeva gli stessi eccipienti presenti nel DentiHex, ovvero paraffina liquida, vanillina e Carbopol 980, mantenuti nelle identiche proporzioni della formulazione finale. La matrice bianca è stata utilizzata per condurre studi riguardanti specificità, linearità, accuratezza, precisione e stabilità delle soluzioni. Questo approccio ha permesso di verificare l'assenza di interferenze attribuibili agli eccipienti e di valutare l'efficacia del metodo nelle condizioni operative previste.

## RISULTATI

L'analisi del campione Dentihex, lotto 26020313 (identificato come campione C1), è stata condotta tramite HPLC-DAD, utilizzando come standard di riferimento la clorexidina PHR1421, lotto LRAD6793, con una purezza dichiarata del 99,10%. Il controllo di idoneità del sistema (System Suitability Test, SST) ha confermato una buona ripetibilità della risposta cromatografica. I fattori di risposta per le due preparazioni standard sono stati rispettivamente 297184,14 e 295479,95, con una differenza percentuale dello 0,57%, soddisfacendo così i criteri di accettazione previsti. Nel cromatogramma del campione è stato rilevato un picco con un tempo di ritenzione che corrisponde a quello della soluzione standard di clorexidina; inoltre, l'analisi degli spettri UV acquisiti dal rivelatore DAD ha confermato l'identità dell'analita. Il cromatogramma del blank non ha mostrato alcun picco che interferisse nell'intervallo di eluizione della clorexidina. I risultati della verifica dell'identificazione qualitativa della clorexidina sono riportati nella Tabella 2. La determinazione quantitativa è stata eseguita con un'area del picco del campione di 6.342.366 e un'area dello standard di 6.903.588, utilizzando un peso del campione di 1,06777 g e un peso dello standard di 23,23 mg. Il calcolo ha rivelato un contenuto di clorexidina dello 0,20% (g/g). Analizzando i risultati del lotto 26020313 rispetto alla specifica aziendale per la clorexidina (0,18–0,22% g/g), si conferma che è conforme ai requisiti qualitativi e quantitativi determinati dal metodo analitico e dalle specifiche di prodotto.

| PARAMETRO              | CRITERIO DI ACCETTAZIONE                              | ESITO    |
|------------------------|-------------------------------------------------------|----------|
| Tempo di ritenzione    | Differenza $\leq \pm 0,5$ min. rispetto allo standard | Conforme |
| Spettro UV             | Sovrapponibile allo standard                          | Conforme |
| Interferenze nel blank | Assenti                                               | Conforme |

Tabella 2 Verifica dell'identificazione qualitativa della clorexidina

### ***Determinazione quantitativa della clorexidina***

Per la determinazione della quantità di clorexidina presente nel campione, è stato implementato il metodo analitico descritto in precedenza. Questo approccio prevede una procedura di confronto tra le aree dei picchi ottenuti dalle analisi cromatografiche del campione e della soluzione standard, seguita dal calcolo del contenuto percentuale attraverso una formula opportunamente validata che garantisce elevata precisione e affidabilità. L'indagine condotta sul lotto identificato come Dentihex n. 26020313

ha rivelato un contenuto di clorexidina pari allo 0,20 % (g/g). Tale valore rientra perfettamente nell'intervallo di accettazione stabilito dalle specifiche aziendali, che prevedono una concentrazione compresa tra lo 0,18 % e lo 0,22 % (g/g). Questo risultato attesta la conformità del lotto analizzato ai requisiti di qualità interni, assicurando che il prodotto rispetti gli standard previsti per il suo utilizzo. Il risultato della determinazione quantitativa della clorexidina e il relativo confronto con la specifica aziendale sono riportati nella Tabella 3.

| PARAMETRO           | SPECIFICA AZIENDALE | RISULTATO |
|---------------------|---------------------|-----------|
| Clorexidina (% g/g) | 0,18-0,22           | 0,20      |
| Conformità          | Conforme            | Conforme  |

Tabella 3 Risultato della determinazione quantitativa

## REPORT DI ANALISI

|                          | SST 3 |           |
|--------------------------|-------|-----------|
| Peso std1                |       | 23,23     |
| area std1                |       | 6903588   |
| FR std 1                 |       | 297184,14 |
| Peso std2                |       | 19,85     |
| area std2                |       | 5865277   |
| FR std2                  |       | 295479,95 |
| Diff% FR std 1 / Fr std2 |       | 0,57      |

| Lotto n°            | n° identif. campione |
|---------------------|----------------------|
| 26020313            | C1                   |
| Clorexidina % (g/g) | 0,2                  |
| Area campione       | 6342366              |
| area standard       | 6903588              |
| peso campione in g  | 1,06777              |
| peso stand in mg    | 23,23                |
| Ris: g/g %          | 0,2                  |

| Standard utilizzato | Codice  | Lotto    | Purezza |
|---------------------|---------|----------|---------|
| Clorexidina         | PHR1421 | LRAD6793 | 99,10%  |

Figura 5 Analisi del report HPLC relativo al lotto Dentihex, impiegato per la quantificazione della clorexidina.

### Verifica dell'idoneità del sistema cromatografico

La verifica dell'idoneità del sistema cromatografico, nota anche come System Suitability Test (SST), è stata accuratamente condotta prima di procedere con l'analisi dei campioni. Questo passaggio preliminare si è reso necessario per garantire che le condizioni operative dello strumento fossero pienamente conformi ai requisiti specifici richiesti per eseguire in maniera accurata e riproducibile sia le determinazioni qualitative sia quelle quantitative. Tale verifica ha rappresentato un aspetto fondamentale per assicurare l'affidabilità dei risultati analitici e la validità complessiva delle

misurazioni effettuate. **I parametri valutati e i relativi limiti di accettazione sono riportati nella Tabella 4.** È stata effettuata la valutazione dei parametri stabiliti dalla procedura interna, comprendendo la simmetria del picco dello standard, la variazione delle aree nelle sei iniezioni consecutive, il fattore di risposta, la stabilità della risposta cromatografica e il numero di piatti teorici. Tutti i requisiti di accettazione sono stati pienamente rispettati, permettendo così l'approvazione della sequenza analitica.

| PARAMETRO                                   | LIMITE  |
|---------------------------------------------|---------|
| Simmetria del picco                         | 0,8-2,0 |
| RSD area standard (n=6)                     | ≤2,0%   |
| Deviazione fattore di risposta              | ≤5,0%   |
| Deviazione area standard/inizio/centro/fine | ≤5,0%   |
| Piatti teorici                              | ≥1500   |

Tabella 4 Parametri di Sistem Stability Test

#### ***Valutazione della precisione del metodo***

La precisione del metodo è stata verificata attraverso un'analisi statistica delle aree dei picchi cromatografici generate dai campioni contenenti clorexidina. Dopo aver escluso un dato anomalo riscontrato, l'elaborazione statistica è stata condotta su cinque misurazioni (n = 5). La deviazione standard è stata impiegata per determinare la dispersione assoluta dei dati raccolti, mentre il coefficiente di variazione (CV) è servito a quantificare la variabilità relativa della risposta cromatografica ottenuta. Il coefficiente di variazione calcolato si è attestato al 7,2 %, segnalando una notevole coerenza tra le misurazioni effettuate e un livello soddisfacente di ripetibilità del metodo nelle condizioni operative applicate. I dati relativi alle aree cromatografiche e i principali parametri statistici ottenuti dall'elaborazione delle misurazioni sono riportati nella Tabella 6.

#### ***Valutazione della specificità del metodo***

La specificità del metodo è stata valutata mediante confronto dei cromatogrammi ottenuti per il bianco, la matrice placebo, la soluzione standard e il campione commerciale, seguendo le indicazioni stabilite nel protocollo di validazione. Il metodo ha dimostrato la sua capacità di distinguere l'analita dalle altre componenti della formulazione, grazie all'assenza di segnali interferenti sia nel blank che

nella matrice placebo al tempo di ritenzione della clorexidina. Inoltre, il picco associato alla clorexidina è apparso nettamente separato dagli altri segnali rilevati nel cromatogramma del prodotto.

#### ***Analisi comparativa rispetto alle specifiche aziendali***

Il valore quantitativo ottenuto attraverso l'analisi del lotto denominato DentiHex è stato attentamente messo a confronto con le norme di riferimento stabilite dalle specifiche aziendali per il rilascio del prodotto. In base a tali specifiche, il contenuto di clorexidina deve essere compreso in un range ben definito che va dallo 0,18% allo 0,22% (g/g). I risultati sperimentali ottenuti per il lotto in esame, pari allo 0,20% (g/g), si collocano perfettamente all'interno di tale intervallo, a conferma della piena conformità del prodotto agli rigorosi requisiti di qualità previsti dall'azienda. Il confronto tra il valore ottenuto e le specifiche aziendali è specificato nella Tabella 5

| <b>Parametro</b>    | <b>Specifica</b> | <b>Risultato</b> |
|---------------------|------------------|------------------|
| Clorexidina (% g/g) | 0,18-0,22        | 0,20             |
| Stato del lotto     | Conforme         | Conforme         |

Tabella 5 Confronto con le specifiche aziendali

## Solidità statistica

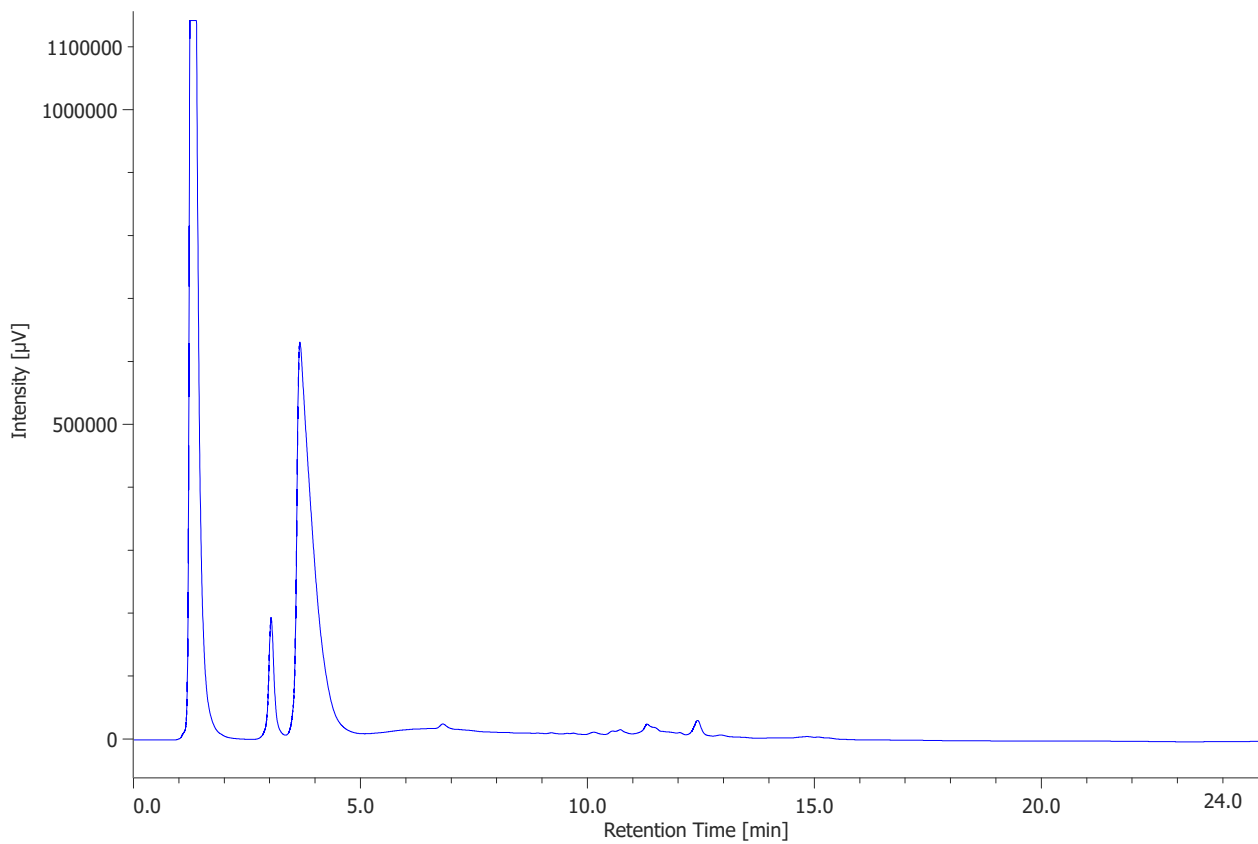
| #        | Chromatogram Name               | CH | Clorexidina | Total          | Executed Sequence      | Project name           | Acquisition Time |
|----------|---------------------------------|----|-------------|----------------|------------------------|------------------------|------------------|
| 1        | blank                           | 9  | N/A         | 0              | DENTIHEX<br>17-03-2026 | Clorexidina_2026_Lab04 | 17/03/2026       |
| 2        | std 1<br>17032026               | 9  | 6904170     | 6904170        | DENTIHEX<br>17-03-2026 | Clorexidina_2026_Lab04 | 17/03/2026       |
| 3        | std 1<br>17032026-              | 9  | 6903005     | 6903005        | DENTIHEX<br>17-03-2026 | Clorexidina_2026_Lab04 | 17/03/2026       |
| 4        | std 2<br>17032026               | 9  | 5865277     | 5865277        | DENTIHEX<br>17-03-2026 | Clorexidina_2026_Lab04 | 17/03/2026       |
| 5        | C1 - 26020313                   | 9  | 6342366     | 6342366        | DENTIHEX<br>17-03-2026 | Clorexidina_2026_Lab04 | 17/03/2026       |
| 6        | std 1<br>17032026 fine<br>lista | 9  | 6921530     | 6921530        | DENTIHEX<br>17-03-2026 | Clorexidina_2026_Lab04 | 17/03/2026       |
|          |                                 |    |             |                |                        |                        |                  |
| Total    |                                 |    |             | 32936348,00000 |                        |                        |                  |
| Mean     |                                 |    |             | 6587269        |                        |                        |                  |
| SD(n)    |                                 |    |             | 422633,6509    |                        |                        |                  |
| CV(n)    |                                 |    |             | 6,415916       |                        |                        |                  |
| SD(n-1)  |                                 |    |             | 472518,7322    |                        |                        |                  |
| CV(n-1)  |                                 |    |             | 7,173212       |                        |                        |                  |
| Min.     |                                 |    |             | 5865277        |                        |                        |                  |
| Median   |                                 |    |             | 6903005        |                        |                        |                  |
| Max      |                                 |    |             | 6921530        |                        |                        |                  |
| Used n.  |                                 |    |             | 5              |                        |                        |                  |
| Total n. |                                 |    |             | 6              |                        |                        |                  |

Tabella 6 Aree cromatografiche integrate derivate dall'analisi dei campioni contenenti clorexidina.

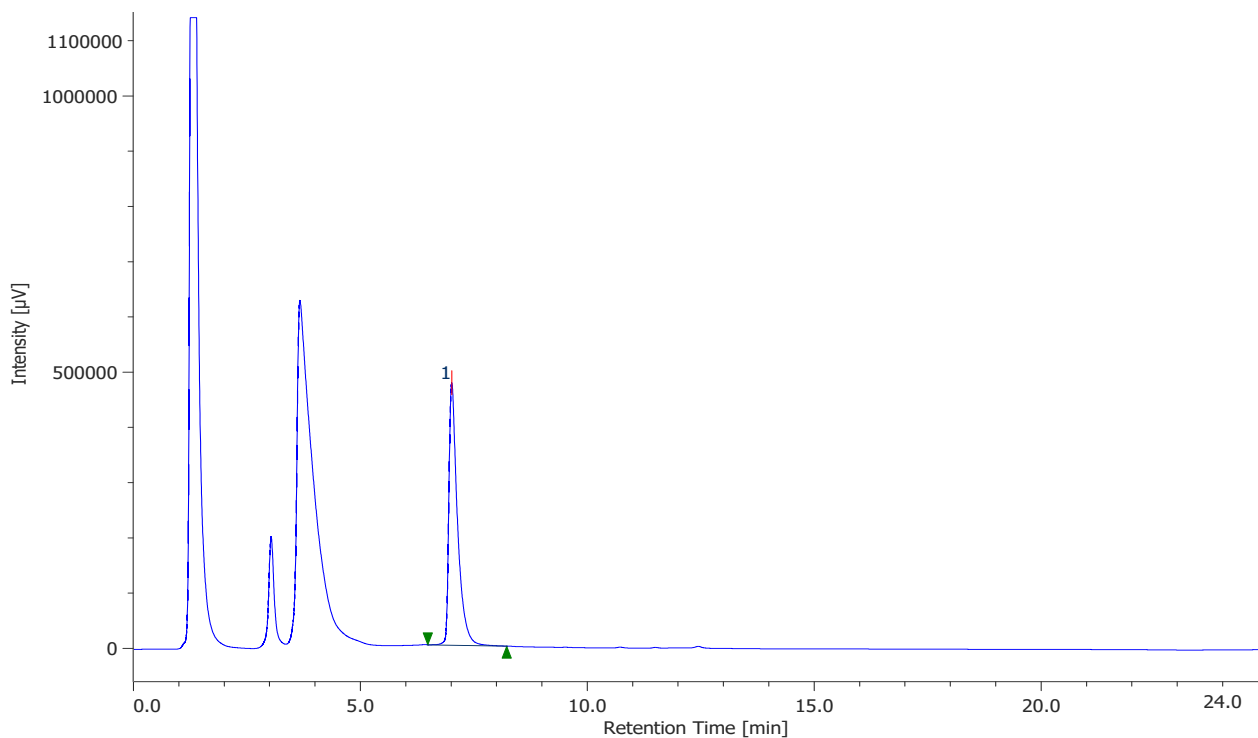
Dato che uno dei dati raccolti è stato rimosso dall'analisi statistica, i calcoli sono stati effettuati considerando un totale di cinque determinazioni ( $n = 5$ ). La deviazione standard (SD), che viene espressa mediante le stesse unità di misura utilizzate per le aree cromatografiche, fornisce una misura chiara della dispersione assoluta dei dati rispetto al valore medio calcolato. Per ottenere una valutazione più dettagliata della variabilità relativa associata al metodo adottato, si è provveduto anche al calcolo del coefficiente di variazione (CV), uno strumento utile per confrontare la variabilità dei dati in termini percentuali rispetto alla media, indipendentemente dall'unità di misura utilizzata. Il campione bianco (blank) è stato inserito nella sequenza analitica sia come controllo sia per registrare le condizioni di acquisizione relative alla sessione cromatografica.

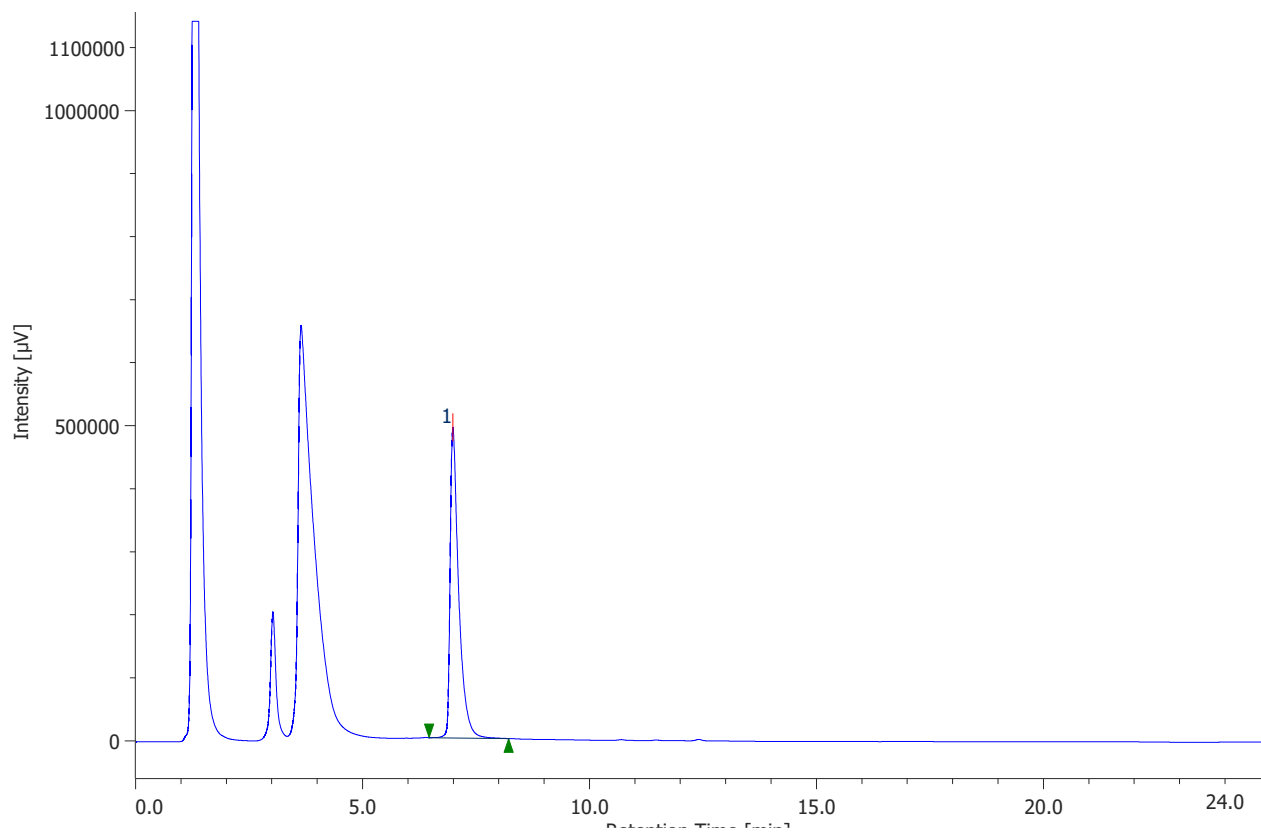
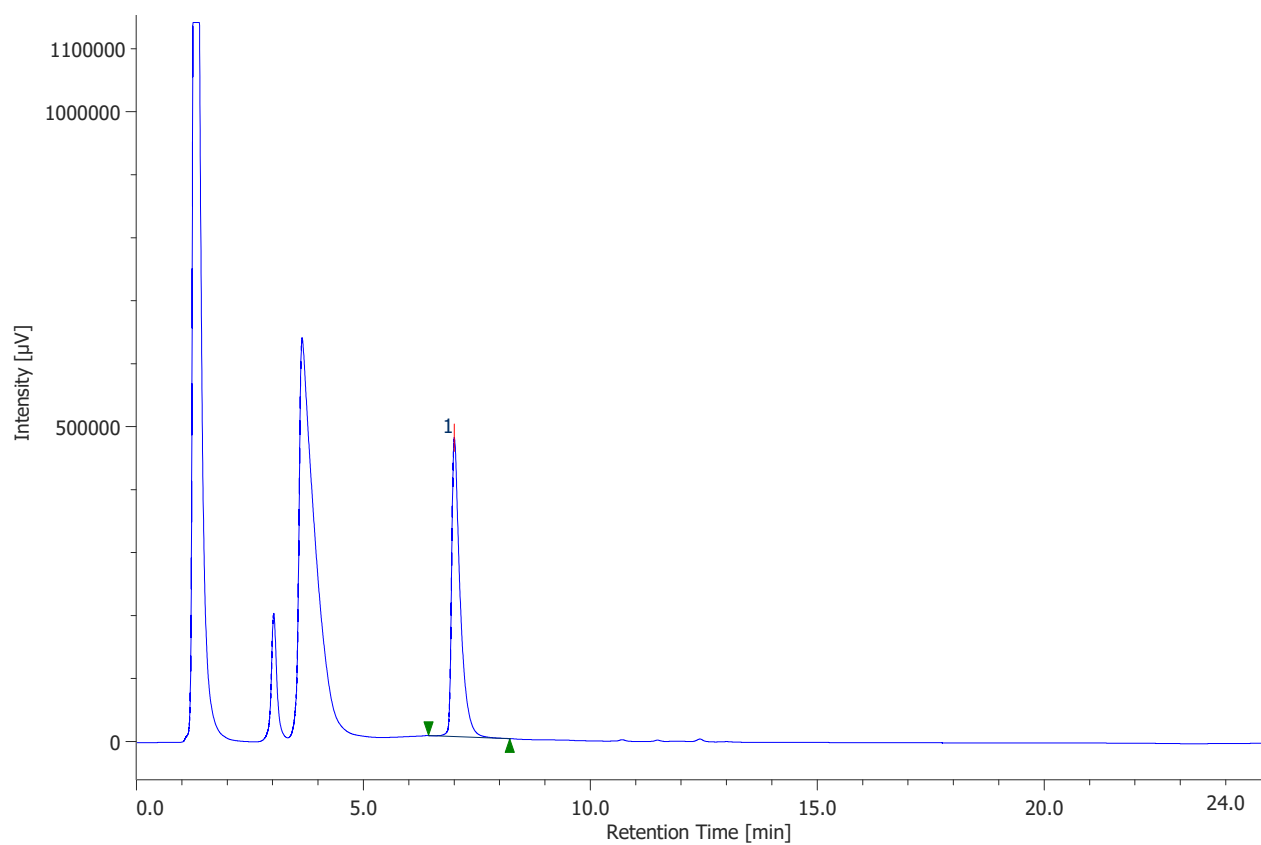


## Cromatogramma



*Figura 9 Il cromatogramma risultante dall'analisi HPLC della clorexidina, accompagnato dai dati sperimentali elaborati, è stato utilizzato per valutare le prestazioni*





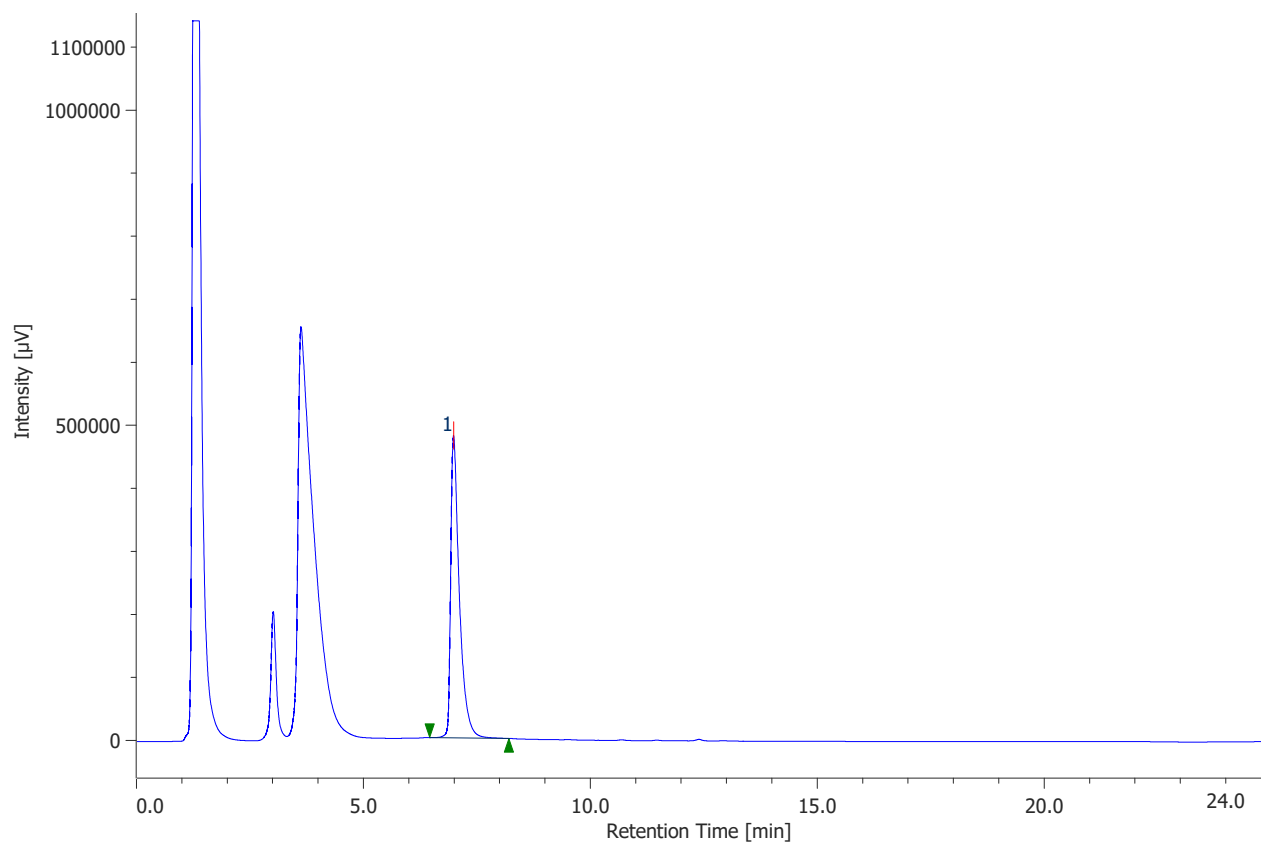
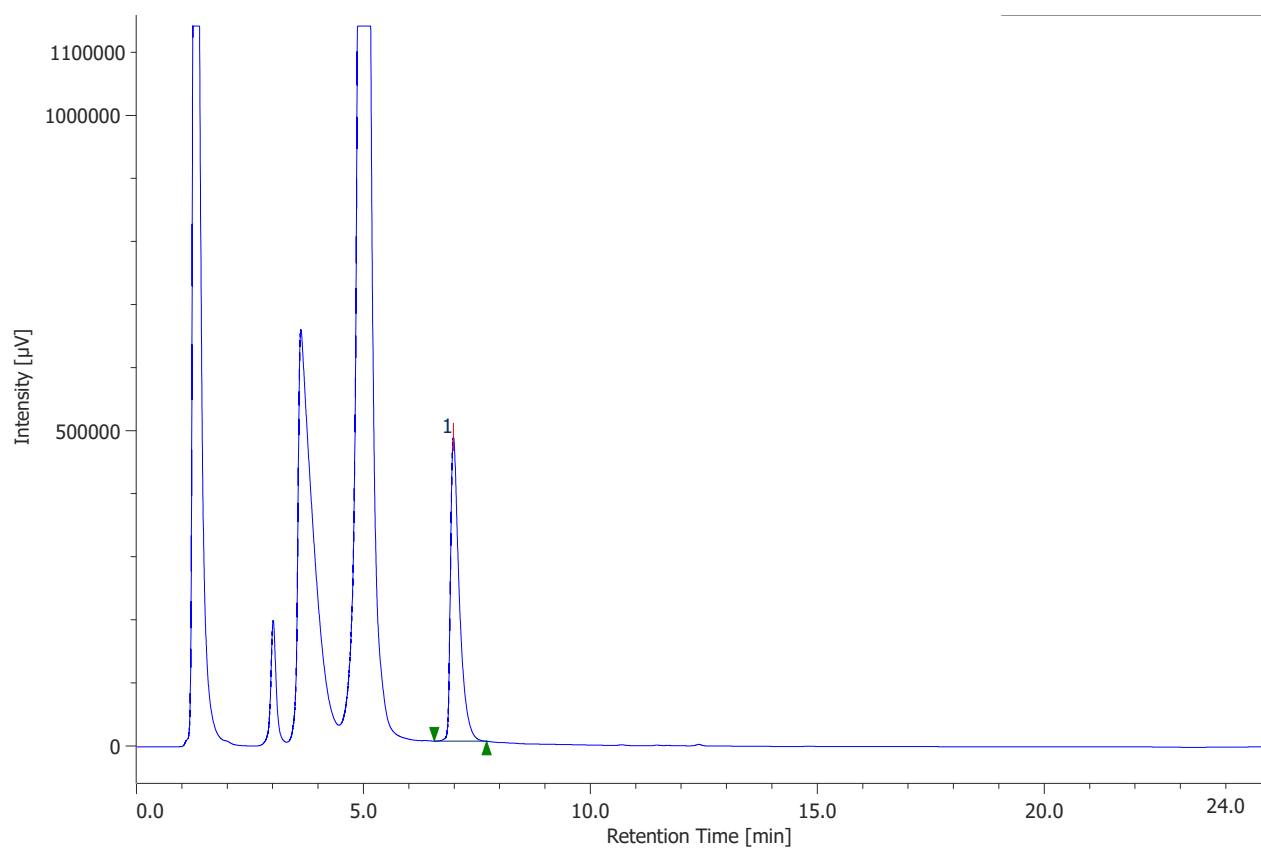


Figura 10 Cromatogrammi esemplificativi HPLC relativi al blank, allo standard di clorexidina e al prodotto Dentihex impiegati per l'analisi dell'identificazione e la quantificazione del principio attivo.

Nel cromatogramma, (Figure 9 e 10) l'asse delle ascisse indica il tempo di ritenzione, un parametro fondamentale per identificare qualitativamente le sostanze presenti nel campione. L'asse delle ordinate, invece, misura l'intensità del segnale rilevato, che viene impiegata per scopi quantitativi. Sono stati presentati il cromatogramma del bianco, quello dello standard di clorexidina e quello del prodotto in esame. Il bianco, costituito unicamente dal solvente di estrazione privo sia di analita che di standard interno, è stato utilizzato per verificare l'eventuale presenza di segnali interferenti o contaminazioni legate ai reagenti impiegati. La stabilità della linea di base e l'assenza di picchi significativi nei tempi di ritenzione rilevanti confermano che i segnali riscontrati nei campioni analizzati sono esclusivamente attribuibili ai composti di interesse. Nel cromatogramma dello standard si distingue chiaramente il picco relativo alla clorexidina. Nel cromatogramma del prodotto, oltre al picco associato alla clorexidina, compare anche un ulteriore segnale attribuibile a uno degli eccipienti presenti nella formulazione.

Tabella dei picchi

Channel & Peak Information Table

|                   |                      |
|-------------------|----------------------|
| chromatogram name | Blank-CH9            |
| Sample name       |                      |
| Channel Name      | 230.0nm              |
| chromatogram name | std 1 17032026 - CH9 |
| Sample name       |                      |
| Channel Name      | 230,0nm              |

| # | Peak Name   | CH | TR(min) | Area (uV sec) | Height % | Area % | Height % | Quantity | NTP  | Resolution | Symmetry Factor | Warning |
|---|-------------|----|---------|---------------|----------|--------|----------|----------|------|------------|-----------------|---------|
| 1 | Clorexidine | 9  | 6,797   | 6904170       | 570916   | 100    | 100      | N/A      | 8835 | N/A        | 2,694           |         |

|                   |                      |
|-------------------|----------------------|
| chromatogram name | std 1 17032026 - CH9 |
| Sample name       |                      |
| Channel Name      | 230,0nm              |

| # | Peak Name   | CH | TR(min) | Area (uV sec) | Height % | Area % | Height % | Quantity | NTP  | Resolution | Symmetry Factor | Warning |
|---|-------------|----|---------|---------------|----------|--------|----------|----------|------|------------|-----------------|---------|
| 1 | Clorexidine | 9  | 6,81    | 6903005       | 574349   | 100    | 100      | N/A      | 9154 | N/A        | 2,751           |         |

|                   |                      |
|-------------------|----------------------|
| chromatogram name | std 2 17032026 - CH9 |
| Sample name       |                      |
| Channel Name      | 230,0nm              |

| # | Peak Name | CH | TR(min) | Area (uV sec) | Height % | Area % | Height % | Quantity | NTP | Resolution | Symmetry Factor | Warning |
|---|-----------|----|---------|---------------|----------|--------|----------|----------|-----|------------|-----------------|---------|
|---|-----------|----|---------|---------------|----------|--------|----------|----------|-----|------------|-----------------|---------|

|   |             |   |      |         |        |     |     |     |      |     |       |  |
|---|-------------|---|------|---------|--------|-----|-----|-----|------|-----|-------|--|
| 1 | Clorexidine | 9 | 6,83 | 5865277 | 489892 | 100 | 100 | N/A | 9334 | N/A | 2,691 |  |
|---|-------------|---|------|---------|--------|-----|-----|-----|------|-----|-------|--|

chromatogram name

C1 - 26020313 - CH9

Sample name

Channel Name

230,0nm

| # | Peak Name   | CH | TR(min) | Area (uV sec) | Height % | Area % | Height % | Quantity | NTP  | Resolution | Symmetry Factor | Warning |
|---|-------------|----|---------|---------------|----------|--------|----------|----------|------|------------|-----------------|---------|
| 1 | Clorexidine | 9  | 6,82    | 6342366       | 525815   | 100    | 100      | N/A      | 9151 | N/A        | 2,688           |         |

chromatogram name

std 2 17032026 fine lista - CH9

Sample name

Channel Name

230,0nm

| # | Peak Name   | CH | TR(min) | Area (uV sec) | Height % | Area % | Height % | Quantity | NTP  | Resolution | Symmetry Factor | Warning |
|---|-------------|----|---------|---------------|----------|--------|----------|----------|------|------------|-----------------|---------|
| 1 | Clorexidine | 9  | 6,823   | 6921530       | 569407   | 100    | 100      | N/A      | 9071 | N/A        | 2,799           |         |

Tabella 7 Principali picchi identificati nei cromatogrammi analizzati, accompagnati dai corrispondenti tempi di ritenzione e dai relativi parametri cromatografici.

### Tabella di acquisizione

| # | Execute | Sample Type | Sample # | Volume (µL) | Chromatogram Name         | Acquisition Time (min) | Control Method | Line #1 | Line #2 | Line #3 | Peak ID Table | Calibration Method | Mode | Data Processing Method | Description |
|---|---------|-------------|----------|-------------|---------------------------|------------------------|----------------|---------|---------|---------|---------------|--------------------|------|------------------------|-------------|
| 1 | *       | UNK         | 1        | 5.0         | blank                     | 24.8                   | Dentihex       |         |         |         |               |                    |      |                        |             |
| 2 | *       | UNK         | 2        | 5.0         | std 1 17032026            | 24.8                   | Dentihex       |         |         |         |               |                    |      |                        |             |
| 3 | *       | UNK         | 2        | 5.0         | std 1 17032026-           | 24.8                   | Dentihex       |         |         |         |               |                    |      |                        |             |
| 4 | *       | UNK         | 3        | 5.0         | std 2 17032026            | 24.8                   | Dentihex       |         |         |         |               |                    |      |                        |             |
| 5 | *       | UNK         | 4        | 5.0         | C1 - 26020313             | 24.8                   | Dentihex       |         |         |         |               |                    |      |                        |             |
| 6 | *       | UNK         | 2        | 5.0         | std 1 17032026 fine lista | 24.8                   | Dentihex       |         |         |         |               |                    |      |                        |             |

Tabella 8 Sequenza di acquisizione della sessione analitica HPLC, comprensiva dell'ordine di iniezione dei campioni, dei parametri operativi e delle relative informazioni di acquisizione associate a ogni analisi eseguita.

L'Acquisition Sequence rappresenta la tabella indispensabile per organizzare e gestire l'ordine delle analisi cromatografiche prima di avviare la sequenza di iniezione. Essa stabilisce l’ordine delle iniezioni dei campioni, degli standard e dei blank, assegnando a ogni analisi il corrispondente metodo cromatografico da utilizzare. La tabella include anche dettagli operativi come la posizione della fiala nell'autocampionatore, il volume di iniezione, il nome attribuito al cromatogramma, il metodo di acquisizione e la durata stimata dell'analisi. Un'impostazione accurata della sequenza assicura sia la

tracciabilità delle analisi effettuate sia il corretto svolgimento dell'intera sessione analitica. La sequenza di acquisizione utilizzata per l'analisi è riportata nella Tabella 7

### **Confronto dei risultati ottenuti con le specifiche aziendali**

Il coefficiente di variazione (CV) calcolato evidenzia una variabilità del 7,2% rispetto al valore medio, dimostrando una soddisfacente ripetibilità delle misurazioni eseguite. Questo livello di variabilità si allinea ai criteri di precisione generalmente accettati nelle metodiche analitiche quantitative. L'esame del certificato di controllo riguardante il lotto n. 26020313, fabbricato nel febbraio 2026 e con scadenza prevista per febbraio 2029, come indicato nelle specifiche di produzione, conferma la piena conformità del prodotto finito agli standard aziendali stabiliti. Il certificato include due parametri principali per la valutazione del lotto: le qualità organolettiche del prodotto e la concentrazione del principio attivo. Relativamente all'aspetto, le specifiche indicano una pasta di colore bianco o crema, accompagnata da un caratteristico profumo di vaniglia. I risultati ottenuti durante il controllo qualità confermano che il lotto rispetta pienamente tali criteri, assicurando sia l'accurata identificazione del prodotto che la sua idoneità per l'utilizzo da parte dell'utente finale. Per quanto riguarda il contenuto di clorexidina, le specifiche aziendali stabiliscono un intervallo compreso tra lo 0,18% e lo 0,22%. Il valore rilevato, pari allo 0,20%, rientra perfettamente in questo range, attestando così la conformità del prodotto agli standard qualitativi richiesti. L'aderenza a tale intervallo risulta fondamentale per assicurare l'efficacia del prodotto, preservandone al contempo un profilo di sicurezza adeguato. In sintesi, l'analisi dei risultati rispetto alle specifiche aziendali conferma la completa conformità del lotto esaminato. Il rispetto dei parametri stabiliti dimostra l'efficienza del controllo dei processi e la corretta gestione delle fasi produttive, garantendo così una qualità uniforme e costante del prodotto finale.

### **Eventuali anomalie o deviazioni**

La gestione dei risultati fuori specifica (*out of specification*, OOS) costituisce un aspetto cruciale del sistema di assicurazione della qualità. Questo processo viene eseguito seguendo procedure documentate che aderiscono ai principi delle Buone Pratiche di Fabbricazione (GMP) dell'Unione Europea (EudraLex, Volume 4) e alle linee guida della FDA, come descritto nella *Guidance for Industry – Investigating Out-of-Specification Test Results for Pharmaceutical Production* (2006). Quando un risultato analitico si discosta dai limiti di specifica, viene avviata una deviazione attraverso la modulistica aziendale preposta, per assicurare una tracciabilità completa dell'evento. Il modulo raccoglie tutte le informazioni identificative dell'analisi, inclusi il numero di lotto, il codice e il nome del prodotto, la data di esecuzione del test, i nomi dell'analista e del revisore, le apparecchiature utilizzate, il metodo analitico impiegato e una descrizione dettagliata dell'anomalia rilevata,

accompagnata dalla documentazione pertinente, come cromatogrammi, report degli strumenti e registrazioni di laboratorio. L'indagine inizia con una verifica preliminare volta a individuare possibili errori analitici o procedurali. Durante questa fase vengono controllati la preparazione dei campioni, il funzionamento corretto della strumentazione, l'idoneità dei reagenti e degli standard di riferimento, oltre al rispetto delle procedure operative stabilite. Se non si riscontrano cause legate al laboratorio, l'indagine si amplia per includere il processo produttivo. Si analizzano eventuali anomalie nelle materie prime, nelle condizioni di produzione o in altre fasi del processo che potrebbero aver influenzato la qualità del prodotto. Allo stesso tempo, si effettua una valutazione del rischio, tenendo conto dell'impatto potenziale sulla qualità, sulla sicurezza del paziente e sulla conformità ai requisiti normativi. Nel corso dell'indagine, si possono prendere provvedimenti immediati per contenere la situazione, come il blocco del lotto coinvolto, la sospensione delle attività connesse e l'informazione alle divisioni Qualità e Produzione. La ripetizione dell'analisi è permessa solo se specificata dalla procedura OOS; deve inoltre essere ben giustificata e documentata. Le prove aggiuntive seguono criteri prestabiliti delineati dalla procedura aziendale, la quale determina il numero di ripetizioni, le condizioni sperimentali e i criteri di accettazione dei risultati. Alla conclusione dell'indagine, i risultati raccolti permettono di determinare se il dato fuori specifica derivi da un errore di analisi o indichi una reale non conformità del prodotto. Nel caso di effettiva non conformità, il lotto viene gestito secondo il sistema di qualità dell'azienda, che include opzioni come mantenerlo in quarantena, respingerlo, ritirarlo dal mercato o richiamare il prodotto già distribuito, se necessario.

## **Esperienza in laboratorio QC (LQC)**

L'esperienza maturata presso il laboratorio di Quality Control (QC) di un'azienda farmaceutica veterinaria ha permesso di sviluppare competenze nell'esecuzione e interpretazione di analisi strumentali dedicate alla verifica della conformità dei prodotti finiti rispetto agli standard qualitativi definiti. In questo ambito, le attività analitiche si concentrano sulla determinazione quantitativa dei principi attivi e sulla conferma della loro identità, utilizzando metodi convalidati su campioni rappresentativi del processo produttivo. Un elemento cruciale del controllo qualità consiste nell'incorporare le attività analitiche all'interno di un sistema di gestione definito, strutturato su procedure operative standardizzate (SOP), documentazione accuratamente gestita e una piena tracciabilità di tutte le operazioni svolte. Questo metodo assicura risultati ripetibili e coerenti nel tempo, favorendo al contempo il rispetto delle normative vigenti e la possibilità di confronto costante dei dati raccolti. Nel contesto delle principali tecniche utilizzate nei laboratori di Controllo Qualità (QC), la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) si distingue come uno strumento fondamentale per l'analisi qualitativa e quantitativa dei principi attivi presenti nei farmaci veterinari. Per esempio, questa metodologia viene applicata al monitoraggio di prodotti contenenti doxiciclina,

permettendo di garantire sia la conformità della formulazione del prodotto che la stabilità del principio attivo lungo l'intero ciclo di vita del farmaco. L'esperienza acquisita ha permesso di approfondire l'applicazione pratica delle *Good Manufacturing Practices* (GMP), sottolineando che la qualità non si limita alla verifica del prodotto finale, ma rappresenta un sistema articolato composto da requisiti organizzativi, documentali e tecnici. In ambito laboratoristico, questo si concretizza nella gestione accurata delle apparecchiature, nella qualificazione e manutenzione della strumentazione, nella validazione dei metodi analitici e nella gestione dei dati nel rispetto dei principi del Data Integrity. L'implementazione di tali pratiche garantisce affidabilità, tracciabilità e integrità dei risultati analitici, aspetti fondamentali per il controllo qualità all'interno dell'industria farmaceutica.

# DISCUSSIONE

## Impatto ambientale

La clorexidina, un efficace antisettico ad ampio spettro, trova largo impiego nei settori farmaceutico, medico e odontoiatrico. (8) Tuttavia, l'uso sempre più diffuso di questa sostanza ha alimentato preoccupazioni circa il possibile impatto ambientale derivante dalla presenza di residui nei reflui provenienti da attività civili e industriali. Sotto il profilo ambientale, la clorexidina mostra una biodegradabilità ridotta e, per via della sua natura cationica, tende a legarsi alla materia organica e alle particelle sospese presenti nei sistemi di trattamento delle acque reflue (8). Questo comportamento porta a un accumulo significativo del composto nei fanghi di depurazione, impedendone la totale eliminazione attraverso i tradizionali processi di trattamento. (14) Diversi studi hanno dimostrato che i residui di clorexidina presenti nelle acque reflue e nei fanghi possono avere effetti tossici sui microrganismi responsabili dei processi biologici di depurazione. Anche a concentrazioni minime, un'esposizione prolungata può modificare la composizione delle comunità microbiche, compromettendo l'efficienza dei meccanismi di trattamento. Inoltre, la presenza costante di agenti antimicrobici nell'ambiente è stata collegata alla selezione di microrganismi con una ridotta sensibilità agli antimicrobici, un fenomeno che solleva crescenti preoccupazioni sia per la salute pubblica che per l'equilibrio ecologico. (15) Le principali vie attraverso cui la clorexidina viene immessa nell'ambiente includono gli scarichi provenienti dai processi produttivi e di confezionamento, gli effluenti degli ospedali e degli studi odontoiatrici, oltre all'impiego domestico di prodotti che contengono questa sostanza attiva. Di conseguenza, è essenziale che le aziende produttrici adottino misure mirate a ridurre l'impatto ambientale legato sia alla produzione che all'utilizzo di tale composto. Tra le principali strategie di mitigazione si annoverano l'ottimizzazione delle formulazioni attraverso l'impiego della dose minima efficace del principio attivo, il controllo dei residui prodotti durante il processo produttivo e l'adozione di tecnologie avanzate per il trattamento dei reflui. Metodologie come l'adsorbimento su carbone attivo e i processi di ossidazione avanzata si sono rivelate significativamente più efficaci rispetto ai trattamenti biologici tradizionali nella rimozione di composti antimicrobici persistenti. Inoltre, il monitoraggio analitico periodico delle acque di processo e dei fanghi di depurazione consente sia di valutare l'efficienza dei sistemi di abbattimento sia di individuare tempestivamente eventuali fenomeni di accumulo indesiderato. Per il prodotto DentiHex, ridurre l'impatto ambientale richiede un approccio globale che includa una gestione efficace dei reflui industriali, un costante monitoraggio delle emissioni e l'implementazione di strategie di trattamento adeguate. Queste azioni consentono di limitare la dispersione della

clorexidina nell'ambiente, minimizzando sia l'accumulo nei sistemi acquatici sia i potenziali danni ai microrganismi fondamentali per i processi ecologici e di depurazione. (11).

## **Interpretazione dei risultati**

I risultati indicano che il metodo HPLC-DAD sviluppato è ideale per determinare la presenza di clorexidina nel prodotto DentiHex. La qualità dei dati analitici non dipende solo dal valore misurato, ma anche dalla capacità del metodo di offrire una determinazione accurata, selettiva e riproducibile in una matrice formulativa complessa. Queste caratteristiche sono essenziali nel contesto del controllo qualità, dove è cruciale che il metodo garantisca risultati affidabili e consistenti nel tempo. (1) L'assenza di interferenze nel picco della clorexidina attesta che la matrice del prodotto e gli eccipienti presenti nella formulazione non compromettono l'analisi dell'analita. I segnali cromatografici aggiuntivi, dovuti ai componenti della formulazione o al sistema analitico, non incidono sulla quantificazione, poiché questi picchi sono nettamente separati da quello della clorexidina. Questo aspetto è un importante indicatore della selettività del metodo e riduce il rischio di sovrastimare o sottostimare il contenuto del principio attivo. (9) La notevole riproducibilità delle risposte cromatografiche sottolinea la solidità del sistema analitico e delle condizioni operative utilizzate. Un metodo che presenta una bassa variabilità nelle misurazioni permette di identificare le autentiche variazioni nel contenuto del principio attivo, distinguendole da quelle dovute all'incertezza analitica, e migliorando così la fiducia nelle decisioni prese durante il controllo qualità. Nel complesso, i risultati ottenuti dimostrano che il metodo HPLC-DAD soddisfa i criteri di performance necessari per il monitoraggio della clorexidina nel prodotto finito. La capacità di identificare in modo selettivo il principio attivo e di misurare con alta precisione il suo contenuto lo rende uno strumento ideale per le operazioni di controllo qualità regolari, contribuendo a mantenere la qualità costante del prodotto e ad assicurare che il processo produttivo rispetti gli standard richiesti.

## **Punti di forza del metodo**

Il metodo HPLC-DAD sviluppato per la determinazione e quantificazione della clorexidina all'interno del prodotto DentiHex si distingue come un'approccio analitico estremamente affidabile, concepito su misura per rispondere alle stringenti esigenze legate al controllo qualità in ambito farmaceutico (9). La corretta identificazione dell'analita viene garantita grazie al confronto diretto tra il tempo di ritenzione e lo spettro UV della sostanza in esame con quelli dello standard di riferimento, assicurando una piena corrispondenza. Per accrescere ulteriormente la robustezza del metodo, è stato adottato un criterio di accettazione particolarmente rigoroso, basato su un fattore di corrispondenza spettrale UV uguale o superiore a 990. Questo approccio non solo consente di minimizzare il rischio di possibili

errori d'identificazione, ma eleva anche la selettività del metodo, rendendolo altamente efficace anche in presenza di componenti della matrice che potrebbero potenzialmente interferire nelle analisi. Il processo di quantificazione si basa sul confronto con uno standard esterno e su una procedura di calcolo ben definita e documentata. Una descrizione accurata della preparazione delle soluzioni, della sequenza di iniezione e dei criteri di accettazione rappresenta un elemento fondamentale per garantire la riproducibilità delle analisi. Inoltre, l'implementazione del System Suitability Test (SST) prima di avviare le determinazioni analitiche assicura che il sistema cromatografico operi entro parametri controllati, minimizzando il rischio di risultati inattendibili. La definizione accurata delle condizioni cromatografiche, inclusi gradiente di eluizione, tipo di colonna analitica, temperatura e flusso regolato, garantisce una separazione ottimale della clorexidina rispetto ai componenti presenti nella formulazione. Contestualmente, l'adozione di una procedura di estrazione standardizzata riduce al minimo le variazioni legate alla preparazione del campione, migliorando così la solidità e l'affidabilità complessiva del metodo analitico. Analizzando questo approccio in relazione ad altre metodologie riportate nella letteratura scientifica, emergono diversi vantaggi significativi. Le tecniche spettrofotometriche UV-Vis sono state impiegate per la quantificazione della clorexidina grazie alla loro semplicità d'uso e ai costi ridotti. Tuttavia, queste tecniche presentano frequentemente una selettività limitata, soprattutto nell'analisi di matrici complesse, poiché non permettono di separare preventivamente gli eventuali interferenti. In contrapposizione, il metodo HPLC-DAD garantisce una separazione cromatografica dell'analita e consente inoltre di verificare l'identità mediante il confronto spettrale, rappresentando quindi un'opzione più robusta e affidabile nell'analisi. In ambito scientifico, vengono frequentemente menzionati metodi basati sulla cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata alla spettrometria di massa (HPLC-MS/MS), noti per la loro elevata sensibilità e selettività. Queste tecniche risultano particolarmente adatte per l'analisi di tracce in matrici biologiche (16). Tuttavia, il loro utilizzo comporta l'impiego di strumentazioni dal costo elevato, la necessità di personale altamente qualificato e l'adozione di procedure operative più complesse. Di conseguenza, per il controllo qualità routinario di un prodotto finito, l'HPLC-DAD emerge come una scelta ideale, offrendo un equilibrio ottimale tra efficacia analitica, sostenibilità economica e semplicità applicativa. In confronto alle metodologie microbiologiche comunemente utilizzate per rilevare indirettamente la presenza di clorexidina basandosi sulla sua attività antimicrobica, l'approccio cromatografico si distingue nettamente per la sua capacità di fornire una misurazione diretta e quantitativa del principio attivo. Questo metodo non solo garantisce un livello superiore di precisione e affidabilità nei risultati, ma permette anche una riproducibilità più elevata e una maggiore velocità nell'esecuzione delle analisi, rendendolo una scelta ottimale per applicazioni in cui sono richieste accuratezza e tempestività. Nel complesso, il metodo sviluppato si distingue per specificità, accuratezza, precisione,

robustezza e tracciabilità, soddisfacendo pienamente i requisiti stabiliti per il controllo qualità dei prodotti a base di clorexidina. Il confronto con le principali metodologie descritte in letteratura mette in evidenza come l'approccio HPLC-DAD rappresenti una soluzione ottimale ed efficiente per l'analisi del prodotto finito, assicurando risultati affidabili e in linea con gli standard regolatori e le esigenze dell'industria.

## Limiti dello studio

La ricerca evidenzia alcuni limiti legati sia agli strumenti utilizzati, sia alle proprietà della matrice analizzata, oltre che alle decisioni metodologiche prese nel corso dell'elaborazione e dell'implementazione del metodo HPLC. Dal punto di vista tecnico, la qualità dei risultati è strettamente legata alle prestazioni del sistema cromatografico e del rivelatore UV. Fattori come la sensibilità e la linearità del rivelatore possono subire variazioni a causa dell'usura della lampada, dell'incremento del rumore di fondo o di cambiamenti nelle condizioni operative, compromettendo così l'accuratezza della misurazione. (6) Pertanto, è fondamentale eseguire regolari controlli delle prestazioni del rivelatore e assicurarsi che i requisiti stabiliti siano costantemente rispettati. Un aspetto cruciale da considerare è la condizione della colonna cromatografica. Con il passare del tempo e l'uso continuativo, parametri fondamentali come l'efficienza, la simmetria dei picchi e il numero di piatti teorici tendono a degradarsi gradualmente. Questo deterioramento può compromettere la qualità della separazione cromatografica, influenzando sia i tempi di ritenzione che il livello di risoluzione tra i vari composti presenti nel campione analizzato. Pertanto, diventa indispensabile monitorare regolarmente i parametri di sistema e procedere alla sostituzione della colonna qualora tali valori si discostino dai limiti accettabili, al fine di preservare l'affidabilità e la precisione del metodo analitico. (12) La stabilità complessiva del sistema analitico costituisce un elemento chiave che può influire sulla variabilità dei risultati. Le analisi condotte nel contesto del System Suitability Test (SST) hanno messo in luce una dispersione nelle aree degli standard, con coefficienti di variazione rilevati intorno al 6-7%. Anche se tali valori sono stati ritenuti adeguati agli obiettivi dello studio, essi evidenziano la vulnerabilità del sistema alle condizioni operative. Questo sottolinea ulteriormente l'importanza di effettuare il SST prima di ogni sequenza analitica per garantire l'affidabilità delle misurazioni. (7) Tra i principali limiti correlati alla composizione della matrice del prodotto, è fondamentale tenere in considerazione la presenza di specifici eccipienti come paraffina, carbopol e vanillina. Questi elementi, infatti, possono esercitare un impatto significativo non solo sull'efficienza del processo di estrazione dell'analita, ma anche sul profilo cromatografico del campione analizzato. In particolare, tali eccipienti possono introdurre interferenze che complicano l'analisi, rappresentando un ulteriore ostacolo nella corretta identificazione e quantificazione della clorexidina, soprattutto quando questa è presente in concentrazioni particolarmente ridotte. Queste problematiche richiedono un ulteriore

livello di attenzione nelle procedure analitiche per garantire risultati accurati e affidabili. Dal punto di vista metodologico, la fase di estrazione rappresenta una potenziale fonte di bias sistematico. La selezione del solvente utilizzato per l'estrazione può influire direttamente sulla capacità di recupero dell'analita, alterando di conseguenza la concentrazione rilevata durante l'esperimento. In modo analogo, i criteri adottati per la definizione dei parametri d'integrazione cromatografica possono influenzare il processo di calcolo delle aree dei picchi cromatografici; approcci non uniformi rischiano di generare una sovrastima o una sottostima del contenuto di clorexidina. Inoltre, è fondamentale considerare la possibilità di errori legati alla pesatura e alla preparazione delle soluzioni, come imprecisioni nelle diluizioni o nella determinazione delle masse, che potrebbero contribuire in maniera significativa alla variabilità complessiva del metodo analitico. (12)

Per ridurre al minimo tutti questi fattori di errore sono state effettuate delle formazioni teoriche e pratiche ad ogni singolo analista e sono state messe in atto delle manutenzioni e prove di calibrazione, performance di tutte le strumentazioni analitiche coinvolte nel processo d'analisi.

## CONCLUSIONI

Questo studio ha permesso di creare, applicare e convalidare un metodo HPLC-DAD per l'identificazione e la quantificazione della clorexidina nel prodotto Dentihex. L'analisi del lotto ha rivelato che il contenuto di clorexidina è dello 0,20% (g/g), in linea con le specifiche qualitative stabilite dall'azienda. I risultati ottenuti hanno dimostrato l'efficacia del metodo nel rilevare selettivamente la clorexidina all'interno della matrice formulativa, senza influenze significative da parte degli eccipienti o dei reagenti utilizzati. La corrispondenza tra il tempo di ritenzione e lo spettro UV del campione con quelli dello standard di riferimento ha confermato la corretta identificazione dell'analita. Inoltre, le verifiche di idoneità del sistema e l'elevata riproducibilità delle analisi hanno attestato l'affidabilità delle condizioni operative impiegate. Nel complesso, gli obiettivi fissati sono stati completamente soddisfatti. Il metodo sviluppato offre le prestazioni necessarie per l'uso nelle attività di controllo qualità del prodotto finito, fornendo risultati precisi, selettivi e riproducibili. Nonostante le limitazioni intrinseche dovute alla variabilità strumentale e alla complessità della matrice, il metodo si è rivelato idoneo all'impiego previsto e rappresenta uno strumento affidabile per il monitoraggio del contenuto di clorexidina nel prodotto Dentihex.

## SVILUPPI FUTURI

Le future attività potranno essere orientate principalmente al consolidamento e all'estensione dell'applicabilità del metodo sviluppato. In particolare, l'analisi di un numero maggiore di lotti produttivi consentirebbe di raccogliere ulteriori evidenze sulla costanza delle prestazioni analitiche nel tempo e di supportare il monitoraggio continuo del metodo durante il suo impiego di routine. Un possibile sviluppo futuro potrebbe coinvolgere la valutazione della trasferibilità del metodo a diverse formulazioni contenenti clorexidina o a prodotti con matrici più complesse. L'obiettivo sarebbe quello di esaminarne la versatilità e determinare se siano necessari adattamenti operativi. Dal punto di vista aziendale, il metodo validato rappresenta una solida base tecnica per supportare strategie di espansione verso nuovi mercati. In quest'ottica, è consigliabile preparare e aggiornare la documentazione tecnico-analitica in linea con i requisiti normativi delle diverse autorità regolatorie. Questo faciliterà le procedure di registrazione e assicurerà il rispetto degli standard qualitativi richiesti a livello internazionale. Alla fine, l'eventuale sviluppo delle linee guida e dei requisiti normativi potrebbe richiedere ulteriori verifiche o aggiornamenti del metodo, garantendo così un costante allineamento agli standard internazionali e il mantenimento delle prestazioni necessarie nel contesto del controllo qualità.

## BIBLIOGRAFIA

1. European Commission. (2000). Regulation (EC) No. 847/2000 of 27 April 2000.
2. Food and Drug Administration. (2018). Data integrity and compliance with drug CGMP: Questions and answers. Guidance for industry pharmaceutical quality/manufacturing standards (CGMP). U.S. Department of Health and Human Services.
3. European Parliament and Council of the European Union. (2001). Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use.
4. European Parliament and Council of the European Union. (2001). Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use.
5. Di Gennaro, S. (2026). Cosa sono i principi ALCOA e perché sono fondamentali nella data integrity. S4BT.
6. Dong, M. W. (2013). The essence of modern HPLC: Advantages, limitations, fundamentals, and opportunities. LCGC North America, 472–479.
7. European Pharmacopoeia Commission. (2008). European Pharmacopoeia 6.0: Substances for pharmaceutical use. Council of Europe.
8. Deus, F. P., & Ouanounou, A. (2022). Chlorhexidine in dentistry: Pharmacology, uses, and adverse effects. International Dental Journal, 72(3), 269–277.
9. BenchChem Technical Support Team. (2026). A comparative guide to chlorhexidine quantification methods for researchers and drug development professionals. BenchChem.
10. Livisto Animal Health. (n.d.). Documentazione tecnica aziendale.
11. Documentazione interna aziendale. (n.d.). Procedure operative standard, specifiche di prodotto e report analitici interni.
12. European Medicines Agency. (1995). ICH topic Q2 (R1): Validation of analytical procedures: Text and methodology (CPMP/ICH/381/95).
13. Smith, C. (2022). Disadvantages & advantages of an HPLC. Sciencing.

14. Cobo Golpe, M., Castro, G., Ramil, M., Cela, R., Santos, Y., & Rodríguez, I. (2022). Chlorhexidine residues in sludge from municipal wastewater treatment plants: Analytical determination and toxicity evaluation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414(22), 6571–6580. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04214-0>
15. Kulik, E. M., Waltimo, T., Weiger, R., Schweizer, I., Lenkeit, K., Filipuzzi-Jenny, E., & Walter, C. (2015). Development of resistance of mutans streptococci and *Porphyromonas gingivalis* to chlorhexidine digluconate and amine fluoride/stannous fluoride-containing mouthrinses, in vitro. *Clinical Oral Investigations*, 19(7), 1547–1553.
16. European Medicines Agency. (2022). ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. Step 5.