



ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ
ΟΥΣΙΩΝ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΛΙΟΚΙΝΟΛΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ
ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ ΤΗΣ ΣΕ ΣΚΕΥΑΣΜΑ ΑΛΟΙΦΗΣ**

ΦΑΝΑΡΑ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ

2013

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Αναλυτικό Εργαστήριο του τμήματος Χημικού του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος ειδίκευσης του τμήματος Φαρμακευτικής και τομέα Φαρμακευτικής Χημείας με τίτλο «Παραγωγή και Έλεγχος Φαρμακευτικών Ουσιών».

Προς τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Μ. Κουμπάρη θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου και την ευγνωμοσύνη μου για την υπομονή του και τη σημαντική βοήθεια και καθοδήγηση του κατά την εκπόνηση της εργασίας.

Προς τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής Καθηγήτρια κα Α. Τσαντίλη-Κακουλίδου και Λέκτορα κ. Ε. Γκίκα εκφράζω τις ευχαριστίες μου για την εξέταση και διόρθωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτορα κα Α. Γκρεμηλογιάννη για την άριστη συνεργασία της, τις χρήσιμες συμβουλές της και την καθοδήγησή της κατά την εκπόνηση των πειραμάτων της παρούσας εργασίας.

Τέλος, θερμές ευχαριστίες στο σύζυγο και τους γονείς μου για την ηθική συμπαράσταση που μου παρείχαν καθόλη τη διάρκεια της εργασίας.

Αφιερώνω την παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή στο σύζυγό μου Κυριάκο, την κόρη μου Χρύσα, τον πατέρα μου Γιάννη και τη μητέρα μου Κατερίνα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η 5-χλωρο-7-ιωδο-κινολίνη-8-όλη (Κλιοκινόλη) είναι μια 8-υδροξυκινολίνη η οποία χρησιμοποιείται για την θεραπεία τοπικών μυκητιάσεων και παρασιτικών μολύνσεων. Σήμερα γίνονται έρευνες σχετικά με τη χρήση της ουσίας για την θεραπεία του Alzheimer και του καρκίνου.

Για την ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού της Κλιοκινόλης και των προσμίξεών της χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφικό σύστημα HPLC αντίστροφης φάσης, ενώ το σκεύασμα στο οποίο εφαρμόστηκε ήταν αντιμυκητιασική αλοιφή του εμπορίου η οποία περιείχε δύο δραστικές, την Κλιοκινόλη (δραστική αναφοράς) σε περιεκτικότητα 3% και την Φλουοκινολόνη σε περιεκτικότητα 0,025%. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε μίγμα υδατικής εξυλαμίνης-μεθανόλης, ενώ η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν BDS Hypersyl C8 (Thermo) 100x4,6 mm (5μm) κατάλληλη για χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Ο χρόνος καταγραφής ορίστηκε στα 15 min και ως μήκος κύματος τα 254 nm και 324 nm.

Μετά από την ανάπτυξη της μεθόδου ακολούθησε επικύρωση των μεθόδων προσδιορισμού της Κλιοκινόλης και των προσμίξεών της, σύμφωνα με τις απαιτήσεις επικύρωσης (ειδικότητα, γραμμικότητα, ακρίβεια, πιστότητα, ανθεκτικότητα κλπ).

ΜΕΡΟΣ Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ

ΚΕΦ.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Με τον όρο Έλεγχος Ποιότητας Φαρμάκων εννοούμε το σύνολο των εργασιών που έχουν ως στόχο την πιστοποίηση της καταλληλότητας των φαρμάκων, σύμφωνα με νομοθετικές προδιαγραφές, οι οποίες καθορίζονται και ελέγχονται με σαφήνεια.

Πρόκειται για το τμήμα εκείνο των Κανόνων Καλής Παρασκευής(GMP) που ασχολείται με τη δειγματοληψία, τις προδιαγραφές, τις δοκιμασίες, καθώς επίσης και με την οργάνωση, την τεκμηρίωση και τις διαδικασίες αποδέσμευσης των υλικών και των προϊόντων έτσι, ώστε αυτά να μην διατεθούν προς χρήση πριν διασφαλιστεί η ποιότητά τους.

1.1 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

1.1.1 Ορθή παρασκευαστική πρακτική όσον αφορά τα φάρμακα και τα υπό δοκιμή φάρμακα που προορίζονται για ανθρώπινη χρήση

Οι αρχές και οι κατευθυντήριες γραμμές της ορθής παρασκευαστικής πρακτικής αφορούν κυρίως το προσωπικό, τους χώρους και τον εξοπλισμό, την παραγωγή, την τεκμηρίωση, τον έλεγχο ποιότητας και την επισήμανση, τις συμβάσεις ανάθεσης έργου, καθώς και τις επιθεωρήσεις, τις καταγγελίες και την απόσυρση προϊόντων.

1.1.2 Σύστημα διασφάλισης ποιότητας : προσωπικό, χώροι και εξοπλισμός

Ο παρασκευαστής πρέπει να εφαρμόζει αποτελεσματικό σύστημα διασφάλισης ποιότητας των φαρμάκων στο οποίο να συμμετέχουν η διοίκηση και το προσωπικό όλων των σχετικών τμημάτων.

Σε κάθε μονάδα παρασκευής, ο παρασκευαστής πρέπει να διαθέτει προσωπικό με τα κατάλληλα προσόντα για την επίτευξη του στόχου της διασφάλισης της ποιότητας των φαρμάκων.

Το προσωπικό λαμβάνει συνεχή εκπαίδευση που καλύπτει τις θεωρητικές και πρακτικές πτυχές της διασφάλισης ποιότητας και της ορθής παρασκευαστικής πρακτικής, περιλαμβάνοντας και τις απαιτήσεις για την παρασκευή δοκιμαζόμενων φαρμάκων.

Πρέπει να καταρτίζονται προγράμματα υγιεινής προσαρμοσμένα στις εκάστοτε δραστηριότητες. Τα προγράμματα αυτά περιλαμβάνουν διαδικασίες σχετικές με την υγεία, τις πρακτικές υγιεινής και την ενδυμασία του προσωπικού.

Επίσης, οι χώροι και ο εξοπλισμός παρασκευής πρέπει να υπόκεινται σε αυστηρούς κανόνες υγιεινής, προκειμένου να αποφεύγεται κάθε μόλυνση και επιβλαβής επίδραση στην ποιότητα του προϊόντος.

Επιπλέον, οι χώροι και ο εξοπλισμός που χρησιμοποιούνται για τις παρασκευαστικές δραστηριότητες που είναι καθοριστικές για την ποιότητα των προϊόντων υπόκεινται σε κατάλληλη πιστοποίηση.[18]

1.1.3 Παραγωγή

Η παραγωγή πρέπει να πραγματοποιείται σύμφωνα με την ορθή παρασκευαστική πρακτική και να συμμορφώνεται με τις προκαθορισμένες οδηγίες και διαδικασίες. Τυχόν παρεκκλίσεις από την παραγωγική διαδικασία, καθώς και τα ελαττωματικά προϊόντα πρέπει να καταγράφονται και να διερευνώνται.

Για την αποφυγή, ιδίως διασταυρούμενης επιμόλυνσης, πρέπει να λαμβάνονται τεχνικά και/ή οργανωτικά μέτρα. Σε ό,τι αφορά τα υπό δοκιμή φάρμακα, πρέπει να δίδεται ιδιαίτερη προσοχή στον τρόπο χειρισμού των προϊόντων κατά τη διάρκεια και μετά από κάθε ενέργεια απόκρυψης της ταυτότητάς τους.

Στην περίπτωση των φαρμάκων, κάθε νέα διαδικασία παρασκευής ή τυχόν σημαντικές τροποποιήσεις της διαδικασίας παρασκευής ενός φαρμάκου πρέπει να επικυρώνονται, ενώ οι κρίσιμες φάσεις των διαδικασιών παρασκευής πρέπει να επανεπικυρώνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα.

Όσον αφορά τα υπό δοκιμή φάρμακα, πρέπει να επικυρώνονται τουλάχιστον τα κρίσιμα στάδια της διαδικασίας, όπως η αποστείρωση και, εάν απαιτείται, συνολικά η διαδικασία παρασκευής.[18]

1.1.4 Τεκμηρίωση

Ο παρασκευαστής πρέπει να διατηρεί σύστημα τεκμηρίωσης το οποίο να καλύπτει όλες τις εκτελούμενες δραστηριότητες παρασκευής. Τα έγγραφα αυτά πρέπει να επιτρέπουν την αναδρομή στο ιστορικό της παρασκευής κάθε παρτίδας προϊόντος και στις τροποποιήσεις που πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ενός υπό δοκιμή φαρμάκου.

Η έγγραφη τεκμηρίωση μπορεί να αντικαθίσταται από ηλεκτρονικά ή άλλα συστήματα. Στην περίπτωση αυτή, ο παρασκευαστής πρέπει να αποδεικνύει ότι τα δεδομένα θα διατηρούνται ανέπαφα κατά την προβλεπόμενη περίοδο φύλαξης.[18]

1.1.5 Έλεγχος ποιότητας και επισημάνση

Ο παρασκευαστής πρέπει να εφαρμόζει σύστημα ελέγχου ποιότητας. Το σύστημα αυτό εποπτεύεται από άτομο ανεξάρτητο από την παραγωγή με τα απαιτούμενα προσόντα. Το άτομο αυτό μπορεί να έχει πρόσβαση σε εργαστήρια ελέγχου ποιότητας προκειμένου να διενεργεί τις απαραίτητες δοκιμές για τις πρώτες ύλες και τα υλικά συσκευασίας, καθώς και τους ελέγχους για τα ενδιάμεσα και τελικά προϊόντα. Επιτρέπεται και η χρησιμοποίηση εξωτερικών εργαστηρίων.

Κατά τον τελικό έλεγχο του έτοιμου προϊόντος πριν από τη διάθεσή του, το σύστημα ελέγχου ποιότητας πρέπει κυρίως να λαμβάνει υπόψη τις συνθήκες παραγωγής, τα αποτελέσματα των ελέγχων που πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια παρασκευής, τα έγγραφα παρασκευής, καθώς και αν το προϊόν συμμορφώνεται με τις προδιαγραφές.

Από κάθε παρτίδα έτοιμων φαρμάκων πρέπει να λαμβάνονται και να διατηρούνται δείγματα τουλάχιστον για ένα χρόνο μετά την ημερομηνία λήξης. Όσον αφορά τα υπό δοκιμή φάρμακα, πρέπει να διατηρούνται δείγματα κάθε παρτίδας χύμα προϊόντων και των βασικών στοιχείων συσκευασίας που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε παρτίδα έτοιμου προϊόντος τουλάχιστον για δύο χρόνια μετά την τελευταία κλινική δοκιμή στην οποία χρησιμοποιήθηκε η παρτίδα, εφόσον η περίοδος αυτή είναι μεγαλύτερη.

Επιπλέον, πρέπει να διατηρούνται και δείγματα ορισμένων πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία παρασκευής τουλάχιστον για δύο χρόνια από τη

διάθεση του προϊόντος Το εν λόγω χρονικό διάστημα μπορεί να μειωθεί σε συγκεκριμένες περιπτώσεις.

Στην περίπτωση των υπό δοκιμή φαρμάκων, η επισήμανση πρέπει να διασφαλίζει την προστασία του συμμετέχοντος στη δοκιμή και την ανιχνευσιμότητα, να προωθεί τη σωστή χρήση του δοκιμαζόμενου φαρμάκου και να διευκολύνει την ταυτοποίηση του προϊόντος και της δοκιμής.[18]

ΚΕΦ.2 ΧΗΜΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Όλες οι διαδικασίες χημικών ελέγχων των φαρμακευτικών σκευασμάτων ακολουθούν την πρόοδο της επιστήμης και είναι διαδικασίες των οποίων η καταλληλότητα έχει αξιολογηθεί ενώ η περιγραφή τους είναι λεπτομερής ώστε να μπορούν οι μέθοδοι να αναπαράγονται εύκολα .

2.1 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

Αρχικά απαιτείται ο ποιοτικός προσδιορισμός, τόσο των δραστικών ουσιών, όσο και των εκδόχων που συνθέτουν ένα σκεύασμα ή ακόμα και του περιέκτη.

Σε περίπτωση που ένα δραστικό συστατικό δεν παράγεται από την εταιρεία που προβαίνει στη σύνθεση του φαρμάκου η εταιρεία οφείλει να παραθέσει τη μονογραφία της Ευρωπαϊκής φαρμακοποιίας ή της φαρμακοποιίας κράτους μέλους.

Σε περίπτωση που δεν υπάρχει αντίστοιχη μονογραφία ή η μονογραφία που υπάρχει δεν προβλέπει τον έλεγχο προσμίξεων οι οποίες καταλείπονται κατά την παρασκευή του προϊόντος η εταιρεία παραγωγής του προϊόντος οφείλει να φροντίσει να παρέχονται από τον παραγωγό της δραστικής απευθείας στις αρχές, τόσο η λεπτομερής περιγραφή της μεθόδου βιομηχανικής παραγωγής της δραστικής, όσο και τα στοιχεία ελέγχου ποιότητας της παραγωγής αυτού.

Όσον αφορά τις χρωστικές αυτές πρέπει να ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις του παραρτήματος V της Υπουργικής Απόφασης Α6α/9392/91.

Για τον έλεγχο ταυτότητας χρησιμοποιούνται:

- *Φυσικές Ιδιότητες*: σημείο τήξεως, σημείο ζέσεως, δείκτης διάθλασης διαλυτότητα, ειδική στροφική ικανότητα.
- *Χημικές Ιδιότητες*: χαρακτηριστικές αντιδράσεις χημικών ομάδων.
- *Φυσικοχημικές Ιδιότητες*: φάσματα υπεριώδους και υπέρυθρου και ποιοτικά χαρακτηριστικά χρωματογραφιών.

Για την ταυτοποίηση χρησιμοποιούνται ως πρότυπα χημικές ουσίες αναφοράς(XOA, CRS) οι οποίες είναι καθιερωμένες από την Επιτροπή Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας, ενώ για τον έλεγχο ουσιών όπως τα ναρκωτικά αντί για πρότυπες ουσίες διατίθενται πρότυπα φάσματα υπέρυθρου.

Συμπερασματικά ως μέθοδοι ελέγχου ταυτοποίησης χρησιμοποιούνται:

Σημείο τήξεως
Σχετική πυκνότητα
Ειδική στροφή
Απορρόφηση στο υπεριώδες – ορατό
Φάσμα υπερύθρου
Χρωστικές αντιδράσεις μορίου
Αντιδράσεις ανιόντων
Αντιδράσεις κατιόντων
Χρωματογραφία χάρτου
HPLC.[17]

2.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΠΡΩΤΩΝ ΥΛΩΝ

Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας όλων των δραστικών των φαρμακευτικών προϊόντων πρέπει, ανάλογα με τη φαρμακοτεχνική μορφή, να προσδιορίζεται για κάθε δραστικό συστατικό η μάζα ή οι μονάδες βιολογικής ενεργότητας είτε ανά μονάδα λήψεως, είτε ανά μονάδα μάζας ή όγκου.

Οι μονάδες βιολογικής ενεργότητας χρησιμοποιούνται για ουσίες που δεν μπορούν να καθοριστούν χημικά.

Τα δραστικά συστατικά που βρίσκονται υπό μορφή ενώσεων ή παραγώγων προσδιορίζονται ποσοτικά με τη συνολική τους μάζα και εφόσον είναι απαραίτητο με τη μάζα των δραστικών τμημάτων του μορίου.

Για δραστικά συστατικά που βρίσκονται υπό μορφή άλατος ή υδροξειδίου ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται στη μάζα των δραστικών τμημάτων του μορίου.

Για τα αλλεργιογόνα προϊόντα, η ποσοτική σύνθεση εκφράζεται σε μονάδες βιολογικής ενεργότητας εκτός από την περίπτωση των καλώς καθορισμένων αλλεργιογόνων προϊόντων των οποίων η συγκέντρωση μπορεί να εκφραστεί σε μάζα ανά μονάδα όγκου.

Για σύνθετα προϊόντα φυτικής, ζωϊκής ή ανθρώπινης προέλευσης όπου υπάρχουν πολλαπλές φαρμακευτικές δράσεις υπάρχει απαίτηση για χημικό, φυσικό ή βιολογικό προσδιορισμό των κυρίων συστατικών. Για προϊόντα που περιέχουν μια ή περισσότερες ουσίες με ανάλογη δραστικότητα γίνεται δεκτή μια συνολική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού.[17]

2.3 ΕΛΕΓΧΟΙ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ

Οι έλεγχοι αυτοί είναι πολύ σημαντικοί γιατί διαπιστώνεται η ύπαρξη προσμίξεων του φαρμάκου, οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν δυσμενώς τη σταθερότητα ή τα αναλυτικά αποτελέσματα του ιδιοσκευάσματος.

Ειδικότερα οι έλεγχοι καθαρότητας περιλαμβάνουν :

Έλεγχος pH

Καθορισμένη ποσότητα της ουσίας διαλύεται ή αναμιγνύεται με καθορισμένο όγκο νερού ελεύθερου διοξειδίου του άνθρακα. Μετρείται το pH ποτενσιομετρικά με pH μετρο –ηλεκτρόδιο και πρέπει να βρίσκεται εντός αποδεκτών ορίων που ορίζει η μονογραφία της ουσίας. Το pHμετρο ρυθμίζεται με πρότυπα ρυθμιστικά διαλύματα των οποίων η παρασκευή γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες της Φαρμακοποιίας.

Η θερμοκρασία πρέπει να είναι 20-25 °C, ενώ σε περίπτωση διαφορετικής θερμοκρασίας απαιτείται διόρθωση με ειδικό τύπο.

Εμφάνιση διαλύματος

Με τον έλεγχο αυτό διαπιστώνεται η διαύγεια και ο βαθμός οπαλισμού μιας ουσίας. Ορισμένη ποσότητα της ουσίας διαλύεται σε ορισμένο όγκο διαλύτη και το διάλυμα θεωρείται διαυγές αν η διαυγεία του είναι το ίδιο με αυτή του διαλύτη.

Επιπλέον, ελέγχεται ο βαθμός χρωματισμού υγρών και διαλυτών. Εξετάζεται το υγρό σε σύγκριση με το διαλύτη σε διάχυτο φώς ημέρας έναντι λευκού πεδίου και διαπιστώνεται εάν είναι «άγχρωμο» (δηλαδή να έχει εμφάνιση διαλύτη) ή χρωματισμένο.

Απορρόφηση

Συγκεκριμένη ποσότητα της ουσίας διαλύεται σε διαλύτη. Ακολουθούν αραιώσεις του διαλύματος και στη συνέχεια ελέγχεται η απορρόφηση που παρουσιάζει το διάλυμα σε ορισμένο μήκος κύματος.

Η ειδική απορρόφηση ($A^{1\%}_{1\text{cm}}$) της ουσίας πρέπει να βρίσκεται εντός ορισμένων ορίων.

Ειδική στροφή

Ως ειδική στροφή μιας ουσίας που βρίσκεται σε διάλυμα ορίζεται η γωνία σε μοίρες του επιπέδου του πολωμένου φωτός στο εξεταζόμενο διάλυμα. Η μέτρηση γίνεται σε θερμοκρασία 20 °C σε στοιβάδα 1dm διαλύματος με περιεκτικότητα 1g/ml. Η μέτρηση γίνεται με πολωσίμετρο, ενώ η κλίμακα ελέγχεται με πλακίδια χαλαζία.

Οξύτητα

Ελέγχεται η ύπαρξη όξινων ευδιάλυτων ουσιών

Συγγενείς ουσίες

Ελέγχεται η ύπαρξη προσμίξεων που αποτελούν παραπροϊόντα της σύνθεσης. Ο έλεγχος συνήθως γίνεται με χρωματογραφία. Επιπλέον ελέγχεται και η ύπαρξη ισομερών καθώς τα εναντιομερή παρουσιάζουν διαφορετική φαρμακολογική δράση.

Αριθμός οξέων

Εκφράζει την ποσότητα σε mg υδροξειδίου του καλίου που απαιτείται για να εξουδετερωθούν τα ελεύθερα οξέα σε 1g της ουσίας.

Ο προσδιορισμός ελευθέρων οξέων είναι πολύ σημαντικός για την ταυτοποίηση και τον έλεγχο καθαρότητας των κηρών, καθώς στους κηρούς τα ελεύθερα οξέα είναι πολλά. Στα λίπη μεγάλος αριθμός ελευθέρων οξέων συνεπάγεται προχωρημένη υδρόλυση γλυκεριδίων.

Αριθμός σαπωνοποίησης

Εκφράζει την ποσότητα του υδροξειδίου του καλίου σε mg που απαιτείται για την σαπωνοποίηση 1g ουσίας.

Αριθμός ιωδίου

Είναι η ποσότητα σε g αλογόνου, υπολογισμένου σε ιώδιου που δεσμεύουν 100 g ουσίας σε καθορισμένες συνθήκες.

Τέφρα

Αποτελεί τα μη πτητικά συστατικά που απομένουν μετά την πλήρη καύση της ουσίας. Διακρίνεται σε ολική τέφρα, θειϊκή τέφρα, τέφρα αδιάλυτη στο υδροχλωρικό οξύ και υδατοδιαλυτή τέφρα.

Απώλεια κατά την ξήρανση

Προσδιορίζεται η ελάττωση της μάζας της ουσίας σε ποσοστό % μετά την ξήρανση.

Προσδιορισμός υγρασίας

Προσδιορίζεται η ποσότητα του νερού που ενυπάρχει στην ουσία. Ο προσδιορισμός γίνεται με τη μέθοδο Karl-Fischer με χρήση έτοιμου προτύπου διαλύματος ή με κουλομετρική ογκομέτρηση.

Προσδιορισμός βαρέων μετάλλων

Ελέγχεται η παρουσία βαρέων μετάλλων με σύγκριση χρώματος αντίδρασης με θειούχα προς το χρώμα που δίνει πρότυπο διάλυμα ιόντων μολύβδου.

Έλεγχος ορίων ανόργανων ουσιών

Ελέγχεται η ύπαρξη φωσφορικών, αμμωνίου, αρσενικού, ασβεστίου, χλωριούχων, φθοριούχων, μαγνησίου, καλίου, θεικών και αργιλίου.

2.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΕΛΙΚΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

Για το έλεγχο του τελικού προϊόντος συνήθως απαιτείται έλεγχος κάθε παρτίδας τελικού προϊόντος. Ως παρτίδα νοείται το σύνολο των τελικών προϊόντων τα οποία παρασκευάστηκαν από την ίδια αρχική ποσότητα δραστικής. Οι έλεγχοι που αφορούν το τελικό προϊόν περιλαμβάνουν τον καθορισμό μέσων μαζών και των μεγίστων αποκλίσεων τους, οργανοληπτικά και φυσικά χαρακτηριστικά. Επιπλέον τα φάρμακα που προορίζονται για από του στόματος χορήγηση υποβάλλονται και σε *in vitro* μελέτες της απελευθέρωσης και της ταχύτητας διαλυτοποίησης των δραστικών ουσιών .π.χ έλεγχος αποσάθρωσης, έλεγχος διαλυτοποίησης.[17]

Ποσοτικός προσδιορισμός των δραστικών ουσιών

Ο ποσοτικός προσδιορισμός εκτελείται σε αντιπροσωπευτικό δείγμα της εξεταζόμενης παρτίδας. Τα συνήθη επιτρεπτά όρια της περιεκτικότητας των δραστικών ουσιών 95-105%. Αν η περιεκτικότητα της πρώτης ύλης είναι εκτός των επιτρεπόμενων ορίων σημαίνει ότι η καθαρότητα της πρώτης ύλης δεν είναι αποδεκτή ή ότι υπάρχει διάσπαση του φαρμάκου ή ότι η διαδικασία παραγωγής δεν ήταν ορθή. Ο προσδιορισμός γίνεται τόσο με ογκομετρικές, όσο και με ενόργανες μεθόδους. Για την επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου λαμβάνονται υπόψη τα ακόλουθα:

- Η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα της μεθόδου.
 - Η απαίτηση για την ύπαρξη προτύπων αναφοράς της ουσίας.
 - Η παροχή πληροφοριών από τη μέθοδο για τα όρια των συγγενών ουσιών .
 - Η διαλυτότητα της ουσίας στους διαλύτες της μεθόδου (που περιγράφεται στη φαρμακοποιία).
 - Η ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου δεν επηρεάζεται.
- Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές είναι:
- Μη υδατικές ογκομετρήσεις
 - HPLC
 - Υδατικές ογκομετρήσεις
 - Φασματοφωτομετρία ορατού
 - Αεριο- χρωματογραφία
 - Φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης
 - Φθορισμομετρία κλπ..

ΚΕΦ.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ- ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Η χρωματογραφία είναι ομάδα αναλυτικών τεχνικών διαχωρισμού ουσιών από μίγμα τους. Ονομάστηκε έτσι επειδή αρχικά χρησιμοποιήθηκε για διαχωρισμό εγχρώμων ουσιών.

Αρχή λειτουργίας

Η χρωματογραφία είναι μια ομάδα τεχνικών στις οποίες το δείγμα τοποθετείται στην μία άκρη ενός υλικού που ονομάζεται στατική φάση. Στη συνέχεια αυτό εκλούεται από την κινητή φάση (έναν διαλύτη ή ένα αέριο), η οποία κινείται προς την άλλη άκρη της στατικής φάσης. Όσες ουσίες είναι πολύ διαλυτές στην κινητή φάση και κατακρατώνται ασθενώς από την στατική φάση "τρέχουν" πρώτες, ενώ όσες κατακρατώνται ισχυρά κινούνται πιο αργά. Το αποτέλεσμα είναι ο διαχωρισμός τους.

3.1 ΕΙΔΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

3.1.1 Χρωματογραφία στήλης.

Είναι η πρώτη ιστορικά χρωματογραφική τεχνική που έγινε. Κατ' αυτήν, μία στήλη (σωλήνας) είναι γεμάτη με κατάλληλο για τον επιθυμητό διαχωρισμό προσροφητικό υλικό (τα συνηθέστερα είναι το οξείδιο πυριτίου και η αλουμίνα), τοποθετημένη κάθετα. Στο άνω μέρος της στήλης τοποθετείται το δείγμα και ακολουθεί έκλυση. Κατάλληλα επιλεγμένος διαλύτης τοποθετείται στο πάνω μέρος της στήλης και όπως ρέει προς τα κάτω εκλούει τα συστατικά του δείγματος. Έτσι μέσα στη στήλη επιτελείται διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος, τα οποία εάν είναι έγχρωμα είναι ορατά σε χρωματιστές ζώνες (εξ ου και το όνομα χρωματογραφία). Αν δεν είναι έγχρωμα, ο διαχωρισμός είναι εξίσου καλός, αλλά επειδή δεν είναι ορατά με το μάτι χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές για να τα "δει" ο αναλυτής (π.χ. αν φθορίζουν στο υπεριώδες φως τα φωτίζει με τέτοιο, οπότε έχουμε φθορίζουσες ζώνες).

3.1.2 Χρωματογραφία χάρτη

Είναι η πιο απλή μορφή χρωματογραφίας. Στην άκρη από μία λωρίδα χαρτί (στατική φάση) τοποθετείται μια κηλίδα δείγματος. Το χαρτί βυθίζεται στον κατάλληλο διαλύτη (κινητή φάση) από την μεριά της κηλίδας, και όπως το χαρτί διαποτίζεται σιγά-σιγά από το διαλύτη (ανέρχεται λόγω τριχοειδούς φαινομένου), εκλύονται τα συστατικά του δείγματος και γίνεται διαχωρισμός. Και εδώ επίσης μπορούν να εμφανιστούν "αόρατες" ουσίες που διαχωρίστηκαν με ψεκασμό (ή διαβροχή) με κατάλληλα αντιδραστήρια. Ο λόγος της απόστασης που διήνυσε η κάθε ουσία προς την απόσταση που διήνυσε ο διαλύτης (R_f), για κάθε σύστημα υλικού προσρόφησης-διαλύτη-θερμοκρασίας είναι φυσική σταθερά για την κάθε ουσία.

3.1.3 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Είναι ανάλογη της χρωματογραφίας χάρτη, αλλά αντ' αυτού χρησιμοποιείται λεπτή στιβάδα προσροφητικού υλικού που στηρίζεται πάνω σε λεία επιφάνεια (συνήθως οξειδίο πυριτίου ή αλουμίνα πάνω σε γυάλινη πλάκα). Έχει πολύ καλύτερη ικανότητα διαχωρισμού από τη χρωματογραφία χάρτη. Επίσης επιτρέπει την εμφάνιση "αόρατων" ουσιών με πολύ πιο έντονα μέσα (π.χ. διαβροχή με θειικό οξύ - κάτι που θα κατέστρεφε το χαρτί).

3.1.4 Αεριοχρωματογραφία (GC)

Σε αυτήν η κινητή φάση είναι αέριο και η όλη οργανολογία είναι αρκετά πολύπλοκη. Το δείγμα εισάγεται σε ένα χώρο που εξαερώνεται άμεσα. Αυτό σημαίνει ότι όλα τα συστατικά του δείγματος πρέπει να μπορούν να εξαερωθούν (αναλυτικός περιορισμός). Το αέριο πλέον δείγμα παρασύρεται μέσα σε μια στήλη που περιέχει μία στατική φάση, οπότε γίνεται ο διαχωρισμός. Έτσι από την άλλη άκρη της στήλης εξέρχονται με τη σειρά τα διαχωρισθέντα συστατικά. Από εκεί οδηγούνται στον ανιχνευτή (ηλεκτρονικό μέρος), ο οποίος στέλνει ένα σήμα σε ένα καταγραφικό ανάλογα με την ένταση ανίχνευσης. Πετυχαίνει πάρα πολύ καλούς διαχωρισμούς, ενώ η ικανότητα ανίχνευσης των αναλυόμενων συστατικών είναι πολύ μεγάλη (φτάνει και μερικά τρισεκατομυριοστά του γραμμαρίου (pg) σε κάποιες περιπτώσεις - συνήθως είναι σε μερικά δισεκατομυριοστά (ng)).

3.1.5 Υγροχρωματογραφία

Στην δεκαετία του '80 αναπτύχθηκε η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης(HPLC) με σταθερή ροή στην κινητή φάση, η οποία με τη χρήση ηλεκτρονικών υπολογιστών βελτιστοποιήθηκε και αυτοματοποιήθηκε.

Η *Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης* (HPLC) είναι μία αναλυτική τεχνική διαχωρισμού και ποσοτικού προσδιορισμού μη πτητικών ή θερμοευαίσθητων ουσιών.

Η χρησιμοποιούμενη κινητή φάση είναι υγρή, ενώ η στατική φάση είναι στερεά ή υγρή ακινητοποιημένη πάνω σε αδρανές υπόστρωμα. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται στον προσδιορισμό μεγάλου αριθμού ουσιών, όπως οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες, τα φυτοφάρμακα, τα αντιβιοτικά, καθώς και άλλες κατηγορίες ενώσεων, αλλά κυρίως στα φάρμακα.

Κατά το χρωματογραφικό διαχωρισμό, κάθε ουσία μερίζεται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης και παράλληλα μετακινείται προς την έξοδο της στήλης, εξαιτίας της ροής του διαλύτη, με αποτέλεσμα να δημιουργείται μία μετακινούμενη ζώνη μέσα στη στήλη, η οποία τελικά αποδίδεται ως μία κορυφή στο χρωματογράφημα. Η ποσοτικοποίηση γίνεται βάσει του ύψους της κορυφής ή συνήθως του εμβαδού της επιφάνειάς της, τα οποία είναι ανάλογα με τη συγκέντρωση ή τη μάζα της ουσίας.

Ο διαχωρισμός ενός μίγματος ουσιών βασίζεται στη διαφορετική αλληλεπίδραση του κάθε συστατικού με την κινητή και τη στατική φάση, με συνέπεια να απαιτείται διαφορετικός χρόνος για την έκλουση κάθε ουσίας από τη στήλη. Η αλληλεπίδραση αυτή σχετίζεται με το μέγεθος, το σχήμα και την πυκνότητα φορτίου των σωματιδίων στο διάλυμα. Υπάρχουν διάφορα είδη χρωματογραφίας τα οποία ταξινομούνται ανάλογα με την κατηγορία των ενώσεων που διαχωρίζουν και το μηχανισμό αλληλεπίδρασης που επικρατεί ανάμεσα στις ουσίες προς διαχωρισμό και τις δύο φάσεις. Ειδικότερα :

- Η χρωματογραφία προσρόφησης εφαρμόζεται για το διαχωρισμό μη πολικών ενώσεων.
- Η χρωματογραφία κατανομής εφαρμόζεται για το διαχωρισμό μη ιοντικών πολικών ή άπολων ενώσεων.
- Η χρωματογραφία ιονανταλλαγής εφαρμόζεται για το διαχωρισμό ιοντικών ενώσεων

- Η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού εφαρμόζεται για το διαχωρισμό ενώσεων με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 10.000 Da.

3.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΕΙΔΗ HPLC

Στην HPLC μπορούν να συμπεριληφθούν και να εφαρμοστούν όλα τα είδη μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς, με την κατάλληλη χρήση υλικού πληρώσεως της στήλης και του διαλύτη έκλουσης.

3.2.1 Χρωματογραφία Προσρόφησης

Ο διαχωρισμός των διαφόρων ουσιών βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό προσρόφησης στη στατική φάση. Οι κυριότερες αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι ηλεκτροστατικής φύσης. Η χρωματογραφία προσρόφησης βρίσκει εφαρμογή στο διαχωρισμό ουσιών με παρόμοια δομή, αλλά με διαφορετική πολικότητα.

3.2.2 Χρωματογραφία Κατανομής

Ο διαχωρισμός στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μείγματος μεταξύ της κινητής και της υγρής στατικής φάσης και εφαρμόζεται στην ανάλυση ομόλογων, μη ιοντικών ενώσεων.

Ανάλογα με τη σχέση πολικότητας μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης διακρίνονται δύο είδη χρωματογραφίας κατανομής:

Χρωματογραφία Κανονικής Φάσης

Εδώ, η στατική φάση (συνήθως SiO_2 ή Al_2O_3) είναι πολικότερη από την κινητή, η οποία αποτελείται από μη πολικούς διαλύτες όπως εξάνιο, χλωροφόρμιο.

Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης

Εδώ, η στατική φάση, η οποία είναι λιγότερο πολική της κινητής, αποτελείται από οξείδιο πυριτίου συζευγμένο με διάφορες ομάδες όπως αλκύλια (ακετύλιο,

δεκαοκτώλιο), φαινύλιο, διόλες, αμινομάδες, κυανομάδες κ.ά., ενώ η κινητή φάση αποτελείται από μείγματα οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, κ.ά.) με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα και νερό.

3.2.3 Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής

Ο διαχωρισμός οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προς διαχωρισμό ιόντων και των φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης. Οι κυριότερες παράμετροι που καθορίζουν τη συγκράτηση στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι το αντίθετο ιόν της δραστηκής ομάδας της στατικής φάσης, η ιοντική ισχύς, το pH, ο τροποποιητής της κινητής φάσης και η θερμοκρασία.

3.2.4 Χρωματογραφία Συγγένειας

Για την επίτευξη του διαχωρισμού, οι προσδιοριζόμενες ενώσεις δεσμεύονται εκλεκτικά σε υποκαταστάτες, οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι στην επιφάνεια του διοξειδίου του πυριτίου. Στη κατηγορία αυτή ανήκει η Χρωματογραφία Εναντιομερών, η οποία αποκτά αυξανόμενο ενδιαφέρον και με την οποία διαχωρίζονται εναντιομερείς μορφές ενώσεων που παρουσιάζουν χειρομορφία

3.2.5 Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους ή Διάχυσης Πηκτής

Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το σχήμα και το μέγεθος των μορίων των προσδιοριζόμενων ενώσεων και βρίσκει εφαρμογές στην ανάλυση και το χαρακτηρισμό των πολυμερών.

Τα μεγάλα μόρια εξέρχονται πρώτα από τη στήλη, ενώ τα μικρά μόρια, καθώς εισέρχονται στους πόρους των σωματιδίων της στατικής φάσης, καθυστερούν και βγαίνουν αργότερα.

3.3 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Ένα σύστημα HPLC περιλαμβάνει:

- Φιάλες αποθήκευσης διαλυτών
- Αντλία (σταθερής ροής, σταθερής πίεσης)

- Μονάδα εισαγωγής δείγματος (βαλβίδα εισαγωγής δείγματος, αυτόματος δειγματολήπτης)
- Χρωματογραφική στήλη
- Ανιχνευτή
- Καταγραφικό ή υπολογιστικό σύστημα.

Στην αναλυτική στήλη γίνεται ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος, ενώ η προώθηση της κινητής φάσης διαμέσου της στήλης γίνεται με την αντλία. Η διεργασία του χρωματογραφικού διαχωρισμού αρχίζει με την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη.

3.3.1 Ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην HPLC

Οι ανιχνευτές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην HPLC είναι οι παρακάτω:

- Ανιχνευτής ορατού-υπεριώδους
- Σειράς φωτοδιόδων(PDA)
- Αγωγιμομετρικός
- Δείκτη διάθλασης
- Φασματόμετρο μαζών
- Ηλεκτροχημικός
- Φθορισμομετρικός
- Ραδιενέργειας
- Σκεδασμού φωτός
- Φλόγας (ιοντισμού φλόγας, εκπομπής, φωτομετρικός ανιχνευτής)

Ανιχνευτές Ορατού-Υπεριώδους

Η απορρόφηση ακτινοβολίας από μια χημική ένωση εξαρτάται από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας και τις ομάδες της χημικής ένωσης. Το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο, ανάλογα με την ενέργεια (συχνότητα) που αλληλεπιδρά με τα ηλεκτρόνια, προκαλεί τη διέγερση και μεταφορά τους σε υψηλότερα ενεργειακά επίπεδα, ή ακόμα προκαλεί δόνηση ή περιστροφή μοριακών δεσμών ορισμένων ομάδων της ένωσης.

Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα χωρίζεται στις περιοχές:

Υπερύθρου (IR) 2500-50000 nm

Έγγυς IR 800-2500 nm

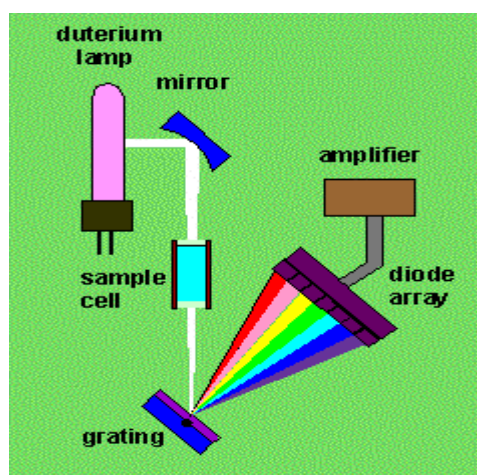
Ορατό Vis 400-800 nm (λάμπα W)

Υπεριώδες UV 190-400 nm (λυχνία D2 ή Hg)

Σύμφωνα με το νόμο του Lambert-Beer, η απορρόφηση της ακτινοβολίας (A) είναι ανάλογη της συγκέντρωσης (C) της ένωσης στη κυψελίδα και του πάχους της κυψελίδας (b) $A = \epsilon dC$, όπου (ϵ) ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης.

Η απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή UV-Vis αντιστοιχεί στη διέγερση χαμηλών ενεργειακά ηλεκτρονίων, όπως π ηλεκτρόνια ή μη συζευγμένα ηλεκτρόνια ορισμένων ομάδων.

Ανιχνευτές σειράς φωτοδιόδων(PDA Σχήμα 3.1)



Σχήμα 3.1: Ανιχνευτής σειράς φωτοδιόδων[7]

Πρόκειται για έναν προηγμένο τύπο ανιχνευτή UV με τη δυνατότητα να παρακολουθεί ταυτόχρονα όλο το εύρος της περιοχής του υπεριώδους, χρησιμοποιώντας μια σειρά φωτοδιόδων που ανιχνεύουν το φως που διασπείρεται από ένα σταθερό μονοχρωμάτορα καθ'όλο το εύρος των μηκών κύματος, παρέχοντας μια διαχωριστική ικανότητα περίπου 1 nm. Χρήσιμος για πολύπλοκα μίγματα που περιέχουν ενώσεις με ευρέως διαφορετικές περιοχές απορρόφησης και για μίγματα των οποίων οι κορυφές αλληλεπικαλύπτονται χρωματογραφικά στα ίδια μήκη κύματος, αλλά «διαχωρίζονται» σε διαφορετικά μήκη.

Ο ανιχνευτής παρέχει πλήρες φάσμα UV κάθε κορυφής του χρωματογραφήματος που βοηθά στην ταυτοποίηση των αγνώστων και παρέχει και το χαρακτηριστικό της «καθαρότητας κορυφής» (peak purity) για τον έλεγχο της ειδικότητας της μεθόδου.

3.4 Κινητή-Στατική φάση

Επιλογή Κινητής Φάσης

Είναι γνωστό από τη χρωματογραφική θεωρία ότι η διαχωριστική ικανότητα R_s εξαρτάται από τον αριθμό των θεωρητικών πλακών N , τον παράγοντα συγκράτησης k' και τον παράγοντα διαχωρισμού α .

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \left(\frac{k'}{k'+1} \right) \times \frac{\alpha-1}{\alpha}$$

Όπου

N = Αριθμός θεωρητικών Πλακών

k' = Παράγοντας χωρητικότητας

α = Παράγοντας διαχωρισμού

Η βελτιστοποίηση των παραμέτρων k' και α γίνεται κυρίως με αλλαγές στη σύσταση της κινητής φάσης. Έτσι, μετά την επιλογή της στατικής φάσης (βελτιστοποίηση του N), η οποία πρέπει να έχει παρόμοια πολικότητα με τις προσδιοριζόμενες ενώσεις, επιλέγεται η κινητή φάση έτσι, ώστε $k'=1-10$.

Επιλογή Στατικής Φάσης

Η επιλογή της στατικής φάσης και της κατάλληλης αναλυτικής στήλης είναι σημαντική για την ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου και καθορίζεται από τις επιμέρους παραμέτρους:

- i. Το μέγεθος των σωματιδίων του υλικού πληρώσεως και τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της στήλης.
- ii. Η φύση της ομάδας που είναι δεσμευμένη στο υπόστρωμα, η οποία καθορίζει και την εκλεκτικότητα της στατικής φάσης.

- iii. Η διάμετρος των πόρων του υλικού πληρώσεως.
- iv. Ο τύπος του υποστρώματος το οποίο πρέπει να είναι χημικά αδρανές.
- v. Η περιεκτικότητα της στήλης σε ελεύθερα σιλανολικά υδροξύλια. Όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό τους, τόσο πιο πολική (όξινη) είναι η στήλη και τόσο ασθενέστερη είναι η συγκράτηση των μη πολικών ενώσεων.

ΚΕΦ.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΗΝ HPLC

4.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΕΞΩΤΕΡΙΚΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ / ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (multiple external standards / calibration curve).

Αποτελεί την πλέον αξιόπιστη μέθοδο ποσοτικοποίησης. Βασίζεται στη χρήση προτύπων εργασίας αναλύτη (working standards) τα οποία είναι διαλυμένα στο χρησιμοποιούμενο διαλύτη. Σε περίπτωση που το μητρικό υλικό των δειγμάτων επηρεάζει την απόκριση της μεθόδου η παρασκευή των προτύπων πρέπει να γίνει στο ίδιο μητρικό υλικό. Η επίδραση του μητρικού υλικού διαπιστώνεται με τη σύγκριση των εξισώσεων παλινδρόμησης από πρότυπα σε μητρικό υλικό και καθαρό διαλύτη. Τα πρότυπα πρέπει να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα στη γραμμική περιοχή και οπωσδήποτε να περικλείουν τις αναμενόμενες συγκεντρώσεις αγνώστων. Στη συνέχεια παρασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας τα ζεύγη τιμών που προκύπτουν και υπολογίζεται η ευθεία παλινδρόμησης με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων. Ο αριθμός των προτύπων που χρησιμοποιούνται ποικίλλει από 1-2 σε περίπτωση απλού ελέγχου έως 3-6 για γραμμική σχέση βαθμονόμησης. Η συχνότητα κατασκευής της καμπύλης αναφοράς εξαρτάται από την ανθεκτικότητα της μεθόδου.[15]

4.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΑΡΕΜΒΟΛΗΣ (bracketing)

Σε περιπτώσεις όπου η καμπύλη βαθμονόμησης δεν είναι γραμμική χρησιμοποιείται η μέθοδος της παρεμβολής. Στη μέθοδο αυτή απαιτείται η εξέταση μεγάλου αριθμού προτύπων. Τα αποτελέσματα των προτύπων αυτών συνιστούν την καμπύλη αναφοράς η οποία είναι μη γραμμική. Στη μέθοδο αυτή ο υπολογισμός του αγνώστου γίνεται γραφικά. Ένα τμήμα της καμπύλης μεταξύ δύο σημείων-προτύπων θεωρείται γραμμικό και ανάμεσα σε αυτά τα δύο σημεία βρίσκεται η απόκριση του αγνώστου. Μπορεί να γίνει και υπολογιστικά με χρήση εξίσωσης.[15]

4.3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΝΟΣ ΕΞΩΤΕΡΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ (single external standard)

Με τη μέθοδο ενός εξωτερικού προτύπου, παρασκευάζεται ένα μόνο πρότυπο διάλυμα ίδιας περιόδου συγκέντρωσης με τα άγνωστα. Η συγκέντρωση του αγνώστου C_x υπολογίζεται από τη σχέση:

$$C_x = \frac{P_0 \Delta C}{P_1 - P_0}$$

Χρησιμοποιείται όπου η μέθοδος παρουσιάζει γραμμική καμπύλη ανφοράς και διέρχεται από την αρχή των αξόνων. Σε περίπτωση που η μέθοδος εμφανίζει σήμα λευκού δείγματος αυτό αφαιρείται από τις μετρήσεις των σημάτων των προτύπων και του αγνώστου δείγματος.[15]

4.4 ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΤΑΘΕΡΗΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ (standard addition method)

Ως μέθοδος της σταθερής προσθήκης νοείται μια διαδικασία κατά την οποία το δείγμα δοκιμής μοιράζεται σε δύο (ή περισσότερα) υποδείγματα προς ανάλυση. Ένα υπόδειγμα αναλύεται όπως έχει και γνωστές ποσότητες της πρότυπης ουσίας προστίθενται στα άλλα υποδείγματα. Η προστιθέμενη ποσότητα της πρότυπης ουσίας πρέπει να είναι διπλάσια έως και πενταπλάσια από την εκτιμώμενη ποσότητα της αναλυτέας ουσίας στο δείγμα. Η μέθοδος αυτή έχει σχεδιαστεί για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας μιας αναλυτέας ουσίας σε ένα δείγμα, λαμβάνοντας υπόψη την ανάκτηση της αναλυτικής διαδικασίας. Ενδείκνυται όταν μέρος του αναλύτη βρίσκεται συνδεδεμένο με το μητρικό υλικό (π.χ. πρωτεΐνες), οπότε επιτυγχάνεται προσδιορισμός ολικής συγκέντρωσης του αναλύτη. Απαιτείται γραμμική σχέση της καμπύλης βαθμονόμησης και υποχρεωτική διέλευση από την αρχή των αξόνων.

4.5 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ (internal standard)

Βασίζεται στο ότι ο λόγος των τιμών της μετρούμενης αναλυτικής παραμέτρου δύο ουσιών ενός διαλύματος είναι πρακτικά ανεξάρτητος από τα χαρακτηριστικά του χρησιμοποιούμενου οργάνου και τις άλλες πειραματικές μεταβλητές (Θερμοκρασία, συγκέντρωση αντιδραστηρίων, σταθερότητα οργάνου κλπ.). Σε κάθε διάλυμα αγνώστου δείγματος (ή και προτύπων) προστίθεται γνωστή

ποσότητα ενός εσωτερικού προτύπου (συστατικό παρόμοιο προς το μετρούμενο) και μετρούνται οι τιμές της αναλυτικής παραμέτρου για το μετρούμενο συστατικό και το εσωτερικό πρότυπο, είτε στο ίδιο στάδιο μετρήσεως. Ο λόγος των δύο τιμών χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του αγνώστου, είτε υπολογιστικά, είτε με τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς, όπως περιγράφεται λεπτομερώς στα οικεία εδάφια. Με τη μέθοδο αυτή, οποιαδήποτε μεταβολή των πειραματικών συνθηκών έχει την ίδια επίδραση στη μέτρηση των αναλυτικών παραμέτρων του συστατικού και του εσωτερικού προτύπου, με συνέπεια ο λόγος τους να παραμένει σταθερός. Συνδυάζεται κυρίως με τη μέθοδο πολλαπλών ή ενός εξωτερικών προτύπων. Εφαρμόζεται στην περίπτωση που αναμένονται μεταβολές στην ευαισθησία της μετρητικής διατάξεως από μέτρηση σε μέτρηση. Η συγκέντρωσή του επιλέγεται έτσι, ώστε το σήμα του να είναι παρόμοιου μεγέθους με τα αναμενόμενα άγνωστα. Το ιδανικό εσωτερικό πρότυπο πρέπει να παρουσιάζει παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες με τον αναλύτη και η μέθοδος να αποκρίνεται κατά τον ίδιο τρόπο με τον αναλύτη, αλλά να μπορεί να μετράται εκλεκτικά.

4.6 ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ (normalization)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί τα εμβαδά των κορυφών των συστατικών του δείγματος. Χρησιμοποιείται στις χρωματογραφικές τεχνικές (GLC, HPLC) για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας των συστατικών μείγματος ουσιών. Στην περίπτωση που η μετρούμενη απόκριση του ανιχνευτή διαφέρει από συστατικό σε συστατικό είναι απαραίτητη η εύρεση του πειραματικού παράγοντα απόκρισης F ως προς μια ουσία αναφοράς.[15]

ΚΕΦ.5 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Έχουν γίνει πολλές συζητήσεις για τους όρους επικύρωση και επαλήθευση αναλυτικής μεθόδου. Ο σκοπός της επικύρωσης(validation) μιας αναλυτικής μεθόδου είναι η απόδειξη καταλληλότητας της μεθόδου για τον σκοπό τον οποίο εξυπηρετεί. Οι αναλυτικές μετρήσεις αποσκοπούν στην συλλογή ακριβών και αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Από μόνη της η επικύρωση της μεθόδου δεν μπορεί να το εγγυηθεί αυτό.

Στη συνέχεια περιγράφονται διάφορα χαρακτηριστικά ποιότητας που μελετώνται κατά την επικύρωση μιας μεθόδου HPLC.

5.1 ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ (Specificity) -ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (Selectivity)

Μια μέθοδος είναι πλήρως ειδική (specific) για ένα αναλύτη, εάν η συγκέντρωσή του μπορεί να προσδιορισθεί με ακρίβεια χωρίς επίδραση από τα άλλα συστατικά του δείγματος. Τα άλλα συστατικά δεν παράγουν αναλυτικό σήμα. Μια μέθοδος είναι πλήρως εκλεκτική (selective), εάν παρέχει ορθά αναλυτικά αποτελέσματα για τα διάφορα συστατικά του μείγματος χωρίς αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Μια εκλεκτική μέθοδος συνίσταται από μια σειρά ειδικών μετρήσεων. Πολλές φορές δεν γίνεται διάκριση των δύο όρων και χρησιμοποιούνται ισοδύναμα. Για την τεχνική της HPLC αναφερόμαστε σε εκλεκτικότητα.

Μια μέθοδος πρέπει να είναι σε θέση να διακρίνει την προσδιοριζόμενη ουσία από άλλες ουσίες υπό τις πειραματικές συνθήκες της μεθόδου. Πρέπει να γίνεται εκτίμηση σχετικά με την έκταση στην οποία αυτό είναι δυνατό να συμβεί. Πρέπει να χρησιμοποιούνται στρατηγικές για την υπέρβαση τυχόν προβλεπτών παρεμποδίσεων με ουσίες όταν χρησιμοποιείται η προβλεφθείσα τεχνική μέτρησης, π.χ. ομόλογες ουσίες, ανάλογες ουσίες, μεταβολίτες και προσμίξεις. Έχει πρωταρχική σημασία να διερευνάται η παρεμπόδιση που μπορεί να προκληθεί από συστατικά της μήτρας. Για τις αναλυτικές μεθόδους έχει σημασία η ικανότητα διάκρισης ανάμεσα στην προσδιοριζόμενη ουσία και σε συγγενικές ουσίες (ισομερή, μεταβολίτες, προϊόντα αποικοδόμησης, ενδογενείς ουσίες, συστατικά της μήτρας, κ.λπ.). Είναι απαραίτητες δύο προσεγγίσεις προκειμένου να ελεγχθούν οι παρεμποδίσεις.

Επιλέγονται δυνητικά παρεμποδίζουσες ουσίες και αναλύονται τα σχετικά λευκά δείγματα (placebo) για να ανιχνεύεται η παρουσία ενδεχόμενων παρεμποδίσεων και να υπολογίζεται η επίδρασή τους:

- Επιλέγεται μια σειρά χημικώς συγγενών ενώσεων (μεταβολίτες, παράγωγα κ.λπ.) ή άλλες ουσίες που ενδέχεται να απαντηθούν σε συνδυασμό με την ένωση που ενδιαφέρει και που μπορεί να υπάρχουν στα δείγματα.
- Αναλύεται ο κατάλληλος αριθμός αντιπροσωπευτικών λευκών δειγμάτων και ελέγχονται τυχόν παρεμποδίσεις (σήματα, κορυφές, ίχνη ιόντων) στην περιοχή που ενδιαφέρει όπου αναμένεται να εκλουστεί η προσδιοριζόμενη ουσία.
- Επιπλέον, τα αντιπροσωπευτικά λευκά δείγματα εμβολιάζονται στην κατάλληλη συγκέντρωση με μία ή περισσότερες ουσίες που μπορεί να δημιουργήσουν παρεμποδίσεις κατά την ταυτοποίηση ή/και τον ποσοτικό προσδιορισμό της προσδιοριζόμενης ουσίας.
- Μετά την ανάλυση εξετάζεται εάν:
 - η παρουσία μπορεί να οδηγήσει σε ψευδή ταυτοποίηση,
 - η ταυτοποίηση της ουσίας-στόχου εμποδίζεται από την παρουσία μιας ή περισσότερων παρεμποδίσεων ή
 - ο ποσοτικός προσδιορισμός επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό.[1]

Στην HPLC η ειδικότητα επιτυγχάνεται με την χρήση διαφορετικών στηλών, καθώς επίσης και με τη ρύθμιση διαφορετικών συνθηκών, όπως διαφορετική κινητή φάση, θερμοκρασία, επιλογή κατάλληλου μήκους κύματος του ανιχνευτή κλπ. Η χρήση ανιχνευτών PDA εξασφαλίζει τον έλεγχο της ειδικότητας μέσω της παραμέτρου «καθαρότητα κορυφής» που παρέχει.

5.2 ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ (Linearity)

Γραμμικότητα μιας αναλυτικής διαδικασίας είναι η ικανότητά της να παρέχει μετρούμενα αποτελέσματα ευθέως ανάλογα των συγκεντρώσεων του αναλύτη. Καθορίζεται από μία σειρά πέντε ή έξι μετρήσεων προτύπων διαλυμάτων των οποίων οι συγκεντρώσεις είναι 80-120% της αναμενόμενης τιμής του αναλύτη. Η απόκριση πρέπει να είναι ευθέως ανάλογη των συγκεντρώσεων των αναλυτών. Εάν στο διάγραμμα απόκρισης – συγκέντρωσης, η τομή (intercept, a) είναι σημαντικά διαφορετική από το μηδέν (t-test, a/S_a), πρώτα αφαιρείται από κάθε απόκριση η τομή

και στη συνέχεια διαιρείται με τη συγκέντρωση. Εφαρμόζεται είτε απευθείας στην καθαρή προσδιοριζόμενη ουσία (αραιώσεις ενός προτύπου διαλύματος παρακαταθήκης) , είτε με ξεχωριστές ζυγίσεις συνθετικού μείγματος των συστατικών ενός προϊόντος, και εφαρμογή της ελεγχόμενης αναλυτικής μεθόδου (εξετάζεται κατά τον έλεγχο της περιοχής συγκεντρώσεων). Τα πρότυπα παρασκευάζονται αν είναι δυνατόν στο ίδιο μητρικό υλικό με τα δείγματα.

Υπολογίζεται ο μέσος όρος (mean), η τυπική απόκλιση (standard deviation, SD), και η σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation, RSD) για κάθε συγκέντρωση και στη συνέχεια γίνεται το διάγραμμα (plot) μέσης απόκρισης (mean response) (y-άξονας) ως προς τη συγκέντρωση (x-άξονας). Κατόπιν υπολογίζεται η εξίσωση παλινδρόμησης (regression equation)

$$Y = a + b X$$

και ο συντελεστής προσδιορισμού (coefficient of determination) r^2 και ο συντελεστής συσχέτισης (r). Προτιμάται το r^2 να είναι μεγαλύτερο ή ίσο με 0.99. Τα προγράμματα υπολογίζουν και την τυπική απόκλιση του a και του b όπως επίσης και το τυπικό σφάλμα της καμπύλης (Sy/y).

5.3 ΕΥΡΟΣ (Range)

Καθορίζει την περιοχή των συγκεντρώσεων ανάμεσα στην υψηλότερη και τη χαμηλότερη τιμή συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα κατά τις οποίες συγκεντρώσεις η αναλυτικά διαδικασία διατηρεί την ακρίβεια τη γραμμικότητα και την επαναληψιμότητα της. Γενικά η περιοχή συγκεντρώσεων μιας αναλυτικής μεθόδου εκτείνεται από το όριο ποσοτικοποίησης μέχρι τη συγκέντρωση που παρατηρείται απόκλιση από τη γραμμικότητα κατά 1-2%. Για προσδιορισμούς δειγμάτων δραστικών ουσιών αναμένεται το εύρος να εκτείνεται σε 80-120% της αναμενόμενης περιεκτικότητας των δειγμάτων. Για προσδιορισμούς των προσμίξεων της δραστικής το εύρος αναμένεται ανάμεσα στο όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου ή το 50% του ορίου έως το 120% του ορίου της πρόσμιξης με το μεγαλύτερο όριο.

5.4 ΑΚΡΙΒΕΙΑ (Accuracy)

Με τον όρο ακρίβεια εννοούμε τη διαφορά ανάμεσα στη μετρούμενη τιμή μιας ποσότητας και την πραγματική τιμή αυτής της ποσότητας.

Η ακρίβεια μιας αναλυτικής μεθόδου μπορεί να προσδιοριστεί με τους ακόλουθους τρόπους:

- Αναλύοντας ένα δείγμα γνωστής συγκέντρωσης και συγκρίνοντας τη μετρούμενη τιμή με την πραγματική τιμή. Είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο ένα πιστοποιημένο υλικό (πρότυπο αναφοράς).
- Αναλύοντας ένα εμβολιασμένο δείγμα και μετρώντας την ανάκτηση. Σ' αυτή την περίπτωση υπάρχει ένα δείγμα placebo το οποίο περιέχει όλες τις ουσίες και τα έκδοχα του σκευάσματος που εξετάζεται εκτός από την προσδιοριζόμενη ουσία. Στο δείγμα αυτό εμβολιάζεται γνωστή ποσότητα διαλύματος πρότυπου αναφοράς του οποίου η συγκέντρωση είναι γνωστή. Κατόπιν μετράται η ανάκτηση και συγκρίνεται με την πραγματική τιμή.
- Μέθοδος σταθερής προσθήκης. Στην περίπτωση αυτή γνωστή συγκέντρωση προτύπου αναφοράς προστίθεται μέσα στο προς εξέταση δείγμα και μετράται η τιμή.

Η διαφορά της μετρούμενης τιμής με τη γνωστή ποσότητα προτύπου που προστέθηκε είναι το μέγεθος που μας ενδιαφέρει. Στις δύο τελευταίες μεθόδους η ανάκτηση ορίζεται ως η διαφορά της μετρούμενης τιμής από την αναμενόμενη πραγματική εκφρασμένη ως ποσοστό επί της εκατό (%).

Η ακρίβεια πρέπει να ικανοποιεί τουλάχιστον 3 επίπεδα συγκεντρώσεων του αναμενόμενου εύρους τιμών (80%, 100%, 120%, της δηλούμενης τιμής).

Η ακρίβεια μπορεί επίσης να διαπιστωθεί συγκρίνοντας τα αποτελέσματα δειγμάτων με αυτά που έχουν εξαχθεί από άλλη πιστοποιημένη μέθοδο.

Τα αποδεκτά κριτήρια που αναμένονται από την ανάκτηση εξαρτώνται από την επίδραση του μητρικού υλικού, την αναλυτική διαδικασία και τη συγκέντρωση του αναλύτη. Η μέση % ανάκτηση πρέπει να βρίσκεται στο ακόλουθο εύρος τιμών.

Για την Αμερικανική και Ευρωπαϊκή Φαρμακοποία, τα όρια είναι 98%-102% για τους ποσοτικούς προσδιορισμούς δραστικών σε φαρμακευτικά σκευάσματα.

Για προϊόντα άνευ κανονισμών ελέγχου γίνεται αποδεκτή ανάκτηση 90%-110%.

Από μερικούς προτείνεται ανεκτό σφάλμα ίσο με 4 φορές την τυπική

απόκλιση της μεθόδου.

Σε κάθε περίπτωση το Εργαστήριο πρέπει να ενημερώνεται για τα κριτήρια αποδοχής των Ευρωπαϊκών και Εθνικών φορέων.

5.5 ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ (Precision), ΕΝΔΙΑΜΕΣΗ ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ (Intermediate precision) ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ (Repeatability)

Με τον όρο πιστότητα εννοούμε τη διασπορά επαναλαμβανόμενων μετρήσεων της ίδιας ποσότητας και κάτω από καθορισμένες συνθήκες μέτρησης. Η πιστότητα μιας αναλυτικής διαδικασίας εκφράζεται με τη διασπορά, την τυπική απόκλιση και την σχετική τυπική απόκλιση. Τουλάχιστον 5 δείγματα πρέπει να αναλυθούν και να αξιολογηθούν στατιστικά τα αποτελέσματα.[16]

Η επαναληψιμότητα και η ενδιάμεση πιστότητα αποτελούν υποσύνολα της πιστότητας και συμβολίζονται με r και R , αντίστοιχα.

Επαναληψιμότητα είναι το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων διαδοχικών ελέγχων στο ίδιο δείγμα, που εκτελούνται κάτω από τις ίδιες συνθήκες, δηλ. ίδια μέθοδος ελέγχου, ίδιος αναλυτής, ίδια συσκευή, ίδιο εργαστήριο και βραχύ χρονικό διάστημα.

Ενδιάμεση Πιστότητα είναι το μέτρο της διασποράς μεταξύ των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με την ίδια μέθοδο στο ίδιο δείγμα, κάτω από διαφορετικές συνθήκες, δηλ. διαφορετικός αναλυτής, διαφορετικές συσκευές, διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίων, διαφορετικούς χρόνους.

Για τον προσδιορισμό της πιστότητας και της ορθότητας (τις δύο συνιστώσες της ακρίβειας) χρησιμοποιούνται πιστοποιημένα υλικά αναφοράς (CRM) ή συνήθη συνθετικά γνωστά δείγματα. Η διαδικασία είναι η εξής:

- Αναλύονται 6 υποδείγματα σύμφωνα με τις οδηγίες δοκιμής για τη μέθοδο.
- Προσδιορίζεται η συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας που υπάρχει σε κάθε υπόδειγμα.
- Υπολογίζεται ο μέσος όρος, η τυπική απόκλιση και η σχετική τυπική απόκλιση (το RSD) για τις συγκεντρώσεις αυτές.[1]

5.6 ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ (Limit of Detection, LOD)

Εκφράζει τη μικρότερη ποσότητα του αναλύτη που μπορεί να ανιχνευτεί στο δείγμα με αξιοπιστία. Το όριο ανίχνευσης συχνά παρομοιάζεται λανθασμένα με την ευαισθησία της μεθόδου, η οποία είναι η ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει μικρές διαφορές στις μάζες των αναλυτών. Στη χρωματογραφία το όριο ανίχνευσης είναι η μικρότερη ποσότητα αναλύτη η οποία όταν ενεθεί δίνει κορυφή της οποίας το ύψος είναι 2-3 φορές το ύψος του θορύβου της γραμμής βάσης (δηλαδή $S/N=2-3$). Γενικά, ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναλύτη της οποίας το αναλυτικό σήμα διαφέρει από το σήμα του λευκού δείγματος κατά 3,3 φορές την τυπική απόκλιση του σήματος του λευκού.[16]

5.7 ΟΡΙΟ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ (Limit of Quantitation, LOQ)

Εκφράζει τη μικρότερη ποσότητα του αναλύτη στο δείγμα που μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο σε μεθόδους για προσμίξεις δραστικών ουσιών και για τον προσδιορισμό προϊόντων διάσπασης. Εφόσον οριστεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου στο επίπεδο του ορίου ποσοτικοποίησης αναλύονται 5-6 δείγματα από 6 φορές το καθένα. Τα δείγματα αυτά έχουν μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις οι οποίες εκτείνονται από το όριο ανίχνευσης έως και 20 φορές αυτό. Έτσι τελικά ως όριο ποσοτικοποίησης ορίζεται η συγκέντρωση του αναλύτη της οποίας το αναλυτικό σήμα διαφέρει από το σήμα του λευκού δείγματος κατά 10 φορές την τυπική απόκλιση του σήματος του λευκού. Για τις μεθόδους HPLC το LOQ είναι η συγκέντρωση του αναλύτη με λόγο $S/N=10$. [16]

5.8 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (Robustness)-ANTOXH (Ruggedness)

Πρόκειται για δύο συνώνυμους όρους που περιγράφουν την ικανότητα που έχει μια αναλυτική μέθοδος να διατηρεί την αναπαραγωγιμότητά της κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα ως ανθεκτικότητα ορίζεται η ικανότητα μιας αναλυτικής μεθόδου να παραμένει ανεπηρέαστη από μικρές μεταβολές των

συνθηκών εργασίας και να διατηρεί την αξιοπιστία της με το πέρασμα του χρόνου. Ως αντοχή εκφράζεται ο βαθμός της ανθεκτικότητας δηλαδή πόσο μπορούν να αλλάξουν αυτές οι συνθήκες αφήνοντας ανεπηρέαστη την αναλυτική μέθοδο. Ελέγχεται λοιπόν αν επηρεάζεται η ενδιάμεση πιστότητα κάτω από μια ποικιλία συνθηκών όπως διαφορετικά εργαστήρια, αναλυτές, όργανα μέτρησης, μέρες, θερμοκρασίες, διαφορετικές παρτίδες του ίδιου σκευάσματος κλπ.

Στις μελέτες αυτού του είδους τα εργαστήρια εισάγουν σκόπιμα λογικές μεταβολές ήσσονος σημασίας και παρατηρούν τις συνέπειες.

Κατά τις προερευνητικές μελέτες πρέπει να επιλέγονται οι παράγοντες προεπεξεργασίας, καθαρισμού και ανάλυσης του δείγματος, που μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα της μέτρησης. Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να περιλαμβάνουν τον αναλυτή, την πηγή και την ηλικία των αντιδραστηρίων, τους διαλύτες, τα πρότυπα και τα εκχυλίσματα του δείγματος, τον ρυθμό θέρμανσης, τη θερμοκρασία, την τιμή του pH, καθώς και πολλούς άλλους παράγοντες που μπορεί να εμφανιστούν στο εργαστήριο. Οι παράγοντες αυτοί πρέπει να επιλέγονται στην τάξη μεγέθους που ταιριάζει στις αποκλίσεις που συναντάμε συνήθως ανάμεσα στα εργαστήρια.

- Εντοπίζονται οι πιθανοί παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα.
- Τροποποιείται ελαφρώς ο κάθε παράγοντας.
- Εάν βρεθεί ότι κάποιος παράγοντας επηρεάζει σημαντικά τα αποτελέσματα της μέτρησης, διεξάγονται περαιτέρω πειράματα για να αποφασιστούν τα όρια ανοχής του παράγοντα αυτού.
- Οι παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά τα αποτελέσματα πρέπει να προσδιορίζονται σαφώς στο πρωτόκολλο της μεθόδου.

Η βασική ιδέα δεν είναι να εξετάζεται μία μεταβολή κάθε φορά αλλά να εισάγονται πολλές μεταβολές ταυτοχρόνως.

ΚΕΦ.6 ΜΥΚΗΤΕΣ-ΜΥΚΗΤΙΑΣΗ

6.1 ΜΥΚΗΤΕΣ

Οι μύκητες ανήκουν στην κατηγορία μικροοργανισμών οι οποίοι εκτείνονται από μονοκυττάρους σχηματισμούς, που μπορούν να γίνουν ορατοί μόνο με μικροσκόπιο, έως τα πολυκυττάρια μανιτάρια (τα οποία είναι σαπρόφυτα) και που εύκολα είναι ορατά με γυμνό οφθαλμό. Διακρίνονται σε σαπρόφυτα και παράσιτα. Τα σαπρόφυτα λαμβάνουν την τροφή τους από νεκρή ύλη και έχουν λιγότερες απαιτήσεις από ότι τα παράσιτα τα οποία τρέφονται από ζωντανή ύλη. Οι μύκητες είναι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί και μπορούν να αναπτυχθούν σε μια μεγάλη ποικιλία περιβαλλόντων που υπάρχουν μέσα ή πάνω σε ζώα και ανθρώπους, πάνω σε φυτά, ακόμα δε και στο έδαφος. Μόνο 15 γένη και περίπου 100 είδη από τις χιλιάδες των ειδών μυκήτων ευθύνονται για νόσους στον άνθρωπο. Οι περισσότεροι από τους μύκητες ιατρικού ενδιαφέροντος έχουν κοσμοπολίτικη κατανομή και βρίσκονται παντού.[4]

6.2 ΜΥΚΗΤΙΑΣΕΙΣ

Οι μυκητιάσεις διακρίνονται σε επιπολής και συστηματικές ή εν τω βάθει. Οι επιπολής μυκητιάσεις προσβάλλουν τα μέρη του σώματος που περιέχουν κερατίνη (επιδερμίδα, τρίχες, νύχια κλπ.). Αυτές οι λοιμώξεις γενικά θεωρούνται αισθητικά προβλήματα και δεν θέτουν σε κίνδυνο τη ζωή. Σπανιότατα και μόνο σε άτομα σοβαρά ανοσοκατασταλμένα επεκτείνονται σε άλλους ιστούς. Τα παιδιά είναι περισσότερο ευαίσθητα και οι λοιμώξεις είναι συχνότερες σε περιοχές με θερμό και υγρό κλίμα.

Τα συχνότερα αίτια επιπολής μυκητιάσεων είναι τα είδη *Trichophyton*, *Microsporum*, και ένα είδος *Epidermophyton*, που ομαδικά αναφέρονται ως δερματόφυτα. Άλλοι μύκητες που προκαλούν επιπολής μυκητιάσεις περιλαμβάνονται στα είδη *Pityrosporum* και *Candida*.

Οι κλινικές εκδηλώσεις είναι απολέπιση του δέρματος, τριχόπτωση, κνησμός και ερύθημα ή άλλη δυσχρωμία. Η συμπτωματολογία είναι χαρακτηριστική, αλλά δεν

είναι επαρκής. Έτσι για να τεθεί ακριβής διάγνωση απαιτείται ειδικός εργαστηριακός έλεγχος.[4]

6.3 ΔΕΡΜΑΤΟΦΥΤΙΕΣ

Τα δερματόφυτα είναι μια ομάδα μυκήτων οι οποίοι χρησιμοποιούν την κερατίνη ως πηγή τροφής και ανευρίσκονται στο δέρμα, στα νύχια και στις τρίχες. Όλα τα δερματόφυτα προκαλούν λοίμωξη με τον ίδιο τρόπο. Τα σπόρια των μυκήτων βλαστάνουν σε θερμές και υγρές επιφάνειες του δέρματος. Παράγουν υφές οι οποίες διεισδύουν στην κερατίνη στιβάδα για να βρουν τροφή. Οι υφές αυτές αυξάνονται και εξαπλώνονται πλευρικά σε όλη την κερατίνη προσβάλλοντας τρίχες και θυλάκους ή νύχια της περιοχής.

Υποδιαιρούνται και ταξινομούνται ανάλογα με το μέρος του σώματος που αφορούν. [4]

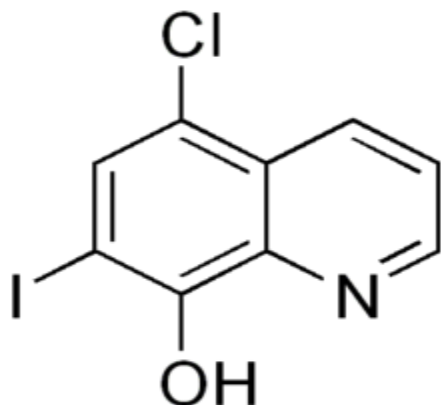
6.4 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΥΚΗΤΙΑΣΕΩΝ

Οι επιφανειακές μυκητιάσεις είναι αρκετά συχνές και κατά κανόνα υποχωρούν με τοπική θεραπεία. Οι εν τω βάθει συστηματικές μυκητιάσεις είναι σπανιότερες και συνήθως παρατηρούνται σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς. Η πρόοδος της ιατρικής έχει συμβάλλει τα τελευταία χρόνια στην αύξηση του αριθμού των ασθενών με ανοσοκαταστολή και ως εκ τούτου και των συστηματικών μυκητιάσεων. Εν τούτοις η πρόοδος στην θεραπευτική των μυκητιάσεων δεν είναι ανάλογη.

Η μυκητίαση δέρματος αντιμετωπίζεται με:

- Αντιμυκητιασικές κρέμες σε ήπιες περιπτώσεις
- Αντιμυκητιασικά φάρμακα από το στόμα (ιτρακοναζόλη, φλουκοναζόλη, τερμπιναφίνη). [4]

ΚΕΦ. 7 ΚΛΙΟΚΙΝΟΛΗ



Χημική δομή της Clisoquinol(5-χλωρο-7-ιωδο-κινολιν-8-όλη)

7.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είναι μία ογκώδης, σπογγώδης, κιτρινόλευκη έως καφεκίτρινη σκόνη με ελαφρά χαρακτηριστική οσμή. Σκουραίνει κατά την έκθεση στο φως. Πρακτικά αδιάλυτη στο νερό. Διαλυτή στην αιθανόλη (σε αναλογία 1:3500) , στο χλωροφόρμιο (1:120) και στον αιθέρα (1:4500). Διαλυτή σε θερμό οξικό αιθυλεστέρα και σε θερμό παγόμορφο οξικό οξύ. Φυλάσσεται σε αεροστεγείς περιέκτες προστατευμένους από το φως.

7.2 ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Η Κλιοκινόλη σπάνια μπορεί να προκαλέσει ιωδίωση σε ευαίσθητους ασθενείς. Τοπική εφαρμογή της κλιοκινόλης σε αλοιφές ή κρέμες μπορεί να προκαλέσει περιστασιακά σοβαρό ερεθισμό ή υπερευαισθησία και μπορεί να υπάρχει διασταυρούμενη ευαισθησία με άλλες αλογονωμένες υδροξυκινολίνες.

Όταν ερθει σε επαφή με ρούχα αφήνει κίτρινα στίγματα και μπορεί να λεκιάσει το δέρμα και να αποχρωματίσει τα ξανθά μαλλιά.

Η Κλιοκινόλη χορηγούμενη από το στόμα έχει συσχετιστεί με σοβαρή νευροτοξικότητα. Στην Ιαπωνία, η εμφάνιση επιδημίας υποξείας μυελο-

οπτικονευροπάθειας (SMDN) στη δεκαετία του 1960 συνδέθηκε με την πρόσληψη κανονικών ή υψηλών δόσεων της κλιοκινόλης για παρατεταμένες περιόδους, και η πώληση της κλιοκινόλης και συναφών υδροξυκινολινών ακολούθως απαγορεύτηκε εκεί. Τα συμπτώματα της SMDN είναι κυρίως εκείνες της περιφερικής νευροπάθειας, συμπεριλαμβανομένης της οπτικής ατροφίας και μυελοπάθειας. Κοιλιακός πόνος και διάρροια συχνά προηγούνται των νευρολογικών συμπτωμάτων. Παραισθησίες στα πόδια εξελίσσονται σε παραπληγία σε μερικούς ασθενείς και η απώλεια της οπτικής οξύτητας μερικές φορές οδηγεί σε τύφλωση. Μια χαρακτηριστική πράσινη χρωστική ουσία, ένα χηλικό σύμπλοκο της κλιοκινόλης με σίδηρο, βρίσκεται συχνά μετά από χημική εξέταση στη γλώσσα, στα ούρα και στα κόπρανα. Επιπλέον έχουν αναφερθεί εγκεφαλικές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένης της σύγχυσης και της αμνησίας. Αν και πολλοί ασθενείς ανάρρωσαν όταν διέκοψαν τη λήψη της κλιοκινόλης, άλλοι είχαν υπολειπόμενη αναπηρία.

Προτάθηκε ότι η ιαπωνική επιδημία μπορεί να οφείλεται σε γενετική προδιάθεση, αλλά μερικές παρόμοιες περιπτώσεις έχουν αναφερθεί και από άλλες χώρες. Γι' αυτό το λόγο τα από στόματος παρασκευάσματα κλιοκινόλης έχουν πλέον απαγορευτεί στις περισσότερες χώρες.

7.3 ΥΠΕΡΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ

Η Κλιοκινόλη έχει ταξινομηθεί ως ένα αλλεργιογόνο επαφής που μπορεί να προκαλέσει ευαισθητοποίηση, ειδικά όταν εφαρμόζεται στο δέρμα ατόμων που πάσχουν από έκζεμα.

7.4 ΤΟΠΙΚΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ

Υπάρχει ένας πιθανός κίνδυνος τοξικότητας για τα βρέφη και τα παιδιά από την απορρόφηση της κλιοκινόλης μέσω του δέρματος μετά από τοπική εφαρμογή. Έτσι τα προϊόντα που περιέχουν οποιαδήποτε από αυτές τις ενώσεις δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται από βρέφη ή παιδιά.

Η Κλιοκινόλη είναι μια αλογονωμένη υδροξυκινολίνη με αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση και χρησιμοποιείται υπό μορφή κρέμας και αλοιφής για τη θεραπεία των λοιμώξεων του δέρματος. Η συνήθης περιεκτικότητα αυτών των σκευασμάτων σε δραστική είναι 3%. Εφαρμόζεται σε συνδυασμό συνήθως με ένα

κορτικοστεροειδές σε φλεγμονώδεις καταστάσεις του δέρματος που προκαλούνται από βακτηριακές ή μυκητιασικές λοιμώξεις. Επίσης χρησιμοποιείται σε σταγόνες στο αυτί για την εξωτερική ωτίτιδα.

Η Κλιοκινόλη παλαιότερα χορηγούνταν από το στόμα για τη θεραπεία της εντερικής αμοιβάδωσης. Επίσης παλαιότερα είχε χρησιμοποιηθεί για την προφύλαξη και τη θεραπεία της διάρροιας των ταξιδιωτών και παρόμοιες λοιμώξεις. Τα από του στόματος σκευάσματα έχουν πλέον αποσυρθεί λόγω της νευροτοξικότητας που προκαλούν. Ωστόσο, η από του στόματος χορήγησή της ερευνάται για τη δράση της στη θεραπεία της νόσου του Alzheimer με μορφή χηλικού συμπλόκου χαλκού και ψευδαργύρου.

Η 5-χλωρο-7-ιωδο-κινολιν-8-όλη (Clioquinol) είναι μια 8-υδροξυκινολίνη η οποία χρησιμοποιούνταν από το 1950-1970 ως αντιπαρασιτικός παράγοντας για την θεραπεία και την πρόληψη της εντερικής αμοιβάδωσης. Ωστόσο ο μηχανισμός δράσης της ως αντιμικροβιακό ήταν άγνωστος.

Τη δεκαετία του '70 αποσύρθηκε από την αγορά φαρμάκων, καθώς προκαλούσε νευροτοξικότητα σε Ιάπωνες ασθενείς. Ωστόσο, σήμερα υπάρχουν ακόμα σκευάσματα τοπικής χρήσης που περιέχουν Κλιοκινόλη και χρησιμοποιούνται για την θεραπεία τοπικών μυκητιάσεων και παρασιτικών μολύνσεων.

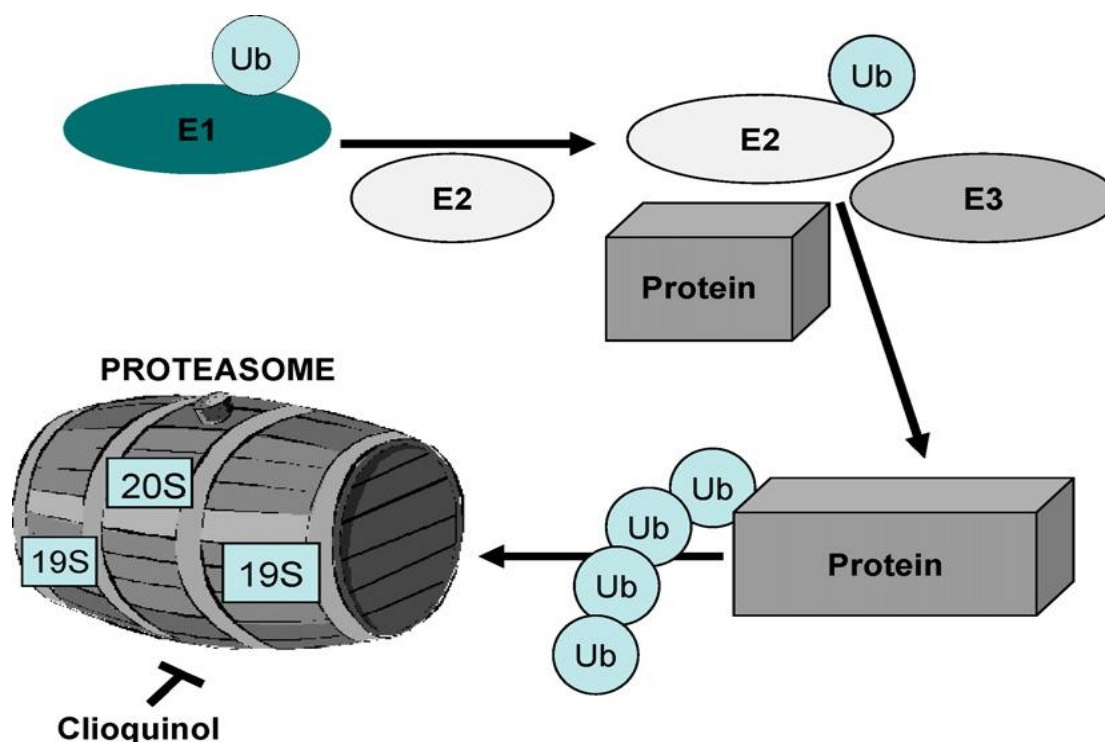
Σήμερα γίνονται έρευνες πάνω στη χρήση της ουσίας για την θεραπεία του Alzheimer και του καρκίνου. Έτσι είναι απαραίτητη η κατανόηση της τοξικολογίας της Κλιοκινόλης, ώστε να γίνουν αντιληπτές οι αντενδείξεις της ουσίας σε αυτούς τους πληθυσμούς ασθενών.

Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι η Κλιοκινόλη αυξάνει την καταστροφή των κακοηθών κυττάρων εμποδίζοντας το πρωτεόσωμα. Το πρωτεόσωμα είναι ένα ενζυματικό σύμπλεγμα το οποίο βρίσκεται στον πυρήνα και στο κυτόπλασμα.

Μέσω αυτής της δράσης λοιπόν η Κλιοκινόλη αυξάνει την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων σε ασθενείς που πάσχουν από λευχαιμία και μυέλωμα. Έτσι μπορεί στο μέλλον η Κλιοκινόλη να αποτελέσει ένα καινοτόμο αντικαρκινικό παράγοντα.

Επίσης εξετάζεται η χρήση της Κλιοκινόλης στη νόσο Alzheimer. Η δράση της αποδίδεται στην ικανότητα της να συνδέεται με το χαλκό. Συνδεδεμένη με το χαλκό αποσπά αυτό το μέταλλο από τις β – αμυλοειδείς πρωτεΐνες, οι οποίες ενοχοποιούνται για την νόσο του Alzheimer. Μελέτες σε ασθενείς που πάσχουν από

Alzheimer έδειξαν βελτίωση της διάνυγkας και της συμπεριφοράς των ασθενών που υποβλήθηκαν στις δοκιμές.



Σχήμα 7.1 Μηχανισμός σύνδεσης Κλιοκινόλης με χαλκό β-αμυλοειδών πρωτεϊνών [10]

7.5 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ [8, 10, 22, 23]

Φαρμακοκινητικές μελέτες της απορροφησης της Κλιοκινόλης σε ποντίκια μετά από ενδοπεριτονεϊκή εφαρμογή του φαρμάκου έδειξαν ότι μέγιστη συγκέντρωση επιτεύχθηκε μετά από 30 min έως 1 ώρα.

Στους ανθρώπους μετά από στόματος χορήγηση η μέγιστη συγκέντρωση του φαρμάκου επιτυγχάνεται μετά από 4 ώρες από την χορήγηση.

Ο χρόνος ημιζώης του φαρμάκου είναι μεταξύ 11 και 14 ώρες . Χρησιμοποιώντας σημασμένη με άνθρακα 14 Κλιοκινόλη εκτιμάται ότι 25% μιας δόσης 750 mg από το στόμα βρίσκεται στα ούρα.

Ακολουθώντας ένα φαρμακολογικό σχήμα με εφάπαξ ημερήσια δόση για μια βδομάδα η ποσότητα της ουσίας στο πλάσμα μειώνεται σε επίπεδο μη ανιχνεύσιμο μέσα σε 3 ημέρες. Αμέσως μετά την απορρόφηση της, η Κλιοκινόλη μεταβολίζεται σε γλυκουρονίδια καιθειούχους ενώσεις.

7.6 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ

Η νευροπροστατευτική δράση της Κλιοκινόλης οφείλεται στην ικανότητα που έχει να σχηματίζει σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα (κυρίως με το σίδηρο και τον ψευδάργυρο) καθώς επίσης και με τον άνθρακα .

Αυτά τα μέταλλα καταλύουν την παραγωγή ενεργών οξειδίων τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία οξειδωτικού στρες το οποίο σχετίζεται με πολλές νευρολογικές δυσλειτουργίες.

7.7 ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΖΩΑ [8, 10, 22, 23]

Τοξικολογικές μελέτες της Κλιοκινόλης έχουν γίνει τόσο για ζώα, όσο και για τους ανθρώπους. Στις μελέτες που αφορούν στα ζώα, η νευροτοξικότητα αποτελεί την κυρίαρχη παρενέργεια μετά τη χορήγηση της Κλιοκινόλης. Εντούτοις , οι δόσεις που μπορούσαν να προκαλέσουν τη νευροτοξικότητα ξεπερνούσαν τη δόση εκείνη που απαιτείται ως ημερήσια δόση για την θεραπεία του Alzheimer και του καρκίνου. Μελέτες σε ποντίκια έδειξαν αλλαγές στα οπτικά νεύρα και στα γάγγλια και νευροτοξικότητα μετά από χορήγηση μεγάλων δόσεων Κλιοκινόλης, ενώ αντίθετα η χορήγηση μικρής δόσης δεν επέφερε κάποια τοξικότητα (100mg/kg).

Χορήγηση αυξανόμενων δόσεων του φαρμάκου σε ενήλικες γάτες έδειξε μειωμένη ευαισθησία στα περιφερειακά νεύρα σε σύγκριση με γάτες που δεν είχαν λάβει την αγωγή.

Τουλάχιστον 20 μελέτες έγιναν σε σκύλους. Τα σκυλιά που υποβλήθηκαν σε αγωγή με Κλιοκινόλη εμφάνισαν χαρακτηριστικό περπάτημα με άκαμπτα πόδια, γενικότερη ακαμψία έως και ολοκληρωτική παράλυση.

Επιπλέον παρατηρήθηκαν άλλες ανωμαλίες, όπως αναιμία και αυξημένη κρεατινίνη, ανορεξία και απώλεια βάρους . Σε σκυλιά στα οποία χορηγήθηκε δόση 100 mg/kg δεν παρατηρήθηκαν ανωμαλίες.

Χορήγηση δόσης 200mg/kg σε μπαμπούνους δεν επέφερε νευροτοξικότητα. Αντίθετα δόσεις 600 mg/kg (ημερήσια δόση)είχε ως αποτέλεσμα απώλεια βάρους και νευροτοξικότητα.

7.8 ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ [8, 10, 22, 23]

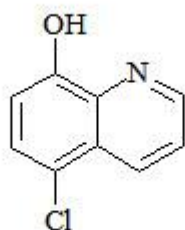
Μελέτες σε εθελοντές ασθενείς σε δόσεις 750 mg/ ημέρα και 1,5g/ ημέρα δεν επέδειξαν κάποια παρενέργεια. Επίσης, χορήγηση 500 mg, 750 mg και 1000 mg ημερησίως σε εθελοντές που έπασχαν από διάρροιες, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των διαρροϊκών κενώσεων χωρίς περεταίρω παρενέργειες.

Στις αρχές του '70 αποσύρθηκαν τα από του στόματος σκευάσματα λόγω της αναφερθείσας μυελο-οπτικής νευροπάθειας (SMDN) της οποίας τα συμπτώματα είναι μεν αναστρέψιμα, ωστόσο παραμένει μια μικρή οπτική ανικανότητα. Πρέπει να σημειωθεί ότι το σύνδρομο αυτό εμφανίστηκε μόνο σε Ιάπωνες ασθενείς, ενώ μεταγενέστερες μελέτες σε άλλους πληθυσμούς (πλήν της Ιαπωνίας) δεν είχαν ως παρενέργεια τη SMDN. Η εξήγηση γι' αυτό το φαινόμενο παραμένει άγνωστη. Πιθανώς η νευροτοξικότητα στους Ιάπωνες να οφείλεται σε μειωμένη πρόσληψη βιταμίνης B₁₂ ή σε διαφορετική σύνθεση των σκευασμάτων της Κλιοκινόλης στην Ιαπωνία ή ακόμη και σε γενετική προδιάθεση αυτών των πληθυσμών σε αυτό το σύνδρομο.

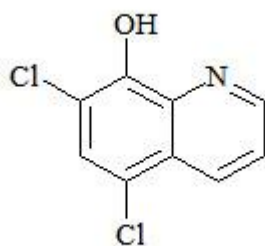
Σήμερα η Κλιοκινόλη χρησιμοποιείται για τοπική χρήση σε μορφή αλοιφής ή σταγόνων. Η τοπική χρήση της μπορεί να έχει ως παρενέργειες ερεθισμό, κνησμό, πρήξιμο ή σε σπάνιες περιπτώσεις ακόμα και πόνο στο δέρμα.

7.9 ΠΡΟΣΜΙΞΕΙΣ ΚΛΙΟΚΙΝΟΛΗΣ

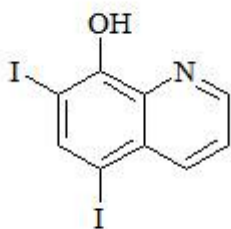
Οι πιο σημαντικές προσμίξεις της Κλιοκινόλης είναι οι ακόλουθες τρεις:



Πρόσμιξη Α



Πρόσμιξη Β



Πρόσμιξη C

7.10 ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΣΙΚΗ ΑΛΟΙΦΗ ΚΛΙΟΚΙΝΟΛΗΣ

Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία των δερματικών παθήσεων εφαρμόζονται τοπικά με διάφορες μορφές. Τα σκευάσματα αυτά περιέχουν εκτός της δραστικής ουσίας και τα έκδοχα ή αδρανή συστατικά η σημασία των οποίων ενέχει ιδιαίτερη αξία στο τελικό θεραπευτικό αποτέλεσμα, καθώς διευκολύνουν την εφαρμογή του κυρίως φαρμάκου και την απελευθέρωσή του, αυξάνουν τη διαβατότητα από το δέρμα ενώ παράλληλα ασκούν και άλλες δράσεις (μαλακτική και προστατευτική).

Οι αλοιφές είναι λιπαρά παρασκευάσματα και ενδείκνυνται σε χρόνια φλεγμονώδεις καταστάσεις στις οποίες απαιτείται παραλλήλως και μαλακτική δράση. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται σε οξείες φλεγμονώδεις καταστάσεις ή πτυχές του δέρματος γιατί μπορεί να προκαλέσουν ερεθισμό.

7.11 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΛΙΟΚΙΝΟΛΗΣ

Για τον προσδιορισμό της Κλιοκινόλης η μονογραφία της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας παρουσιάζει ως μέθοδο ανάλυσης της πρώτης ύλης την ακόλουθη: Ποσότητα ουσίας διαλύεται σε οξικό ανυδρίτη και προστίθεται παγόμορφο οξικό οξύ. Ακολουθεί τιτλοδότηση με υπερχλωρικό οξύ 0,1 M. Πρόκειται λοιπόν για ποτενσιομετρική ογκομέτρηση κι όχι μέθοδο HPLC.

Για τον προσδιορισμό των προσμίξεων η Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία προβλέπει μέθοδο HPLC αντίστροφης φάσης με στήλη C₈ και ως κινητή φάση μίγμα μεθανόλης-νερού όπου έχει διαλυθεί ποσότητα EDTA και εξυλαμίνης και έχει ρυθμιστεί το pH στο 3 με φωσφορικά.

Άλλες μέθοδοι της Κλιοκινόλης που έχουν εφαρμοστεί σε μελέτες είναι οι ακόλουθες:

- Φθορισμομετρικός προσδιορισμός Κλιοκινόλης με Ίνδιο(III) σε CTAB. Η μέθοδος αυτή ενδείκνυται για φαρμακευτικά σκευάσματα αλοιφών και κρεμών που περιέχουν Κλιοκινόλη.
- Προσδιορισμός Κλιοκινόλης σε πλάσμα και ιστούς χάμστερ με χρήση HPLC και ηλεκτροχημική ανίχνευση. Χρησιμοποιήθηκε στήλη C₁₈ και ως κινητή φάση μίγμα αποτελούμενο από υδατικό διάλυμα με φωσφορικά/κιτρικά, μεθανόλη και ακετονιτρίλιο.
- Προσδιορισμός Κλιοκινόλης σε βιολογικά υγρά με χρήση HPLC. Χρησιμοποιήθηκε στήλη C₁₈ και ως κινητή φάση μίγμα κιτρικού οξέος 0,1 M, μεθανόλης και n-εξανίου.
- Προσδιορισμός πρώτης ύλης Κλιοκινόλης και των προσμίξεων αυτής με χρήση HPLC αντίστροφης φάσης. Χρησιμοποιήθηκε στήλη C₈ και ως κινητή φάση μίγμα υδατικού διαλύτη μεθανόλης.
- Προσδιορισμός Κλιοκινόλης σε φαρμακευτικά σκευάσματα αλοιφών και κρεμών με χρήση HPLC αντίστροφης φάσης. Χρησιμοποιήθηκε στήλη με συνδεδεμένο φαινύλιο και ως κινητή φάση μίγμα ακετονιτριλίου-μεθανόλης-νερού που περιείχε οξικό αμμώνιο και χλωρίδιο του νικελίου.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη και επικύρωση αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού της Κλιοκινόλης και των προσμίξεων αυτής σε φαρμακευτικό σκεύασμα αντιμυκητιασικής αλοιφής.

Έγιναν πειράματα σχετικά με την εύρεση βέλτιστων συνθηκών και χρωματογραφικών παραμέτρων, καθώς επίσης και βέλτιστης μεθόδου κατεργασίας του σκευάσματος. Τα παραπάνω χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού Κλιοκινόλης και των προσμίξεων της.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν έλεγχοι ειδικότητας, ακρίβειας, γραμμικότητας, πιστότητας, ανθεκτικότητας και σταθερότητας, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για την επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού Κλιοκινόλης και των προσμίξεων της. Επιπλέον για την επικύρωση της μεθόδου των προσμίξεων έγινε έλεγχος των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης.

Η μέθοδος προσδιορισμού που αναπτύσσεται είναι σύντομη και πρακτική καθώς ο χρόνος ανάλυσης είναι σύντομος, ενώ ταυτόχρονα η επεξεργασία του σκευάσματος και η προετοιμασία των διαλυμάτων εργασίας είναι απλές, γεγονός πολύ σημαντικό για εργαστήρια που εκτελούν μεγάλο όγκο αναλύσεων.

ΚΕΦ. 8 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ – ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ – ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται τα όργανα, τα διαλύματα και τα σκεύασμα που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση αυτής της εργασίας.

8.1 ΣΥΣΤΗΜΑ HPLC



Πρόκειται για ένα χρωματογραφικό σύστημα Shimadzu (Duisburg, Germany) Prominence Series HPLC-DAD modular system, το οποίο αποτελείται από:

- Ένα σύστημα απαέρωσης της κινητής φάσης DGU-20A5,
- Μια αντλία LC-20 AD micro dual piston,
- Αυτόματο δειγματολήπτη τύπου SIL-20ACHT,
- Φούρνο τύπου CTO-20AC,
- Ανιχνευτή φωτοδιόδων τύπου SPD-M20 UV/Vis και
- Έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με τον χρωματογράφο και στον οποίο είναι εγκατεστημένο το λογισμικό Shimadzu LC Solutions (v.1.11 SP1) ως σύστημα ελέγχου, καθώς επίσης και για την καταγραφή και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων και των διαδικασιών.

8.2 ΑΝΑΛΥΤΙΚΟΣ ΖΥΓΟΣ

Οι ζυγίσσεις απαιτούσαν μεγάλη ακρίβεια γι' αυτό χρησιμοποιήθηκε ένας ζυγός με 5 δεκαδικά ψηφία τύπου Mettler Toledo.

8.3 ΛΟΥΤΡΟ ΥΠΕΡΗΧΩΝ

Για τη διαλυτοποίηση ορισμένων ουσιών χρησιμοποιήθηκε λουτρό υπερήχων τύπου Branson 1510.

8.4 ΠΕΧΑΜΕΤΡΟ

Για τη ρύθμιση του pH της κινητής φάσης ήταν απαραίτητη η χρήση pHμέτρου τύπου Delta OHM του οποίου η βαθμονόμηση έγινε με πρότυπα ρυθμιστικά διαλύματα.

8.5 ΣΥΣΚΕΥΗ Vortex

Η συσκευή Vortex χρησιμοποιήθηκε για τη διάλυση ουσιών με ανάδευση σε σωληνάρια ή μικρά φιαλίδια. Η ανάδευση ξεκινά αμέσως μετά την τοποθέτηση του σωλήνα στην κεφαλή της συσκευής και σταματάει όταν απομακρυνθεί ο σωλήνας.

8.6 ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΗΘΗΣΗΣ-ΑΠΑΕΡΩΣΗΣ

Για την απομάκρυνση διαλυμένων σωματιδίων ή αέρα που περιέχονται στην κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε συσκευή διήθησης-απαέρωσης υπό κενό με φίλτρο Durapore πορώδους 0,45 μm της Millipore.

8.7 ΔΙΑΛΥΤΕΣ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Νερό HPLC-grade ($> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) απιονισμένο και απεσταγμένο.

Μεθανόλη (MeOH) (HPLC grade, Merck)

Εξυλαμίνη (For synthesis, Merck)

Τετραϋδροφουράνιο (Analytical reagent grade, Fisher Scientific)

Αιθυλενο-διάμινο-τετραοξικό νάτριο (EDTA)(Merck)

8.8 ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Clioquinol BP CRS (Batch 3107)

5,7-Dichloro-8-hydroxyquinoline (Impurity B, 99%, Aldrich)

8-chloro-8-hydroxyquinoline (Impurity A, 95%, Acros)

5,7-Diiodo-8-hydroxyquinoline (Impurity C, 97%, Acros)

Fluocinolone acetonide EP CRS

8.9 ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟ ΣΚΕΥΑΣΜΑ ΚΛΙΟΚΙΝΟΛΗΣ

Φαρμακευτική αντιμυκητιασική αλοιφή με δραστικές Κλιοκινόλη 3% και Φλουοκινολόνη 0,025% .

8.10 ΈΚΔΟΧΑ

Η περιεκτικότητα των εκδόχων σε κάθε γραμμάριο αλοιφής είναι:

0,1 mg κιτρικού οξέος (citric acid)

100 mg υγρής παραφίνης (paraffin liquid)

50 mg προπυλενογλυκόλης (propylene glycol)

40 mg λίπους (wool fat)

779,65 mg μαλακής λευκής παραφίνης (white soft paraffin)

ΚΕΦ.9 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΛΙΟΚΙΝΟΛΗΣ (ASSAY)

9.1 ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΗΚΟΥΣ ΚΥΜΑΤΟΣ

Ως μήκος κύματος επιλέχθηκαν τα 254 nm, καθώς σ' αυτό το μήκος κύματος παρουσιάζει η Κλιοκινόλη κορυφή, σύμφωνα με τη μονογραφία της ουσίας Στην Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία.

9.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΚΛΙΟΚΙΝΟΛΗΣ

Παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα Κλιοκινόλης ως εξής:
25 mg προτύπου προστέθηκαν σε ογκομετρική φιάλη 25 ml και διαλύθηκαν με μεθανόλη. Έγινε πλήρης διαλυτοποίηση με τη βοήθεια λουτρού υπερήχων. Το διάλυμα αυτό είχε συγκέντρωση Κλιοκινόλης 1000 µg/ml. Παρασκευάστηκε διάλυμα εργασίας συγκέντρωσης 400 µg/ml.

Εδώ πρέπει να αναφερθεί ότι τα διαλύματα της Κλιοκινόλης είναι πολύ φωτοευαίσθητα οπότε αμέσως μετά την παρασκευή τους φυλάσσονται σε φωτοσκιερά δοχεία ώστε να αποφευχθεί η αποικοδόμηση της ουσίας.

9.3 ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΗΛΗΣ

Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε αυτή που περιγράφεται στη μέθοδο προσδιορισμού των προσμίξεων στη μονογραφία της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας. Η παρασκευή της κινητής φάσης έγινε ως εξής:

1,052 g ένυδρου EDTA προστέθηκαν σε ογκομετρική φιάλη 2 l με 700 ml νερού HPLC και διαλύθηκαν πλήρως με χρήση λουτρού υπερήχων. Ακολούθως, προστέθηκαν 8 ml εξυλαμίνης. Ρυθμίστηκε το pH στο 3 με τη χρήση φωσφορικών και προστέθηκαν 1200 ml μεθανόλης. Συμπληρώθηκε ο όγκος έως τα 2 l με νερό και ακολούθησε διήθηση με το σύστημα διήθησης υπό κενό για την απαέρωση της κινητής φάσης.

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν μία στήλη BDS Hypersyl C8 (Thermo) 100x4,6 mm (5μm) κατάλληλη για χρωματογραφία αντίστροφης φάσης.

Μηχανισμός διαχωρισμού της ουσίας σύμφωνα με τις παραπάνω συνθήκες

Η Κλιοκινόλη σχηματίζει σύμπλοκα με πολυσθενή μεταλλικά ιόντα, όπως τα ιόντα ασβεστίου, οπότε δεσμεύεται πάνω στη στήλη και απομακρύνεται αργά δίνοντας άσχημες και διευρυμένες κορυφές. Για την αποφυγή αυτού του προβλήματος χρησιμοποιείται το EDTA το οποίο δεσμεύει τα παραπάνω ιόντα (καλυπτικό αντιδραστήριο) επιτρέποντας την Κλιοκινόλη να εκλουστεί πιο γρήγορα. Από την άλλη, η Κλιοκινόλη είναι πολύ πολικό μόριο με αποτέλεσμα να εκλούεται τόσο γρήγορα από τη στήλη αντιστρόφου φάσης μέσης πολικότητας C₈, ώστε η κορυφή της βρίσκεται στο νεκρό χρόνο του χρωματογραφήματος. Το πρόβλημα αυτό επιλύεται με την προσθήκη της εξυλαμίνης στην κινητή φάση, η οποία στο pH 3,0 δημιουργεί κατιόντα και με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται μηχανισμός ζεύγους ιόντων με τη βοήθεια του οποίου η κορυφή της Κλιοκινόλης εμφανίζεται πιο αργά.

9.4 ΕΠΙΛΟΓΗ ΛΟΙΠΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ

Όσον αφορά τις υπόλοιπες παραμέτρους του χρωματογραφικού συστήματος οι βέλτιστες συνθήκες ήταν οι ακόλουθες:

- Ταχύτητα ροής κινητής φάσης: 1,3 ml/min.
- Θερμοκρασία μετρήσεων: 25 °C (περιβάλλοντος).
- Χρόνος καταγραφής χρωματογραφήματος: 15 min.
- Όγκος ένεσης: 20 μl (καθώς αύξηση του όγκου προκαλούσε ασυμμετρία στις κορυφές του χρωματογραφήματος).
- Συγκέντρωση εργασίας: 100 ppm.

9.5 ΕΞΙΣΟΡΡΟΠΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Μετά την παρασκευή της η κινητή φάση αφέθηκε στο χρωματογραφικό σύστημα για εξισορρόπηση με ροή 1,3 ml/min για περίπου μισή ώρα.

9.6 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΟΣ

Για να βρεθεί ο βέλτιστος τρόπος κατεργασίας της αλοιφής για την παραλαβή της Κλικινόλης έγιναν ορισμένες δοκιμές. Ζυγίστηκαν περίπου από 200 mg αλοιφής και τοποθετήθηκαν σε 5 δοκιμαστικούς σωλήνες. Για την εκχύλιση της Κλικινόλης από την αλοιφή χρησιμοποιήθηκαν 5 ml από διάφορους διαλύτες και ακολούθησε θέρμανση επί 5 min σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 47-48 °C. Τα αποτελέσματα ήταν τα ακόλουθα:

1. Προσθήκη Μεθανόλης ως διαλύτη είχε ως αποτέλεσμα μερική μόνο διάλυση του σκευάσματος.
2. Προσθήκη Νερού δεν επέφερε διάλυση.
3. Προσθήκη Ακετόνης είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη διάλυση, αλλά και τη δημιουργία δύο φάσεων.
4. Προσθήκη Εξανίου οδήγησε σε πλήρη διάλυση.
5. Προσθήκη Τετραϋδροφουρανίου (THF) οδήγησε σε πλήρη διάλυση.

Από τις δοκιμές προέκυψε ότι το Εξάνιο και το THF είναι οι πλέον κατάλληλοι διαλύτες για την εκχύλιση. Προτιμάται το THF διότι το Εξάνιο είναι διαλύτης που χρησιμοποιείται σε χρωματογραφικές στήλες κανονικής φάσης, ενώ στη συγκεκριμένη μέθοδο έχουμε στήλη αντίστροφης φάσης.

Αφού επιλέχθηκε το THF ως εκχυλιστικό μέσο, επόμενο στάδιο ήταν η εύρεση του διαλύτη αραίωσης. Σε 1 ml από το δοκιμαστικό σωλήνα Νο 5 προστέθηκαν 4 ml μεθανόλης. Το διάλυμα που προέκυψε ήταν θολό. Επαναλήφθηκε η διαδικασία προσθέτοντας 4 ml από την κινητή φάση (υδατικό διάλυμα εξυλαμίνης pH 3,0 : μεθανόλης) και η εικόνα ήταν η ίδια δηλαδή πάλι το διάλυμα ήταν θολό. Έγινε διήθηση στα δύο διαλύματα και το διήθημα ενέθηκε στην HPLC. Τα χρωματογραφήματα που πάρθηκαν και από τα δύο διαλύματα ήταν πολύ καλά οπότε αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί ως διαλύτη αραίωσης η κινητή φάση του συστήματος.

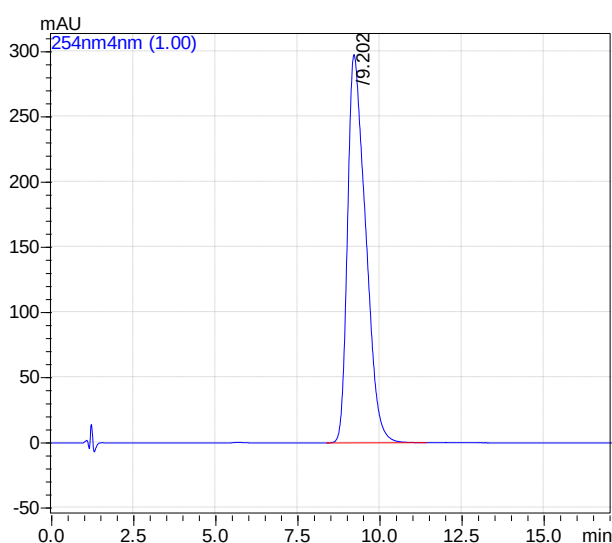
Ένα τελευταίο ζήτημα που έπρεπε να εξετασθεί ήταν η μείωση της ποσότητας του χρησιμοποιούμενου THF, καθώς η μεγάλη ποσότητα είχε ως αποτέλεσμα την διαλυτοποίηση των λιπαρών εκδόχων της αλοιφής τα οποία επικάθονται πάνω στη

στήλη αχρηστεύοντας την. Βρέθηκε ότι η ελάχιστη ποσότητα THF για την εκχύλιση της Κλιοκινόλης από 1 g αλοιφής είναι 10 ml.

Συγκεντρώνοντας όλα τα παραπάνω, η επεξεργασία της αλοιφής συνοψίζεται ως εξής:

Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml ζυγίζεται 1 g αλοιφής και προστίθενται 10 ml THF. Εμβαπτίζεται η φιάλη σε νερό 47-48 °C για 30 s και στη συνέχεια αναδεύεται στο vortex για άλλα 30 s. Το διάλυμα που προκύπτει είναι διαυγές. Αφήνεται το διάλυμα να κρύνει (θολώνει όσο κρύνει, λόγω καταβύθισης των λιπαρών συστατικών) και συμπληρώνεται έως τη χαραγή με κινητή φάση. Διηθείται και 1 μέρος από το διήθημα αραιώνεται με 2 μέρη κινητής φάσης. Με αυτό τον τρόπο προκύπτει το διάλυμα ελέγχου.

Μετά από την εξισορρόπηση του συστήματος έγινε ένεση με το πρότυπο διάλυμα των 400 μg/ml και λήφθηκε το χρωματογράφημα που παρουσιάζεται στο σχήμα 9.1.



Σχήμα 9.1 Χρωματογράφημα διαλύματος Κλιοκινόλης 400 μg/ml

Παρατηρούμε λοιπόν ότι εφαρμόζοντας τις παραπάνω χρωματογραφικές παραμέτρους η κορυφή της Κλιοκινόλης είναι καθαρή και παρουσιάζει καλή εικόνα συνεπώς οι παράμετροι που επιλέχθηκαν είναι οι βέλτιστες.

ΚΕΦ. 10 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ (IMPURITIES)

Για την ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού των προσμίξεων της Κλιοκινόλης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που προβλέπει η Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία με μικρές αλλαγές.

10.1 ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΗΚΟΥΣ ΚΥΜΑΤΟΣ

Ενώ για τον προσδιορισμό της ουσίας ως μήκος κύματος επιλέχθηκαν τα 254 nm, καθώς σ' αυτό το μήκος κύματος παρουσιάζει η Κλιοκινόλη κορυφή, για τον προσδιορισμό των προσμίξεων το μήκος αυτό δεν ήταν κατάλληλο για όλες τις προσμίξεις. Πιο συγκεκριμένα, η κορυφή της Πρόσμιξης Α συνέπεφτε με τη κορυφή που εμφανίζει η συνυπάρχουσα δραστική του σκευάσματος (Φλουοκινολόνη) στα 254 nm. Για το λόγο αυτό, η καταγραφή των χρωματογραφημάτων έγινε για την Πρόσμιξη Α στα 324 nm, όπου η πρόσμιξη αυτή παρουσιάζει απορρόφηση, σε αντίθεση με τη Φλουοκινολόνη η οποία δεν παρουσιάζει κορυφή σε αυτό το μήκος κύματος. Οι απορροφήσεις των άλλων δύο προσμίξεων καθώς και του προτύπου της Κλιοκινόλης έγινε στα 254 nm.

10.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΗΛΗΣ

Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε αυτή που περιγράφεται στη μέθοδο προσδιορισμού των προσμίξεων στη μονογραφία της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας. Η παρασκευή της κινητής φάσης περιγράφεται στο εδάφιο 9.3.

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ίδια με αυτή της μεθόδου προσδιορισμού της Κλιοκινόλης και τα χαρακτηριστικά της αναφέρονται στο εδάφιο 9.3.

10.3 ΕΠΙΛΟΓΗ ΛΟΠΙΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ

Όσον αφορά τις υπόλοιπες παραμέτρους του χρωματογραφικού συστήματος ήταν οι ίδιες με αυτές που περιγράφονται στο εδάφιο 9.4 της ανάπτυξης μεθόδου προσδιορισμού της Κλιοκινόλης.

10.4 ΕΞΙΣΟΡΡΟΠΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Όπως και στην ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού της Κλιοκινόλης, μετά την παρασκευή της η κινητή φάση αφέθηκε στο χρωματογραφικό σύστημα για εξισορρόπηση με ροή 1,3 ml/min για περίπου μισή ώρα.

10.5 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΟΣ

Για την κατεργασία του σκευάσματος εφαρμόστηκε η μέθοδος που αναπτύχθηκε στο εδάφιο 9.6 της μεθόδου προσδιορισμού της Κλιοκινόλης.

ΚΕΦ. 11 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΚΛΙΟΚΙΝΟΛΗΣ ΣΕ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟ ΣΚΕΥΑΣΜΑ

11.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Οι χρωματογραφικές συνθήκες της μεθόδου περιγράφονται στο κεφάλαιο 9. Ο όγκος εισαγωγής ήταν 20 μl.

11.2 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΔΟΧΗΣ

Τα κριτήρια που πρέπει να πληρούνται ώστε η μέθοδος να αξιολογηθεί ως αποδεκτή είναι τα ακόλουθα:

Καταλληλότητα συστήματος

- Η %RSD διαδοχικών ενέσεων πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση με 2,0.
- Η %RSD του χρόνου κατακράτησης της Κλιοκινόλης να είναι μικρότερη ή ίση με 0,5.

Ειδικότητα μεθόδου

- Διάλυμα λευκού δείγματος: Δεν πρέπει να εμφανίζεται κορυφή στο χρόνο κατακράτησης της Κλιοκινόλης.
- Εμβολιασμένο διάλυμα Β: Ο διαχωρισμός (resolution) μεταξύ της κορυφής της Κλιοκινόλης και οποιασδήποτε άλλης κορυφής βρίσκεται δίπλα της πρέπει να είναι ≥ 2.0 .
- Η καθαρότητα της χρωματογραφικής κορυφής (peak purity) που αντιστοιχεί στην Κλιοκινόλη στα εμβολιασμένα διαλύματα πρέπει να είναι $\geq 0,98$.

Γραμμικότητα

- Ο συντελεστής συσχέτισης δεν πρέπει να είναι μικρότερος από 0,99.
- Η καμπύλη απόκρισης να περνά από την αρχή των αξόνων.

Ακρίβεια μεθόδου

- Η % ανάκτηση να κυμαίνεται μεταξύ 98-102%.
- Το %RSD μεταξύ των ανακτήσεων να είναι ≤ 2.0 .

Πιστότητα μεθόδου

- Για την επαναληψιμότητα του συστήματος η %RSD του εμβαδού της κορυφής της Κλιοκινόλης πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση από 1,5.
- Για την επαναληψιμότητα της μεθόδου πρέπει η % ανάκτηση να κυμαίνεται μεταξύ 98-102% και η %RSD μεταξύ των ανακτήσεων να είναι $\leq 2,0$.
- Για την ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα κάθε % ανάκτηση θα πρέπει να βρίσκεται μεταξύ των τιμών 98-102 % η %RSD_r της συνολικής επαναληψιμότητας πρέπει να είναι $\leq 5,0\%$, και η %RSD_R της ενδιάμεσης πιστότητας πρέπει να είναι $\leq 5,0\%$.

Ανθεκτικότητα μεθόδου

- Η % ανάκτηση πρέπει να βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές 98-102 %.
- Η %RSD των ανακτήσεων του πειράματος πρέπει να είναι ≤ 2.0 .

Σταθερότητα

- Η % ανάκτηση πρέπει να βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές 98-102 %.
- Η %RSD των ανακτήσεων ανάμεσα στις τιμές ενός πειράματος πρέπει να είναι $\leq 2,0$.

11.3 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό εφαρμόζεται ο παρακάτω τύπος:

$$\text{Περιεκτικότητα } _{(\%)} = \frac{A_{\text{test}}}{A_{\text{standard}}} \times \frac{W_{\text{std}}}{30} \times \frac{1}{W_{\text{test}} \times L} \times \%P$$

όπου:

A_{test} : Το εμβαδό της χρωματογραφικής κορυφής της Κλιοκινόλης στο διάλυμα ελέγχου.

A_{std} : Το εμβαδό της χρωματογραφικής κορυφής της Κλιοκινόλης στο πρότυπο διάλυμα.

W_{std} : Το ακριβές βάρος πρότυπης ουσίας αναφοράς της Κλιοκινόλης που χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία του πρότυπου διαλύματος (σε mg).

W_{test} : Το ακριβές βάρος τελικού προϊόντος που χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία του διαλύματος ελέγχου (σε mg).

L : Η δηλούμενη περιεκτικότητα (mg/gr).

$\%P$: Η % καθαρότητα της ουσίας αναφοράς της Κλιοκινόλης.

30 : Το θεωρητικό βάρος πρότυπης ουσίας αναφοράς της Κλιοκινόλης που χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία του πρότυπου διαλύματος (σε mg).

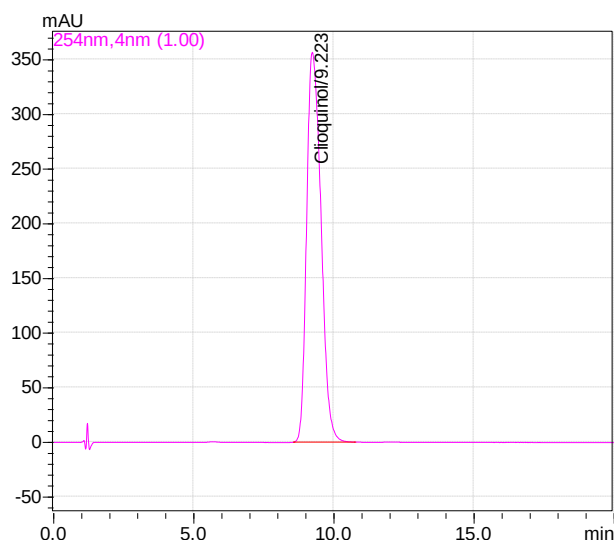
1 : Το θεωρητικό βάρος τελικού προϊόντος που χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία του διαλύματος ελέγχου (σε g).

11.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

11.4.1 Καταλληλότητα συστήματος

Για την καταλληλότητα του συστήματος παρασκευάστηκε διάλυμα αναφοράς Κλιοκινόλης συγκέντρωσης 100 $\mu\text{g/ml}$ ως εξής: Ζυγίστηκαν 10 mg πρότυπης ουσίας Κλιοκινόλης προστέθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml και συμπληρώθηκε ο όγκος μέχρι τη χαραγή με THF. 1 ml από αυτό το διάλυμα αραιώθηκε με κινητή φάση σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml και ο όγκος συμπληρώθηκε μέχρι τη χαραγή με τον ίδιο διαλύτη. Έγιναν τρεις εισαγωγές στην HPLC και μελετήθηκαν τα εμβαδά των κορυφών.

Το χρωματογράφημα του πρότυπου διαλύματος φαίνεται στο σχήμα 11.1 ενώ τα δεδομένα εμβαδά των χρόνων κατακράτησης φαίνονται στον πίνακα 11.1



Σχήμα 11.1 Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος Κλιοκινόλης 100 µg/ml

Ύστερα από μελέτη του παραπάνω χρωματογραφήματος μετά από τρεις επαναλήψεις πήραμε τα ακόλουθα αποτελέσματα:

1	12145275
2	12136458
3	12146952
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ	12142895
SD	5637
%RSD	0,05

Πίνακας 11.1 Δεδομένα ελέγχου καταλληλότητας συστήματος

Οι σχετικοί χρόνοι κατακράτησης ως προς την ουσία αναφοράς ήταν μικρότεροι από 0,5. Επομένως η μέθοδος ανταποκρίνεται στον έλεγχο καταλληλότητας του συστήματος.

11.4.2 Ειδικότητα (Specificity)

Για τον έλεγχο της ειδικότητας του συστήματος έγιναν τα ακόλουθα:

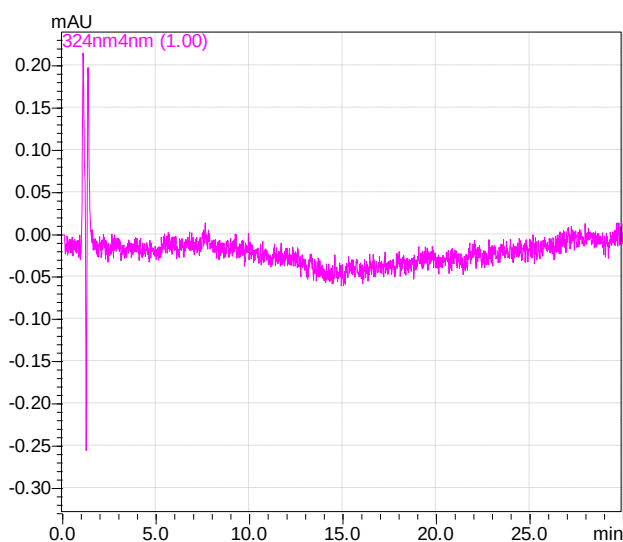
-Παρασκευάστηκαν δύο λευκά δείγματα (placebo). Ζυγίστηκαν ακριβώς αντίστοιχες ποσότητες του κάθε εκδόχου με αυτές που βρίσκονται στο σκεύασμα και αναμίχθηκαν με υάλινη ράβδο. Αυτό αποτέλεσε το λευκό δείγμα 1 το οποίο περιείχε

μόνο τα έκδοχα. Επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία παρασκευής λευκού δείγματος, αλλά σε αυτό προστέθηκε ποσότητα της συνυπάρχουσας δραστικής (Φλουκινολόνης), αντίστοιχης με αυτής στο σκεύασμα (λευκό δείγμα 2)

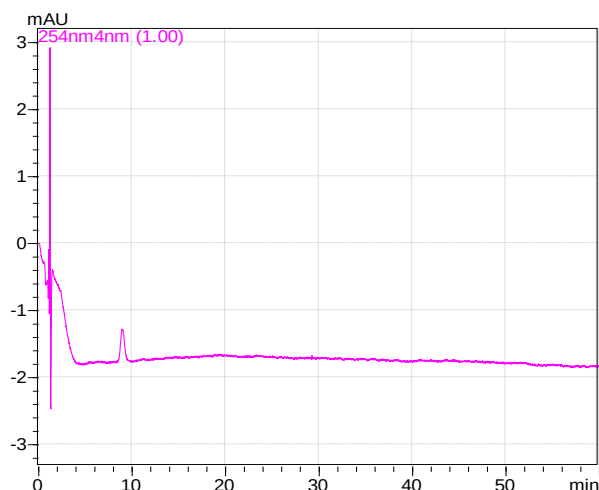
-Έγινε κατεργασία των δύο λευκών δειγμάτων ακριβώς όπως στο δείγμα του σκευάσματος και προέκυψαν τα διαλύματα λευκού δείγματος.

-Παρασκευάστηκε ένα εμβολιασμένο διάλυμα Β το οποίο αντιστοιχεί στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας με επίπεδο εμβολιασμού 102 mg/ml και το οποίο παρασκευάστηκε όπως περιγράφεται στο εδάφιο 11.4.4 της ακρίβειας.

Στο σχήμα 11.2 φαίνεται το χρωματογράφημα του λευκού δείγματος 1 (μόνο έκδοχα) ενώ στο σχήμα 11.3 φαίνεται το χρωματογράφημα του λευκού δείγματος 2 (έκδοχα και Φλουκινολόνη).

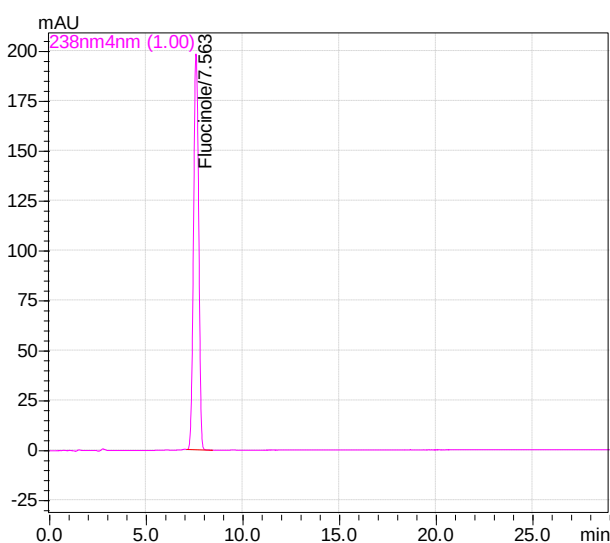


Σχήμα 11.2 Χρωματογράφημα λευκού δείγματος 1 (μόνο έκδοχα)



Σχήμα 11.3 Χρωματογράφημα λευκού δείγματος 2 (έκδοχα και Φλουοκινολόνη)

Στο σχήμα 11.4 φαίνεται το χρωματογράφημα της Φλουοκινολόνης η κορυφή της οποίας δεν παρεμποδίζει την κορυφή της Κλιοκινόλης καθώς ο χρόνος κατακράτησης της πρώτης είναι κοντά στα 7,5 min.



Σχήμα 11.4 Χρωματογράφημα Φλουοκινολόνης

Μετά τη μελέτη των αποτελεσμάτων προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

Διάλυμα λευκού δείγματος: Η εξέταση του χρωματογραφήματος επιβεβαίωσε ότι δεν υπάρχει κορυφή στο χρόνο κατακράτησης της Κλιοκινόλης (9,2 min περίπου) .

Εμβολιασμένο διάλυμα Β: Η διαχωριστικότητα ανάμεσα στην κορυφή της Κλιοκινόλης και οποιασδήποτε άλλης κορυφής βρέθηκε ≥ 2 .

Η καθαρότητα της χρωματογραφικής κορυφής της Κλιοκινόλης βρέθηκε $>0,99$

Συνεπώς τα κριτήρια αποδοχής ικανοποιούνται και η μέθοδος κρίνεται ως ειδική.

11.4.3 Γραμμικότητα και εύρος (Linearity – Range)

Για τον έλεγχο της γραμμικότητας της μεθόδου παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα της Κλιοκινόλης τα οποία περιείχαν 80, 90, 100, 110 και 120 % της συγκέντρωσης εργασίας, δηλαδή, αντίστοιχα 80, 90, 100, 110 και 120 $\mu\text{g/ml}$ της ουσίας. Για την παρασκευή αυτών των διαλυμάτων έγινε αρχικά ένα πρότυπο διάλυμα 1000 $\mu\text{g/ml}$ Κλιοκινόλης ζυγίζοντας 10 mg από την πρότυπη ουσία αναφοράς (BP) και διαλύοντάς τα σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml με THF. Στη συνέχεια 4 ml από το διάλυμα αυτό μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml και συμπληρώθηκε ο όγκος μέχρι τη χαραγή με κινητή φάση (πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης Κλιοκινόλης 400 $\mu\text{g/ml}$). Από το δεύτερο αυτό διάλυμα παρακαταθήκης παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα διαλύματα:

Πρότυπο διάλυμα A: (80 $\mu\text{g/ml}$ το οποίο αντιστοιχεί στο 80 % του διαλύματος εργασίας). 2,0 ml του διαλύματος παρακαταθήκης 400 $\mu\text{g/ml}$ μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με κινητή φάση.

Πρότυπο διάλυμα B: (90 $\mu\text{g/ml}$ το οποίο αντιστοιχεί στο 90 % του διαλύματος εργασίας). 2,25 ml του διαλύματος παρακαταθήκης 400 $\mu\text{g/ml}$ μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με κινητή φάση.

Πρότυπο διάλυμα C: (100 $\mu\text{g/ml}$ το οποίο αντιστοιχεί στο 100 % του διαλύματος εργασίας). 2,5 ml του διαλύματος παρακαταθήκης 400 $\mu\text{g/ml}$ μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με κινητή φάση.

Πρότυπο διάλυμα D: (110 $\mu\text{g/ml}$ το οποίο αντιστοιχεί στο 110 % του διαλύματος εργασίας). 2,75 ml του διαλύματος παρακαταθήκης 400 $\mu\text{g/ml}$ μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με κινητή φάση.

Πρότυπο διάλυμα E: (120 $\mu\text{g/ml}$ το οποίο αντιστοιχεί στο 120 % του διαλύματος εργασίας). 3 ml του διαλύματος παρακαταθήκης 400 $\mu\text{g/ml}$ μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με κινητή φάση.

Σε καθένα από αυτά τα παραπάνω διαλύματα έγιναν τρεις μετρήσεις. Μετρήθηκε το εμβαδό των κορυφών της Κλιοκινόλης και υπολογίστηκε ο μέσος όρος, η τυπική απόκλιση SD και η %RSD. Χρησιμοποιώντας τους μέσους όρους έγινε ανάλυση παλινδρόμησης με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων για να υπολογιστεί η εξίσωση της καμπύλης απόκρισης ($y=ax+b$) και ο συντελεστής συσχέτισης (r) καθώς επίσης και η τυπική απόκλιση υπολοίπων (Sy/x).

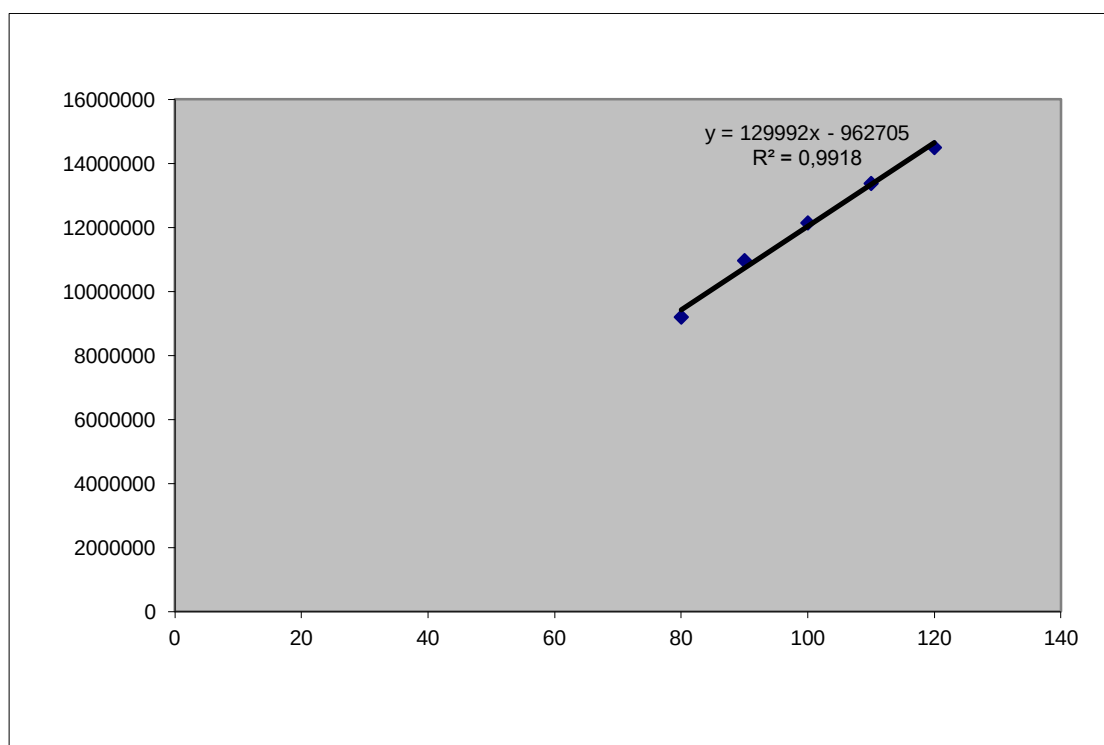
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων μετά από την επεξεργασία φαίνονται στον πίνακα 11.2

	80%	90%	100%	110%	120%
1	9203165	10967779	12145275	13369591	14495138
2	9200689	10966944	12136458	13378599	14493629
3	9203542	10959850	12146952	13378140	14501536
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ	9202465	10964858	12142895	13375443	14496768
SD	1550	4357	5637	5073	4198
%RSD	0,02	0,04	0,05	0,04	0,03

%	µg/ml	
80	80	9202465
90	90	10964858
100	100	12142895
110	110	13375443
120	120	14496768

Πίνακας 11.2 Αποτελέσματα μετρήσεων γραμμικότητας

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ	
Στατιστικά παλινδρόμησης	
Πολλαπλό R	0,995904051
R Τετράγωνο	0,991824878
Προσαρμοσμένο R Τετράγωνο	0,989099838
Τυπικό σφάλμα	215469,2451
Μέγεθος δείγματος	5



Σχήμα 11.5 Καμπύλη αναφοράς Κλιοκινόλης

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ								
	βαθμοί ελευθερίας	SS	MS	F	Σημαντικότητα F			
Παλινδρόμηση	1	1,68979E+13	1,69E+13	363,967	0,000314484			
Υπόλοιπο	3	1,39281E+11	4,64E+10					
Σύνολο	4	1,70372E+13						
	Συντελεστές	Τυπικό σφάλμα	t	τιμή-P	Κατώτερο 95%	Υψηλότερο 95%	Κατώτερο 95,0%	Υψηλότερο 95,0%
Τεταγμένη επί την αρχή	-962704,5333	688153,5839	-1,39897	0,256285	-3152716,364	1227307,297	-3152716,364	1227307,297
Μεταβλητή X 1	129991,9033	6813,735803	19,07792	0,000314	108307,555	151676,2517	108307,555	151676,2517

Πίνακας 11.3 Αποτελέσματα ανάλυσης παλινδρόμησης για την Κλιοκινόλη

Εξίσωση ευθείας: $Y = -9,62 (\pm 6,88) \times 10^5 + 1,30 (\pm 0,068) \times 10^5 C \text{ } \mu\text{g/ml}$.

Η ευθεία διέρχεται από την αρχή των αξόνων διότι $t_{\text{πειρ}}=1,39 < t_{\text{θεωρ}}=3,18$ και $P=0,256 > 0,0$

Συνεπώς ο συντελεστής συσχέτισης είναι 0,996 και η καμπύλη περνά από την αρχή των αξόνων. Άρα η μέθοδος χαρακτηρίζεται από γραμμικότητα.

Το εύρος της μεθόδου καθορίζεται από 80 έως 120 $\mu\text{g/ml}$ που αντιστοιχεί σε 80-120 % της συγκέντρωσης εργασίας.

11.4.4 Ακρίβεια μεθόδου (Accuracy)

Παρασκευάστηκαν τρία ανεξάρτητα εμβολιασμένα διαλύματα τα οποία περιείχαν, τόσο τη προσδιοριζόμενη δραστική ουσία, όσο και όλα τα έκδοχα. Τα διαλύματα αυτά έχουν συγκεντρώσεις που ανταποκρίνονται στο εύρος τιμών της γραμμικότητας και είναι τα ακόλουθα :

Εμβολιασμένο διάλυμα Α (80 $\mu\text{g/ml}$ που αντιστοιχεί στο 80% της συγκέντρωσης εργασίας): Ζυγίστηκε κατάλληλη ποσότητα του λευκού δείγματος η οποία αντιστοιχεί σε 30 mg Κλιοκινόλης και μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mg. Προστέθηκαν 24 mg από την πρότυπη ουσία αναφοράς της Κλιοκινόλης. Ακολούθησε προσθήκη 10 ml THF και η φιάλη εμβαπτίστηκε σε νερό θερμοκρασίας 47-48 °C για 30 sec. Αναμίχθηκε με περιστροφή (vortex) έως ότου διαλυθεί πλήρως (περίπου 30 sec). Αφέθηκε το διάλυμα να κρυώσει (όσο κρυώνει γίνεται θολό) και συμπληρώνεται κινητή φάση έως τη χαραγή. Διηθήθηκε το εναιώρημα που προέκυψε με φίλτρο με πόρους 0,45 μm . 1 ml από το διηθημένο διάλυμα αναμίχθηκε με 2 ml κινητής φάσης και το διάλυμα ήταν έτοιμο προς ένεση.

Εμβολιασμένο διάλυμα Β (100 $\mu\text{g/ml}$ που αντιστοιχεί στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας): Η παρασκευή του έγινε όπως το Εμβολιασμένο διάλυμα Α, αλλά με προσθήκη 30 mg Κλιοκινόλης.

Εμβολιασμένο διάλυμα C (120 $\mu\text{g/ml}$ που αντιστοιχεί στο 120% της συγκέντρωσης εργασίας): Η παρασκευή του έγινε όπως το Εμβολιασμένο διάλυμα Α, αλλά με προσθήκη 36 mg Κλιοκινόλης.

Επιπλέον παρασκευάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα Κλιοκινόλης 100 $\mu\text{g/ml}$.

Υπολογίστηκε η % ανάκτηση κάθε δείγματος και ο συντελεστής σχετικής τυπικής απόκλισης των ανακτήσεων (%RSD).

$$\% \text{ Ανάκτηση} = \frac{\text{Κλιοκινόλη} \%}{\% \text{ Επίπεδο} \text{ εμβολιασμού}} \times 100$$

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στον πίνακα 11.4:

	Εμβαδό προτύπου	Εμβαδό (80 %)	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση
1	12269160	9513560	78,0	99,41
2	12273629	9512171	78,0	99,36
3	12293983	9504697	78,0	99,12
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ				99,30
SD				0,16
%RSD				0,16
	Εμβαδό προτύπου	Εμβαδό (100 %)	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση
1	12269160	12674256	102,0	101,28
2	12273629	12663565	102,0	101,15
3	12293983	12650728	102,0	100,88
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ				101,10
SD				0,20
%RSD				0,20
	Εμβαδό προτύπου	Εμβαδό (120 %)	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση
1	12269160	15057661	121,5	101,01
2	12273629	15059248	121,5	100,98
3	12293983	15067650	121,5	100,87

ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ				100,96
SD				0,07
%RSD				0,07

Πίνακας 11.4 Αποτελέσματα ελέγχου ακρίβειας

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η % ανάκτηση είναι μεταξύ 99,12% έως 101,28 %. Επίσης το %RSD είναι $\leq 0,20$.Άρα η μέθοδος χαρακτηρίζεται ως ακριβής.

11.4.5 Πιστότητα (precision) της μεθόδου

Για τον έλεγχο της πιστότητας της μεθόδου ελέγχονται η επαναληψιμότητα του συστήματος, η επαναληψιμότητα της μεθόδου και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (ενδιάμεση πιστότητα).

Επαναληψιμότητα του συστήματος

Η επαναληψιμότητα του συστήματος προσδιορίζεται μετρώντας το εμβαδο των κορυφών τριών μετρήσεων προτύπων διαλυμάτων. Η πιστότητα εκφράζεται με την % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) του εμβαδού των κορυφών της Κλιοκινόλης.

Επαναληψιμότητα μεθόδου

Προετοιμάζονται έξι δείγματα του Εμβολιασμένου διαλύματος Β (του οποίου η παρασκευή περιγράφεται στο εδάφιο 11.4.4 της ακρίβειας). Επιπλέον ετοιμάζεται ένα πρότυπο διάλυμα αναφοράς σύμφωνα με τη μέθοδο και γίνονται ξεχωριστές μετρήσεις σε κάθε ένα από τα έξι παραπάνω δείγματα. Υπολογίζονται η % ανάκτηση, καθώς επίσης και η σχετική τυπική απόκλιση των ανακτήσεων.

$$\% \text{ ανάκτηση} = \frac{\text{Κλιοκινόλη} \text{ _ \%}}{\% \text{ επί πεδο _ εμβολιασμού}} \times 100$$

Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (ενδιάμεση πιστότητα)

Διενεργούνται τρεις ακόμα επαναλαμβανόμενες μελέτες επαναληψιμότητας χρησιμοποιώντας ανεξάρτητα παρασκευασθέντα εμβολιασμένα διαλύματα. Οι μελέτες αυτές γίνονται διαφορετική μέρα, από διαφορετικό αναλυτή και με διαφορετικό όργανο.

Υπολογίζονται η % ανάκτηση των μετρήσεων, καθώς επίσης και η σχετική τυπική απόκλιση των ανακτήσεων.

Τα αποτελέσματα αναλύονται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ANOVA ως προς ένα παράγοντα. Η τυπική απόκλιση της ενδιάμεσης πιστότητας υπολογίζεται με την ακόλουθη εξίσωση:

$$S_R = \sqrt{S_r^2 + S_g^2}$$

όπου

S_r^2 : η τυπική απόκλιση μεταξύ των μετρήσεων μιας ομάδας

S_g^2 : η τυπική απόκλιση μεταξύ των ομάδων, η οποία ισούται με:

$$S_g^2 = (between_MS \times (k, n) - S_r^2 \times (k, n)).$$

αν $S_r^2 \times (k, n) > between_MS \times (k, n)$, τότε $S_g^2 = between_MS \times (k, n)$

όπου,

$$k, n = \frac{(k-1) \sum n_j}{(\sum n_j)^2 - \sum (n_j^2)}$$

όπου,

k = αριθμός των σειρών πειραμάτων (4 σε αυτή την περίπτωση).

n_j = ο αριθμός των μετρήσεων στην j^{th} σειρά (6, 3, 3, 3 σε αυτή την περίπτωση)

Συνεπώς το $k, n = 0,27778$

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στον πίνακα 11.5

Αναλυτής_1	Εμβολιασμένο διάλυμα	Πρότυπο διάλυμα	Ανάκτηση
1	12502072	12282005	101,79
2	12517638	12281141	101,93
3	12466158	12278798	101,53
4	12496204	12276818	101,79
5	12494392	12287689	101,68
6	12510421	12291048	101,78
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			101,75
SD			0,13
%RSD			0,13
Αναλυτής_2	Εμβολιασμένο διάλυμα	Πρότυπο διάλυμα	Ανάκτηση
1	12511125	12287481	101,82
2	12525475	12289729	101,92
3	12531678	12297107	101,91
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			101,88
SD			0,05
%RSD			0,05
Όργανο_1	Εμβολιασμένο διάλυμα	Πρότυπο διάλυμα	Ανάκτηση
1	12544906	12300985	101,98
2	12541035	12302664	101,94
3	12514549	12299766	101,75
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			101,89
SD			0,13
%RSD			0,12
Ημέρα_2η	Εμβολιασμένο διάλυμα	Πρότυπο διάλυμα	Ανάκτηση

1	12525388	12297320	101,85
2	12533754	12313717	101,79
3	12486586	12309921	101,44
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			101,69
SD			0,23
%RSD			0,22

Πίνακας 11.5 Αποτελέσματα ελέγχου πιστότητας

Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (ANOVA)				
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ				
Ομάδες	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση
Στήλη 1	6	610,4973679	101,7495613	0,018003934
Στήλη 2	3	305,6458623	101,8819541	0,002898436
Στήλη 3	3	305,6667312	101,8889104	0,015781787
Στήλη 4	3	305,0766846	101,6922282	0,050714979

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	0,093117	3	0,031038879	1,492188106	0,270739	3,587434
Μέσα στις ομάδες	0,22881	11	0,020800916			
Σύνολο	0,321927	14				
Sr	0,144225	0,14				
SR	0,153769	0,15				

Από τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει ότι η % ανάκτηση κυμαίνεται από 101,44% έως 101,98%. Επιπλέον, η %RSD_r είναι 0,14%, ενώ το %RSD_R είναι 0,15%. Επομένως η πιστότητα της μεθόδου είναι αποδεκτή.

11.4.6 Ανθεκτικότητα (Robustness)

Η ανθεκτικότητα είναι μία παράμετρος που μετράται αρχικά κατά την ανάπτυξη της μεθόδου. Αποσκοπεί στην διαπίστωση της ανθεκτικότητας της μεθόδου και αναδεικνύει εκείνους τους παράγοντες που επηρεάζουν περισσότερο την ανάλυση. Για τη μέτρησή της προετοιμάζεται ένα εμβολιασμένο διάλυμα B (όπως περιγράφεται στο εδάφιο 11.4.4 της ακρίβειας), καθώς επίσης κι ένα πρότυπο διάλυμα Κλιοκινόλης, όπως προβλέπει η μέθοδος.

Γίνεται εκτίμηση της επίδρασης που παρουσιάζουν οι ακόλουθοι παράγοντες στην % προσδιορισμένη ανάκτηση σύμφωνα με το παραγοντικό μοντέλο των Plackett και Burman:

- Ταχύτητα ροής της κινητής φάσης
- Αναλογία μεθανόλης-νερού στην κινητή φάση και
- Συγκέντρωση της εξυλαμίνης στην κινητή φάση.

Έτσι έγιναν οι παρακάτω αλλαγές

Παράγοντας A: Ταχύτητα ροής της κινητής φάσης από ονομαστική τιμή 1,3 ml/min σε 1,25 ml/min

Παράγοντας B: Αναλογία μεθανόλης-νερού από ονομαστική τιμή 600:396 σε 550:446 και

Παράγοντας Γ: Η συγκέντρωση της εξυλαμίνης από ονομαστική τιμή 4 ml/l σε 4,2 ml/l.

Ο συνδυασμός των αλλαγών των παραμέτρων στα πειράματα έγινε σύμφωνα με το ακόλουθο διάγραμμα του πίνακα 11.6.

Παράγοντες			Πείραμα
A	B	C	
+	+	+	Y1
-	+	-	Y2
+	-	-	Y3
-	-	+	Y4

Πίνακας 11.6 Συνδυασμός αλλαγών παραμέτρων για έλεγχο ανθεκτικότητας

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται παρακάτω :

Y1	Πρότυπο διάλυμα	Εμβολιασμένο διάλυμα	Ανάκτηση
1	12282005	12502072	101,79
2	12281141	12517638	101,93
3	12278798	12466158	101,53
4	12276818	12496204	101,79
5	12287689	12494392	101,68
6	12291048	12510421	101,78
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			101,75
SD			0,13
%RSD			0,13
Y2	Πρότυπο διάλυμα	Εμβολιασμένο διάλυμα	Ανάκτηση
1	13107738	13366490	98,06
2	13080447	13166988	99,34
3	13094478	13347033	98,11
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			98,50
SD			0,73
%RSD			0,74
Y3	Πρότυπο διάλυμα	Εμβολιασμένο διάλυμα	Ανάκτηση
1	13306147	13532185	98,33
2	13311355	13491560	98,66
3	13330628	13516809	98,62
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			98,54
SD			0,18
%RSD			0,19
Y4	Πρότυπο διάλυμα	Εμβολιασμένο διάλυμα	Ανάκτηση
1	12629525	12840878	98,35

2	12640388	12827664	98,54
3	12648771	12901381	98,04
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			98,31
SD			0,25
%RSD			0,26

Πίνακας 11.7 Αποτελέσματα μετρήσεων ανθεκτικότητας

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η % ανάκτηση βρίσκεται μεταξύ 98,04 % και 101,93 %, ενώ το % RSD υπολογίζεται $\leq 0,74$. Συνεπώς μικρές αλλαγές στις εξεταζόμενες παραμέτρους του χρωματογραφικού συστήματος δεν επηρέασαν σημαντικά την % ανάκτηση της Κλιοκινόλης. Επομένως η μέθοδος χαρακτηρίζεται από ανθεκτικότητα.

11.4.7 Σταθερότητα(Stability)

Το εμβολιασμένο διάλυμα Β αναλύεται αμέσως μετά την παρασκευή του και επαναλαμβάνεται ο έλεγχος 24 ώρες μετά από αποθήκευση στους 25 °C .

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στον πίνακα 11.7.

Σταθερότητα	Πρότυπο διάλυμα	Εμβολιασμένο διάλυμα	Ανάκτηση
1	12705001	12875356	98,68
2	12738734	12853499	99,11
3	12749001	12969598	98,30
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			98,69
SD			0,40
%RSD			0,41

Πίνακας 11.7 Αποτελέσματα σταθερότητας

Συνεπώς, τα διαλύματα της Κλιοκινόλης αποδεικνύονται να είναι σταθερά για τουλάχιστον 24 ώρες.

ΚΕΦ.12 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ ΤΗΣ ΚΛΙΟΚΙΝΟΛΗΣ ΣΕ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟ ΣΚΕΥΑΣΜΑ

Για την επικύρωση της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού των προσμίξεων της Κλιοκινόλης χρησιμοποιούμε την ίδια μέθοδο που χρησιμοποιήσαμε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της δραστικής με μικρές αλλαγές .

Συνεπώς οι συνθήκες της μεθόδου είναι οι ακόλουθες:

12.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Οι χρωματογραφικές συνθήκες της μεθόδου περιγράφονται στο κεφάλαιο 10 της ανάπτυξης μεθόδου προσδιορισμού προσμίξεων. Ο όγκος εισαγωγής ήταν 20 μ l.

12.2 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΔΟΧΗΣ

Τα κριτήρια που πρέπει να πληρούνται ώστε η αξιολόγηση της μεθόδου να είναι αποδεκτή είναι τα ακόλουθα:

Καταλληλότητα συστήματος

- Η διαχωριστικότητα μεταξύ της κορυφής της Κλιοκινόλης και της Πρόσμικης C να είναι μεγαλύτερη ή ίση με 2.

Ειδικότητα μεθόδου

- Διάλυμα λευκού δείγματος: Δεν πρέπει να εμφανίζεται κορυφή στο χρόνο κατακράτησης της Κλιοκινόλης και των προσμίξεων A, B και C.
- Εμβολιασμένο διάλυμα B: Ο διαχωρισμός (resolution) μεταξύ της κορυφής της Κλιοκινόλης και οποιασδήποτε άλλης κορυφής βρίσκεται δίπλα της πρέπει να είναι $\geq 2,0$.
- Η καθαρότητα της χρωματογραφικής κορυφής (peak purity) που αντιστοιχεί στην Κλιοκινόλη στα εμβολιασμένα διαλύματα πρέπει να είναι $\geq 0,99$.

Γραμμικότητα

- Ο συντελεστής συσχέτισης δεν πρέπει να είναι μικρότερος από 0,99.
- Η καμπύλη απόκρισης να περνά από την αρχή των αξόνων.

Ακρίβεια μεθόδου

- Η % ανάκτηση να κυμαίνεται μεταξύ 95-105%.
- Το %RSD μεταξύ των ανακτήσεων να είναι $\leq 5,0$.

Πιστότητα μεθόδου

- Για την επαναληψιμότητα του συστήματος η %RSD του εμβαδού της κορυφής της Κλιοκινόλης πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση από 5.
- Για την επαναληψιμότητα της μεθόδου πρέπει η % ανάκτηση να κυμαίνεται μεταξύ 95-105% και η %RSD μεταξύ των ανακτήσεων να είναι $\leq 5,0$.
- Για την ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα κάθε % ανάκτηση θα πρέπει να βρίσκεται μεταξύ των τιμών 95-105 % η %RSD_r της συνολικής επαναληψιμότητας πρέπει να είναι $\leq 5,0\%$, και η %RSD_R της ενδιάμεσης πιστότητας πρέπει να είναι $\leq 5,0\%$.

Ανθεκτικότητα μεθόδου

- Η % ανάκτηση πρέπει να βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές 95-105 %.
- Η %RSD των ανακτήσεων του πειράματος πρέπει να είναι $\leq 5,0$.

Σταθερότητα

- Η % ανάκτηση πρέπει να βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές 95-105 %.
- Η %RSD των ανακτήσεων του πειράματος πρέπει να είναι $\leq 5,0$.

12.3 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό κάθε πρόσμιξης εφαρμόζεται ο παρακάτω τύπος:

$$\text{Περιεκτικότητα } (\%) \text{ πρόσμιξης} = \frac{\text{Απροσμι}}{\text{Αδοτος} - \text{αναφ}} \times 0,2\%$$

όπου:

Απροσμ: Το εμβαδό της χρωματογραφικής κορυφής κάθε πρόσμιξης της Κλιοκινόλης στο χρωματογράφημα του διαλύματος ελέγχου.

Αδτος _ αναφ: Το εμβαδό της χρωματογραφικής κορυφής της Κλιοκινόλης στο χρωματογράφημα του διαλύματος αναφοράς 0,2%..

RRF : Παράγοντας σχετικής απόκρισης (όπως φαίνεται στον πίνακα 12.3) ίσος με 0,15 για την Πρόσμιξη Α, 0,56 για την Πρόσμιξη Β και 0,59 για την Πρόσμιξη C (σχετικοί χρόνοι κατακράτησης 0,31, 0,6 και 1,3 αντίστοιχα).

0,2%: Η % περιεκτικότητα του διαλύματος αναφοράς.

12.4 ΔΙΑΛΥΜΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ 0,2%

Ζυγίζονται 20 mg του προτύπου της Κλιοκινόλης BP(CRS) και προστίθενται σε μία ογκομετρική φιάλη των 25 ml. Συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με THF και τοποθετείται για 30 sec σε λουτρό υπερήχων ώσπου το διάλυμα να γίνει διαυγές. 125 μl από αυτό το διάλυμα προστίθενται σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml και αραιώνεται με κινητή φάση έως τη χαραγή. Ακολουθεί επιπλέον αραιώση 1:10 με κινητή φάση και το διάλυμα αναφοράς 0,2% είναι έτοιμο προς χρήση.

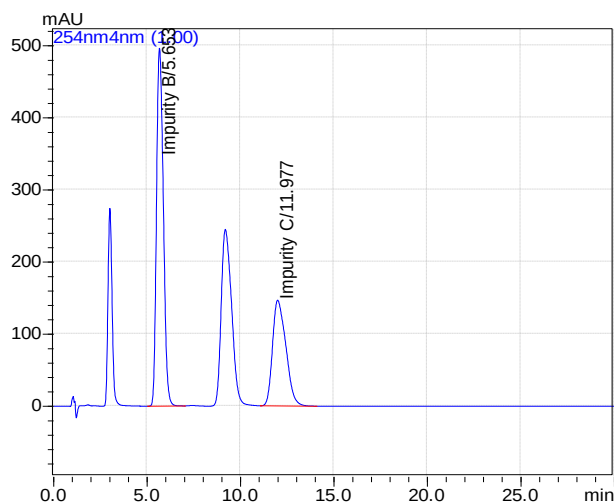
12.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

12.5.1 ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Στην καταλληλότητα του συστήματος για τον έλεγχο προσμίξεων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα το οποίο παρασκευάζεται ως εξής:

Ζυγίστηκαν 20 mg της Πρόσμιξης Α, 10,4 mg της Πρόσμιξης Β, 5,2 mg της πρότυπης ουσίας αναφοράς της Κλιοκινόλης και 10,3 mg της Πρόσμιξης C και προστέθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 20 ml. Συμπληρώθηκε ο όγκος με μεθανόλη μέχρι τη χαραγή και 1 ml από το διάλυμα που προέκυψε προστέθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml και αραιώθηκε με κινητή φάση. Το διάλυμα αυτό αποτέλεσε το διάλυμα ελέγχου καταλληλότητας του συστήματος (system suitability solution).

Τα αποτελέσματα του ελέγχου καταλληλότητας συστήματος του διαλύματος αυτού φαίνονται στο σχήμα 12.1.



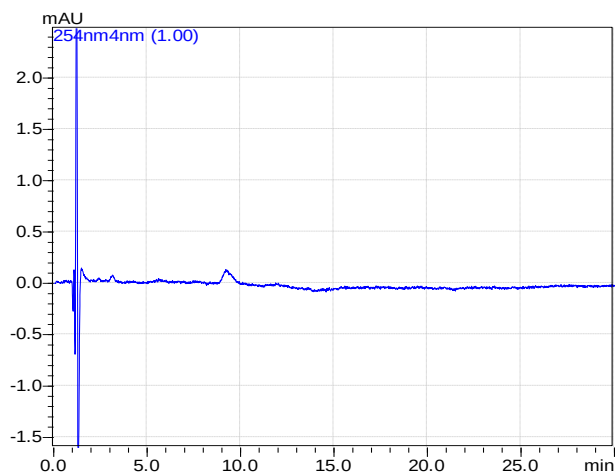
Σχήμα 12.1 Χρωματογράφημα για τον έλεγχο καταλληλότητας συστήματος

Από το σχήμα 12.1 αποδεικνύεται ότι το κριτήριο αποδοχής για την καταλληλότητα του συστήματος καλύπτεται.

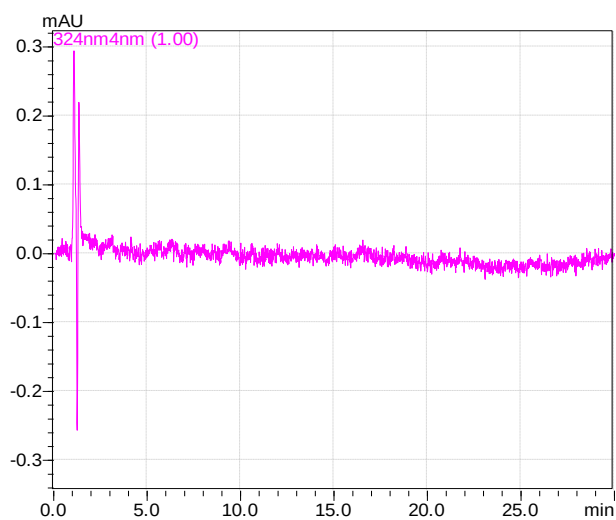
12.5.2 ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ

Για τον έλεγχο της ειδικότητας παρασκευάστηκε λευκό διάλυμα (placebo) των εκδόχων όπως περιγράφηκε στο εδάφιο 11.4.2 και Εμβολιασμένο διάλυμα Β όπως περιγράφεται στο εδάφιο 12.5.4.

Μετά την παρασκευή τους τα διαλύματα εισήχθησαν στο χρωματογράφο και τα χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στα επόμενα σχήματα:

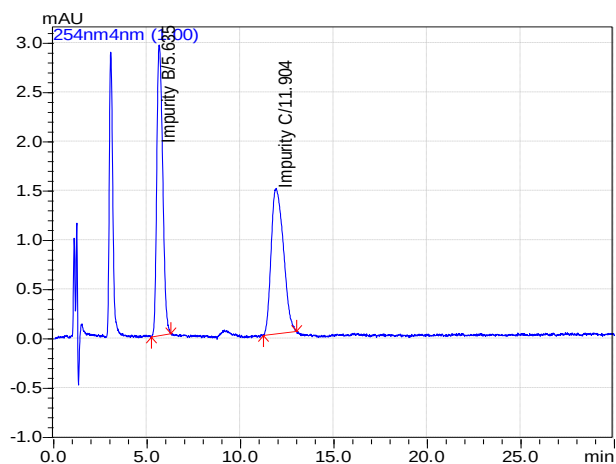


Σχήμα 12.2 Χρωματογράφημα λευκού δείγματος σε $\lambda=254$ nm

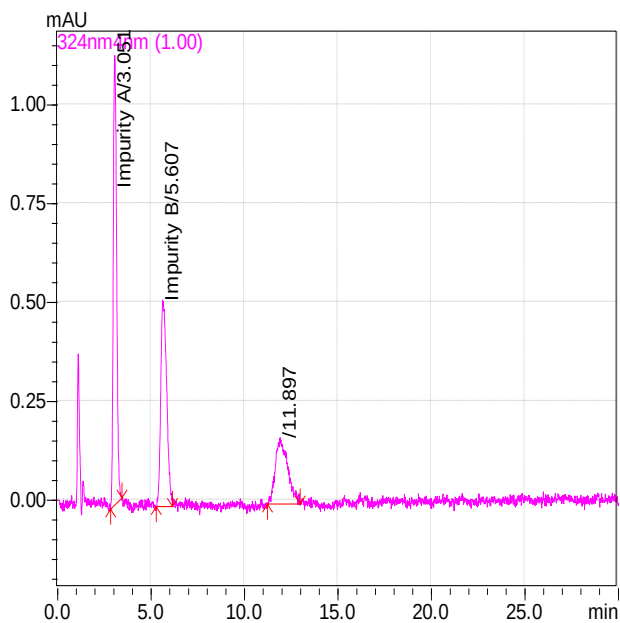


Σχήμα 12.3 Χρωματογράφημα λευκού δείγματος σε $\lambda=324$ nm

Παρατηρώντας τα χρωματογραφήματα λευκού δείγματος στα σχήματα 12.2 και 12.3 αποδεικνύεται ότι καμία κορυφή δεν εμφανίζεται στους χρόνους κατακράτησης της Κλιοκινόλης και των προσμίξεων αυτής.

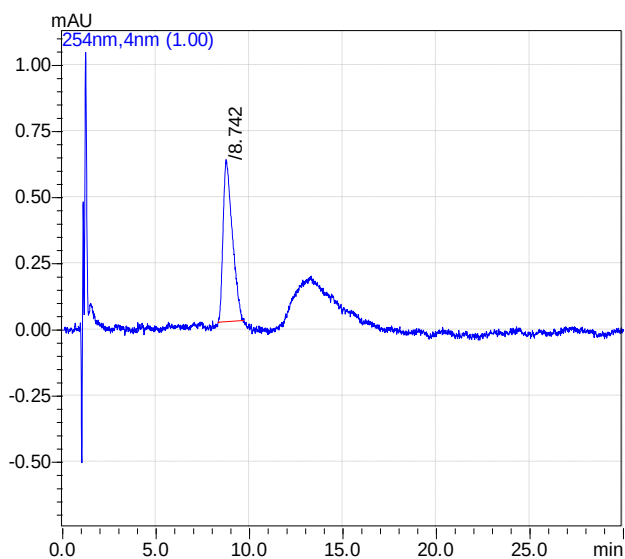


Σχήμα 12.4 Χρωματογράφημα Εμβολιασμένου διαλύματος B σε $\lambda=254$ nm

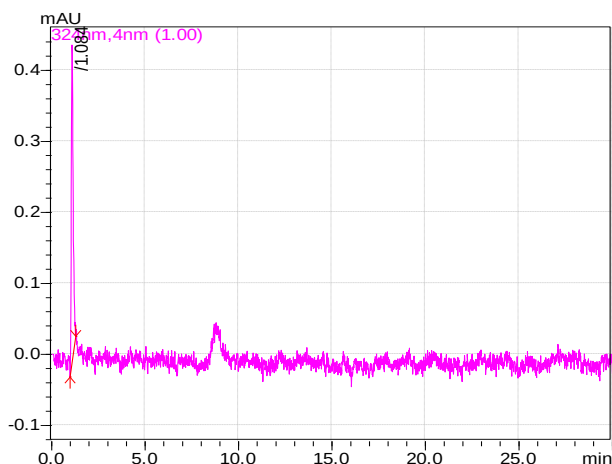


Σχήμα 12.5 Χρωματογράφημα Εμβολιασμένου διαλύματος B σε $\lambda = 324 \text{ nm}$

Μετά από παρατήρηση των χρωματογραφημάτων του Εμβολιασμένου διαλύματος B που παρουσιάζονται στα σχήματα 12.4 και 12.5 διαπιστώνεται ότι η καθαρότητα των χρωματογραφικών κορυφών είναι μεγαλύτερη από 0,99.



Σχήμα 12.6 Χρωματογράφημα διαλύματος αναφοράς Κλιοκινόλης 0,2% σε $\lambda = 254 \text{ nm}$



Σχήμα 12.7 Χρωματογράφημα διαλύματος αναφοράς Κλιοκινόλης 0,2% σε $\lambda=324$ nm

Τέλος, μετά τη μελέτη των σχημάτων 12.4, 12.5, 12.6, 12.7 διαπιστώνεται ότι η διαχωριστικότητα ανάμεσα στην κορυφή της Κλιοκινόλης, των προσμίξεών της και οποιασδήποτε άλλης κορυφής βρέθηκε >2 .

Συνεπώς τα κριτήρια αποδοχής ικανοποιούνται και η μέθοδος χαρακτηρίζεται από ειδικότητα.

12.5.3 ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ-ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ-ΟΡΙΟ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ

Για τη μελέτη της γραμμικότητας παρασκευάζονται τα ακόλουθα διαλύματα:

Διαλύματα παρακαταθήκης προσμίξεων

Πρόσμιξη Α: Ζυγίστηκαν 20 mg της πρότυπης ουσίας της πρόσμιξης Α (καθαρότητας 95%) και διαλύθηκαν με THF σε ογκομετρική φιάλη 25 ml (760 $\mu\text{g/ml}$).

Πρόσμιξη Β: Ζυγίστηκαν 20 mg της πρότυπης ουσίας της πρόσμιξης Β (καθαρότητας 99%) και διαλύθηκαν με THF σε ογκομετρική φιάλη 25 ml (792 $\mu\text{g/ml}$).

Πρόσμιξη C: Ζυγίστηκαν 19,9 mg της πρότυπης ουσίας της πρόσμιξης C (καθαρότητας 97%) και διαλύθηκαν με THF σε ογκομετρική φιάλη 25 ml (772 $\mu\text{g/ml}$).

Μικτό διάλυμα παρακαταθήκης προσμίξεων 10 $\mu\text{g/ml}$ (10% διαλύματος εργασίας)

Σε μία ογκομετρική φιάλη των 25 ml τοποθετήθηκαν 329 μl της Πρόσμιξης Α, 316 μl της Πρόσμιξης Β και 324 μl της Πρόσμιξης C και συμπληρώθηκε ο όγκος μέχρι τη χαραγή με κινητή φάση.

Πρότυπο διάλυμα Α των Προσμίξεων Α, Β και C (αντιστοιχεί στο 0,1% της % περιεκτικότητας σε πρόσμιξη, δηλαδή 0,1 μg/ml): 100 μl από το Μικτό διάλυμα παρακαταθήκης προσμίξεων των 10 μg/ml και αραιώνεται σε τελικό όγκο 10 ml με κινητή φάση.

Πρότυπο διάλυμα Β των Προσμίξεων Α, Β και C (αντιστοιχεί στο 0,5% της % περιεκτικότητας σε πρόσμιξη, δηλαδή 0,5 μg/ml): 500 μl από το Μικτό διάλυμα παρακαταθήκης προσμίξεων των 10 μg/ml και αραιώνεται σε τελικό όγκο 10 ml με κινητή φάση.

Πρότυπο διάλυμα C των Προσμίξεων Α, Β και C (αντιστοιχεί στο 1% της % περιεκτικότητας σε πρόσμιξη, δηλαδή 1 μg/ml): 1 ml από το Μικτό διάλυμα παρακαταθήκης προσμίξεων των 10 μg/ml και αραιώνεται σε τελικό όγκο 10 ml με κινητή φάση.

Πρότυπο διάλυμα D των Προσμίξεων Α, Β και C (αντιστοιχεί στο 2% της % περιεκτικότητας σε πρόσμιξη, δηλαδή 2 μg/ml): 2 ml από το Μικτό διάλυμα παρακαταθήκης προσμίξεων των 10 μg/ml και αραιώνεται σε τελικό όγκο 10 ml με κινητή φάση.

Πρότυπο διάλυμα Ε των Προσμίξεων Α, Β και C (αντιστοιχεί στο 4% της % περιεκτικότητας σε πρόσμιξη δηλαδή, 4 μg/ml): 4 ml από το Μικτό διάλυμα παρακαταθήκης προσμίξεων των 10 μg/ml και αραιώνεται σε τελικό όγκο 10 ml με κινητή φάση.

Σε καθένα από αυτά τα παραπάνω διαλύματα έγιναν τρεις μετρήσεις. Μετρήθηκε το εμβαδό των κορυφών των Προσμίξεων της Κλιοκινόλης και υπολογίστηκε ο μέσος όρος, η τυπική απόκλιση SD και η %RSD. Χρησιμοποιώντας τους μέσους όρους έγινε ανάλυση παλινδρόμησης με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων για να υπολογιστεί η εξίσωση της καμπύλης απόκρισης ($y=ax+b$) και ο συντελεστής συσχέτισης (r), καθώς επίσης και η τυπική απόκλιση υπολοίπων (Sy/x).

Για να υπολογιστεί ο παράγοντας σχετικής απόκρισης RRF χρησιμοποιείται ο

$$\text{ακόλουθος τύπος: } RRF = \frac{A_{imp}}{A_{St}} \times \frac{C_{St}}{C_{imp}}$$

Όπου:

A_{imp} : Η μέση τιμή εμβαδού κορυφής κάθε πρόσμιξης στο χρωματογράφημα του προτύπου διαλύματος C.

A_{St} : Η μέση τιμή εμβαδού κορυφής της Κλιοκινόλης στο διάλυμα αναφοράς 0,2%.

C_{St} : Η συγκέντρωση του διαλύματος αναφοράς 0,2%.

C_{imp} : Η συγκέντρωση της κάθε πρόσμιξης.

Όριο Ανίχνευσης

$$\text{Ισούται με } 3,3 \times \sigma / S$$

S = η κλίση της καμπύλης αναφοράς της μεθόδου

σ = η τυπική απόκλιση των πλέον αραιών προτύπων

Όριο

ποσοτικοποίησης

$$\text{Ισούται με } 10 \times \sigma / S$$

S = η κλίση της καμπύλης αναφοράς της μεθόδου

σ = η τυπική απόκλιση των πλέον αραιών προτύπων

Τα αποτελέσματα ελέγχου γραμμικότητας παρουσιάζονται στον πίνακα 12.1.

Επίπεδο 0,10%	Πρόσμιξη Α	Πρόσμιξη Β	Πρόσμιξη C
1	1869	6934	7038
2	1877	6899	7082
3	1812	6948	6876
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ	1853	6927	6999
SD	35	25	108
%RSD	1,91	0,36	1,55

Επίπεδο 0,50%	Πρόσμιξη Α	Πρόσμιξη Β	Πρόσμιξη C
1	7993	29723	32068
2	7813	30416	31732
3	7811	29918	32481
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ	7872	30019	32094
SD	105	357	375
%RSD	1,33	1,19	1,17
Επίπεδο 1,00%	Πρόσμιξη Α	Πρόσμιξη Β	Πρόσμιξη C
1	14223	64312	68318
2	14251	65150	67555
3	14346	64752	67928
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ	14273	64738	67934
SD	64	419	382
%RSD	0,45	0,65	0,56
Επίπεδο 2,00%	Πρόσμιξη Α	Πρόσμιξη Β	Πρόσμιξη C
1	25963	119249	127792
2	25878	118916	128683
3	26358	119108	127552
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ	26066	119091	128009
SD	256	167	596
%RSD	0,98	0,14	0,47
Επίπεδο 4,00%	Πρόσμιξη Α	Πρόσμιξη Β	Πρόσμιξη C
1	57734	256089	268812
2	56377	255779	271459
3	56671	255916	271597
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ	56927	255928	270623
SD	714	155	1570
%RSD	1,25	0,06	0,58

Πίνακας 12.1 Αποτελέσματα μελέτης γραμμικότητας.

%	C µg/ml	Πρόσμιξη A	Πρόσμιξη B	Πρόσμιξη C
0,1	0,1	1853	6927	6999
0,5	0,5	7872	30019	32094
1	1	14273	64738	67934
2	2	26066	119091	128009
4	4	56927	255928	270623

Πίνακας 12.2 Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων μελέτης γραμμικότητας (μέσοι όροι.)

C πρόσμιξης	Εμβαδό	RRF
Πρόσμιξη A	7872	0,15
Πρόσμιξη B	30019	0,56
Πρόσμιξη C	32094	0,59
Κλιοκινόλη 0,2 %	21580	

Πίνακας 12.3 Υπολογισμοί RRF προσμίξεων

Πρόσμιξη A	
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ	
Στατιστικά παλινδρόμησης	
Πολλαπλό R	0,998535644
R Τετράγωνο	0,997073433
Προσαρμοσμένο R Τετράγωνο	0,99609791
Τυπικό σφάλμα	1361,377138
Μέγεθος δείγματος	5

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ

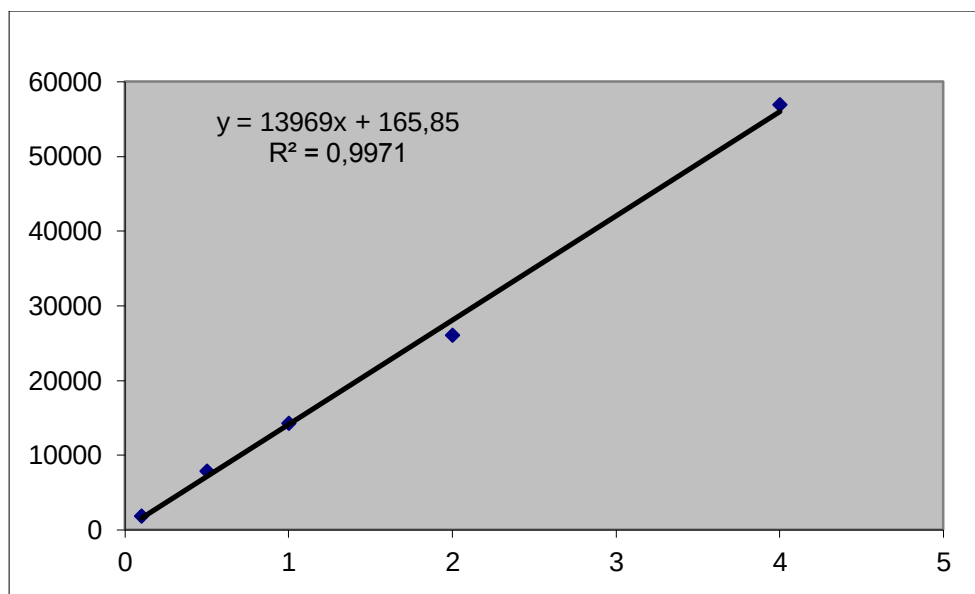
	βαθμοί ελευθερίας	SS	MS	F	Σημαντικότητα F			
Παλινδρόμηση	1	1894291408	1894291408	1022,092	6,72525E-05			
Υπόλοιπο	3	5560043,132	1853347,711					
Σύνολο	4	1899851451						
	Συντελεστές	Τυπικό σφάλμα	t	τιμή-P	Κατώτερο 95%	Υψηλότερο 95%	Κατώτερο 95,0%	Υψηλότερο 95,0%
Τεταγμένη επί την αρχή	165,8527675	900,9697235	0,184082509	0,865689	-2701,435	3033,140535	-2701,435	3033,140535
Μεταβλητή X 1	13968,78107	436,9317147	31,97016972	6,73E-05	12578,26935	15359,29279	12578,26935	15359,29279

Πίνακας 12.4 Αποτελέσματα ανάλυσης παλινδρόμησης για την Πρόσμιξη Α

Η γραμμή παλινδρόμησης διέρχεται από την αρχή των αξόνων διότι $P=0,865 > 0,05$

	μg/ml
LOD	0,0083
LOQ	0,025

Πίνακας 12.5 Όριο ποσοτικοποίησης-όριο ανίχνευσης Πρόσμιξης Α



Σχήμα 12.8 Καμπύλη αναφοράς Πρόσμιξης Α

Πρόσμιξη Β	
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ	
Στατιστικά παλινδρόμησης	
Πολλαπλό R	0,999186853
R Τετράγωνο	0,998374367
Προσαρμοσμένο R Τετράγωνο	0,99783249
Τυπικό σφάλμα	4619,007415
Μέγεθος δείγματος	5

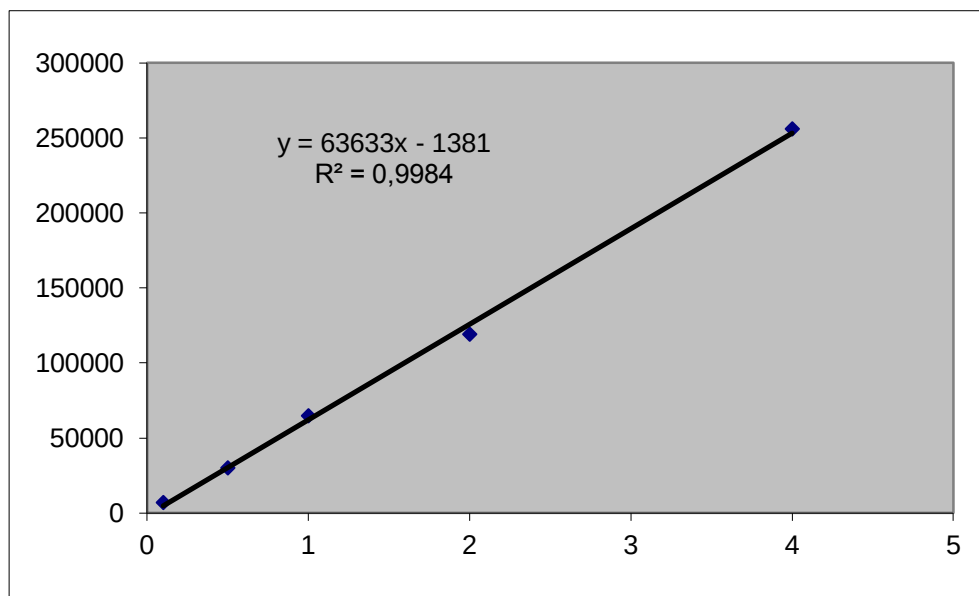
ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ								
	βαθμοί ελευθερίας	SS	MS	F	Σημαντικότητα F			
Παλινδρόμηση	1	39308784069	39308784069	1842,435	2,78314E-05			
Υπόλοιπο	3	64005688,49	21335229,5					
Σύνολο	4	39372789757						
	Συντελεστές	Τυπικό σφάλμα	t	τιμή-P	Κατώτερο 95%	Υψηλότερο 95%	Κατώτερο 95,0%	Υψηλότερο 95,0%
Τεταγμένη επί την αρχή	1381,008241	3056,894169	0,451768417	0,682099	-11109,40979	8347,393311	-11109,40979	8347,393311
Μεταβλητή X 1	63632,637	1482,462702	42,92360065	2,78E-05	58914,77905	68350,49495	58914,77905	68350,49495

Πίνακας 12.6 Αποτελέσματα ανάλυσης παλινδρόμησης για την Πρόσμιξη Β

Η γραμμή παλινδρόμησης διέρχεται από την αρχή των αξόνων διότι $P=0,68 > 0,05$

	μg/ml
LOD	0,013
LOQ	0,0039

Πίνακας 12.7 Όριο ποσοτικοποίησης-όριο ανίχνευσης Πρόσμιξης Β



Σχήμα 12.9 Καμπύλη αναφοράς Πρόσμιξης Β

Πρόσμιξη C	
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ	
Στατιστικά παλινδρόμησης	
Πολλαπλό R	0,999531085
R Τετράγωνο	0,999062391
Προσαρμοσμένο R Τετράγωνο	0,998749854
Τυπικό σφάλμα	3715,849016
Μέγεθος δείγματος	5

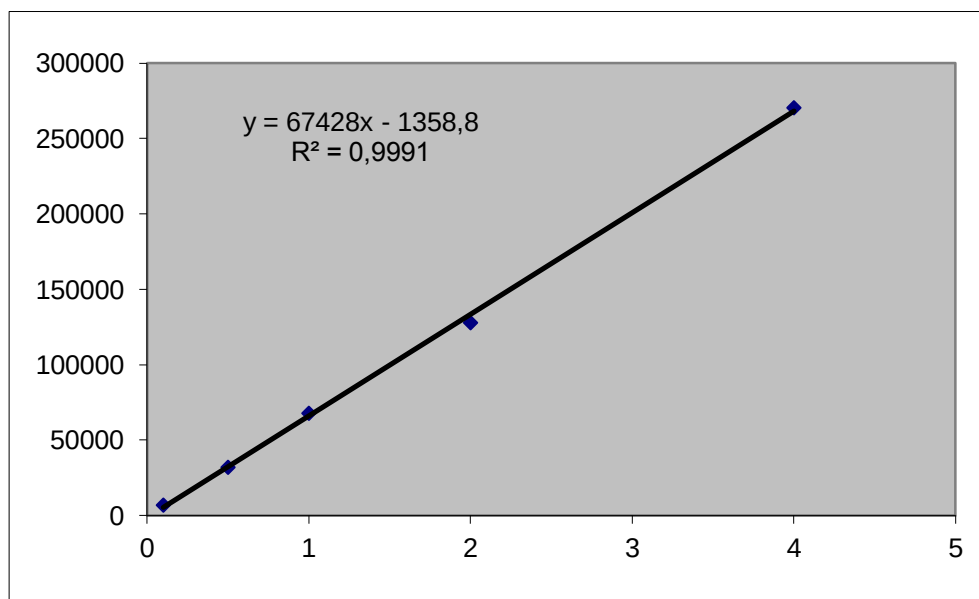
ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ								
	βαθμοί ελευθερίας	SS	MS	F	Σημαντικότητα F			
Παλινδρόμηση	1	44137541863	44137541863	3196,627	1,21883E-05			
Υπόλοιπο	3	41422601,74	13807533,91					
Σύνολο	4	44178964465						
	Συντελεστές	Τυπικό σφάλμα	t	τιμή-P	Κατώτερο 95%	Υψηλότερο 95%	Κατώτερο 95,0%	Υψηλότερο 95,0%
Τεταγμένη επί την αρχή	1358,769262	2459,177085	-0,55253006	0,619086	-9184,96829	6467,429765	-9184,96829	6467,429765
Μεταβλητή Χ 1	67427,83066	1192,595525	56,53872519	1,22E-05	63632,45943	71223,20188	63632,45943	71223,20188

Πίνακας 12.8 Αποτελέσματα ανάλυσης παλινδρόμησης για την Πρόσμιξη C

Η γραμμή παλινδρόμησης διέρχεται από την αρχή των αξόνων διότι P=0,62 > 0,05

	µg/ml
LOD	0,053
LOQ	0,016

Πίνακας 12.9 Όριο ποσοτικοποίησης-όριο ανίχνευσης Πρόσμιξης Β



Σχήμα 12.10 Καμπύλη αναφοράς Πρόσμιξης C

Συνεπώς το %RSD των προσμίξεων είναι:

Πρόσμιξη A: 0,997

Πρόσμιξη B: 0,998

Πρόσμιξη C: 0,999

Επίσης τα όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης των προσμίξεων είναι τα ακόλουθα:

Πρόσμιξη A: LOD 0,0083 και LOQ 0,025

Πρόσμιξη B: LOD 0,0013 και LOQ 0,0039

Πρόσμιξη C: LOD 0,0053 και LOQ 0,016

ΆΡΑ Η ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΙΝΑΙ ΓΡΑΜΜΙΚΗ

12.5.4 ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΜΕΘΟΔΟΥ (Accuracy)

Παρασκευάστηκαν τρία ανεξάρτητα εμβολιασμένα διαλύματα τα οποία περιείχαν τόσο τη δραστική ουσία και τις προσμίξεις της όσο και όλα τα έκδοχα. Τα διαλύματα αυτά έχουν συγκεντρώσεις που ανταποκρίνονται στο εύρος τιμών της γραμμικότητας των προσμίξεων. Για την παρασκευή των εμβολιασμένων διαλυμάτων παρασκευάστηκαν και τα ακόλουθα διαλύματα:

Διάλυμα Λευκού δείγματος (placebo) 400%(του ορίου προσμίξεων)

Ζυγίστηκε σε μία ογκομετρική φιάλη των 25 ml 1 g του λευκού δείγματος που παρασκευάστηκε νωρίτερα (εδάφιο 11.4.2). Προστέθηκαν 5 ml THF και θερμάνθηκαν σε νερό 47-48 °C για περίπου 30 sec, και ανακατεύτηκαν στο vortex για άλλα 30 sec ώσπου να γίνει το διάλυμα διαυγές. Αφέθηκε το διάλυμα να κρυώσει και προστέθηκε κινητή φάση μέχρι τη χαραγή. Διηθήθηκε το διάλυμα και αραιώθηκε 1 μέρος του διηθημένου διαλύματος με 2 μέρη κινητής φάσης.

Διάλυμα Φλουοκινολόνης 800% (της συγκέντρωσης εργασίας)

Ζυγίζονται 20 mg πρότυπης ουσίας Φλουοκινολόνης και διαλύονται σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml με THF.

Πρότυπο διάλυμα Κλιοκινόλης 800% (της συγκέντρωσης εργασίας)

Ζυγίζονται 20 mg πρότυπης ουσίας Κλιοκινόλης και το διαλύονται σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml με THF.

Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν τα εμβολιασμένα διαλύματα όπως ακολούθως:

Εμβολιασμένο διάλυμα Α (αντιστοιχεί στο 0,1% της περιεκτικότητας σε κάθε πρόσμιξη): Σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml προστέθηκαν 2,5 ml από το διάλυμα λευκού δείγματος 400%, 1,25 ml από το πρότυπο διάλυμα Φλουοκινολόνης 800%, 1,25 ml από το πρότυπο διάλυμα Κλιοκινόλης 800% και 100 μl από το πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης των προσμίξεων 10%. Συμπληρώθηκε ο όγκος με κινητή φάση.

Εμβολιασμένο διάλυμα Β (αντιστοιχεί στο 1% της περιεκτικότητας σε κάθε πρόσμιξη): Όπως το εμβολιασμένο διάλυμα Α αλλά με προσθήκη 1 ml από το πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης των προσμίξεων 10%.

Εμβολιασμένο διάλυμα C (αντιστοιχεί στο 4% της περιεκτικότητας σε κάθε πρόσμιξη): Όπως το εμβολιασμένο διάλυμα Α αλλά με προσθήκη 4 ml από το πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης των προσμίξεων 10%.

Επίσης παρασκευάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα Κλιοκινόλης 0,2% όπως προβλέπει το πρωτόκολλο της μεθόδου και όπως περιγράφεται στο εδάφιο 12.4.

Αναλύονται τα εμβολιασμένα δείγματα και η % ανάκτηση κάθε πρόσμειξης σε καθένα από τα δείγματα και ο συντελεστής σχετικής τυπικής απόκλισης των ανακτήσεων (%RSD).

$$\% \text{ ανάκτηση} = \frac{\text{πρόσμειξη} - \% \text{ περιεκτικότητα}}{\% \text{ επίπεδο} - \text{εμβολιασμού}} \times 100$$

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στους παρακάτω πίνακες:

Πρόσμειξη Α				
Εμβολιασμένο διάλυμα Α	Επίπεδο 0,1%	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση	Εμβαδό προτύπου_0,2%
1	1818	0,11	103,47	21298
2	1725	0,11	99,67	20979
3	1733	0,11	102,24	20545
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			101,79	
SD			1,94	
%RSD			1,91	
Εμβολιασμένο διάλυμα Β	Επίπεδο 2%	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση	Εμβαδό προτύπου_0,2%
1	28677	1,88	95,49	21298
2	28488	1,88	96,31	20979
3	28584	1,88	98,67	20545
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			96,82	
SD			1,65	
%RSD			1,71	
Εμβολιασμένο διάλυμα C	Επίπεδο 4%	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση	Εμβαδό προτύπου_0,2%
1	59775	3,8	98,48	21298
2	58125	3,8	97,22	20979
3	57475	3,8	98,16	20545
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			97,95	
SD			0,66	
%RSD			0,67	

Πίνακας 12.10 Αποτελέσματα ελέγχου ακρίβειας Πρόσμειξης Α

Πρόσμιξη Β				
Εμβολιασμένο διάλυμα Α	Επίπεδο 0,1%	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση	Εμβαδό προτύπου_0,2%
1	7726	0,13	99,66	21298
2	7434	0,13	97,35	20979
3	7266	0,13	97,16	20545
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			98,06	
SD			1,39	
%RSD			1,42	
Εμβολιασμένο διάλυμα Β	Επίπεδο 1%	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση	Εμβαδό προτύπου_0,2%
1	63798	1,10	97,26	21298
2	64298	1,10	99,51	20979
3	63162	1,10	99,82	20545
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			98,86	
SD			1,40	
%RSD			1,41	
Εμβολιασμένο διάλυμα C	Επίπεδο 4%	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση	Εμβαδό προτύπου_0,2%
1	240983	1,00	101,03	21298
2	241436	1,00	102,75	20979
3	241221	1,00	104,83	20545
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			102,87	
SD			1,91	
%RSD			1,85	

Πίνακας 12.11 Αποτελέσματα ελέγχου ακρίβειας Πρόσμιξης Β

Πρόσμιξη C				
Εμβολιασμένο διάλυμα Α	Επίπεδο 0,1%	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση	Εμβαδό προτύπου_0,2%
1	6221	0,1	99,01	21298
2	6171	0,1	99,71	20979
3	5834	0,1	96,26	20545
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			98,33	
SD			1,83	
%RSD			1,86	

Εμβολιασμένο διάλυμα Β	Επίπεδο 1%	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση	Εμβαδό προτύπου_0,2%
1	64002	1	101,87	21298
2	62450	1	100,91	20979
3	63030	1	104,00	20545
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			102,26	
SD			1,58	
%RSD			1,55	
Εμβολιασμένο διάλυμα C	Επίπεδο 4%	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση	Εμβαδό προτύπου_0,2%
1	260185	4,1	101,00	21298
2	260362	4,1	102,61	20979
3	253946	4,1	102,19	20545
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			101,94	
SD			0,83	
%RSD			0,82	

Πίνακας 12.13 Αποτελέσματα ελέγχου ακρίβειας Πρόσμιξης C

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η % ανάκτηση των προσμίξεων κυμαίνεται όπως παρακάτω:

Πρόσμιξη A: 95,5-103,5%

Πρόσμιξη B: 97,2-104,8% και

Πρόσμιξη C: 96,3-104, 0%

Επίσης η %RSD προσδιορίζεται σε:

Πρόσμιξη A: $\leq 1,91$ %

Πρόσμιξη B: $\leq 1,85$ %

Πρόσμιξη C: $\leq 1,86$ %

Επομένως η μέθοδος χαρακτηρίζεται από ακρίβεια.

12.5.5 ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ

Για την αξιολόγηση της πιστότητας της μεθόδου ελέγχθηκε η επαναληψιμότητα του συστήματος, η επαναληψιμότητα της μεθόδου και η ενδιάμεση πιστότητα (ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα).

Επαναληψιμότητα συστήματος

Ελέγχθηκε μετρώντας το εμβαδό των κορυφών τριών μετρήσεων προτύπων διαλυμάτων. Εκφράζεται με την % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) του εμβαδού της κορυφής της Κλιοκινόλης.

Επαναληψιμότητα μεθόδου

Προετοιμάζονται έξι δείγματα του εμβολιασμένου διαλύματος Β (του οποίου η παρασκευή περιγράφεται στο εδάφιο 12.5.4 της ακρίβειας). Επιπλέον ετοιμάζεται ένα πρότυπο διάλυμα αναφοράς Κλιοκινόλης 0,2% σύμφωνα με τη μέθοδο και γίνονται ξεχωριστές μετρήσεις σε κάθε ένα από τα έξι παραπάνω δείγματα. Υπολογίζονται η % ανάκτηση, καθώς επίσης και η σχετική τυπική απόκλιση των ανακτήσεων.

$$\% \text{ ανάκτηση} = \frac{\text{πρόσμιξη \% περιεκτικότητα}}{\text{\% επί πεδο - εμβολιασμού}} \times 100$$

Ενδιάμεση πιστότητα(ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα)

Ο σχεδιασμός του ελέγχου της ενδιάμεσης πιστότητας είναι ο ίδιος που περιγράφεται στο εδάφιο της ενδιάμεσης πιστότητας της μεθόδου προσδιορισμού της Κλιοκινόλης (εδάφιο 11.4.5).

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στους παρακάτω πίνακες:

Πρόσμιξη Α				
Αναλυτής_1	Επίπεδο 2% (εμβαδό)	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση	Εμβαδό προτύπου 0,2 %
1	27463	1,78	97,15	21175
2	27022	1,78	95,59	21175
3	27468	1,78	96,05	21422
4	27451	1,78	100,47	20467
5	27631	1,78	95,52	21669
6	27487	1,78	96,11	21422
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			96,81	
SD			1,88	
%RSD			1,94	
Αναλυτής_2	Επίπεδο 2% (εμβαδό)	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση	Εμβαδό προτύπου 0,2 %
1	27222	1,73	96,47	21748
2	27770	1,73	95,76	22351
3	27629	1,73	96,73	22014
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			96,32	
SD			0,50	
%RSD			0,52	
Όργανο_2	Επίπεδο 2% (εμβαδό)	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση	Εμβαδό προτύπου 0,2 %
1	27681	1,68	100,38	21886
2	28989	1,68	99,52	23118
3	25733	1,68	101,76	20069
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			100,55	
SD			1,13	
%RSD			1,13	

Ημέρα_2η	Επίπεδο 2% (εμβαδό)	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση	Εμβαδό προτύπου 0,2 %
1	26692	1,68	102,37	20694
2	27566	1,68	103,44	21150
3	29536	1,68	100,46	23333
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			102,09	21580
SD			1,51	
%RSD			1,48	

Πίνακας 12.14 Αποτελέσματα ελέγχου ενδιάμεσης πιστότητας Πρόσμιξης Α

ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΟΒΑ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ						
Ομάδες	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση		
97,150109	5	483,7342855	96,7468571	4,395265394		
96,47023552	2	192,4867022	96,24335109	0,472635981		
100,3794554	2	201,2844662	100,6422331	2,516693196		
102,3684497	2	203,9050499	101,952525	4,431292626		
ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	58,17375251	3	19,39125084	5,429184659	0,030328428	4,346831402
Μέσα στις ομάδες	25,00168338	7	3,571669054			
Σύνολο	83,17543589	10				
Sr	1,88988599	1,92				
SR	2,822416072	2,86				

Πρόσμιξη B			
Αναλυτής_1	Επίπεδο 2% (εμβαδό)	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση
1	63439	1,05	101,90
2	63079	1,05	101,32
3	63127	1,05	100,23
4	62268	1,05	103,48
5	62236	1,05	97,69
6	62771	1,05	99,67
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			100,72
SD			2,00
%RSD			1,98
Αναλυτής_2	Επίπεδο 2% (εμβαδό)	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση
1	63746	1,04	100,66
2	66124	1,04	101,59
3	63183	1,04	98,56
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			100,27
SD			1,55
%RSD			1,55
Όργανο_2	Επίπεδο 2% (εμβαδό)	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση
1	63388	1,03	100,43
2	66361	1,03	99,53
3	59063	1,03	102,05
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			100,67
SD			1,27
%RSD			1,27
Ημέρα 2η	Επίπεδο 2% (εμβαδό)	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση
1	63407	1,05	104,22
2	63784	1,05	102,58
3	69467	1,05	101,27
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			102,69
SD			1,48
%RSD			1,44

Πίνακας 12.15 Αποτελέσματα ελέγχου ενδιάμεσης πιστότητας Πρόσμιξης B

ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΟΝΑ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ						
Ομάδες	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση		
101,9026737	5	502,3966686	100,4793337	4,555638596		
100,6565969	2	200,1567295	100,0783648	4,598170157		
100,4258227	2	201,5787255	100,7893628	3,156535324		
104,218647	2	203,8432529	101,9216265	0,861541884		
ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	4,010148778	3	1,336716259	0,34863754	0,791636341	4,346831402
Μέσα στις ομάδες	26,83880175	7	3,834114536			
Σύνολο	30,84895053	10				
Sr	1,958089512	1,94				
SR	1,772113778	1,75				

Πρόσμιξη C			
Αναλυτής_1	Επίπεδο 2% (εμβαδό)	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση
1	64544	1,04	99,35
2	65255	1,04	100,45
3	63977	1,04	97,34
4	61336	1,04	97,68
5	64751	1,04	97,40
6	62504	1,04	95,10
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			97,89
SD			1,85
%RSD			1,89
Αναλυτής_2	Επίπεδο 2% (εμβαδό)	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση
1	64811	1,00	101,02
2	64342	1,00	97,58
3	65318	1,00	100,58
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			99,73
SD			1,87
%RSD			1,88
Όργανο 2	Επίπεδο 2% (εμβαδό)	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση
1	64156	1,00	99,37
2	68785	1,00	100,86
3	60444	1,00	102,10
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			100,77
SD			1,37
%RSD			1,35
Ημέρα 2η	Επίπεδο 2% (εμβαδό)	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση
1	61098	0,99	101,09
2	62746	0,99	101,58
3	67522	0,99	99,09
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			100,59
SD			1,32
%RSD			1,31

Πίνακας 12.16 Αποτελέσματα ελέγχου ενδιάμεσης πιστότητας Πρόσμιξης C

ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΟΝΑ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ						
Ομάδες	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση		
99,35211168	5	487,9715602	97,59431204	3,613064282		
101,0200042	2	198,1633805	99,08169027	4,490237517		
99,36853061	2	202,9558102	101,4779051	0,762177752		
101,0939903	2	200,669587	100,3347935	3,113036417		
ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	25,68395896	3	8,561319655	2,626435374	0,132131757	4,346831402
Μέσα στις ομάδες	22,81770881	7	3,259672687			
Σύνολο	48,50166778	10				
Sr	1,805456365	1,82				
SR	2,175399775	2,19				

Μελετώντας τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι η % ανάκτηση κυμαίνεται ως εξής:

Πρόσμιξη Α από 95,5 % έως 103,4%

Πρόσμιξη Β από 97,7% έως 104,2% και

Πρόσμιξη C από 95,1% έως 102,1%

Επιπλέον βρέθηκε ότι το $\%RSD_r$ είναι:

Πρόσμιξη Α 1,92 %

Πρόσμιξη Β 1,94 %

Πρόσμιξη C 1,82 %

ενώ το $\%RSD_R$ είναι:

Πρόσμιξη Α 2,9

Πρόσμιξη Β 1,8

Πρόσμιξη C 2,2

Επομένως η μέθοδος χαρακτηρίζεται από ενδιάμεση πιστότητα (ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα).

12.5.6 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ (Robustness)

Ο σχεδιασμός του ελέγχου ανθεκτικότητας μεθόδου είναι ο ίδιος με αυτόν της μεθόδου προσδιορισμού της Κλιοκινόλης (εδαφιο 11.4.6).

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Πρόσμιξη Α				
Y1	Εμβολιασμένο διάλυμα 2%	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση	Πρότυπο Διάλυμα 0,2%
1	27463	1,78	97,15	21175
2	27022	1,78	95,59	21175
3	27468	1,78	96,05	21422
4	27451	1,78	100,47	20467
5	27631	1,78	95,52	21669
6	27487	1,78	96,11	21422
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			96,81	
SD			1,88	
%RSD			1,94	
Y2	Εμβολιασμένο διάλυμα 2%	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση	Πρότυπο Διάλυμα 0,2%
1	26946	1,70	101,26	20871
2	26927	1,70	99,76	21169
3	27901	1,70	99,59	21974
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			100,20	
SD			0,92	
%RSD			0,92	
Y3	Εμβολιασμένο διάλυμα 2%	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση	Πρότυπο Διάλυμα 0,2%
1	27966	1,7	100,09	21914
2	27393	1,7	98,09	21902
3	27449	1,7	99,08	21728
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			99,09	
SD			1,00	
%RSD			1,01	

Y4	Εμβολιασμένο διάλυμα 2%	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση	Πρότυπο Διάλυμα 0,2%
1	26118	1,7	99,82	20522
2	26160	1,7	98,76	20776
3	26264	1,7	98,70	20871
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			99,09	
SD			0,63	
%RSD			0,64	

Πίνακας 12.17 Αποτελέσματα μελέτης ανθεκτικότητας Πρόσμιξης Α

Πρόσμιξη Β			
Y1	Εμβολιασμένο διάλυμα 1%	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση
1	63439	1,05	101,90
2	63079	1,05	101,32
3	63127	1,05	100,23
4	62268	1,05	103,48
5	62236	1,05	97,69
6	62771	1,05	99,67
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			100,72
SD			2,00
%RSD			1,98
Y2	Εμβολιασμένο διάλυμα 1%	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση
1	62187	1,03	103,31
2	61221	1,03	100,28
3	64274	1,03	101,42
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			101,67
SD			1,53
%RSD			1,51

Y3	Εμβολιασμένο διάλυμα 1%	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση
1	63725	1,00	103,86
2	62806	1,00	102,41
3	61475	1,00	101,05
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			102,44
SD			1,40
%RSD			1,37
Y4	Εμβολιασμένο διάλυμα 1%	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση
1	58807	1,05	97,47
2	58562	1,05	95,88
3	60276	1,05	98,23
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			97,19
SD			1,20
%RSD			1,24

Πίνακας 12.18 Αποτελέσματα μελέτης ανθεκτικότητας Πρόσμιξης Β

Πρόσμιξη C			
Y1	Εμβολιασμένο διάλυμα 1%	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση
1	64544	1,04	99,35
2	65255	1,04	100,45
3	63977	1,04	97,34
4	61336	1,04	97,68
5	64751	1,04	97,40
6	62504	1,04	95,10
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			97,89
SD			1,85

%RSD			1,89
Y2	Εμβολιασμένο διάλυμα 1%	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση
1	65982	1,03	104,05
2	64448	1,03	100,20
3	67950	1,03	101,77
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			102,00
SD			1,94
%RSD			1,90
Y3	Εμβολιασμένο διάλυμα 1%	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση
1	65549	1,00	101,40
2	65530	1,00	101,42
3	66968	1,00	104,48
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			102,43
SD			1,77
%RSD			1,73
Y4	Εμβολιασμένο διάλυμα 1%	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση
1	62282	1,00	102,88
2	61393	1,00	100,17
3	61792	1,00	100,36
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			101,14
SD			1,51
%RSD			1,49

Πίνακας 12.19 Αποτελέσματα μελέτης ανθεκτικότητας Πρόσμιξης C

Σύμφωνα με τα παραπάνω η % ανάκτηση κυμαίνεται ως εξής:

Πρόσμιξη A από 95,6 % έως 101,3 %

Πρόσμιξη B από 95,9 % έως 103,9 % και

Πρόσμιξη C από 95,1 % έως 104,5 %

ενώ η % RSD υπολογίζεται:

Πρόσμιξη A: $\leq 1,9 \%$

Πρόσμιξη B: $\leq 2,0 \%$ και

Πρόσμιξη C: $\leq 1,9 \%$.

Συνεπώς μικρές αλλαγές στις εξεταζόμενες παραμέτρους του χρωματογραφικού συστήματος δεν επηρέασαν σημαντικά την % ανάκτηση των προσμίξεων της Κλιοκινόλης. Επομένως η μέθοδος χαρακτηρίζεται από ανθεκτικότητα.

12.5.7 ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Το εμβολιασμένο διάλυμα B (εδάφιο 12.5.4) αναλύθηκε αμέσως μετά την παρασκευή του και επαναλήφθηκε ο έλεγχος 24 ώρες μετά από αποθήκευση στους 25 °C.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στους πίνακες που ακολουθούν:

Πρόσμιξη A				
Σταθερότητα	Εμβολιασμένο διάλυμα 100%	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση	Πρότυπο διάλυμα 0,2%
1	29971	1,85	98,84	21855
2	27740	1,85	101,79	19641
3	29087	1,85	100,82	20794
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			100,48	
SD			1,51	
% RSD			1,50	

Πίνακας 12.20 Αποτελέσματα μελέτης σταθερότητας Πρόσμιξης A

Πρόσμιξη Β				
Σταθερότητα	Εμβολιασμένο διάλυμα 100%	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση	Πρότυπο διάλυμα 0,2%
1	64986	1,03	103,10	21855
2	58817	1,03	103,84	19641
3	62429	1,03	104,10	20794
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			103,68	
SD			0,52	
% RSD			0,50	

Πίνακας 12.21 Αποτελέσματα μελέτης σταθερότητας Πρόσμιξης Β

Πρόσμιξη C				
Σταθερότητα	Εμβολιασμένο διάλυμα 100%	Επίπεδο εμβολιασμού	Ανάκτηση	Πρότυπο διάλυμα 0,2%
1	63795	1	98,95	21855
2	57770	1	99,70	19641
3	60127	1	98,02	20794
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ			98,89	
SD			0,84	
% RSD			0,85	

Πίνακας 12.22 Αποτελέσματα μελέτης σταθερότητας Πρόσμιξης C

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι ικανοποιούνται τα κριτήρια σταθερότητας της μεθόδου. Επομένως η μέθοδος προσδιορισμού προσμίξεων χαρακτηρίζεται από σταθερότητα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία εκπονείται η ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων προσδιορισμού της Κλιοκινόλης και των προσμίξεών της σε αντιμυκητιασική αλοιφή με μέθοδο HPLC αντίστροφης φάσης.

Κατά την ανάπτυξη των μεθόδων βρέθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες και χρωματογραφικές παράμετροι οι οποίες παρείχαν καλή χρωματογραφική εικόνα.

Για την επικύρωση των μεθόδων προσδιορισμού, τόσο της ουσίας όσο και των προσμίξεων εξετάστηκαν η ειδικότητα, η καταλληλότητα του συστήματος, η γραμμικότητα, η ακρίβεια, η ανθεκτικότητα και η σταθερότητα και τα αποτελέσματα βρέθηκαν να συμμορφώνονται στις απαιτήσεις επικύρωσης.

Οι δυσκολίες που αντιμετωπίστηκαν κατά την ανάπτυξη των μεθόδων αφορούσαν τη συνύπαρξη δεύτερης δραστικής στο σκεύασμα (Φλουοκινολόνης), η ύπαρξη της οποίας δυσχεραίνει τον προσδιορισμό των προσμίξεων της Κλιοκινόλης. Έγινε προσπάθεια ανάπτυξης μεθόδου ταυτόχρονου προσδιορισμού και των δύο δραστικών του σκεύασματος με HPLC αντίστροφης φάσης. Δοκιμάστηκε διαδικασία βαθμιδωτής έκλουσης, τόσο των δύο δραστικών, όσο και των προσμίξεών τους με κινητή φάση ακετονιτρίλιο-νερό σε διαφορετικές αναλογίες. Ωστόσο, στάθηκε αδύνατο να προσδιοριστούν όλες οι ουσίες με μία μόνο μέθοδο καθώς η Κλιοκινόλη κατακρατείται πάνω στη στήλη λόγω ιοντικών ζευγών που σχηματίζει προκαλώντας αργή απομάκρυνση. Έτσι, δεν είναι εφικτό να παρατηρηθούν οι κορυφές των υπολοίπων ουσιών καθώς καλύπτονται από την αργή απομάκρυνση της Κλιοκινόλης. Επιπλέον, ένα άλλο σημαντικό εμπόδιο για την ανάπτυξη μιας ενιαίας μεθόδου είναι η μεγάλη διαφορά συγκέντρωσης που παρουσιάζουν οι δύο δραστικές στο σκεύασμα που εξετάζεται.

Συνεπώς για τον προσδιορισμό της Φλουοκινολόνης απαιτείται ανάπτυξη διαφορετικής μεθόδου από αυτή που αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε στην παρούσα εργασία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Επίσημη Εφημερίδα αριθ. L 221 της 17/08/2002 σ. 0008 – 0036 (2002/657/EK: Απόφαση της Επιτροπής, της 12ης Αυγούστου 2002.).
2. Οδηγία 2003/63/EK της Επιτροπής, της 25ης Ιουνίου 2003, για την τροποποίηση της οδηγίας 2001/83/EK του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου περί κοινοτικού κώδικος για τα φάρμακα που προορίζονται για ανθρώπινη χρήση.
3. ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures:Text and Methodology.
4. Μυκητίαση δέρματος ,Dermamedicine cosmetic.
5. Skoog, F. Holler, T.A. Nieman, Απόδοση στα ελληνικά Καραγιάννης Μ.Ι., Ευσταθίου Κ.Η., Χανιωτάκης Ν., Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, Εκδόσεις Κωσταράκη, Αθήνα, 2002, 301-323, 785-841.
6. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch, Practical HPLC method development, second edition, John Wiley and Sons, New York, 1997.
7. Diode array detectors , det_uvda.html.htm.
8. Arasaki and Nakanishi ,Selective neurotoxicity of Clioquinol on the function of the posterior column nuclei , Neuroscience letters 107(1989)85-88
9. Xinliang Mao and Aaron D.Schimmer ,The toxicology of Clioquinol ,Toxicology letters 182(2008) 1-65.
10. Synthesis and pharmacological exploitation of Clioquinol-derived copper-binding apoptosis inducers triggering reactive oxygen species generation and MAPK pathway activation ,Bioorganic and Medical Chemistry, 17(2009)7239-7247.
11. Ludwig Huber ,Validation of Analytical Methods ,Agilent Technologies.
12. Clioquinol ,Eu.Ph.5.0 ,01/2005:2111.
13. Quidelines for the validation of analytical methods for active constituent,agricultural and veterinary chemical products ,Australian pesticides and veterinary medicines authority.
14. Validation of Analytical methods for pharmaceutical analysis ,Oona McPolin,MTS.

15. Μ. Κουπάρης, Μέθοδοι ποσοτικοποίησης, σημειώσεις μεταπτυχιακών μαθημάτων, Αθήνα 1999.
16. Μ. Κουπάρης, Επικύρωση αναλυτικών μεθόδων, σημειώσεις μεταπτυχιακών μαθημάτων, Αθήνα 1999.
17. Μ. Κουπάρης, Έλεγχος ποιότητας φαρμάκων, σημειώσεις μεταπτυχιακών μαθημάτων, Αθήνα 1999.
18. Bondiolotti GP, Pollera C, Pirola R, Bareggi SR, Determination of 5-chloro-7-iodo-8-quinolinol (clioquinol) in plasma and tissues of hamsters by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection, Department of Pharmacology Chemotherapy and Medical Toxicology, School of Medicine, University of Milan, Italy.
19. Gimenez Izquierdo, Guiteras, Prat, Spectrofluorimetric determination of clioquinol in pharmaceutical preparations, Fresenius J Anal Chem 341:638-640.
20. Wojtowicz, Reverse-phase liquid chromatographic determination of clioquinol in cream and ointment preparations: collaborative study, J Assoc Of Anal Chem, 1989 Jul-Aug 72(4):562-3.
21. Determination of Clioquinol and its Related Substances by HPLC, STMOPEN.net, 17/04/2013.
22. Regland B, Lehmann W, Abedini I, Blennow K, Jonsson M, Karlsson I, Sjögren M, Wallin A, Xilinas M, Gottfries CG, Treatment of Alzheimer's disease with clioquinol, Dement Geriatr Cogn Disord. 2001 Nov-Dec;12(6):408-14.
23. Di Chen^{1,2}, Qiuzhi Cindy Cui^{1,2}, Huanjie Yang^{1,2}, Raul A. Barrea⁴, Fazlul H. Sarkar^{1,2}, Shijie Sheng^{1,2}, Bing Yan⁵, G. Prem Veer Reddy^{1,2,3}, and Q. Ping Dou^{1,2}, Clioquinol, a Therapeutic Agent for Alzheimer's Disease, Has Proteasome-Inhibitory, Androgen Receptor-Suppressing, Apoptosis-Inducing, and Antitumor Activities in Human Prostate Cancer Cells and Xenografts, CAN-06-3546 Cancer Res February 15, 2007 67; 1636

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
ΜΕΡΟΣ Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ	3
ΚΕΦ.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	4
1.1 Βασικές απαιτήσεις του ελέγχου ποιότητας	4
1.1.1 Ορθή παρασκευαστική πρακτική όσον αφορά τα φάρμακα και τα υπό δοκιμή φάρμακα που προορίζονται για ανθρώπινη χρήση	4
1.1.2 Σύστημα διασφάλισης ποιότητας : προσωπικό, χώροι και εξοπλισμός	4
1.1.3 Παραγωγή	5
1.1.4 Τεκμηρίωση	6
1.1.5 Έλεγχος ποιότητας και επισήμανση	6
ΚΕΦ.2 ΧΗΜΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ	8
2.1 Ταυτοποίηση	8
2.2 Έλεγχος περιεκτικότητας πρώτων υλών	9
2.3 Έλεγχος καθαρότητας	10
2.4 Έλεγχος τελικού προϊόντος	13
ΚΕΦ.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ-ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ	14
3.1 Είδη χρωματογραφίας	14
3.1.1 Χρωματογραφία στήλης.	14
3.1.2 Χρωματογραφία χάρτη	15
3.1.3 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)	15
3.1.4 Αεριοχρωματογραφία (GC)	15
3.1.5 Υγροχρωματογραφία	16

3.2 Μηχανισμοί και είδη HPLC	17
3.2.1 Χρωματογραφία Προσρόφησης	17
3.2.2 Χρωματογραφία Κατανομής	17
3.2.3 Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής	18
3.2.4 Χρωματογραφία Συγγένειας	18
3.2.5 Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους ή Διάχυσης Πηκτής	18
3.3 Οργανολογία	18
3.3.1 Ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην HPLC	19
3.4 Κινητή-Στατική φάση	21

ΚΕΦ.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΗΝ HPLC **23**

4.1 Μέθοδος πολλαπλών εξωτερικών προτύπων / καμπύλης αναφοράς (multiple external standards / calibration curve).	23
4.2 Μέθοδος παρεμβολής(bracketing)	23
4.3 Μέθοδος ενός εξωτερικού προτύπου(single external standard)	24
4.4 Μέθοδος σταθερής προσθήκης (standard addition method)	24
4.5 Μέθοδος εσωτερικού προτύπου (internal standard)	24
4.6 Μέθοδος κανονικοποίησης (normalization)	25

ΚΕΦ.5 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ **26**

5.1 Ειδικότητα (Specificity) -Εκλεκτικότητα (Selectivity)	26
5.2 Γραμμικότητα (Linearity)	27
5.3 Εύρος (Range)	28
5.4 Ακρίβεια (Accuracy)	29
5.5 Πιστότητα (Precision)- Ενδιάμεση πιστότητα (Intermediate precision)	
Επαναληψιμότητα (Repeatability)	30
5.6 Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD)	31
5.7 Όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Quantitation, LOQ)	31
5.8 Ανθεκτικότητα (Robustness)-Αντοχή (Ruggedness)	31

ΚΕΦ.6 ΜΥΚΗΤΕΣ-ΜΥΚΗΤΙΑΣΗ **33**

6.1 Μύκητες	33
6.2 Μυκητιάσεις	33
6.3 Δερματοφυτίες	34
6.4 Θεραπεία μυκητιάσεων	34

ΚΕΦ. 7 ΚΛΙΟΚΙΝΟΛΗ **35**

7.1 Εισαγωγή	35
7.2 Παρενέργειες και προφυλάξεις	35
7.3 Υπερευαισθησία	36
7.4 Τοπική εφαρμογή	36
7.5 Φαρμακοκινητική και μεταβολισμός	38
7.6 Μηχανισμός δράσης	39
7.7 Τοξικολογικές μελέτες σε ζώα	39
7.8 Τοξικολογικές μελέτες σε ανθρώπους	40
7.9 Προσμίξεις Κλιοκινόλης	40
7.10 Αντιμυκητιασική αλοιφή Κλιοκινόλης	41
7.11 Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού Κλιοκινόλης	42

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ **43**

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ **44**

ΚΕΦ. 8 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ – ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ – ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ **44**

8.1 Σύστημα HPLC	44
8.2 Αναλυτικός ζυγός	45
8.3 Λουτρό υπερήχων	45
8.4 Πεχάμετρο	45
8.5 Συσκευή Vortex	45
8.6 Σύστημα διήθησης –απαέρωσης	46
8.7 Διαλύτες-Αντιδραστήρια	46
8.8 Πρότυπες Ουσίες	46
8.9 Φαρμακευτικό σκεύασμα Κλιοκινόλης	46

8.10 Έκδοχα	46
-------------	----

ΚΕΦ.9 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΛΙΟΚΙΝΟΛΗΣ (ASSAY)	48
---	-----------

9.1 Επιλογή μήκους κύματος	48
9.2 Παρασκευή προτύπου διαλύματος Κλιοκινόλης	48
9.3 Επιλογή κινητής φάσης και στήλης	48
9.4 Επιλογή λοιπών παραμέτρων	49
9.5 Εξισορρόπηση χρωματογραφικού συστήματος	49
9.6 Ανάπτυξη μεθόδου κατεργασίας σκευάσματος	50

ΚΕΦ. 10 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ (IMPURITIES)	52
---	-----------

10.1 Επιλογή μήκους κύματος	52
10.2 Επιλογή κινητής φάσης και στήλης	52
10.3 Επιλογή λοιπών παραμέτρων	53
10.4 Εξισορρόπηση χρωματογραφικού συστήματος	53
10.5 Ανάπτυξη μεθόδου κατεργασίας σκευάσματος	53

ΚΕΦ. 11 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΚΛΙΟΚΙΝΟΛΗΣ ΣΕ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟ ΣΚΕΥΑΣΜΑ	54
--	-----------

11.1 Χρωματογραφικές συνθήκες	54
11.2 Κριτήρια αποδοχής	54
11.3 Υπολογισμοί	55
11.4 Αποτελέσματα	56
11.4.1 Καταλληλότητα συστήματος	56
11.4.2 Ειδικότητα (Specificity)	57
11.4.3 Γραμμικότητα και εύρος (Linearity – Range)	60
11.4.4 Ακρίβεια μεθόδου (Accuracy)	64
11.4.5 Πιστότητα (precision) της μεθόδου	66
11.4.6 Ανθεκτικότητα (Robustness)	69

11.4.7 Σταθερότητα(Stability)	72
-------------------------------	----

ΚΕΦ.12 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ ΤΗΣ ΚΛΙΟΚΙΝΟΛΗΣ ΣΕ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟ ΣΚΕΥΑΣΜΑ 73

12.1 Χρωματογραφικές συνθήκες	73
12.2 Κριτήρια αποδοχής	73
12.3 Υπολογισμοί	74
12.4 Διάλυμα αναφοράς 0,2%	75
12.5 Αποτελέσματα	75
12.5.1 Καταλληλότητα συστήματος	75
12.5.2 Ειδικότητα	76
12.5.3 Γραμμικότητα– όριο ανίχνευσης- όριο ποσοτικοποίησης	79
12.5.4 Ακρίβεια μεθόδου (Accuracy)	89
12.5.5 Πιστότητα της μεθόδου	94
12.5.6 Ανθεκτικότητα (Robustness)	102
12.5.7 Σταθερότητα	107

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 109

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 110

